



УКРАЇНА

(19) UA (11) 97479 (13) C2
(51) МПК
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ G-БІЛОКЗВ'ЯЗАНОГО РЕЦЕПТОРА (GPCR) ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗАСОБІВ, ЩО ПОСИЛЮЮТЬ СЕКРЕЦІЮ ГЛЮКОЗОЗАЛЕЖНОГО ІНСУЛІНОТРОПНОГО ПЕПТИДУ (GIP)

1

(21) а200813041
(22) 10.04.2007
(24) 27.02.2012
(86) PCT/US2007/008902, 10.04.2007
(31) 60/791,550
(32) 11.04.2006
(33) US
(46) 27.02.2012, Бюл.№ 4, 2012 р.
(72) ЧУ ЧЖИ-ЛЯН, US, ЛЕОНАРД ДЖЕЙМС Н., US
(73) АРЕНА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК., US
(56) WO 2005007647 A1, 27.01.2005.
WO 0187929 A, 22.11.2001.
US 6410508 B1, 25.06.2002.
OVERTON HILARY A ET AL: "Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents" CELL METABOLISM, vol. 3, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 167-175 URL, XP002449851 ISSN: 1550-4131.
MAYET S ET AL: "GPR119 activation increases glucose-dependent insulin secretion in insulin-producing cells and isolated rat islets" DIABETOLOGIA, vol. 48, no. Suppl. 1, 2005, page A166, XP002449852 & 41ST ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES; ATHENS, GREECE; SEPTEMBER 10-15, 2005 ISSN: 0012-186X.
(57) 1. Застосування G-білокзв'язаного рецептора (GPCR) для ідентифікації засобів, що посилюють секрецію глюкозозалежного інсулінотропного пептиду (GIP), у способі in vitro, який включає в себе наступні стадії:
(a) приведення сполуки, що тестується, в контакт з клітиною-хазяїном або з мембраною клітини-хазяїна, що містить вказаний GPCR, де GPCR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:
(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;
(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;
(iii) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зразка людської ДНК з використанням специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;
(iv) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в

2

умовах високої жорсткості з послідовністю, ком-
плементарною SEQ ID NO: 1;
(v) амінокислотної послідовності GPCR, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO: 2;
(vi) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії GPCR, описаної як SEQ ID NO: 2; і
(vii) біологічно активного фрагмента (i) або (ii); і
(b) визначення здатності сполуки, що тестується, стимулювати функціонування рецептора, де здатність сполуки, що тестується, стимулювати функціонування рецептора вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.
2. Застосування за п. 1, що додатково включає:
(c) приведення сполуки, що має здатність стимулювати функціонування рецептора, визначене на стадії (b), в контакт in vitro з ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного; і
(d) визначення того, чи стимулює сполука секрецію GIP ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного, де здатність сполуки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного, додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.
3. Застосування за п. 1, що додатково включає:
(c) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетного, шляхом вимірювання рівня GIP в зразку, отриманому від хребетного, якому заздалегідь вводили сполуку, стимулюючу функціонування рецептора на стадії (b), де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетного додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.
4. Застосування за п. 1, що додатково включає:
(c) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетного, шляхом вимірювання рівня кісткової маси в зразку, отриманому від хребетного, якому заздалегідь вводили сполуку, стимулюючу функціонування рецептора на стадії (b), де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетного додатково вка-

(13) C2
(11) 97479
(19) UA

жує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

5. Застосування за п. 3 або 4, де хребетним є людина.

6. Застосування за п. 3 або 4, де хребетне являє собою відмінного від людини ссавця.

7. Застосування за будь-яким з пп. 1-6, де рецептор є рекомбінантним.

8. Застосування за будь-яким з пп. 1-7, де клітина-хазяїн містить вектор експресії, а вказаний вектор експресії містить полінуклеотид, що кодує GPCR.

9. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, де вказане визначення проводять шляхом вимірювання рівня вторинного месенджера.

10. Застосування за п. 9, де вторинний месенджер вибраний з групи, що складається з циклічного АМФ (цАМФ), циклічного ГМФ (цГМФ), інозитол-1,4,5-трифосфату (IP₃), діацилгліцерину (DAG), активності кінази MAP, активності кінази-1 кінази MAPK/ERK (MEKK1) і Ca²⁺.

11. Застосування за п. 10, де рівень цАМФ підвищується.

12. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, де вказане визначення проводять за допомогою аналізу меланокорин шляхом вимірювання зв'язування ГТФγS з мембраною, що містить вказаний GPCR, або за допомогою аналізу репортера.

13. Застосування за будь-яким з пп. 1-12, де клітина-хазяїн являє собою клітину-хазяїна ссавця.

14. Застосування за будь-яким з пп. 1-12, де клітина-хазяїн являє собою дріжджову клітину-хазяїна.

15. Застосування за будь-яким з пп. 1-12, де клітина-хазяїн являє собою меланокор.

16. Застосування за будь-яким з пп. 1-15, де сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль.

17. Застосування за будь-яким з пп. 1-16, де рецептор містить амінокислотну послідовність G-білокзв'язаного рецептора, щонайменше приблизно на 80 % ідентичну SEQ ID NO: 2.

18. Застосування за будь-яким з пп. 1-17, де рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

19. Спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, що включає в себе наступні стадії:

(a) приведення агоніста GPR119 *in vitro* в контакт з ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GPR, хребетного; і

(b) визначення того, чи стимулює агоніст GPR119 секрецію GIP ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GPR, хребетного, де здатність агоніста GPR119 стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GPR, хребетного вказує на те, що агоніст GPR119 являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

20. Спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, що включає в себе стадію:

(a) визначення того, чи збільшує агоніст GPR119 рівень GIP у хребетного, шляхом вимірювання рівня GPR в зразку, отриманому від хребетного, якому заздалегідь вводили агоніст GPR119,

де здатність агоніста GPR119 збільшувати рівень GIP у хребетного вказує на те, що агоніст GPR119 являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

21. Спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, що включає в себе стадію:

(a) визначення рівня кісткової маси у біологічному зразку, що отриманий від хребетного, якому попередньо вводили агоніст GPR119, де здатність агоніста GPR119 збільшувати рівень кісткової маси у хребетного вказує на те, що агоніст GPR119 являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

22. Спосіб за п. 20 або 21, де хребетним є людина.

23. Спосіб за п. 20 або 21, де хребетне являє собою відмінного від людини ссавця.

24. Спосіб за будь-яким з пп. 19-23, де агоніст GPR119 являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль.

25. Спосіб за будь-яким з пп. 19-23, де агоніст GPR119 являє собою агоніст GPR119 людини.

26. Спосіб за будь-яким з пп. 19-25, де агоніст GPR119 являє собою селективний агоніст GPR119.

27. Спосіб за будь-яким з пп. 19-26, де агоніст GPR119 має вибірковість відносно GPR119 більшу, ніж до рецептора кортикотропін-рилізінг фактора-1 (CRF-1).

28. Спосіб за будь-яким з пп. 19-27, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 10 мкМ.

29. Спосіб за будь-яким з пп. 19-27, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 1 мкМ.

30. Спосіб за будь-яким з пп. 19-27, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 100 нМ.

31. Спосіб за будь-яким з пп. 19-27, де агоніст GPR119 є перорально активним і має EC₅₀ менше ніж 100 нМ.

32. Спосіб за будь-яким з пп. 19-31, де агоніст GPR119 є перорально активним.

33. Спосіб за п. 19, що включає перед стадією (a) наступні додаткові стадії *in vitro*:

(x) приведення сполуки, що тестується, в контакт з клітиною-хазяїном або з мембраною клітини-хазяїна, що містить вказаний GPCR, де GPCR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зразка людської ДНК з використанням специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(iv) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(v) амінокислотної послідовності GPCR, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO: 2;

(vi) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії GPCR, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(vii) біологічно активного фрагмента (i) або (ii); і

(y) визначення здатності сполуки, що тестується, стимулювати функціонування рецептора,

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати функціонування рецептора вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, і де агоніст GPR119 стадії (а) являє собою сполуку, що тестується, ідентифіковану як стимулююча функціонування рецептора на стадії (у).

34. Спосіб за п. 20 або 21, що включає перед стадією (а) наступні додаткові стадії *in vitro*:

(х) приведення сполуки, що тестується, в контакт з клітиною-хазяїном або з мембраною клітини-хазяїна, що містить GPCR, де GPCR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зразка людської ДНК з використанням специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(iv) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(v) амінокислотної послідовності GPCR, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO: 2;

(vi) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії GPCR, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(vii) біологічно активного фрагмента (i) або (ii); і

(у) визначення здатності сполуки, що тестується, стимулювати функціонування рецептора, де здатність сполуки, що тестується, стимулювати функціонування рецептора вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, і де агоніст GPR119 стадії (а) являє собою сполуку, що тестується, ідентифіковану як стимулююча функціонування рецептора на стадії (у).

35. Спосіб за п. 34, де хребетним є людина.

36. Спосіб за п. 34, де хребетне являє собою відмінного від людини ссавця.

37. Спосіб за будь-яким з пп. 33-36, де рецептор є рекомбінантним.

38. Спосіб за будь-яким з пп. 33-37, де клітина-хазяїн містить вектор експресії, а вказаний вектор експресії містить полінуклеотид, що кодує GPCR.

39. Спосіб за будь-яким з пп. 33-38, де вказане визначення проводять шляхом вимірювання рівня вторинного месенджера.

40. Спосіб за п. 39, де вторинний месенджер вибраний з групи, що складається з циклічного АМФ (цАМФ), циклічного ГМФ (цГМФ), інозитол-1,4,5-трифосфату (IP₃), діацилгліцерину (DAG), активності кінази MAP, активності кінази-1 кінази MAPK/ERK (MEKK1) і Ca²⁺.

41. Спосіб за п. 40, де рівень цАМФ підвищується.

42. Спосіб за будь-яким з пп. 33-38, де вказане визначення проводять за допомогою аналізу меланофорів шляхом вимірювання зв'язування ГТФγS з мембраною, що містить вказаний GPCR, або за допомогою аналізу репортера.

43. Спосіб за будь-яким з пп. 33-42, де клітина-хазяїн являє собою клітину-хазяїна ссавця.

44. Спосіб за будь-яким з пп. 33-42, де клітина-хазяїн являє собою дріжджову клітину-хазяїна.

45. Спосіб за будь-яким з пп. 33-42, де клітина-хазяїн являє собою меланофор.

46. Спосіб за будь-яким з пп. 33-45, де сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль.

47. Спосіб за будь-яким з пп. 33-46, де рецептор містить амінокислотну послідовність G-білокзв'язаного рецептора, щонайменше приблизно на 80 % ідентичну SEQ ID NO: 2.

48. Спосіб за будь-яким з пп. 33-47, де рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

49. Застосування GPCR для ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, у способі *in vitro*, який включає в себе наступні стадії:

(а) приведення GPCR в контакт з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора в присутності або за відсутності сполуки, що тестується, де GPCR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зразка людської ДНК з використанням специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(iv) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(v) амінокислотної послідовності GPCR, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO: 2;

(vi) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії GPCR, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(vii) біологічно активного фрагмента (i) або (ii); і

(b) детекція комплексу вказаного відомого ліганду з вказаним рецептором; і

(c) визначення того, чи утворюється в присутності сполуки, що тестується, менше вказаного комплексу, ніж за відсутності сполуки, що тестується, де згадане визначення вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

50. Застосування за п. 49, де вказаний спосіб додатково включає:

(d) приведення сполуки, у присутності якої на стадії (c) утворюється менша кількість вказаного комплексу, *in vitro* в контакт з ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного; і

(e) визначення того, чи стимулює сполука секрецію GIP ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного, де здатність сполуки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

51. Застосування за п. 49, де вказаний спосіб додатково включає:

(d) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетного, шляхом вимірювання рівня GPR у зразку, отриманому від хребетного, якому заздалегідь вводили сполуку, в присутності якої на стадії (c) утворюється менша кількість вказаного комплексу,

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

52. Застосування за п. 49, де вказаний спосіб додатково включає:

(d) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетного, шляхом вимірювання рівня кісткової маси у зразку, отриманому від хребетного, якому заздалегідь вводили сполуку, в присутності якої на стадії (c) утворюється менша кількість вказаного комплексу,

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

53. Застосування за п. 51 або 52, де хребетним є людина.

54. Застосування за п. 51 або 52, де хребетне являє собою відмінного від людини ссавця.

55. Застосування за будь-яким з пп. 49-54, де рецептор є рекомбінантним.

56. Застосування за будь-яким з пп. 49-55, де клітина-хазяїн містить вектор експресії, а вказаний вектор експресії містить полінуклеотид, що кодує GPCR.

57. Застосування за будь-яким з пп. 49-55, де відомим лігандом є агоніст GPR119.

58. Застосування за п. 57, де агоніст GPR119 являє собою агоніст людського GPR119.

59. Застосування за п. 57 або 58, де агоніст GPR119 являє собою селективний агоніст GPR119.

60. Застосування за будь-яким з пп. 57-59, де агоніст GPR119 має вибірковість відносно GPR119 щонайменше приблизно в 100 разів більше, ніж до CRF-1.

61. Застосування за будь-яким з пп. 57-60, де агоніст GPR119 має EC_{50} менше ніж 10 мкМ.

62. Застосування за будь-яким з пп. 57-60, де агоніст GPR119 має EC_{50} менше ніж 1 мкМ.

63. Застосування за будь-яким з пп. 57-60, де агоніст GPR119 має EC_{50} менше ніж 100 нМ.

64. Застосування за будь-яким з пп. 57-63, де агоніст GPR119 являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль.

65. Застосування за будь-яким з пп. 49-64, де сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль.

66. Застосування за будь-яким з пп. 49-65, де рецептор містить амінокислотну послідовність G-білокзв'язаного рецептора, щонайменше приблизно на 80 % ідентичну SEQ ID NO: 2.

67. Застосування за будь-яким з пп. 49-66, де рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

68. Спосіб за п. 19, що включає перед стадією (a) наступні додаткові стадії *in vitro*:

(x) приведення GPCR в контакт з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора в присутності або за відсутності сполуки, що тестується, де GPCR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зразка людської ДНК з використанням специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(iv) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(v) амінокислотної послідовності GPCR, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO: 2;

(vi) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії GPCR, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(vii) біологічно активного фрагмента (i) або (ii); і

(y) детекція комплексу вказаного відомого ліганду з вказаним рецептором; і

(z) визначення того, чи утвориться в присутності сполуки, що тестується, менше вказаного комплексу, ніж за відсутності сполуки, що тестується, де вказане визначення вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, і де агоніст GPR119 стадії (a) являє собою сполуку, що тестується, ідентифіковану на стадії (z) як сполука, в присутності якої утворюється менше вказаного комплексу.

69. Спосіб за п. 20 або 21, що включає перед стадією (a) наступні додаткові стадії *in vitro*:

(x) приведення GPCR в контакт з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора в присутності або за відсутності сполуки, що тестується, де GPCR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зразка людської ДНК з використанням специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(iv) амінокислотної послідовності GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(v) амінокислотної послідовності GPCR, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO: 2;

(vi) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії GPCR, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(vii) біологічно активного фрагмента (i) або (ii); і

(y) детекція комплексу вказаного відомого ліганду з вказаним рецептором; і

(z) визначення того, чи утвориться в присутності сполуки, що тестується, менше вказаного комплексу, ніж за відсутності сполуки, що тестується,

де вказане визначення вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, і де агоніст GPR119 стадії (а) являє собою сполуку, що тестується, ідентифіковану на стадії (z) як сполука, в присутності якої утворюється менше вказаного комплексу.

70. Спосіб за п. 69, де хребетним є людина.

71. Спосіб за п. 69, де хребетне являє собою відмінного від людини ссавця.

72. Спосіб за будь-яким з пп. 68-71, де рецептор є рекомбінантним.

73. Спосіб за будь-яким з пп. 68-72, де клітина-хазяїн містить вектор експресії, а вказаний вектор експресії містить полінуклеотид, що кодує GPCR.

74. Спосіб за будь-яким з пп. 68-73, де відомим лігандом є агоніст GPR119.

75. Спосіб за п. 70, де агоніст GPR119 являє собою агоніст людського GPR119.

76. Спосіб за п. 74 або 75, де вказаний агоніст GPR119 являє собою селективний агоніст GPR119.

77. Спосіб за будь-яким з пп. 74-76, де агоніст GPR119 має вибірковість відносно GPR119 більшу, ніж до CRF-I.

78. Спосіб за будь-яким з пп. 74-77, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 10 мкМ.

79. Спосіб за будь-яким з пп. 74-77, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 1 мкМ.

80. Спосіб за будь-яким з пп. 74-77, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 100 нМ.

81. Спосіб за будь-яким з пп. 74-80, де агоніст GPR119 являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль.

82. Спосіб за будь-яким з пп. 68-81, де сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль.

83. Спосіб за будь-яким з пп. 68-82, де рецептор містить амінокислотну послідовність G-білокзв'язаного рецептора, щонайменше приблизно на 80 % ідентичну SEQ ID NO: 2.

84. Спосіб за будь-яким з пп. 68-83, де рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

85. Застосування клітини-хазяїна або мембрани клітини-хазяїна, що містить GPCR, для ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, де клітина-хазяїн або її мембрана призначені для взаємодії з сполукою, що тестується, а GPCR містить:

(i) амінокислоти 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислоти 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислотну послідовність GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(iv) амінокислотну послідовність GPCR, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO: 2;

(v) амінокислотну послідовність конститутивно активної версії GPCR, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(vi) фрагмент будь-якого з (i) - (v), що має біологічну активність GPR119; і

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати функціонування GPCR вказує на те, що сполука,

що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP.

86. Застосування за п. 85, де рецептор є рекомбінантним.

87. Застосування за п. 85 або 86, де клітина-хазяїн містить вектор експресії, а вказаний вектор експресії містить полінуклеотид, що кодує GPCR.

88. Застосування за будь-яким з пп. 85-87, де клітина-хазяїн являє собою клітину-хазяїна ссавця.

89. Застосування за будь-яким з пп. 85-87, де клітина-хазяїн являє собою дріжджову клітину-хазяїна.

90. Застосування за будь-яким з пп. 85-87, де клітина-хазяїн являє собою меланофор.

91. Застосування за будь-яким з пп. 85-90, де сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 10000 грамів на моль.

92. Застосування за п. 91, де молекулярна маса є меншою ніж приблизно 5000 грамів на моль.

93. Застосування за будь-яким з пп. 85-92, де амінокислотна послідовність GPCR щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO: 2 по всій своїй довжині.

94. Застосування за будь-яким з пп. 85-93, де GPCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

95. Спосіб отримання фармацевтичної композиції, яка містить агоніст GPR119, що має ефект посилення секреції GIP, причому спосіб включає:

(а) приведення агоніста GPR119 *in vitro* в контакт з ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного; і

(b) визначення того, чи стимулює агоніст GPR119 секрецію GIP ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного, де здатність агоніста GPR119 стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною або клітиною, здатною секретувати GIP, хребетного вказує на те, що агоніст являє собою засіб, що посилює секрецію GIP; і

(c) змішування агоніста GPR119, що має ефект посилення секреції GIP, з фармацевтично прийнятним носієм.

96. Спосіб отримання фармацевтичної композиції, яка містить агоніст GPR119, що має ефект посилення секреції GIP, який включає:

(а) введення хребетному агоніста GPR119; і

(b) визначення рівня GIP у крові у зразку, отриманому від хребетного, де здатність агоніста GPR119 збільшувати рівень GIP у крові у зразку вказує на те, що агоніст являє собою засіб, що посилює секрецію GIP; і

(c) змішування агоніста GPR119, що має ефект посилення секреції GIP, з фармацевтично прийнятним носієм.

97. Спосіб отримання фармацевтичної композиції, яка містить агоніст GPR119, що має ефект посилення секреції GIP, що включає:

(b) визначення того, чи збільшує агоніст GPR119 рівень кісткової маси у хребетного, де здатність агоніста GPR119 збільшувати рівень кісткової маси у хребетного вказує на те, що агоніст являє собою засіб, що посилює секрецію GIP; і

(с) змішування агоніста GPR119, що має ефект посилення секреції GIP, з фармацевтично прийнятним носієм.

98. Спосіб за п. 96 або 97, де хребетним є людина.

99. Спосіб за п. 96 або 97, де хребетне являє собою відмінного від людини ссавця.

100. Спосіб за будь-яким з пп. 95-99, де агоніст GPR119 являє собою агоніст людського GPR119.

101. Спосіб за будь-яким з пп. 95-100, де вказаний агоніст GPR119 являє собою селективний агоніст GPR119.

102. Спосіб за п. 101, де агоніст GPR119 має вибіковість відносно GPR119 більшу, ніж до CRF-1.

103. Спосіб за будь-яким з пп. 95-102, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 10 мкМ.

104. Спосіб за будь-яким з пп. 95-102, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 1 мкМ.

105. Спосіб за будь-яким з пп. 95-102, де агоніст GPR119 має EC₅₀ менше ніж 100 нМ.

106. Спосіб за будь-яким з пп. 95-102, де агоніст GPR119 є перорально активним і має EC₅₀ менше ніж 100 нМ.

107. Спосіб за будь-яким з пп. 95-106, де агоніст GPR119 є перорально активним.

108. Спосіб за будь-яким з пп. 95-107, де агоніст GPR119 являє собою низькомолекулярну сполуку, яка має молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль.

Галузь винаходу

Даний винахід стосується способів застосування рецептора GPR119 для ідентифікації сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. Агоністи рецептора GPR119 можна використати як терапевтичні засоби для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, а також для збільшення кісткової маси суб'єкта. Агоністи рецептора GPR119 стимулюють кісткоутворення у суб'єкта.

Рівень техніки

Нижченаведене обговорення наводиться для полегшення розуміння винаходу, однак не має на увазі, або не передбачається, що воно стосується попереднього рівня техніки винаходу.

А. Остеопороз

Остеопороз являє собою захворювання, яке приводить до втрати дієздатності і характеризується зменшенням кісткової маси і погіршенням мікроархітектури скелета, що приводить до зменшення міцності кістки і розвитку схильності пацієнта до підвищеного ризику переломів кісток. Остеопороз вражає більше за 75 мільйонів людей в Європі, Японії і Сполучених Штатах і є причиною більше 2,3 мільйонів переломів тільки в Європі і Сполучених Штатах. У Сполучених штатах остеопороз вражає, щонайменше, 25% всіх постклімактеричних білих жінок, причому даний процент збільшується до 70% у жінок старше 80 років. Одна з трьох жінок старше 50 років має остеопоротичний перелом, що є серйозною соціальною і фінансовою проблемою для суспільства. Дане захворювання зустрічається не тільки у жінок, воно також може вражати немолодих чоловіків. Очікується, що до 2050 року розповсюдженість переломів кісток тазостегнового суглоба у всьому світі збільшиться у чоловіків на 310% і у жінок на 240%. Загальний ризик зареєстрованих в клініці переломів кісток тазостегнового суглоба, передпліччя і хребта протягом всього життя становить приблизно 40% і є еквівалентним ризику серцево-судинних захворювань. Таким чином, остеопоротичні переломи викликають значну смертність і захворюва-

ність і супроводжуються великими економічними витратами. Внаслідок старіння населення число остеопоротичних переломів і витрати на їх лікування в наступні 50 років подвоються, якщо не будуть розроблені ефективні профілактичні стратегії. (Див., наприклад, Atik et al., Clin Orthop Relat Res (2006) 443:19-24; Raisz, J Clin Invest (2005) 115:3318-3325; і World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis).

В. Глюкозо-залежний інсулінотропний поліпептид (GIP)

Глюкозо-залежний інсулінотропний поліпептид (GIP, також відомий як шлунковий інгібіторний поліпептид) являє собою пептидний гормон інкретин з 42 амінокислот, який вивільняється з ендокринних К-клітин дванадцятипалої кишки після проковтування їжі. Кількість GIP, що вивільняється, сильно залежить від кількості споживаної глюкози. Показано, що GIP стимулює глюкозо-залежну секрецію інсуліну бета-клітинами підшлункової залози. Дія GIP опосередковується специфічним рецептором, зв'язаним з G-білком, а саме, GIPR.

Оскільки GIP містить аланін в положенні 2, він є чудовим субстратом для дипептидилпептидази-4 (DPP-IV), ферменту, регулюючого деградацію GIP. Повнорозмірний GIP(1-42) швидко, протягом декількох хвилин після секреції з К-клітин травного тракту, перетворюється в GIP(3-42), що не володіє біологічною активністю. Показано, що інгібування DPP-IV збільшує біологічну активність GIP. (див., наприклад, Drucker, Cell Metab (2006) 3:153-165; McIntosh et al., Regul Pept (2005) 128:159-165; Deacon, Regul Pept (2005) 128:117-124; і Ahren et al., Endocrinology (2005) 146:2055-2059). Визначення повнорозмірного біологічно активного GIP, наприклад, в крові, можна провести за допомогою специфічних N-кінцевих аналізів (див., наприклад, Deacon et al., J Clin Endocrinol Metab (2000) 85:3575-3581).

Недавно було показано, що GIP стимулює остеогенез. Також показано, що GIP активує рецептори остеобластів, приводячи до збільшення синтезу колагену типу I і підвищення активності луж-

ної фосфатази, пов'язаних з остеогенезом. Виявлено, що GIP інгібує активність і диференціацію остеокластів *in vitro*. Показано, що введення GIP запобігає зменшенню кісткової маси, викликаного оварієктомією. У мишей з нокаутом гена рецептора GIP (GIPR) спостерігається зменшення розміру кісток, зниження маси кісток, зміна мікроархітектури і біохімічних властивостей кісток, а також зміна параметрів ремоделювання кісток, особливо кістоутворення (див., наприклад, Zhong et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2007) 292:E543-E548; Bollag et al., *Endocrinology* (2000) 141:1228-1235; Bollag et al., *Mol Cell Endocrinol* (2001) 177:35-41; Xie et al., *Bone* (2005) 37:759-769; i Tsukiyama et al., *Mol Endocrinol* (2006) 20:1644-1651).

Придатність GIP для підтримки або збільшення щільності кістки або кістоутворення була підтверджена Бюро по патентах і товарних знаках США шляхом видачі патенту США № 6410508 на спосіб лікування зниженої мінералізації кістки шляхом введення пептиду GIP. Однак існуючі в цей час агоністи пептиду GIP володіють недостатньою біодоступністю при пероральному застосуванні, що негативно впливає на ставлення пацієнта. Ефективний альтернативний підхід полягає в розробці перорально активної композиції для збільшення рівня активності ендогенного GIP.

C. GPR119

GPR119 являє собою G-білок-зв'язаний рецептор (GPR119; наприклад, людський GPR119, GenBank®, номер доступу AAP72125, і його алелі; наприклад, мишачий GPR119, GenBank®, номер доступу AY288423, і його алелі). Активація GPR119, наприклад, під дією агоністу, приводить до збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ, що узгоджується з даними, що свідчать про поєднання GPR119 з G-білками. У патентній літературі GPR119 згадується як RUP3 (наприклад, в WO 00/31258); GPR119 також називають глюкозо-залежним інсуліноутропним рецептором (GD1R).

D. Рецептори, зв'язані з G-білком

Хоча у людей виявлено декілька класів рецепторів, найбільш численним і терапевтично значущим є клас рецепторів, зв'язаних з G-білком (GPCR). У людському геномі присутньо приблизно 30000-40000 генів, і приблизно 2% з них кодують GPCR.

GPCR складають важливу галузь розробки фармацевтичних продуктів. Лікарські засоби, що володіють активністю у відношенні GPCR, надають сприятливу терапевтичну дію на широкий спектр захворювань людини, що включають в себе біль, когнітивну дисфункцію, гіпертонію, виразкові хвороби, риніти і астму. Приблизно з 500 лікарських засобів, що поставляються в клініку більше 30% є модуляторами функції GPCR. Дані лікарські засоби здатні впливати приблизно на 30 повністю охарактеризованих GPCR (див., наприклад, Wise et al., *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2004) 44:43-66).

GPCR мають загальний структурний мотив, що містить сім послідовностей з 22-24 гідрофобних амінокислот, які утворюють сім альфа-спіралей, кожна з яких пронизує мембрану (кожна трансмембранна ділянка має номер, наприклад, трансмембранна ділянка-1 (TM-1), трансмембранна ділян-

ка-2 (TM-2) і інш.). Трансмембранні спіралі з'єднані амінокислотними ланцюгами, що знаходяться між трансмембранною ділянкою-2 і трансмембранною ділянкою-3, трансмембранною ділянкою-4 і трансмембранною ділянкою-5 і трансмембранною ділянкою-6 і трансмембранною ділянкою-7 на зовнішній, або "позаклітинній" стороні клітинної мембрани (їх називають "позаклітинні" ділянки 1, 2 і 3 (EC-1, EC-2 і EC-3), відповідно). Трансмембранні спіралі також з'єднані амінокислотними ланцюгами, що знаходяться між трансмембранною ділянкою-1 і трансмембранною ділянкою-2, трансмембранною ділянкою-3 і трансмембранною ділянкою-4 і трансмембранною ділянкою-5 і трансмембранною ділянкою-6 на внутрішній, або "внутрішньоклітинній" стороні клітинної мембрани (їх називають "внутрішньоклітинні" ділянки 1, 2 і 3 (IC-1, IC-2 і IC-3), відповідно). "Карбокси-" ("C-") кінець рецептора знаходиться у внутрішньоклітинному просторі, а "аміно-" ("N-") кінець рецептора знаходиться у позаклітинному просторі.

Як правило, при зв'язуванні ліганда з рецептором (дану подію часто називають "активацією" рецептора) відбувається зміна конформації рецептора, яка забезпечує з'єднання внутрішньоклітинної ділянки з внутрішньоклітинним "G-білком." Виявлено, що GPCR є "проміскупітетними" по відношенню до G-білків, тобто що GPCR можуть взаємодіяти більш ніж з одним G-білком. Див., Kenakin, *Life Sciences* (1988) 43:1095-1101. В цей час ідентифіковані G-білки Gq, Gs, Gi, Gz і Go, хоч існують і інші різновиди даного класу. Активоване ланцюгом з'єднання GPCR з G-білком ініціює каскад процесів сигнального шляху (який називається "передачею сигналу"). У звичайних умовах передача сигналу зрештою приводить до активації або інгібування клітинних функцій. Без зв'язку з якою-небудь теорією, автори вважають, що з G-білком взаємодіють петля IC-3 і карбоксильний кінець рецептора.

Існують також проміскупітетні G-білки, які зв'язують декілька класів GPCR з шляхом фосфоліпази C, такі як G15 або G16 (Offermanns & Simon, *J Biol Chem* (1995) 270:15175-80), або химерні G-білки, здатні зв'язувати велике число різних GPCR з одним шляхом, наприклад, з шляхом фосфоліпази C (Milligan & Rees, *Trends in Pharmaceutical Sciences* (1999) 20:118-24).

У фізіологічних умовах присутні в клітинній мембрані GPCR знаходяться в стані рівноваги між двома різними конформаціями: відповідними "неактивному" стану і "активному" стану. Рецептор в неактивному стані не здатний зв'язуватися з внутрішньоклітинним шляхом передачі сигналу і ініціювати передачу сигналу, що приводить до біологічної відповіді. Зміна конформації рецептора на конформацію, відповідну активному стану, забезпечує з'єднання з шляхом передачі сигналу (через G-білок) і подальшу біологічну відповідь.

Активний стан рецептора можна стабілізувати з допомогою ліганда або сполучи, такої як лікарський засіб. Зроблені останнім часом відкриття, що включають в себе, без обмеження, модифікації амінокислотної послідовності рецептора, надають способи придання рецептору конформації актив-

ного стану і стабілізації її без застосування лігандів і лікарських засобів. Дані способи дозволяють ефективно стабілізувати рецептор в активному стані шляхом імітації ефекту зв'язування ліганда з рецептором. Стабілізацію за допомогою таких ліганд-незалежних способів називають "конститутивною активацією рецептора".

Суть винаходу

Даний винахід стосується несподіваного відкриття, зробленого авторами даної заявки, яке полягає в тому, що введення агоніста GPR119 суб'єкту, наприклад, пероральне введення, може впливати на рецептор GPR119, збільшуючи рівень GIP у суб'єкта. Даний винахід описує способи застосування GPR119 для ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, а також сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. Агоніст GPR119 можна використати для стимуляції (наприклад, збільшення) кісткоутворення у суб'єкта. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою людину.

Нуклеотидна послідовність, що кодує людський поліпептид GPR119, описана в SEQ ID NO: 1. Амінокислотна послідовність людського поліпептиду GPR119, що кодується вищезгаданою нуклеотидною послідовністю, описана в SEQ ID NO: 2.

У першому аспекті даний винахід описує способи ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) приведення сполуки, що тестується, в контакт з клітиною-хазяїном, або з мембраною клітини-хазяїна, що містить G-білок-зв'язаний рецептор, де G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, за умови, що рецептор не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(iv) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, поліпептидом, що кодується, якого можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зразка людської ДНК з використанням специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(v) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується поліпептидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(vi) варіанту SEQ ID NO: 2;

(vii) амінокислотної послідовності (vi), вибраної з групи, що складається з:

(a') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(b') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(viii) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(ix) біологічно активного фрагмента послідовності за будь-яким з пунктів (i)-(viii); і

(b) визначення здатності сполуки, що тестується, стимулювати функціонування G-білок-зв'язаного рецептора;

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою алель SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог ссавців SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є рекомбінантним.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP.

У деяких втіленнях спосіб включає в себе ідентифікацію агоніста рецептора.

У деяких втіленнях спосіб включає в себе ідентифікацію часткового агоніста рецептора.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (a) і (b), описані в першому аспекті, а також наступні стадії:

(c) необов'язково синтез сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначеної на стадії (b);

(d) приведення сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначеної на стадії (b), в контакт *in vitro* з ентероендокринною клітиною хребетного, або з клітиною, здатною секретувати GIP; і

(e) визначення того, чи дійсно сполука стимулює секрецію GIP ентероендокринною клітиною

хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP;

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP, вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях ентероендокринна клітина хребетного являє собою ентероендокринну клітину ссавця. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина являє собою К-клітину. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини дванадцятипалої кишки або худі кишки (див., наприклад, Sondhi et al., *Pharmacogenomics J* (2006) 6:131-140). У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується лінії ентероендокринних клітин. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою рекомбінантну клітину, отриману з метою придання здатності секретувати GIP.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (a) і (b), описані в першому аспекті, а також наступні стадії:

(c) необов'язково синтез сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b);

(d) введення сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b), хребетному; і

(e) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетного;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію загального GIP в крові або плазмі. У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію біоактивного GIP в крові або плазмі.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати

для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (a) і (b) описані в першому аспекті, а також наступні стадії:

(c) необов'язково синтез сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b);

(d) введення сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b), хребетному; і

(e) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетного;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказане визначення включає в себе вимірювання рівня кісткової маси у хребетного. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси проводять методом двоенергетичної рентгенівської абсорбціометрії (DXA). У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси методом DXA включає в себе вимірювання T-показника методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання T-показника методом DXA включає в себе вимірювання T-показника в тазостегновому суглобі з допомогою DXA. Очевидно, що вказане вимірювання рівня кісткової маси можна здійснювати за допомогою методу, відмінного від DXA, такого як моноенергетична рентгенівська абсорбціометрія (SXA) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), *Prevention and Management of Osteoporosis*).

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях хребетне або ссавець являє собою щура або мишу з видаленими яєчниками.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (a) і (b) описані в першому аспекті, а також наступні стадії:

(c) необов'язково синтез сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b);

(d) необов'язково надання сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b);

(e) приведення сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b), в контакт *in vitro* з ентероендокринною клітиною хребетного або з клітиною, здатною секретувати GIP; і

(f) визначення того, чи дійсно сполука стимулює секрецію GIP ентероендокринною клітиною

хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP;

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина хребетного являє собою ентероендокринну клітину ссавця. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина являє собою К-клітину. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника, збагаченої К-клітинами. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини дванадцятипалої кишки або худі кишки (див., наприклад, Sondhi et al., *Pharmacogenomics J* (2006) 6:131-140). У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується лінії ентероендокринних клітин. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою рекомбінантну клітину, отриману з метою придання здатності секретувати GIP.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (a) і (b), описані в першому аспекті, а також наступні стадії:

(c) необов'язково синтез сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b);

(d) необов'язково надання сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b);

(e) введення сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b), хребетному; і

(f) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетного; де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію загального GIP в крові або плазмі. У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію біоактивного GIP в крові або плазмі.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук,

придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (a) і (b), описані в першому аспекті, а також наступні стадії:

(c) необов'язково синтез сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b);

(d) необов'язково надання сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b);

(e) введення сполуки, стимулюючої функціонування рецептора, визначене на стадії (b), хребетному; і

(f) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетного; де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказане визначення включає в себе вимірювання рівня кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси включає в себе вимірювання рівня кісткової маси методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання Т-показника методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника в тазостегновому суглобі методом DXA. Очевидно, що вказане вимірювання рівня кісткової маси можна здійснювати за допомогою методу, відмінного від DXA, такого як моноенергетична рентгенівська абсорбціометрія (SXA) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), *Prevention and Management of Osteoporosis*).

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях хребетне або ссавець являє собою щура або мишу з видаленими яєчниками.

У деяких втіленнях ідентифікований засіб, що посилює секрецію GIP, або ідентифікована сполука, придатна для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або ідентифікована сполука, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, являє собою агоніст рецептора. У деяких втіленнях агоніст являє собою частковий агоніст.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, пов'язаний з G-білком. У деяких втіленнях активація G-білок-зв'язаного рецептора, збільшує рівень внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях G-білок являє собою Gs.

У деяких втіленнях зразок людської ДНК являє собою людську геномну ДНК.

У деяких втіленнях полімеразна ланцюгова реакція являє собою полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Методи ЗТ-ПЛР добре відомі кваліфікованим фахівцям. У деяких втіленнях зразок людської ДНК являє собою людську кДНК. У деяких втіленнях кДНК отримують з людської тканини, що експресує GPR119. У деяких втіленнях, людська тканина, яка експресує GPR119, являє собою підшлункову залозу або панкреатичний острівцев. У деяких втіленнях кДНК отримують з людських клітин, що експресують GPR119. У деяких втіленнях кДНК отримують з бета-клітин підшлункової залози. У деяких втіленнях кДНК отримують з лінії клітин підшлункової залози.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях жорсткі умови гібридизації включають в себе гібридизацію при 42°C в розчині, що містить 50% формамід, 5×SSC (1×SSC=150 mM NaCl, 15 mM тринатрію цитрат), 50 mM фосфат натрію (pH 7,6), 5× розчин Денхардта, 10% сульфат декстрану і 20 мкг/мл денатурованої, деградованої ДНК з молок лосося, з подальшим промиванням при 65°C розчином, що містить 0,1×SSC. Способи проведення гібридизації добре відомі кваліфікованим фахівцям.

У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною

SEQU ID NO: 1, являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою GPCR. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є частиною гібридного білка, що включає в себе G-білок. Способи отримання гібридної конструкції GPCR:G добре відомі кваліфікованим фахівцям (див., наприклад, міжнародну заявку WO 02/42461).

У деяких втіленнях клітина-хазяїн містить вектор експресії, до складу якого входить полінуклеотид, що кодує G-білок-зв'язаний рецептор. У деяких втіленнях вектор експресії являє собою pCMV. Даний вектор вміщений в Американську колекцію типових культур (ATCC) 13 жовтня 1998 р. (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) відповідно до положень "Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури". У ATCC проведений аналіз ДНК, який показав, що вона є життєздатною. ATCC привласнила pCMV наступний номер депонування: ATCC #203351. Рядовим фахівцям в даній галузі добре відомо, що можна використати і інші відповідні вектори експресії, багато які з яких є комерційно доступними (наприклад, від Clontech, Palo Alto, CA; Stratagene, La Jolla, CA; і Invitrogen, Carlsbad, CA).

У деяких втіленнях клітина-хазяїн являє собою клітину хребетного. У деяких втіленнях клітина-хазяїн являє собою клітину ссавця. У деяких втіленнях клітина-хазяїн ссавця вибрана з групи, що складається з клітини 293, клітини 293Т, клітини CHO, клітини MCB3901 і клітин COS-7. У деяких втіленнях клітина-хазяїн являє собою дріжджову клітину. У деяких втіленнях клітина-хазяїн являє собою меланофор. Рядовим фахівцям в даній галузі добре відомі і інші відповідні клітини-хазяї, причому широкий ряд клітинних ліній можна придбати в Американській колекції типових культур, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

У деяких втіленнях у вказаному визначенні як G-білок-зв'язаний рецептор, використовують Gs-зв'язаний рецептор.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять з використанням G-білок-зв'язаного рецептора, який через проміскупітетний G-білок, такий як G α 15 або G α 16, сполучений з шляхом фосфолипази C. Проміскупітетні G-білки добре відомі кваліфікованим фахівцям (див., наприклад, Offermanns et al., J Biol Chem (1995) 270:15175-15180). У деяких втіленнях вказане визначення проводять з використанням G-білок-зв'язаного рецептора, який через химерний G-білок, сполучений, наприклад, з шляхом фосфолипази C. Химерні G-білки добре відомі кваліфікованим фахівцям (див., наприклад, Milligan et al., Trends in Pharmaceutical Sciences (1999) 20:(118-124; і WO 02/42461).

У деяких втіленнях вказане визначення проводять шляхом вимірювання рівня повторного месенджера.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять шляхом вимірювання рівня повторного месенджера, вибраного з групи, що складається з циклічного АМФ (цАМФ), циклічного ГМФ (цГМФ), інозитол 1,4,5-трифосфату (IP3), діацилгліцерину (DAG), MAP-кіназної активності, активності кінази MAPK/ERK 1 (MEKK1) і Ca²⁺. У деяких переважних втіленнях повторний месенджер являє собою цАМФ. У деяких втіленнях рівень внутрішньоклітинного цАМФ підвищується.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять з використанням мембрани, що містить G-білок-зв'язаний рецептор.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять шляхом аналізу меланофорів. У деяких втіленнях рівень диспергування пігменту збільшується.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять шляхом аналізу репортера. У деяких втіленнях вказаний аналіз репортера являє собою аналіз репортера CRE-Luc.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять шляхом вимірювання активності, опосередкованої збільшенням рівня внутрішньоклітинного цАМФ.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять шляхом аналізу репортера CRE-Luc. У деяких втіленнях рівень активності люцеферици підвищується.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять шляхом вимірювання зв'язування ГТФ γ S з мембраною, що містить G-білок-зв'язаний рецептор. У деяких втіленнях вказаний ГТФ γ S мітять [³⁵S]. У деяких втіленнях зв'язування вказаного ГТФ γ S з мембраною, що містить GPCR, збільшується.

У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку за умови, що вона не є поліпептидом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку за умови, що вона не є ліпідом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку за умови, що вона не є поліпептидом або ліпідом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою поліпептид. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою поліпептид, за умови, що поліпептид не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою ліпід. У деяких втіленнях сполука, що тестується, не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент.

У деяких втіленнях спосіб додаково включає в себе стадію необов'язкового визначення структури засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуки, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях спосіб додатково включає в себе стадію необов'язкового надання назви або структури засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуки, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказаний спосіб додатково включає в себе стадію необов'язкового отримання або синтезу засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуки, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях вказаний спосіб додатково включає в себе стадію отримання фармацевтичної композиції на основі засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуки, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У другому аспекті даний винахід описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збі-

льшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) приведення споулки, ідентифікованої за способом першого аспекту, з ентероендокринною клітиною хребетного або з клітиною, здатною секретувати GIP, в контакт *in vitro*; і

(b) визначення того, чи дійсно сполука стимулює секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP;

де здатність споулки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP, додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях ентероендокринна клітина хребетного являє собою ентероендокринну клітину ссавця. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина являє собою К-клітину. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника, збагаченої К-клітинами. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини дванадцятипалої кишки або худої кишки (див., наприклад, Sondhi et al., *Pharmacogenomics J* (2006) 6:131-140). У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується лінії ентероендокринних клітин. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою рекомбінантну клітину, отриману з метою секреції GIP.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, споулк, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або споулк, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) введення хребетному споулки, причому вказана сполука ідентифікована способом по першому аспекту; і

(b) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетного;

де здатність споулки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетного додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію в крові або плазмі загального GIP. У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію в крові або плазмі біоактивного GIP. У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, споулк, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або споулк, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) введення хребетному споулки, причому вказана сполука ідентифікована способом по першому аспекту; і

(b) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетного; де здатність споулки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетного додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію в крові або плазмі загального GIP. У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію в крові або плазмі біоактивного GIP.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

У деяких втіленнях вказане визначення включає в себе вимірювання рівня кісткової маси у хребетного. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси проводять методом двоенергетичної рентгенівської абсорбціометрії (DXA). У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання Т-показника методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника в тазостегновому суглобі з допомогою DXA. Очевидно, що вказане вимірювання рівня кісткової маси можна здійснювати за допомогою методу, відмінного від DXA, такого як моноенергетична рентгенівська абсорбціометрія (SXA) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), *Prevention and Management of Osteoporosis*). У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях хребетне або ссавець являє собою щура або мишу з видаленими яєчниками.

У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку за умови, що вона не є поліпептидом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку за умови, що вона не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях, сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку за умови, що вона не є ліпідом. У деяких втіленнях сполука, що тестується,

являє собою низькомолекулярну сполуку за умови, що вона не є поліпептидом або ліпідом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою поліпептид. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою поліпептид за умови, що поліпептид не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою ліпід. У деяких втіленнях сполука, що тестується, не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент.

У третьому аспекті даний винахід описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(a) приведення агоніста GPR119 з ентероендокринною клітиною хребетного або з клітиною, здатною секретувати GIP, в контакт *in vitro*; і

(b) визначення того, чи дійсно агоніст GPR119 стимулює секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP;

де здатність агоніста GPR119 стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP, вказує на те, що агоніст GPR119 являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях ентероендокришна клітина хребетного являє собою ентероендокринну клітину ссавця. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина являє собою К-клітину. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника, збагаченої К-клітинами. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини дванадцятипалої кишки або худой кишки (див., наприклад, Sondhi et al., *Pharmacogenomics* 3 (2006) 6:131-140). У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується лінії ентероендокринних клітин. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою рекомбінантну клітину, отриману з метою секреції GIP.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(a) введення агоніста GPR119 хребетному; і

(b) визначення того, чи дійсно агоніст GPR119 збільшує рівень GIP у хребетного;

де здатність агоніста GPR119 збільшувати рівень GIP у хребетного вказує на те, що агоніст GPR119 являє собою засіб, що посилює секрецію

GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію в крові або плазмі загального GIP. У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію в крові або плазмі біоактивного GIP.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(a) введення агоніста GPR119 хребетному; і

(b) визначення того, чи дійсно агоніст GPR119 збільшує рівень кісткової маси у хребетного;

де здатність агоніста GPR119 збільшувати рівень кісткової маси у хребетного вказує на те, що агоніст GPR119 являє собою сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію в крові або плазмі загального GIP. У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію в крові або плазмі біоактивного GIP.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

У деяких втіленнях вказане визначення включає в себе вимірювання рівня кісткової маси у хребетного. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси проводять методом двохенергетичної рентгенівської абсорбціометрії (DXA). У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання Т-показника методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника в тазостегновому суглобі з допомогою DXA. Очевидно, що вказане вимірювання рівня кісткової маси можна здійснювати за допомогою методу, відмінного від DXA, такого як моноенергетична рентгенівська абсорбціометрія (SXA) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), *Prevention and Management of Osteoporosis*). У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких вті-

лення хребетне або ссавець являє собою щура або мишу з видаленими яєчниками.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою агоніст ендогенного GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою агоніст людського GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою частковий агоніст GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою селективний агоніст GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою низькомолекулярну сполуку. У деяких втіленнях низькомолекулярна сполука не є поліпептидом. У деяких втіленнях низькомолекулярна сполука не є антитілом або його аптиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях низькомолекулярна сполука не є ліпідом. У деяких втіленнях низькомолекулярна сполука не є поліпептидом або ліпідом.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 є доступним при пероральному введенні.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 має значення EC_{50} менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 75 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 15 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 4 нМ, менше ніж приблизно 3 нМ, менше ніж приблизно 2 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях агоніст GPR119 має значення EC_{50} менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 75 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 15 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 4 нМ, менше ніж приблизно 3 нМ, менше ніж приблизно 2 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ, при взаємодії з людським GPR119, що має послідовність SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях агоніст GPR119 має значення EC_{50} менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 75 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 15 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 4 нМ, менше ніж приблизно 3 нМ, менше ніж приблизно 2 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ, по даним аденілатциклазного аналізу, що проводиться з використанням людського GPR119, що має послідовність SEQ ID NO: 2 (типовий аденілатциклазний аналіз описаний нижче в прикладах 7 і 8). У деяких втіленнях агоніст GPR119 має значення EC_{50} менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 75 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 15 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 4 нМ, менше ніж приблизно 3 нМ, менше ніж приблизно 2 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ, за даними аналізу меланофорів, що проводиться з використанням людського GPR119, що має послі-

довність SEQ ID NO: 2 (типовий аналіз меланофорів описаний нижче в прикладі 9).

Приклади агоністів GPR119 розкриті, наприклад, в міжнародній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 04/065380); міжнародній заявці № PCT/US2004/005555 (опублікованої як WO 04/076413); міжнародній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 05/007647); міжнародній заявці № PCT/US2004/022417 (опублікованої як WO 05/007658); міжнародній заявці № PCT/US2005/019318 (опублікованої як WO 2005/121121); міжнародній заявці № PCT/GB2004/050046 (опублікованої як WO 2005/061489); міжнародній заявці № PCT/US06/00567 (опублікованої як WO 2006/083491); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050264 (опублікованої як WO 2006/067531); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050265 (опублікованої як WO 2006/067532); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050266 (опублікованої як WO 2006/070208); міжнародній заявці № PCT/JP02/09350 (опублікованої як WO 03/026661); міжнародній заявці № PCT/JP2005/018412 (опублікованої як WO 06/040966); міжнародній заявці № PCT/JP2005/019000 (опублікованої як WO 2006/043490); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050176 (опублікованої як WO 2007/003960); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050177 (опублікованої як WO 2007/003961); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050178 (опублікованої як WO 2007/003962); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050182 (опублікованої як WO 2007/003964); і міжнародній заявці № PCT/JP02/09350 (опублікованої як WO 03/026661).

У деяких втіленнях спосіб включає в себе надання агоніста GPR119. У деяких втіленнях агоніст GPR119 можна ідентифікувати за допомогою способу, описаного в першому аспекті.

У деяких втіленнях спосіб включає в себе проведення способу, описаного в першому аспекті, з метою ідентифікації агоніста GPR119.

У деяких втіленнях спосіб включає в себе ідентифікацію агоніста GPR119 за допомогою способу, описаного в першому аспекті.

У четвертому аспекті даний винахід описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) приведення G-білок-зв'язаного рецептора в контакт з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора в присутності або за відсутності сполуки, що тестується, де G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, за умови, що рецептор не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(iv) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(v) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(vi) варіанту SEQ ID NO: 2;

(vii) амінокислотної послідовності за пунктом (vi), вибраної з групи, що складається з:

(a') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(b') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ TD NO: 2;

(viii) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(ix) біологічно активного фрагмента послідовності за будь-яким з пунктів (i)-(viii);

(b) детекція комплексу вказаного відомого ліганду з вказаним рецептором; і

(c) визначення того, чи дійсно в присутності сполуки, що тестується, утвориться менше вказаного комплексу, ніж за відсутності сполуки, що тестується;

де вказане визначення вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою алель SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог ссавців SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є рекомбінантним.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою ліганд або агоніст ендogenousного рецептора GPR119 хребетного, ссавця або людини. У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою відомий агоніст ендogenousного рецептора GPR119 хребетно-

го, ссавця або людини. У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою ліганд або агоніст ендogenousного людського рецептора GPR119. У деяких втіленнях відомий ліганд ідентичний сполуці, розкритому, наприклад, в міжнародній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 04/065380); міжнародній заявці № PCT/US2004/005555 (опублікованої як WO 04/076413); міжнародній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 05/007647); міжнародній заявці № PCT/US2004/022417 (опублікованої як WO 05/007658); міжнародній заявці № PCT/US2005/019318 (опублікованої як WO 2005/121 121); міжнародній заявці № PCT/GB2004/050046 (опублікованої як WO 2005/061489); міжнародній заявці № PCT/US06/00567 (опублікованої як WO 2006/083491); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050264 (опублікованої як WO 2006/067531); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050265 (опублікованої як WO 2006/067532); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050266 (опублікованої як WO 2006/070208); міжнародній заявці № PCT/JP02/09350 (опублікованої як WO 03/026661); міжнародній заявці № PCT/JP2005/018412 (опублікованої як WO 06/040966); міжнародній заявці № PCT/JP2005/019000 (опублікованої як WO 2006/043490); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050176 (опублікованої як WO 2007/003960); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050177 (опублікованої як WO 2007/003961); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050178 (опублікованої як WO 2007/003962); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050182 (опублікованої як WO 2007/003964); або міжнародній заявці № PCT/JP02/09350 (опублікованої як WO 03/026661). У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою ендogenousний ліганд ендogenousного рецептора GPR119 хребетного, ссавця або людини.

У деяких втіленнях необов'язково мічений відомий ліганд являє собою мічений відомий ліганд. У деяких втіленнях мічений відомий ліганд являє собою відомий ліганд, мічений радіоактивним ізотопом. Способи мічення сполуки радіоактивним ізотопом, такі як мічення відомого ліганду G-білок-зв'язаного рецептора, даного винаходу, добре відомі кваліфікованим фахівцям. Див., наприклад, міжнародну заявку WO 04/065380. Також див., наприклад, приведений нижче приклад 11.

Способи детекції комплексу G-білок-зв'язаного рецептора із сполукою, що явно є лігандом G-білок-зв'язаного рецептора, добре відомі кваліфікованим фахівцям. Див., наприклад, міжнародну заявку WO 04/065380. Також див., наприклад, наведений нижче приклад 12.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану,

що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (а)-(с) четвертого аспекту, а також наступні стадії:

(d) необов'язково синтез сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(е) приведення сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу, з ентероендокринною клітиною хребетного або з клітиною, здатною секретувати GIP, в контакт *in vitro*; і

(f) визначення того, чи дійсно сполука стимулює секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP;

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина хребетного являє собою ентероендокринну клітину ссавця. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина являє собою К-клітину. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника, збагаченої К-клітинами. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини дванадцятипалої кишки або худі кишки (див., наприклад, Sondhi et al., *Pharmacogenomics J* (2006) 6:131-140). У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується лінії ентероендокринних клітин. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою рекомбінантну клітину, отриману з метою секреції GIP.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (а)-(с) четвертого аспекту, а також наступні стадії:

(d) необов'язково синтез сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(е) введення хребетному сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу; і

(f) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетного;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою

відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (а)-(с) четвертого аспекту, а також наступні стадії:

(d) необов'язково синтез сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(е) введення хребетному сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу; і

(f) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетного;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетного вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказане визначення включає в себе вимірювання рівня кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси включає в себе вимірювання рівня кісткової маси методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання Т-показника методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника в тазостегновому суглобі методом DXA. Очевидно, що вказане вимірювання рівня кісткової маси можна здійснювати за допомогою методу, відмінного від DXA, такого як моноенергетична рентгенівська абсорбціометрія (SXA) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), *Prevention and Management of Osteoporosis*). У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях хребетне або ссавець являє собою щура або мишу з видаленими яєчниками.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (а)-(с) четвертого аспекту, а також наступні стадії:

(d) необов'язково синтез сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(е) необов'язково надання сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(f) приведення сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу, з ентероендокринною клітиною хребетного або з клітиною, здатною секретувати GIP, в контакт *in vitro*; i

(g) визначення того, чи дійсно сполука стимулює секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP;

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP, вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина хребетного являє собою ентероендокринну клітину ссавця. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина являє собою К-клітину. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника, збагаченої К-клітинами. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини дванадцятипалої кишки або худой кишки (див., наприклад, Sondhi et al., *Pharmacogenomics J* (2006) 6:131-140). У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується лінії ентероендокринних клітин. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою рекомбінантну клітину, отриману з метою секреції GIP.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (а)-(с) четвертого аспекту, а також наступні стадії:

(d) необов'язково синтез сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(e) необов'язково надання сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(f) введення хребетному сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу; i

(g) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетною;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетною вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе стадії (а)-(с) четвертого аспекту, а також наступні стадії:

(d) необов'язково синтез сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(e) необов'язково надання сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу;

(i) введення хребетному сполуки, в присутності якої на стадії (с) утвориться менша кількість вказаного комплексу; i

(g) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетною;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетною вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказане визначення включає в себе вимірювання рівня кісткової маси суб'єкта. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси включає в себе вимірювання рівня кісткової маси методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання Т-показника методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника в тазостегновому суглобі методом DXA. Очевидно, що вказане вимірювання рівня кісткової маси можна здійснювати за допомогою методу, відмінного від DXA, такого як моноенергетична рентгенівська абсорбціометрія (SXA) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), *Prevention and Management of Osteoporosis*). У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях хребетне або ссавець являє собою щура або мишу з видаленими яєчниками.

У деяких втіленнях зразок людської ДНК являє собою людську геномну ДНК.

У деяких втіленнях полімеразна ланцюгова реакція являє собою полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Способи проведення ЗТ-ПЛР добре відомі кваліфікованим фахівцям. У деяких втіленнях зразок людської ДНК являє собою людську кДНК. У деяких втіленнях кДНК отримують з людської тканини, що експресує GPR119. У деяких втіленнях людська тканина, яка експресує GPR119, являє собою підшлункову залозу або панкреатичний острівцев. У деяких втіленнях кДНК отримують з людських клітин, що експресують GPR119. У деяких втіленнях кДНК отримують з бета-клітин підшлункової залози. У

деяких втіленнях кДНК отримують з лінії клітин підшлункової залози.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях жорсткі умови гібридизації (наприклад, умови високої жорсткості) включають в себе гібридизацію при 42°C в розчині, що містить 50% формамід, 5×SSC (1×SSC=150 mM NaCl, 15 mM тринатрію цитрат), 50 mM фосфат натрію (pH 7,6), 5× розчин Денхардта, 10% сульфат декстрану і 20 мкг/мл денатурованої, деградованої ДНК сперми лосося, з подальшим промиванням при 65°C розчином, що містить 0,1×SSC. Способи гібридизації добре відомі кваліфікованим фахівцям.

У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-

[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою GPCR. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях, варіант SEQ ID NO: 2 володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях, конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є частиною гібридного білка, що включає в себе G-білок. Способи отримання гібридної конструкції GPCR:G добре відомі кваліфікованим фахівцям (див., наприклад, міжнародну заявку WO 02/42461).

У деяких втіленнях вказане визначення проводять з використанням клітини-хазяїна, що містить G-білок-зв'язаний рецептор. У деяких втіленнях клітина-хазяїн містить вектор експресії, який, в свою чергу, містить полінуклеотид, що кодує GPCR. У деяких втіленнях вектор експресії являє собою pCMV. Даний вектор вміщений в Американську колекцію типових культур (ATCC) 13 жовтня 1998 р. (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) відповідно до положень "Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури". У ATCC проведений аналіз ДНК, який показав, що вона є життєздатною. ATCC привласнила pCMV наступний номер депонування: ATCC #203351. Рядовим фахівцям в даній галузі добре відомо, що можна використати і інші відповідні вектори експресії, багато які з яких є комерційно доступними (наприклад, від Clontech, Palo Alto, CA; Stratagene, La Jolla, CA; і Invitrogen, Carlsbad, CA).

У деяких втіленнях клітина-хазяїн являє собою клітину хребетного. У деяких втіленнях клітина-хазяїн являє собою клітину ссавця. У деяких втіленнях клітина-хазяїн ссавця вибрана з групи, що складається з клітини 293, клітини 293T, клітини CHO, клітини MCB3901 і клітин COS-7. У деяких втіленнях клітина-хазяїн являє собою дріжджову клітину. У деяких втіленнях клітина-хазяїн являє собою меланофор. Рядовим фахівцям в даній галузі добре відомі і інші відповідні клітини-хазяї, причому широкий ряд клітинних ліній можна придбати в Американській колекції типових культур,

10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

У деяких втіленнях вказане визначення проводять з використанням мембрани, що містить G-білок-зв'язаний рецептор.

У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку. У деяких втіленнях, сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є поліпептидом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є ліпідом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є поліпептидом або ліпідом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою поліпептид. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою поліпептид, за умови, що поліпептид не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою ліпід. У деяких втіленнях сполука, що тестується, не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент.

У деяких втіленнях спосіб додатково включає в себе стадію необов'язкового визначення структури засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях спосіб додатково включає в себе стадію необов'язкового надання назви або структури засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію отримання фармацевтичної композиції на основі засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію отримання фармацевтичної композиції на основі засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У п'ятому аспекті даний винахід описує спосіб скрининга сполук, що тестуються з метою ідентифікації засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, даний спосіб харак-

теризується застосуванням G-білок-зв'язаного рецептора, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(a) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(b) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(c) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, де GPCR не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(d) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується поліпептидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(e) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується поліпептидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(f) варіанту SEQ ID NO: 2;

(g) амінокислотної послідовності за пунктом (f), вибраної з групи, що складається з:

(i) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(ii) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(h) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(i) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (a)-(h).

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою алель SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог ссавців SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є рекомбінантним.

У деяких втіленнях спосіб включає в себе ідентифікацію агоніста рецептора.

У деяких втіленнях спосіб включає в себе ідентифікацію часткового агоніста рецептора.

У деяких втіленнях, вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію отримання фармацевтичної композиції на основі засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У шостому аспекті даний винахід описує спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення

кісткової маси суб'єкта, ідентифікованих відповідно до першого аспекту, другого аспекту, третього аспекту, четвертого аспекту, або п'ятого аспекту.

У сьомому аспекті даний винахід описує застосування G-білок-зв'язаного рецептора, для скринінга сполук, що тестуються як засобів, що посилюють секрецію GIPs, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, де G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(a) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(b) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(c) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, де GPCR не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(d) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(e) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(f) варіанту SEQ ID NO: 2;

(g) амінокислотної послідовності за пунктом (f), вибраної з групи, що складається з:

(i) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(ii) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(h) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(i) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (a)-(h).

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою алель SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог ссавців SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях рецептор є рекомбінантним.

У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку.

У деяких втіленнях сполуки, що тестується, являє собою агоніст GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою агоніст ендogenous GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою агоніст людського GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою часиковий агоніст GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою селективний агоніст GPR119.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 являє собою низькомолекулярну сполуку.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 є доступним при пероральному введенні.

У деяких втіленнях агоніст GPR119 має значення EC₅₀ менше ніж, приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 75 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 15 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 4 нМ, менше ніж приблизно 3 нМ, менше ніж приблизно 2 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях агоніст GPR119 має значення EC₅₀ менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 75 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 15 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 4 нМ, менше ніж приблизно 3 нМ, менше ніж приблизно 2 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ, при взаємодії з людським GPR119, що має послідовність SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях агоніст GPR119 має значення EC₅₀ менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 75 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 15 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 4 нМ, менше ніж приблизно 3 нМ, менше ніж приблизно 2 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ, при взаємодії з людським GPR119, що має послідовність SEQ ID NO: 2, по даним аденілатциклазного аналізу (типовий аденілатциклазний аналіз описаний нижче в прикладах 7 і 8). У деяких втіленнях агоніст GPR119 має значення EC₅₀ менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 75 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 15 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 4 нМ, менше ніж приблизно 3 нМ, менше ніж приблизно 2 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ, при взаємодії з людським GPR119, що має послідовність SEQ ID NO: 2, за даними аналізу меланокорів (типовий аналіз меланокорів описаний вище в прикладі 9).

Приклади агоністів GPR119 розкриті, наприклад, в міжнародній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 04/065380); міжнародній заявці № PCT/US2004/005555 (опублікованої як WO 04/076413); міжнародній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 05/007647); міжнародній заявці № PCT/US2004/022417 (опублікованої як WO 05/007658); міжнародній заявці № PCT/US2005/019318 (опублікованої як WO 2005/121 121); міжнародній заявці № PCT/GB2004/050046 (опублікованої як WO 2005/061489); міжнародній заявці №

PCT/US06/00567 (опублікованої як WO 2006/083491); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050264 (опублікованої як WO 2006/067531); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050265 (опублікованої як WO 2006/067532); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050266 (опублікованої як WO 2006/070208); міжнародній заявці № PCT/JP02/09350 (опублікованої як WO 03/026661); міжнародній заявці № PCT/JP2005/018412 (опублікованої як WO 06/040966); міжнародній заявці № PCT/JP2005/019000 (опублікованої як WO 2006/043490); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050176 (опублікованої як WO 2007/003960); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050177 (опублікованої як WO 2007/003961); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050178 (опублікованої як WO 2007/003962); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050182 (опублікованої як WO 2007/003964); і міжнародній заявці № PCT/JP02/09350 (опублікованої як WO 03/026661).

У восьмому аспекті даний винахід описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) приведення сполуки, яка стимулює функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, де вказаний G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, за умови, що рецептор не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(iv) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зразка людської ДНК з використанням специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(v) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості-з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(vi) варіанту SEQ ID NO: 2;

(vii) амінокислотної послідовності (vi), вибраної з групи, що складається з:

(a') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(b') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(viii) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(ix) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (i)-(viii);

in vitro з ентероендокринною клітиною хребетного або з клітиною, здатною секретувати GIP, де вказану сполуку визначено або ідентифіковано за способом першого аспекту; і

(b) визначення здатності сполуки стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP;

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP, додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою алель SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог ссавців SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є рекомбінантним.

У деяких втіленнях ентероендокринна клітина хребетного являє собою ентероендокринну клітину ссавця. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина являє собою K-клітину. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника, збагаченої K-клітинами. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини дванадцятипалої кишки або худі кишки (див., наприклад, Sondhi et al., Pharmacogenomics J (2006) 6:131-140). У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується лінії ентероендокринних клітин. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою клітину підшлункової залози. Експресія GIP в підшлунковій залозі описана, наприклад, в Xie et al., Bone 2007. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою рекомбінантну клітину, отриману з метою секреції GIP.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) введення хребетному сполуки, яка стимулює функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, де вказаний G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, за умови, що рецептор не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(iv) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(viii) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(ix) варіанту SEQ ID NO: 2;

(x) амінокислотної послідовності за пунктом (vi), вибраної з групи, що складається з:

(a') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(b') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(viii) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(ix) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (i)-(viii);

де вказана сполука визначена або ідентифікована за способом першого аспекту; і

(b) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетного;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетного додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою алель SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог ссавців SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є рекомбінантним.

У деяких втіленнях рівень GIP являє собою концентрацію загального GIP в крові, в плазмі або в сироватці. У деяких втіленнях рівень GIP концентрацію біоактивного GIP в крові, в плазмі або в сироватці.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне, У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) введення хребетному сполуки, яка стимулює функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, де вказаний G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, за умови, що рецептор не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(iv) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(xi) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(xii) варіанту SEQ ID NO: 2;

(xiii) амінокислотної послідовності за пунктом (vi), вибраної з групи, що складається з:

(a') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(b') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(viii) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(ix) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (i)-(viii);

де вказана сполука визначена або ідентифікована за способом першого аспекту; і

(b) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетного;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетного додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою алель SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог ссавців SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є рекомбінантним.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях хребетне або ссавець являє собою щура або мишу з видаленими яєчниками.

У деяких втіленнях вказане визначення включає в себе вимірювання рівня кісткової маси у хребетного. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси проводять методом двоенергетичної рентгенівської абсорбціометрії (DXA). У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси методом DXA включає в себе вимірювання T-показника методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання T-показника методом DXA включає в себе вимірювання T-показника в тазостегновому суглобі з допомогою DXA. Очевидно, що вказане вимірювання рівня кісткової маси можна здійснювати за допомогою методу, відмінного від DXA, такого як моноенергетична рентгенівська абсорбціометрія (SXA) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis).

У деяких втіленнях зразок людської ДНК являє собою людську геномну ДНК.

У деяких втіленнях полімеразна ланцюгова реакція являє собою полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Способи проведення ЗТ-ПЛР добре відомі кваліфікованим фахівцям. У деяких втіленнях зразок людської ДНК являє собою людську кДНК. У деяких втіленнях кДНК отримують з людської тканини, що експресує GPR119. У деяких втіленнях людська тканина, яка експресує GPR119, являє собою підшлункову залозу або панкреатичний острівцев. У деяких втіленнях кДНК отримують з людських клітин, що експресують GPR119. У деяких втіленнях кДНК отримують з бета-клітин підшлункової залози. У деяких втіленнях кДНК отримують з лінії клітин підшлункової залози.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-

нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях жорсткі умови гібридизації включають в себе гібридизацію при 42°C в розчині, що містить 50% формамід, 5×SSC (1×SSC=150 мМ NaCl, 15 мМ тринатрію цитрат), 50 мМ фосфат натрію (pH 7,6), 5х розчин Денхардта, 10% сульфат декстрану і 20 мкг/мл денатурованої, деградованої ДНК з молоко лосося, з подальшим промиванням при 65°C розчином, що містить 0,1×SSC. Способи проведення гібридизації добре відомі кваліфікованим фахівцям.

У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою GPCR. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 володіє детектованим рівнем

конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є частиною гібридного білка, що включає в себе G-білок. Способи отримання гібридної конструкції GPCR:G добре відомі кваліфікованим фахівцям (див., наприклад, міжнародну заявку WO 02/42461).

У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, являє собою низькомолекулярну сполуку. У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є поліпептидом. У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є поліпептидом або ліпідом. У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, являє собою поліпептид. У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, являє собою поліпептид, за умови, що поліпептид не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, являє собою ліпід. У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, стимулююча функціонування G-білок-зв'язаного рецептора, являє собою антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент.

У деяких втіленнях спосіб додатково включає в себе стадію необов'язкового визначення структури засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях спосіб додатково включає в себе стадію необов'язкового надання назви або структури засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію необов'язкового отримання або синтезу засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію отримання засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта у вигляді фармацевтичного препарату.

У деяких втіленнях вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію отримання фармацевтичної композиції на основі засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У дев'ятому аспекті даний винахід описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) приведення в контакт сполуки, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, де G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, за умови, що рецептор не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(iv) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується поліпептидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(v) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується поліпептидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(vi) варіанту SEQ ID NO: 2;

(vii) амінокислотної послідовності за пунктом (vi), вибраної з групи, що складається з:

(a') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(b') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(viii) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(ix) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (i)-(viii);

in vitro з ентероендокринною клітиною хребетного, або з клітиною, здатною секретувати GIP, де вказана сполука визначена або ідентифікована за способом четвертого аспекту; і

(b) визначення того, чи дійсно сполука стимулює секрецію GIP ентероендокринною клітиною

хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP;

де здатність сполуки, що тестується, стимулювати секрецію GIP ентероендокринною клітиною хребетного або клітиною, здатною секретувати GIP додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях рецептор містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою алель SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ортолог ссавців SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є рекомбінантним.

У деяких втіленнях ентероендокринна клітина хребетного являє собою ентероендокринну клітину ссавця. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина являє собою К-клітину. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини тонкого кишечника, збагаченої К-клітинами. У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується тканини дванадцятипалої кишки або худі кишки (див., наприклад, Sondhi et al., *Pharmacogenomics J* (2006) 6:131-140). У деяких втіленнях ентероендокринна клітина стосується лінії ентероендокринних клітин. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP являє собою клітину підшлункової залози. Експресія GIP в підшлунковій залозі описана, наприклад, Xie et al., *Bone* 2007. У деяких втіленнях клітина, здатна секретувати GIP, являє собою рекомбінантну клітину, отриману з метою секреції GIP.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) введення хребетному сполуки, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, де G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, за умови, що рецептор не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(iv) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(viii) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(ix) варіанту SEQ ID NO: 2;

(x) амінокислотної послідовності за пунктом (vi), вибраної з групи, що складається з:

(a') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(b') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(viii) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(ix) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (i)-(viii);

де вказана сполука визначена або ідентифікована за способом четвертого аспекту; і

(b) визначення того, чи збільшує сполука рівень GIP у хребетного; де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень GIP у хребетного додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відміне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

Даний винахід також описує спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP, сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, що включає в себе наступні стадії:

(а) введення хребетному сполуки, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, де G-білок-зв'язаний рецептор містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(ii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(iii) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, за умови, що рецептор не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(iv) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням

зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(xi) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(xii) варіанту SEQ ID NO: 2;

(xiii) амінокислотної послідовності за пунктом (vi), вибраної з групи, що складається з:

(a') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(b') амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(viii) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(ix) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (i)-(viii);

де вказана сполука визначена або ідентифікована за способом четвертого аспекту; і

(b) визначення того, чи збільшує сполука рівень кісткової маси у хребетного;

де здатність сполуки, що тестується, збільшувати рівень кісткової маси у хребетного додатково вказує на те, що сполука, що тестується, являє собою засіб, що посилює секрецію GIP, сполуку, придатну для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях хребетне або ссавець являє собою щура або мишу з видаленими яєчниками.

У деяких втіленнях вказане визначення включає в себе вимірювання рівня кісткової маси у хребетного. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси включає в себе вимірювання рівня кісткової маси методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання рівня кісткової маси методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника методом DXA. У деяких втіленнях вказане вимірювання Т-показника методом DXA включає в себе вимірювання Т-показника в тазостегновому суглобі методом DXA. Очевидно, що вказане вимірювання рівня кісткової маси можна здійснювати за допомогою методу, відмінного від DXA, такого як моноенергетична рентгеновська абсорбціометрія (SXA) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis). У деяких втіленнях хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінне від людини хребетне. У деяких втіленнях хребетне являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях ссавець являє собою відмінного від людини ссавця.

У деяких втіленнях зразок людської ДНК являє собою людську геномну ДНК.

У деяких втіленнях полімеразна ланцюгова реакція являє собою полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Способи проведення ЗТ-ПЛР добре відомі кваліфікованим фахівцям. У деяких втіленнях зразок людської ДНК являє собою людську кДНК. У деяких втіленнях кДНК отримують з людської тканини, що експресує GPR119. У деяких втіленнях, людська тканина, яка експресує GPR119, являє собою підшлункову залозу або панкреатичний острівцев. У деяких втіленнях кДНК отримують з людських клітин, що експресують GPR119. У деяких втіленнях кДНК отримують з бета-клітин підшлункової залози. У деяких втіленнях кДНК отримують з лінії клітин підшлункової залози.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях жорсткі умови гібридизації включають в себе гібридизацію при 42°C в розчині, що містить 50% формамід, 5×SSC (1×SSC=150 mM NaCl, 15 mM тринатрію цитрат), 50 mM фосфат натрію (pH 7,6), 5х розчин Денхардта, 10% сульфат декстрану і 20 мкг/мл денатурованої, деградованої ДНК з молоко лосося, з подальшим промиванням при 65°C розчином, що містить 0,1×SSC. Способи проведення гібридизації добре відомі кваліфікованим фахівцям.

У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується

полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою GPCR. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, є частиною гібридного білка, що включає в себе G-білок. Способи отримання гібридної конструкції GPCR: G добре відомі кваліфікованим фахівцям (див., наприклад, міжнародну заявку WO 02/42461).

У деяких втіленнях сполука, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, являє собою низькомолекулярну сполуку. У деяких втіленнях сполука, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є поліпептидом. У деяких втіленнях сполука, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях спо-

лука, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є ліпідом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою низькомолекулярну сполуку, за умови, що вона не є поліпептидом або ліпідом. У деяких втіленнях сполука, що тестується, являє собою поліпептид. У деяких втіленнях сполука, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, являє собою поліпептид, за умови, що поліпептид не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, являє собою ліпід. У деяких втіленнях сполука, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, не є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом. У деяких втіленнях сполука, в присутності якої утвориться менше комплексу G-білок-зв'язаного рецептора з необов'язково міченим відомим лігандом рецептора, ніж за відсутності сполуки, являє собою антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації засобів, що посилюють секрецію GIP.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації сполук, придатних для профілактики або лікування стану, що характеризується зниженням кісткової маси.

У деяких втіленнях спосіб являє собою спосіб ідентифікації сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою ліганд або агоніст ендogenous рецептора GPR119 хребетного, ссавця або людини. У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою ліганд або агоніст ендogenous рецептора GPR119 людини. У деяких втіленнях відомий ліганд ідентичний сполуці, розкритій, наприклад, в міжнародній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 04/065380); міжнародній заявці № PCT/US2004/005555 (опублікованої як WO 04/076413); міжнародній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 05/007647); міжнародній заявці № PCT/US2004/022417 (опублікованої як WO 05/007658); міжнародній заявці № PCT/US2005/019318 (опублікованої як WO 2005/121 121); міжнародній заявці № PCT/GB2004/050046 (опублікованої як WO 2005/061489); міжнародній заявці № PCT/US06/00567 (опублікованої як WO 2006/083491); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050264 (опублікованої як WO 2006/067531); міжнародній заявці №

PCT/GB2005/050265 (опублікованої як WO 2006/067532); міжнародній заявці № PCT/GB2005/050266 (опублікованої як WO 2006/070208); міжнародній заявці № PCT/JP02/09350 (опублікованої як WO 03/026661); міжнародній заявці № PCT/JP2005/018412 (опублікованої як WO 06/040966); міжнародній заявці № PCT/JP2005/019000 (опублікованої як WO 2006/043490); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050176 (опублікованої як WO 2007/003960); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050177 (опублікованої як WO 2007/003961); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050178 (опублікованої як WO 2007/003962); міжнародній заявці № PCT/GB2006/050182 (опублікованої як WO 2007/003964); або міжнародній заявці № PCT/JP02/09350 (опублікованої як WO 03/026661). У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях відомий ліганд являє собою ендogenousний ліганд ендogenousного рецептора GPR119 хребетного, ссавця або людини.

У деяких втіленнях необов'язково мічений відомий ліганд являє собою мічений відомий ліганд. У деяких втіленнях мічений відомий ліганд являє собою відомий ліганд, мічений радіоактивним ізотопом. Способи мічення сполуки радіоактивним ізотопом, такі як мічення відомого ліганду G-білок-зв'язаного рецептора, даного винаходу, добре відомі кваліфікованим фахівцям. Див., наприклад, міжнародну заявку WO 04/065380. Також див., наприклад, приведенний нижче приклад 11.

Способи детекції комплексу G-білок-зв'язаного рецептора із сполукою, що явно є лігандом G-білок-зв'язаного рецептора, добре відомі кваліфікованим фахівцям. Див., наприклад, міжнародну заявку WO 04/065380. Також див., наприклад, наведений нижче приклад 12.

У деяких втіленнях спосіб додатково включає в себе стадію необов'язкового визначення структури засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях, спосіб додатково включає в себе стадію необов'язкового надання назви або структури засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях, вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію необов'язкового отримання або синтезу засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

У деяких втіленнях вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію отримання засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для

лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта, у вигляді фармацевтичного препарату.

У деяких втіленнях вказаний спосіб необов'язково включає в себе стадію отримання фармацевтичної композиції на основі засобу, що посилює секрецію GIP, сполуки, придатної для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, або сполуку, яку можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта.

Короткий опис креслень

Даний винахід також ілюструється кресленнями, що додаються:

На Фіг. 1 зображений фармакодинамічний аналіз впливу агоніста GPR119 на рівень GIP в крові мишей дикого типу. А. Динамічний аналіз, що проводиться з використанням сполуки 1 як агоніста GPR119. В. Динамічний аналіз, що проводиться з використанням сполуки 3 як агоніста GPR119. С. Дозо-титриметричний аналіз, що проводиться з використанням сполуки 3 як агоніста GPR119.

На Фіг. 2 показаний вплив агоніста GPR119 на рівень GLP в крові GPR119-дефіцитних (з нокаутом по гену GPR119) мишей в порівнянні з мишами дикого типу. А. Порівняльний аналіз проводять з використанням сполуки 1 як агоніста GPR119. В. Порівняльний аналіз проводять з використанням сполуки 2 як агоніста GPR119.

Докладний опис винаходу

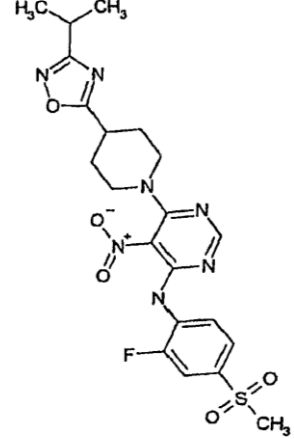
Даний винахід описує способи застосування рецептора GPR119 для ідентифікації сполук, які можна використати для збільшення кісткової маси суб'єкта. Агоністи рецептора GPR119 можна використати як терапевтичні засоби для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, а також для збільшення кісткової маси суб'єкта. Даний винахід оснований, щонайменше, частково, на несподіваному відкритті, зробленому заявником, яке полягає в тому, що введення агоніста GPR119 суб'єкту, таке як пероральне введення, може впливати на рецептор GPR119, збільшуючи рівень GIP у суб'єкта.

Термін "ліганд" в даному описі стосується молекули, (наприклад, сполуки, що тестується), яка специфічно зв'язується з поліпептидом, таким як GPR119. Ліганд може являти собою, наприклад, поліпептид, ліпід, низькомолекулярну сполуку, антитіло. Сполука 1 є типовим лігандом поліпептиду рецептора GPR119 (хімічна структура і хімічна назва сполуки 1 наведені в таблиці А). Сполука 1 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 2004/065380). (2-Фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін (див. таблицю А) є типовим лігандом поліпептиду рецептора GPR119. Сполука 2 є типовим лігандом поліпептиду рецептора GPR119. Сполука 2 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022417 (опублікованої як WO 2005/007658). Сполука 3 є типовим лігандом полі-

пептиду рецептора GPR119. Сполука 3 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 2005/007647). Ендогенний ліганд являє собою лі-

ганд, який є ендогенним, природним лігандом нативного поліпептиду, такого як GPR119. Ліганд може являти собою "антагоніст", "агоніст", "частковий агоніст", "зворотний агоніст" або т.п.

Таблиця А

| | |
|---|---|
|  | <p>(2-Фтор-4-метансульфонілфеніл)- {6-[4-(3-ізопропіл- [1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1- іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін</p> |
|---|---|

Термін "агоніст" в даному описі стосується засобу (наприклад, ліганду, сполуки, що тестується), який, зв'язуючись з GPCR, активує його і ініціює внутрішньоклітинну відповідь, опосередковану GPCR.

Термін "частковий агоніст" в даному описі стосується засобу (наприклад, ліганду, сполуки, що тестується), який, зв'язуючись з GPCR, активує його і ініціює внутрішньоклітинну відповідь, опосередковану GPCR, але в меншій мірі, або на більш низькому рівні, ніж повний агоніст.

Термін "антагоніст" стосується засобу (наприклад, ліганду, сполуки, що тестується), який зв'язується, переважно конкурентно, з GPCR приблизно по тій же ділянці, що і агоніст або частковий агоніст, але не викликає внутрішньоклітинну відповідь, що ініціюється активною формою GPCR, і, отже, може інгібувати внутрішньоклітинну відповідь під дією агоніста або часткового агоніста. Антагоніст звичайно не зменшує фонову внутрішньоклітинну відповідь за відсутності агоніста або часткового агоніста.

Термін "зворотний агоніст" стосується засобу (наприклад, ліганду, сполуки, що тестується), який зв'язується з GPCR і зменшує фонову внутрішньоклітинну відповідь, що ініціюється активною формою рецептора, до рівня нижче нормальної базової активності, що спостерігається за відсутності агоніста або часткового агоніста.

Термін "агоніст GPR119" в даному описі стосується сполуки, яка зв'язується з рецептором GPR119 і діє як агоніст. Сполука 1 є прикладом агоніста GPR119 (хімічна структура і хімічна назва сполуки 1 приведені в таблиці А). Сполука 1 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 2004/065380). (2-Фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін є прикладом агоніста GPR119. Сполука 2 є прикладом агоніста GPR119.

Сполука 2 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022417 (опублікованої як WO 2005/007658). Сполука 3 є прикладом агоніста GPR119. Сполука 3 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 2005/007647).

Термін "селективний агоніст GPR119" в даному описі стосується агоністу GPR119, що володіє вибірковістю по відношенню до рецептору GPR119 в порівнянні з одним або декількома родинними рецепторами, такими як рецептор кортикотропін-релізінг фактора-1 (CRF-1). Сполука 1 є прикладом селективного агоніста GPR119 (хімічна структура і хімічна назва сполуки 1 наведені в таблиці А). Сполука 1 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 2004/065380). (2-Фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін є прикладом селективного агоніста GPR119. Сполука 2 є прикладом селективного агоніста GPR119. Сполука 2 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022417 (опублікованої як WO 2005/007658). Сполука 3 є прикладом селективного агоніста GPR119. Сполука 3 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 2005/007647).

Термін "засіб, що посилює секрецію GTP" стосується засобу (наприклад, ліганду, сполуки, що тестується), який стимулює секрецію GIP в клітині, наприклад, в ентероендокринній клітині, або який збільшує рівень загального GIP, наприклад, рівень загального GIP в крові або плазмі, при введенні суб'єкту, такому як хребетне або ссавець. У деяких втіленнях засіб, що посилює секрецію GIP, являє собою сполуку, придатну для збільшення рівня загального GIP у суб'єкта, наприклад рівня загального GIP в крові або плазмі.

Термін "суб'єкт" в даному описі стосується хребетного і включає в себе, без обмеження, риб (таких як риби, що розводяться з комерційною метою, кімнатні риби і інш.), амфібій (таких як жаби, жаби, домашні амфібії і інш.), рептилій (таких як змії, ящірки, черепахи, домашні рептилії і інш.), птахів (таких як кури, індики, домашні птахи і інш.) і ссавців (таких як миші, щури, хом'яки, кролики, свині, собаки, кішки, коні, корови, вівці, кози, відмінні від людини примати, відмінні від людини ссавці, відмінні від людини домашні ссавці, люди і інш.). У деяких втіленнях суб'єкт являє собою рибу. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою амфібію. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою рептилію. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою птаха. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою індичку. Протягом останніх 25 років тиск комерційної селекції, спрямований на виведення індичок з підвищеною масою грудного м'яза, обумовлює зростання вимог по цілісності скелета. Однак, оскільки підвищення маси грудного м'яза не супроводжується компенсаторними змінами скелета, воно приводить до збільшення проблем, пов'язаних з ногами. Описані випадки переломів довгої трубчастої кістки у молодих дорослих самців індичок (див., наприклад, Crespo et al., Poult Sci (2000) 79:602-608). У деяких втіленнях суб'єкт являє собою ссавця. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою мишу, щура, хом'яка, кролика, свиню, собаку, кішку, коня, корову, вівцю, козла, відмінного від людини примату або людини (які можуть бути включені у втілення даного винаходу окремо або в будь-яких поєднаннях). У деяких втіленнях суб'єкт являє собою коня. У коней для виступів, що беруть участь в стрибках, виїздки і інших видах змагань, часто бувають переломи кісток. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою собаку або кішку. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою тварину-компаньйона людини (таку як собака, кішка і інш.), сільськогосподарську тварину (таку як корова, вівця, коза, свиня, курка і інш.), спортивну тварину (таку як кінь, собака і інш.), в'ючну тварину (така як мул, верблюд і інш.) або екзотичну тварину (такі як тварина, що знаходиться в зоопарку, і інш.), які можуть бути включені у втілення даного винаходу окремо або в будь-яких поєднаннях. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою відмінного від людини ссавця. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою відмінного від людини примата (такого як макаки-резус, шимпанзе і інш.). У деяких втіленнях суб'єкт являє собою людину.

Термін "потребуючий профілактики або лікування" в даному описі стосується суб'єкта, який по висновку особи, що здійснює догляд за хворими (наприклад, лікаря, медсестри, практикуючої медсестри, якщо суб'єкт являє собою людину; ветеринара, якщо суб'єкт являє собою відмінне від людини хребетне, в конкретному втіленні відмінний від людини ссавець), вимагає лікування, або на якого лікування може надати сприятливий вплив.

Термін "терапевтично ефективна кількість" або "терапевтично ефективна доза" в даному описі стосується кількості активної сполуки або фармацевтичного засобу, який викликає біологічну або медичну відповідь в тканині, системі, у тварини,

суб'єкта або людини, яку хоче досягнути дослідник, ветеринар, лікар або інший клініцист, і який включає в себе один або декілька з наступних ефектів:

(1) профілактика захворювання; наприклад, профілактика захворювання, стану або порушення у суб'єкта, який може бути схильним до захворювання, стану або порушення, але у якого ще не виявляється або не спостерігається патологія або симптоматика захворювання,

(2) придушення захворювання; наприклад, придушення захворювання, стану або порушення у суб'єкта, у якого виявляється або спостерігається патологія або симптоматика захворювання, стану або порушення (тобто припинення подальшого розвитку патології і/або симптоматики), і

(3) лікування захворювання; наприклад, лікування захворювання, стану або порушення у суб'єкта, у якого виявляється або спостерігається патологія або симптоматика захворювання, стану або порушення (тобто придання зворотного ходу патології і/або симптоматики).

Термін "терапевтична ефективність" в даному описі стосується отримаршя біологічної або медичної відповіді в тканині, системі, у тварини, суб'єкта або людини, яку хоче досягнути дослідник, ветеринар, лікар або інший клініцист, і який включає в себе один або декілька з наступних ефектів:

(1) профілактика захворювання; наприклад, профілактика захворювання, стану або порушення у суб'єкта, який може бути схильний до захворювання, стану або порушення, але у якого ще не виявляється або не спостерігається патологія або симптоматика захворювання,

(2) придушення захворювання; наприклад, придушення захворювання, стану або порушення у суб'єкта, у якого виявляється або спостерігається патологія або симптоматика захворювання, стану або порушення (тобто припинення подальшого розвитку патології і/або симптоматики), і

(3) лікування захворювання; наприклад, лікування захворювання, стану або порушення у суб'єкта, у якого виявляється або спостерігається патологія або симптоматика захворювання, стану або порушення (тобто придання зворотного ходу патології і/або симптоматики).

Термін "кількість, ефективна для профілактики" стосується кількості лікарського засобу, що запобігає або зменшує ризик біологічної або медичної події, якій потрібно запобігти. Часто кількість, ефективна для профілактики, дорівнює терапевтично ефективній кількості.

Термін "композиція" стосується речовини, яка включає в себе, щонайменше, один компонент.

Термін "активний інгредієнт" стосується будь-якого компонента, який володіє фармакологічною активністю або надає інший безпосередній ефект, пов'язаний з діагностикою, лікуванням, полегшенням, лікуванням або профілактикою захворювання.

Термін "фармацевтична композиція" стосується композиції, яка містить, щонайменше, один активний інгредієнт, який дозволяє використати композицію для дослідження і лікування ссавця.

Термін "фармацевтично прийнятний" стосується носіїв, середовищ, розріджувачів, наповнювачів і/або солей, які є сумісними з іншими інгредієнтами композиції і не надають шкідливого впливу на реципієнта.

Термін "лікарська форма" стосується фізичної форми, що містить лікарський засіб, такої як таблетка, капсула або препарат для ін'єкцій.

Термін "кістка" стосується щільної, напівжорсткої, пористої, кальцинованої з'єднувальної тканини, створюючої основну частину скелета більшості хребетних, яка містить щільну органічну основу і неорганічні мінеральні компоненти. Кісткою є будь-яка з анатомічно різних структур, що складають скелет хребетного.

Терміни "кісткова маса" і "мінеральна щільність кістки (МЩК)" в даному описі використовуються як взаємозамінні. МЩК у людей звичайно вимірюють за допомогою стандартного радіографічного методу, двоенергетичної рентгенівської абсорбціометри (DXA). Серед багатьох методів, розроблених для визначення МЩК, DXA є найбільш довершеним в технічному відношенні і найбільш перевіреним з біологічної точки зору. Метод DXA з відповідним чином адаптованим програмним забезпеченням також можна використати для надійного визначення МЩК у тварин. DXA використовують при діагностиці остеопорозу, прогнозуванні (схильності до переломів), реєстрації природної історії порушення і визначення відповіді на лікування.

Термін "зниження кісткової маси" в даному описі стосується будь-якого зменшення або зниження мінеральної щільності кістки (МЩК) у суб'єкта і включає в себе як остеопороз, так і остеопенію, відповідно до пропозиції Всесвітньої Організації Охорони здоров'я (ВОЗ). По визначенню ВОЗ нормальному стану відповідає значення МЩК, що знаходиться в межах однієї одиниці стандартного відхилення від типового значення молодого дорослого суб'єкта ($T\text{-показник} \geq -1$). ВОЗ визначає остеопенію як стан, при якому значення МЩК нижче типового значення для молодого дорослого суб'єкта більш ніж на 1 стандартне відхилення, але менше, ніж на 2,5 стандартних відхилень ($T\text{-показник} < -1$ і $> -2,5$). ВОЗ класифікує остеопороз як більш важку форму остеопенії і визначає його як стан, при якому значення МЩК нижче типового значення для молодого дорослого суб'єкта більш ніж на 2,5 стандартних відхилень ($T\text{-показник} < -2,5$) (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis, дана публікація включена в даний опис як посилання у всій повноті). Частіше остеопенію визначають як стан, при якому $T\text{-показник}$ менше -1 і більше -2 , а остеопороз визначають як стан, при якому $T\text{-показник}$ менше або дорівнює -2 . В деяких втіленнях даного винаходу $T\text{-показник}$ вимірюють в тазостегновому суглобі методом DXA.

Термін "остеопороз" в даному описі характеризується значенням МЩК нижче типового значення для молодого дорослого суб'єкта на 2 стандартних відхилення або більше ($T\text{-показник} < -2$), або стосується діагнозу, встановленого особою,

що здійснює догляд за хворими (наприклад, лікарем, медсестрою, практикуючою медсестрою, якщо суб'єкт являє собою людину; ветеринаром, якщо суб'єкт являє собою відмінне від людини хребетне).

Остеопороз можна класифікувати як первинний або вторинний (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis). У даному описі термін "остеопороз" охоплює первинний остеопороз і вторинний остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою первинний остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою вторинний остеопороз.

"Первинний остеопороз" відповідно до даного опису пов'язаний з менопаузою (природною, передчасною або хірургічною), старінням, або і з тим, і з іншим. Потрібно розуміти, що в даному винаході первинний остеопороз, пов'язаний з менопаузою (природною, передчасною або хірургічною), первинний остеопороз, пов'язаний зі старінням, і первинний остеопороз, пов'язаний з менопаузою і зі старінням, може входити в об'єм втілень окремо або в будь-яких поєднаннях.

"Вторинний остеопороз" в даному описі стосується остеопорозу, який пов'язаний не з менопаузою або старінням, а швидше з медичними станами або із застосуванням медичних препаратів або лікарських засобів. Підвищений ризик остеопорозу пов'язаний з множиною медичних станів, що включають в себе, без обмеження, ендокринні і метаболічні порушення і зловживання деякими препаратами і лікарських засобів, приклади яких добре відомі фахівцям в даній галузі (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis; Williams Textbook of Endocrinology, 10th Edition; зміст яких включений в даний опис як посилання у всій повноті). Вторинний остеопороз також може бути пов'язаний із зменшенням рухливості. Остеопороз, вторинний по відношенню до медичного стану, застосуванню медичного препарату або лікарського засобу, або зменшення рухливості, може діагностувати особа, що здійснює догляд за хворими (наприклад, лікар, медсестра, практикуюча медсестра, якщо суб'єкт являє собою людину; ветеринар, якщо суб'єкт являє собою відмінне від людини хребетне).

Під "переломом кістки" мається на увазі повний або частковий розрив, розлом або тріщина кістки. Діагностування переломів звичайно здійснюють на основі клінічного обстеження і результатів рентгенологічного аналізу. У даному винаході переломи кісток включають в себе, без обмеження, травматичні переломи, довготривалі переломи і патологічні переломи.

"Травматичний перелом" в даному описі стосується безпосереднього перелому, який включає в себе надпорогову травму внаслідок прикладення локального зусилля, що перевищує природну еластичність кістки. Такий перелом може супроводжуватися одночасним пошкодженням м'яких тканин і дуже часто шкіри. Травматичний перелом може бути закритим (сусідня м'яка тканина може бути

пошкоджена, але покривні тканини в основному зберігаються). Травматичний перелом може бути відкритим (кінці кістки в місці перелому оголюються внаслідок екстенсивного пошкодження м'якої тканини і патогени із зовнішнього середовища можуть проникати безпосередньо в рану).

"Довготривалий перелом" в даному описі стосується хронічного перелому, стомлювального перелому, маршової стопи або спонтанного перелому типу I.

"Патологічний перелом" в даному описі стосується спонтанного перелому типу II. Патологічний перелом виникає спонтанно, за відсутності травми, яка може бути його причиною. Кістка може бути заздалегідь пошкоджена внаслідок системного захворювання (такого як остеопороз, остеодистрофія або деформуючий остит Педжета) або локального пошкодження (такого як метастаз, променевий остеонекроз або пухлина кістки). Див. Adler, Claus-Peter, BONE DISEASES, p. 114 (Springer-Verlag, Germany 2000).

Переломи можуть включати в себе, без обмеження, косий торсійний перелом, поперечний перелом, осколковий перелом, компресійний перелом, перелом ребра, ковзний перелом і перелом шийки стегна (Adler, Claus-Peter, BONE DISEASES, Springer-Verlag, Germany (2000)).

У даному описі термін "стан, що характеризується низькою кістковою масою" включає в себе, без обмеження, остеопенію, остеопороз, ревматоїдний артрит, остеоартрит, періодонтальне захворювання, розрідження альвеолярної кістки, остеотомічне розрідження кістки, викривлення хребта і зменшення маси. У деяких втіленнях остеопороз являє собою первинний остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою вторинний остеопороз. У деяких втіленнях вторинний остеопороз пов'язаний з медичним станом. У деяких втіленнях вторинний остеопороз пов'язаний із застосуванням медичного препарату або лікарського засобу. У деяких втіленнях вторинний остеопороз пов'язаний із зменшенням рухливості. Стани, що характеризуються зниженням кісткової маси також включають в себе, без обмеження, хворобу Педжета, розрідження кістки внаслідок метастатичного раку і остеолітичні пошкодження, такі як пошкодження, викликані новоутворенням, променевою терапією або хіміотерапією. Стани, що характеризуються зниженням кісткової маси також включають в себе, без обмеження, довгострокові ускладнення остеопорозу, такі як викривлення хребта, втрата маси і наслідки протезної хірургії. Потрібно розуміти, що стани, що характеризуються зниженням кісткової маси, можуть входити в об'єм втілень даного винаходу окремо, або в будь-яких поєднаннях (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis; Williams Textbook of Endocrinology, 10th Edition, Larsen et al., Eds. (2002), W.B. Saunders Company; і Endocrinology and Metabolism, 4th Edition, Felig et al., Eds. (2001), McGraw-Hill Book Company; зміст яких включений в даний опис як посилання у всій повноті).

У даному описі термін "захворювання кістки" стосується порушення або стану, пов'язаного з аномалією кістки. Захворювання кісток, які можна лікувати за допомогою способу даного винаходу шляхом збільшення кісткової маси або зростання кістки, включають в себе, без обмеження, остеопенію, остеопороз, ревматоїдний артрит, остеоартрит, періодонтальне захворювання, розрідження альвеолярної кістки, остеотомічне розрідження кістки, дитяче ідіопатичне розрідження кістки, викривлення хребта і зменшення маси. У деяких втіленнях остеопороз являє собою первинний остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою вторинний остеопороз. У деяких втіленнях вторинний остеопороз пов'язаний з медичним станом. У деяких втіленнях вторинний остеопороз пов'язаний із застосуванням медичного препарату або лікарського засобу. У деяких втіленнях вторинний остеопороз пов'язаний із зменшенням рухливості. Захворювання кісток, які можна лікувати за допомогою способу даного винаходу шляхом збільшення кісткової маси або зростання кістки, включають в себе, без обмеження, хворобу Педжета і розрідження кістки внаслідок метастатичного, раку. Деструктивні порушення кістки, які можна лікувати за допомогою способу даного винаходу шляхом збільшення кісткової маси або зростання кістки, можуть входити в об'єм втілень даного винаходу окремо, або в будь-яких поєднаннях (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis; Williams Textbook of Endocrinology, 10th Edition, Larsen et al., Eds. (2002), W.B. Saunders Company; і Endocrinology and Metabolism, 4th Edition, Felig et al., Eds. (2001), McGraw-Hill Book Company; зміст яких включений в даний опис як посилання у всій повноті).

Способи лікування даного винаходу шляхом підвищення кісткової маси і зростання кістки також можна використати для прискорення зрощення кістки після лицьової хірургії, верхньощелепної хірургії, нижньощелепної хірургії, періодонтального захворювання або видалення зуба, прискорення подовження довгої кістки, прискорення зростання всередині протеза і прискорення зрощення кісток.

Термін "ендогенний" стосується речовини, яку в природі продукує суб'єкт (наприклад, без обмеження, людина). І навпаки, термін "неендогенний" стосується речовини, яку суб'єкт (наприклад, без обмеження, людина) в природі не продукує.

Термін "біологічно активний фрагмент" G-білок-зв'язаного рецептора, стосується фрагмента GPCR, що виконує структурні і біохімічні функції природного GPCR. У деяких втіленнях біологічно активний фрагмент зв'язаний з G-білком. У деяких втіленнях біологічно активний фрагмент зв'язується з відомим лігандом GPCR.

Термін "праймер" в даному описі стосується специфічної нуклеотидної послідовності, комплементарної цільовій нуклеотидній послідовності, яка використовується для гібридизації з цільовою нуклеотидною послідовністю. Праймер забезпечує точку ініціації полімеризації нуклеотидів, що каталізується ДНК-полімеразою, РНК-полімеразою або зворотною транскриптазою.

Термін "вектор експресії" стосується послідовності ДНК, необхідної для транскрипції клонованої ДНК і трансляції транскрибованої мРНК у відповідній рекомбінантній клітині-хазяїні, що містить вектор експресії. Відповідним чином сконструйований вектор експресії повинен містити точку початку реплікації, що забезпечує автономну реплікацію в клітинах-хазяях, маркери, що полегшують селекцію, невелике число відповідних ділянок ферментативної рестрикції, послідовність, що забезпечує високе число піків, і активні промотори. Клонована ДНК, що входить до складу вектора експресії і підлягає транскрипції, функціонально пов'язана з конститутивно активним промотором, або промотором, активність якого залежить від різних факторів.

Термін "клітина-хазяїн" стосується клітини, здатної містити вбудований в неї вектор. У контексті даного винаходу вектор звичайно містить нуклеїнову кислоту, що кодує GPCR або гібридний білок GPCR, функціонально пов'язану з послідовністю відповідного промотора, щоб забезпечити експресію GPCR або гібридного білка GPCR. У конкретному втіленні клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину. У деяких втіленнях еукаріотична клітина-хазяїн являє собою клітину ссавця. У деяких втіленнях еукаріотична клітина-хазяїн являє собою дріжджову клітину. У деяких втіленнях еукаріотична клітина-хазяїн являє собою мелянофор.

Термін "контакт" або "приведення в контакт" означає об'єднання, щонайменше, двох речовин.

Терміни "модулювати" або "модифікувати" відносяться до збільшення або зменшення кількості, якості або ефекту конкретної активності, функції або молекул. Як ілюстрація, але без обмеження, агоністи, часткові агоністи, зворотні агоністи і антагоністи G-білок-зв'язаного рецептора, можуть бути модуляторами рецептора. Термін "низкомолекулярна сполука" стосується сполуки, що має молекулярну масу менше ніж приблизно 10000 грамів на моль, і включає в себе пептид, пептидоміметик, амінокислоту, аналог амінокислоти, поліпептид, аналог поліпептиду, нуклеотид, аналог нуклеотиду, органічну сполуку або неорганічну сполуку (наприклад, що включає в себе гетероорганічну сполуку або органометалічну сполуку), а також солі, складні ефіри і інші фармацевтично прийнятні форми перерахованих сполук. У деяких втіленнях низкомолекулярні сполуки являють собою органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну масу менше ніж приблизно 5000 грамів на моль. У деяких втіленнях низкомолекулярні сполуки являють собою органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну масу менше ніж приблизно 1000 грамів на моль. У деяких втіленнях низкомолекулярні сполуки являють собою органі-

чні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну масу менше ніж приблизно 800 грамів на моль. У деяких втіленнях низкомолекулярні сполуки являють собою органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну масу менше ніж приблизно 600 грамів на моль. У деяких втіленнях низкомолекулярні сполуки являють собою органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну масу менше ніж приблизно 500 грамів на моль.

Скорочення, що використовуються в даному описі для позначення амінокислот, наведені в таблиці В:

Таблиця В

| | | |
|----------------------|-----|---|
| Аланін | ALA | A |
| Аргінін | ARG | R |
| Аспарагін | ASN | N |
| Аспарагінова кислота | ASP | D |
| Цистеїн | CYS | C |
| Глутамінова кислота | GLU | E |
| Глутамін | GLN | Q |
| Гліцин | GLY | G |
| Гістидін | HIS | H |
| Ізолейцин | ILE | I |
| Лейцин | LEU | L |
| Лізин | LYS | K |
| Метіонін | VET | M |
| Фенілаланін | PHE | F |
| Пролін | PRO | P |
| Серин | SER | S |
| Треонін | THR | T |
| Триптофан | TRP | W |
| Тірозин | TYR | Y |
| Валін | VAL | Y |

Термін "поліпептид" стосується полімеру з амінокислот, незалежно від довжини полімеру. Так, визначення поліпептиду охоплює пептиди, олігопептиди і білки. В об'єм даного терміну також входять, хоч спеціально і не вказуються, постекспресійні модифікації поліпептидів. Наприклад, поліпептиди, які містять ковалентно приєднані глікозильні групи, ацетильні групи, фосфатні групи, ліпідні групи і т.п., окремо входять в об'єм терміну поліпептид.

Термін "поліпептид" стосується послідовності РНК, ДНК, або гібридної послідовності РНК/ДНК, що містить більше одного нуклеотиду і що знаходиться в одноланцюжковій або двохланцюжковій формі. Поліпептиди даного винаходу можна отримати за допомогою будь-якого відомого способу, що включає в себе синтетичний спосіб, рекомбінантний спосіб, отримання *ex vivo*, або їх поєднання, а також з використанням будь-яких способів очищення, відомих в даній галузі.

Термін "антитіло" в даному описі охоплює моноклональне антитіло і поліклональне антитіло.

Термін "вторинний месенджер" стосується внутрішньоклітинної відповіді, яка продукується внаслідок активації рецептора. Вторинний месенджер може включати в себе, наприклад, інозитол 1,4,5-трифосфат (IP3), діацилгліцерин (DAG), циклічний АМФ (цАМФ), циклічний ГМФ (цГМФ), MAP-

кіназу активність, активність кінази-1 кінази MAPK/ERK (MEKK1) і Ca^{2+} . Активацію рецептора можна визначити шляхом вимірювання рівня вторинного месенджера.

Термін "функціонування рецептора" стосується будь-якої функції рецептора, що виконується у відповідь на отримання стимулу і опосередковує внутрішньоклітинний ефект, яка включає в себе регуляцію транскрипції генів, регуляцію притоку або відтоку іонів, здійснення каталітичної реакції і/або модулювання активності через G-білки, наприклад, індукування відповіді, опосередкованої вторинним месенджером.

Термін "стимулювати" або "стимуляція" в зв'язку з термінами "відповідь" або "функціонування рецептора" означає, що відповідь або функціонування рецептора посилюється в присутності сполуки в порівнянні з відповіддю або функціонуванням рецептора за відсутності сполуки.

Термін "інгібувати" або "інгібування" в зв'язку з термінами "відповідь" або "функціонування рецептора" означає, що відповідь або функціонування рецептора меншає в присутності сполуки в порівнянні з відповіддю або функціонуванням рецептора за відсутності сполуки.

Термін "ефективність сполуки" стосується здатності сполуки інгібувати або стимулювати функціонування рецептора в порівнянні зі спорідненістю зв'язування рецептора.

Термін "сполука, що тестується", що використовується як взаємозамінний з терміном "сполука-кандидат", стосується молекули (наприклад, і без обмеження, хімічної сполуки), що піддається процедурі скринінга.

Термін "конститутивно активний" відносно G-білок-зв'язаного рецептора означає, що G-білок-зв'язаний рецептор, володіє агоніст-незалежною активністю.

Термін "безпосередня ідентифікація" або "безпосередньо ідентифікований" в застосуванні до "сполуки, що тестується" означає скринінг сполуки проти G-білок-зв'язаного рецептора за відсутності відомого ліганду (наприклад, відомого агоніста) G-білок-зв'язаного рецептора.

Якщо пропонується діапазон значень, потрібно розуміти, що кожне проміжне значення, до десятої частки нижньої межі, якщо в контексті явно не вказано інакше, між верхнім і нижнім кордоном даного інтервалу, а також будь-яке інше вказане значення, або проміжне значення вказаного діапазону, входить в об'єм даного винаходу. Верхні і нижні кордони даних менших діапазонів можуть бути незалежно включені в більш маленькі діапазони і також входять в об'єм даного винаходу, з урахуванням всіх спеціально виключених кордонів вказаного діапазону. Якщо у вказаний діапазон включені одне або обидва граничних значення, даний винахід також охоплює діапазони, в які не входять одне або обидва із згаданих граничних значень.

A. Вступ

Нижченаведені розділи наведені з метою ілюстрації і не призначаються для обмеження, або не повинні тлумачитися як обмеження опису або формули винаходу, що додається.

B. Експресія рецептора

I. Поліпептиди GPCR, що представляють інтерес

GPCR даного винаходу може містити амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(a) амінокислот 1-335 SEQ ID NO: 2;

(b) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2;

(c) амінокислот 2-335 SEQ ID NO: 2, де GPCR не містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;

(d) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням зразка людської ДНК як матриці і специфічних праймерів SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4;

(e) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1;

(f) варіанту SEQ ID NO: 2;

(g) амінокислотної послідовності за пунктом (f), вибраної з групи, що складається з:

(i) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка, щонайменше, приблизно на 80% ідентична SEQ ID NO: 2; і

(ii) амінокислотної послідовності G-білок-зв'язаного рецептора, яка містить, щонайменше, 20 суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2;

(h) амінокислотної послідовності конститутивно активної версії G-білок-зв'язаного рецептора, описаної як SEQ ID NO: 2; і

(i) біологічно активного фрагмента будь-якої з послідовностей, описаних в пунктах (a)-(h).

У деяких втіленнях GPCR даного винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою ендogenousний G-білок-зв'язаний рецептор. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, і який являє собою ендogenousний G-білок-зв'язаний рецептор, є G-білок-зв'язаним рецептором ссавця. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою ендogenousний G-білок-зв'язаний рецептор, є рецептором GPR119 ссавця. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, полінуклеотидом, що кодується, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою алель SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, специфічно зв'язує сполуку I (хімічна структура і хімічна назва сполуки I наведені в таблиці A). У деяких втіленнях G-білок-

зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 50 мкМ, менше ніж приблизно 25 мкМ, менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, являє собою а рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях G-білок-зв'язаний рецептор, що кодується полінуклеотидом, який можна ампліфікувати методом полімеразної ланцюгової реакції, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких вті-

леннях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях людська ДНК являє собою геномну ДНК.

У деяких втіленнях полімеразна ланцюгова реакція являє собою полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Методи ЗТ-ПЛР добре відомі кваліфікованим фахівцям. У деяких втіленнях людська ДНК являє собою людську кДНК, отриману з тканини або клітини, що експресує GPR119. У деяких втіленнях людська тканина, яка експресує GPR119, являє собою підшлункову залозу або панкреатичний острівцев. У деяких втіленнях кДНК отримують з людської клітини, що експресує GPR119. У деяких втіленнях кДНК отримують з лінії бета-клітин підшлункової залози.

У деяких втіленнях GPCR даного винаходу є рекомбінантним. У деяких втіленнях рекомбінантний GPCR являє собою рекомбінантний людський GPR119.

У деяких втіленнях GPCR, який можна використати в способах, що пропонуються, володіє детектованим рівнем конститутивної активності.

У деяких втіленнях GPCR даного винаходу є ендегенним. У деяких втіленнях GPCR даного винаходу являє собою GPR119 ссавця. У деяких втіленнях ендегенний GPCR даного винаходу являє собою GPR119 ссавця.

Як ілюстрація, але не для обмеження, здійснюють делецію N-кінцевого залишку метіоніну з метою отримання біологічно активного фрагмента, придатного для використання в даному винаході. У деяких втіленнях біологічно активний фрагмент даного винаходу являє собою фрагмент, необов'язково сполучений по N-кінцю з пептидом, що містить N-кінцевий залишок метіоніну і маркер епітопа НА (з гемагглютиніну вірусу грипу), який специфічно зв'язує сполуку 1. В деяких втіленнях біологічно активний фрагмент даного винаходу являє собою фрагмент, необов'язково сполучений по N-кінцю з пептидом, що містить N-кінцевий залишок метіоніну і маркер епітопа НА (з гемагглютиніну вірусу грипу), який специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін. У деяких втіленнях біологічно активний фрагмент даного винаходу являє собою фрагмент, необов'язково сполучений по N-кінцю з пептидом, що містить N-кінцевий залишок метіоніну і маркер епітопу НА, який специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфоніл феніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 50 мкМ, менше ніж приблизно 25 мкМ, менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях біологічно активний фрагмент даного винаходу являє собою фрагмент, необов'язково сполучений по N-кінцю з пептидом, що містить N-кінцевий залишок метіоніну і маркер епітопу НА (з гемагглютиніну

вірусу грипу), який специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 50 мкМ, менше ніж приблизно 25 мкМ, менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях біологічно активний фрагмент даного винаходу являє собою фрагмент, необов'язково сполучений по N-кінцю з пептидом, що містить N-кінцевий залишок метіоніну і маркер епітопу HA, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін, що зв'язується з вказаним фрагментом, необов'язково сполученим по N-кінцю з вказаним пептидом, зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях біологічно активний фрагмент даного винаходу являє собою фрагмент, необов'язково сполучений по N-кінцю з пептидом, що містить N-кінцевий залишок метіоніну і маркер епітопу HA, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін, що зв'язується з вказаним фрагментом, необов'язково сполученим по N-кінцю з вказаним пептидом, зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях біологічно активний фрагмент даного винаходу являє собою фрагмент, необов'язково сполучений по N-кінцю з пептидом, що містить N-кінцевий залишок метіоніну і маркер епітопу HA, який володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях, конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях, конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах. У деяких втіленнях фрагмент сполучений по N-кінцю з пептидом, що складається в основному з N-кінцевого залишку метіоніну і маркера епітопу HA. Способи з'єднання пептиду, що містить в основному N-кінцевий залишок метіоніну і маркер епітопу HA, з N-кінцем фрагмента поліпептиду добре відомі в даній галузі, крім того, такі гібридні поліпептиди є в продажу (наприклад, від Clontech, Mountain View, CA).

Об'єм даного винаходу включає в себе алельний варіант людського GPR119 з послідовністю SEQ ID NO: 2. Людський GPR119 також входить в об'єм даного винаходу.

Варіант, який являє собою присутній у хребетних ортолог людського GPR119 з послідовністю SEQ ID NO: 2, входить в об'єм даного винаходу. Варіант, який являє собою присутній у ссавців ортолог людського GPR119 з послідовністю SEQ ID NO: 2, входить в об'єм даного винаходу. Наприклад, об'єм даного винаходу може включати в себе, без обмеження, мишачий GPR119 (наприклад, GenBank®, № доступу AY288423), щурячий GPR119 (GenBank®, № доступу AAN95195), GPR119 хом'яків, собачий GPR119 і GPR119 відмінних від людини приматів.

У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою GPCR.

Варіант, ідентичний SEQ ID NO: 2, щонайменше, приблизно на 80%, щонайменше, приблизно на 85%, щонайменше, приблизно на 90%, щонайменше, приблизно на 95%, щонайменше, приблизно на 96%, щонайменше, приблизно на 97%, щонайменше, приблизно на 98%, або, щонайменше, приблизно на 99%, входить в об'єм даного винаходу. У деяких втіленнях варіант, ідентичний SEQ ID NO: 2, щонайменше, приблизно на 80%, щонайменше, приблизно на 85%, щонайменше, приблизно на 90%, щонайменше, приблизно на 95%, щонайменше, приблизно на 96%, щонайменше, приблизно на 97%, щонайменше, приблизно на 98%, або, щонайменше, приблизно на 99%, являє собою GPCR. У деяких втіленнях, варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ендогенний GPCR. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою не ендогенний GPCR. У деяких втіленнях, варіант SEQ ID NO: 2, який є ендогенним GPCR, являє собою GPCR ссавця. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує сполуку 1. В деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 50 мкМ, менше ніж приблизно 25 мкМ, менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними

описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях, конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях, конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах. Процент ідентичності можна визначити традиційним способом з використанням відомих комп'ютерних програм.

У деяких втіленнях варіант GPCR, який можна використати в способах, що описуються, має амінокислотну послідовність, ідентичну SEQ ID NO: 2, щонайменше, приблизно на 80%, щонайменше, приблизно на 85%, щонайменше, приблизно на 90%, щонайменше, приблизно на 95%, щонайменше, приблизно на 96%, щонайменше, приблизно на 97%, щонайменше, приблизно на 98%, або, щонайменше, приблизно на 99%. Якщо варіант GPCR "ідентичний" SEQ ID NO: 2, наприклад, на 95%, це означає, що амінокислотна послідовність варіанту ідентична амінокислотам 1-335 SEQ ID NO: 2, але може містити до п'яти амінокислотних змін на кожні 100 амінокислот SEQ ID NO: 2. Так, наприклад, амінокислотну послідовність, ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2, щонайменше, на 95%, можна отримати шляхом вставки, делеції або заміни на інші залишки до 5% (5 з 100) амінокислотних залишків в порівнянні з амінокислотами 1-335 SEQ ID NO: 2. Дані зміни можна здійснювати по аміно- або карбокси-кінцю, або в будь-якій ділянці між кінцевими положеннями, або врозкид, або в одному або декількох суміжних положеннях послідовності.

У деяких втіленнях варіант G-білок-зв'язаного рецептора, який можна використати в способах, що описуються, являє собою G-білок-зв'язаний рецептор, що має амінокислотну послідовність, отриману з SEQ ID NO: 2 шляхом делеції, заміни і/або додання однієї або декількох амінокислот. У деяких втіленнях варіант G-білок-зв'язаного рецептора, який можна використати в способах, що описуються, являє собою G-білок-зв'язаний рецептор, що має амінокислотну послідовність, отриману з SEQ ID NO: 2 шляхом здійснення в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2 не більше за 10 консервативних амінокислотних заміни і/або не більше за 3 неконсервативних амінокислотних заміни. У деяких втіленнях аргінін, лізин і гістидин

можуть консервативно замінювати один одне; глутамінова кислота і аспарагінова кислота можуть консервативно замінювати одна одну; глутамін і аспарагін можуть консервативно замінювати один одне; лейцин, ізолейцин і валін можуть консервативно замінювати один одне; фенілаланін, триптофан і тирозин можуть консервативно замінювати один одне; і гліцин, аланін, серин, треонін і метіонін можуть консервативно замінювати один одне. Заміни, делеції і додання амінокислот можна здійснювати по будь-якому положенню (наприклад, по С- або N-кінцю, або в проміжних положеннях). У деяких втіленнях варіант являє собою ендогенний G-білок-зв'язаний рецептор. У деяких втіленнях варіант являє собою ендогенний G-білок-зв'язаний рецептор хребетного. У деяких втіленнях варіант являє собою ендогенний G-білок-зв'язаний рецептор ссавця. У деяких втіленнях варіант являє собою ендогенний людський G-білок-зв'язаний рецептор. У деяких втіленнях варіант являє собою не ендогенний G-білок-зв'язаний рецептор. У деяких втіленнях варіант володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах. У деяких втіленнях вказаний G-білок-зв'язаний рецептор, що має амінокислотну послідовність, отриману з SEQ ID NO: 2, являє собою G-білок-зв'язаний рецептор, лігандом якого є сполука 1. В деяких втіленнях вказаний G-білок-зв'язаний рецептор, що має амінокислотну послідовність, отриману з SEQ ID NO: 2, являє собою G-білок-зв'язаний рецептор, лігандом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 50 мкМ, менше ніж приблизно 25 мкМ, менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях вказаний G-білок-зв'язаний рецептор, що має амінокислотну послідовність, отриману з SEQ ID NO: 2, являє собою G-білок-зв'язаний рецептор, агоністом якого є сполука 1. В деяких втіленнях вказаний G-білок-зв'язаний рецептор, що має амінокислотну послідовність, отриману з SEQ ID NO: 2, являє собою G-білок-зв'язаний рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ.

Варіант SEQ ID NO: 2, що являє собою G-білок-зв'язаний рецептор, який містить, щонайменше 20, щонайменше 30, щонайменше 40, щонай-

менше 50, щонайменше 75, або щонайменше 100, суміжних амінокислот послідовності SEQ ID NO: 2, входить в об'єм даного винаходу. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2, який містить, щонайменше 20, щонайменше 30, щонайменше 40, щонайменше 50, щонайменше 75, або, щонайменше 100, суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2, являє собою GPCR. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою ендogenous GPCR. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою не ендogenous GPCR. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2, ендogenous GPCR, що є, являє собою GPCR ссавця. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує сполуку 1. В деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 50 мкМ, менше ніж приблизно 25 мкМ, менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциюіазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілагциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях варіант SEQ ID NO: 2 володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутріш-

ньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах. У деяких втіленнях G-білок зв'язаний рецептор, який містить, щонайменше 20, щонайменше 30, щонайменше 40, щонайменше 50, щонайменше 75, або, щонайменше 100, суміжних амінокислот SEQ ID NO: 2 володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях варіант GPCR, який можна використати в способах, що описуються, являє собою GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою ендogenous GPCR. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою не ендogenous GPCR. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, і ендogenous GPCR, що є, являє собою ендogenous GPCR ссавця. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою SEQ ID NO: 2 або його алель. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою ортолог SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, специфічно зв'язує сполуку 1. В деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридизується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 50 мкМ, менше ніж приблизно 25 мкМ, менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях GPCR,

що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, специфічно зв'язує (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 12 аналізу зв'язування рецептора складає менше ніж приблизно 10 мкМ, менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 500 нМ, менше ніж приблизно 100 нМ, або менше ніж приблизно 50 нМ. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 5 мкМ, менше ніж приблизно 1 мкМ, менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, являє собою рецептор, агоністом якого є (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-{6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл}амін, що зв'язується з вказаним рецептором зі значенням IC_{50} , яке за даними описаного в прикладі 8 аденілатциклазного аналізу на цілих клітинах складає менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, або менше ніж приблизно 1 нМ. У деяких втіленнях GPCR, що кодується полінуклеотидом, який гібридується в умовах високої жорсткості з послідовністю, комплементарною SEQ ID NO: 1, володіє детектованим рівнем конститутивної активності. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах. Способи гібридизації добре відомі кваліфікованим фахівцям. У деяких втіленнях жорсткі умови гібридизації (наприклад, умови високої жорсткості) включають в себе інкубацію протягом ночі при 42°C в розчині, що містить: 50% формамід, 5×SSC (1×SSC=150 mM NaCl, 15 mM тринатрію цитрат), 50 mM фосфат натрію (pH 7,6), 5х розчин Денхардта, 10% сульфат декстрану і 20 мкг/мл денатурованої, деградованої ДНК сперми лосося; з подальшим промиванням фільтра розчином, що містить 0,1×SSC, приблизно при 65°C. В деяких втіленнях, жорсткі умови гібридизації (наприклад, умови високої жорсткості) включають в себе інкубацію протягом ночі при 42°C в розчині, що містить: 50% формамід, 5×SSC (1×SSC=150 mM NaCl, 15 mM тринатрію цитрат), 50 mM фосфат натрію (pH 7,6),

5х розчин Денхардта, 10% сульфат декстрану і 20 мкг/мл денатурованої, деградованої ДНК сперми лосося; з подальшим промиванням 0,1×SSC/0,1% SDS (додецилсульфат натрію) або 0,2×SSC/0,1% SDS, приблизно при 50°C, приблизно при 55°C, приблизно при 60°C або приблизно при 65°C. В деяких втіленнях вказані умови високої жорсткості включають в себе промивання при 65°C розчином, що містить 0,1×SSC. В деяких втіленнях вказані умови високої жорсткості включають в себе промивання приблизно при 50°C, приблизно при 55°C, приблизно при 60°C або приблизно при 65°C розчином, що містить 0,1×SSC/0,1% SDS або 0,2×SSC/0,1% SDS.

У деяких втіленнях GPCR, придатний для використання в описуваних способах являє собою не ендогенний, конститутивно активований рецептор, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, де лейцин в амінокислотному положенні 224 послідовності SEQ ID NO: 2 замінений на амінокислоту, відмінну від лейцина. У деяких втіленнях амінокислота, відмінна від лейцину, являє собою лізин. У деяких втіленнях амінокислота, відмінна від лейцину, являє собою аланін. У деяких втіленнях амінокислота, відмінна від лейцину, являє собою аргінін. У деяких втіленнях амінокислота, відмінна від лейцину, являє собою гістидин. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях GPCR даного винаходу включає в себе конститутивно активну версію G-білок-зв'язаного рецептора, маючу послідовність SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях конститутивно активна версія рецептора являє собою ендогенну конститутивно активну версію, що має послідовність SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях конститутивно активна версія рецептора являє собою не ендогенну конститутивно активну версію, несучу мутацію в амінокислотному положенні 224 послідовності SEQ ID NO: 2. У деяких втіленнях мутація залишку являє собою заміну на залишок, відмінний від лейцину. У деяких втіленнях мутація залишку являє собою заміну на залишок лізину. У деяких втіленнях мутація залишку являє собою заміну на залишок аланіну. У деяких втіленнях мутація залишку являє собою заміну на залишок аргініну. У деяких втіленнях мутація залишку являє собою заміну на залишок гістидину. У деяких втіленнях конститутивна активність спрямована на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У деяких втіленнях конститутивна активність викликає диспергування пігменту в меланофорах.

У деяких втіленнях GPCR даного винаходу і G-білок утворюють гібридний білок.

а. Ідентичність послідовності

У деяких втіленнях процент ідентичності визначають за допомогою програмного забезпечення Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST"), добре відомого в даній галузі [див., наприклад, Karlin and Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-2268; Altschul et al., J Mol Biol (1990) 215:403-410; Altschul et al., Nature Genetics (1993) 3:266-272; and

Altschul et al., *Nucleic Acids Res* (1997) 25:3389-3402; зміст яких включений в даний опис як посилання у всій повноті]. У програмах BLAST можна використати параметри за умовчанням або параметри, модифіковані користувачем. Переважно використовують параметри за умовчанням.

У деяких втіленнях переважний спосіб визначення найкращої загальної відповідності послідовності, що досліджується, (наприклад, амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2) і послідовності, що запитується з бази даних, який також називається глобальним вирівнюванням послідовності, можна здійснювати за допомогою комп'ютерної програми FASTDB на основі алгоритму Brutlag et al. (*Comp App Biosci* (1990) 6:237-245; зміст якого включений в даний опис як посилання у всій повноті). При вирівнюванні і послідовність, що досліджується, і послідовність, що запитується, є амінокислотними послідовностями. За допомогою вказаного глобального вирівнювання послідовностей визначають процент ідентичності. У програмі FASTDB для амінокислотного вирівнювання переважно використовуються наступні значення параметрів: матриця = PAM 0, розмір слова (k-tuple) = 2, штраф за неспівпадання = 1, штраф за з'єднання = 20, група рандомізації = 25, довжина = 0, бал відсікання Cutoff Score = 1, розмір вікна = довжині послідовності, штраф за відкриття пропуску = 5, штраф за розмір пропуску = 0,05, розмір вікна = 247 або довжині відомої амінокислотної послідовності, незалежно від того, яка послідовність коротше. Якщо послідовність, що запитується, коротше від тієї, що досліджується, внаслідок N- або C-кінцевої, але не внутрішніх, делецій, отриманий процент ідентичності потрібно відкоректувати вручну, оскільки програма FASTDB не враховує N- і C-кінцеве усікання послідовності, що запитується, при розрахунку процента глобальної ідентичності. Якщо послідовності, що запитуються, зрізані по N- і C-кінцю в порівнянні з послідовністю, що досліджується, процент ідентичності коректують шляхом розрахунку числа залишків поверхні, що досліджується, які є N- і C-кінцевими послідовностями, що запитується, і які не співпадають/вирівнюються з відповідними залишками послідовності, що запитується, у вигляді процента від загального числа залишків послідовності, що запитується. Збіг/вирівнювання залишку визначають за результатами вирівнювання послідовностей з допомогою FASTDB. Потім даний процент віднімають з процента ідентичності, розрахованого за допомогою вищезгаданої програми FASTDB з використанням вказаних параметрів, і отримують кінцеве значення процента ідентичності. Дане кінцеве значення процента ідентичності використовують з метою даного винаходу. Тільки залишки на N- і C-кінці послідовності, що запитується, які не співпадають/вирівнюються із залишками послідовності, що досліджується, враховуються при ручному коректуванні значення процента ідентичності. Тобто, тільки залишки амінокислотної послідовності, що досліджується, що знаходяться поза самими крайніми N- і C-кінцевими залишками послідовності, що запитується.

Наприклад, щоб визначити процент ідентичності, 90 амінокислотний залишок послідовності, що запитується, вирівнюють із 100 залишком послідовності, що досліджується. На N-кінці послідовності, що запитується, присутня делеція і, отже, вирівнювання з допомогою FASTDB не дозволяє визначити збіг/проведену вирівнювання з першими залишками N-кінця. 10 непарних залишків становлять 10% послідовності (число не співпадаючих залишків на N- і C-кінцях/загальне число залишків послідовності, що досліджується), тому 10% віднімають із значенням процента ідентичності, розрахованого за допомогою програми FASTDB. Якщо інші 90 залишків повністю співпадають, кінцевий процент ідентичності становить 90%. В іншому прикладі 90 залишок послідовності, що запитується, порівнюють із 100 залишком послідовності, що досліджується. На цей раз дслеци знаходяться на внутрішніх ділянках, тому на N- або C-кінці послідовності, що запитується, відсутні ділянки, які не співпадають/вирівнюються з ділянками послідовності, що досліджується. У цьому випадку процент ідентичності, розрахований з допомогою FASTDB, вручну не коректують. Знову ж, тільки положення залишків, що знаходяться поза N- і C-кінцевими областями послідовності, що аналізується, виявлені при вирівнюванні з допомогою FASTDB, які не співпадають/вирівнюються з ділянками послідовності, що досліджується, коректують вручну. З метою даного винаходу інші корекції не проводять.

b. Гібридні білки

У деяких втіленнях представляючий інтерес поліпептид є гібридним білком і може містити, наприклад, домен афінного маркера або репортерний домен. Відповідні афінні маркери включають в себе будь-які амінокислотні послідовності, які можуть специфічно зв'язуватися з іншим фрагментом, звичайно, з іншим поліпептидом, частіше за все, з антитілом. Відповідні афінні маркери добре відомі в даній галузі і включають в себе епітопні маркери, наприклад, маркер V5, маркер FLAG, маркер HA (з гемагглютиніну вірусу грипу), маркер тус і т.п. Як відомо в даній галузі, відповідні афінні маркери також включають в себе домени, що зв'язуються з відомими субстратами, наприклад, маркери HIS, GST і MBP, і домени інших білків, мають комерційно доступних специфічних партнерів по зв'язуванню, наприклад, антитіла, особливо, моноклональні антитіла. Відповідні афінні маркери також включають в себе будь-які домени, що беруть участь в білках-білковій взаємодії, такі як ділянка Fc IgG, яку можна детектувати після зв'язування з відповідним партнером, наприклад рецептором Fc IgG. Спеціально передбачається, що такий гібридний білок може містити гетерологічний N-кінцевий домен (наприклад, епітопний маркер), з'єднаний в рамці читування з GPCR, в якого N-кінцевий залишок метіоніну видалений або замінений на альтернативну амінокислоту.

Відповідні репортерні домени включають в себе будь-які домени, які можуть вказувати на присутність поліпептиду. Хоча відомо, що для виявлення присутності поліпептиду можна використати афінний маркер, наприклад, мічене антитіло, яке

специфічно зв'язується з міткою, частіше використовують світловипромінювальні репортерні домени. Відповідні світловипромінювальні репортерці домени включають в себе люциферазу (наприклад, з жука-світляка, *Vargula*, *Renilla reniformis* або *Renilla muelleri*) або її світловипромінювальні варіанти. Інші відповідні репортерні домени включають в себе флуоресцентні білки (наприклад, з медуз, коралів і інших кишечнополосних, таких як види *Aequoria*, *Renilla*, *Ptilosarcus*, *Stylatula*) або їх світловипромінювальні варіанти. Світловипромінювальні варіанти вказаних репортерних білків добре відомі в даній галузі, вони можуть мати більш яскраве або більш темне випромінювання, ніж природний репортерний білок, або інший спектр збудження і/або емісії. Наприклад, деякі варіанти після зміни мають не зелене, а синіше, блакитне, жовте, яскраве жовте або червоне (звані BFP, CFP, YFP eYFP і RFP, відповідно) випромінювання, або мають інший спектр емісії, як відомо в даній галузі. Інші відповідні репортерні домени включають в себе домени, які можуть вказувати на присутність поліпептиду за допомогою біохімічної або колірної зміни, такі як β -галактозидаза, β -глюкуронідаза, хлорамфенікол ацетилтрансфераза і секретована ембріональна лужна фосфатаза.

У даній галузі також відомо, що афінні маркери або репортерні домени можуть бути присутніми в будь-якому положенні поліпептиду, що представляє інтерес. Однак в більшості втілень вони присутні в С- або N-кінцевій області поліпептиду, що представляє інтерес.

2. Нуклеїнові кислоти, що кодують поліпептиди GPCR, що представляють інтерес

Оскільки генетичний код і способи рекомбінації нуклеїнових кислот відомі, а амінокислотні послідовності поліпептидів GPCR, що представляють інтерес, описані, як вказано вище, конструювання і отримання нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди GPCR, що представляють інтерес, знаходиться в сфері компетенції фахівців даної галузі. У деяких втіленнях використовують стандартні способи рекомбінації ДНК (Ausubel, et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor). Наприклад, послідовності, що кодують GPCR, можна виділити з бібліотеки GPCR-кодуючих послідовностей з використанням будь-якого рекомбінантного способу, або поєднання декількох рекомбінантних способів, які немає необхідності описувати в даному документі. Подальші заміни, делеції і/або додання нуклеотидів в нуклеотидній послідовності, що кодує білок, також можна здійснити за допомогою стандартних методів рекомбінантних ДНК. Наприклад, для введення/делеції/заміни нуклеотидних залишків в полінуклеотиді, що кодує представляючий інтерес поліпептид, можна використати направлений мутагенез і субклонування. В інших втіленнях можна використати метод ПЛР. Нуклеїнові кислоти, що кодують представляючий інтерес поліпептид, також можна отримати шляхом повного хімічного синтезу або хімічного синтезу з олігонуклеотидів (наприклад, Cello et al., *Science* (2002) 297: 1016-

8). У деяких втіленнях кодони нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди, що представляють інтерес, оптимізують для експресії в клітинах конкретних видів, зокрема, видів ссавців, таких як миша, щур, хом'як, відмінний від людини примат або людина. У деяких втіленнях кодони нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди, що представляють інтерес, оптимізують для експресії в клітинах конкретних видів, зокрема, видів амфібій.

а. Вектори

Далі даний винахід пропонує вектори (які також називаються "конструкції"), що містять нуклеїнову кислоту, що досліджується. У різних втіленнях даного винаходу послідовності нуклеїнової кислоти, що досліджується, функціонально пов'язані з послідовністю, регулюючою експресію, що включає в себе, наприклад, промотор, експресують в хазяїні. Нуклеїнові кислоти, що досліджуються, звичайно вміщують у вектор експресії, який здатний реплікуватися в клітині-хазяїні або у вигляді епісоми, або у вигляді складового елемента хромосомальної ДНК хазяїна. Вектори експресії часто містять маркери селекції, наприклад, гени стійкості до тетрацикліну або неоміцину, щоб забезпечити детекцію клітин, трансформованих бажаними послідовностями ДНК (див., наприклад, патент США № 4704362, який включений в даний опис як посилання). Вектори, в тому числі одинарні і подвійні касетні вектори експресії, добре відомі в даній галузі (Ausubel, et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Відповідні вектори включають в себе вірусні вектори, плазміди, косміди, штучні хромосоми (людські штучні хромосоми, бактерійні штучні хромосоми, дріжджові штучні хромосоми і інш.), міні-хромосоми і т.п. Можна використати ретровірусні, аденовірусні і адено-асоційовані вектори.

Для продукування поліпептида, що представляє інтерес, в клітині можна використати ряд векторів експресії, які включають в себе комерційно доступні вектори експресії (наприклад, що поставляються Invitrogen, Carlsbad, CA; Clontech, Mountain View, CA; Stratagene, La Jolla, CA).

Комерційно доступні вектори експресії включають в себе, без обмеження, вектори, що містять промотор CMV. Відповідним вектором експресії є pCMV. Вектор експресії може бути аденовірусним. Типовий аденовірусний вектор можна отримати у вигляді AdEasyTM від Qbiogene (Carlsbad, CA) (He TC et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95: 2509-2514; і патент США № 5922576; зміст кожної з вказаних публікацій включений в даний опис як посилання у всій повноті). Інші відповідні вектори експресії можуть бути легко вибрані рядовим фахівцем в даній галузі.

Нуклеїнові кислоти, що розглядаються, звичайно містять одну відкриту рамку читання, що кодує досліджуваний поліпептид, що представляє інтерес, однак в деяких втіленнях, якщо клітина-хазяїн, що використовується для експресії поліпептида, що представляє інтерес, являє собою еукаріотичну клітину, наприклад, клітину ссавця, таку як людська клітина, відкрита рамка читання

може уриватися інтронами. Нуклеїнові кислоти, що досліджуються, звичайно є частиною одиниці транскрипції, яка може містити крім нуклеїнової кислоти, що досліджується 3'- і 5'-нетрансльовані ділянки (UTR), контролюючи стабільність РНК, ефективність трансляції і інш. Нуклеїнова кислота, що досліджується, також може бути частиною касети експресії, яка містить, крім нуклеїнової кислоти, що досліджується, промотор, контролюючий транскрипцію і експресію поліпептида, що представляє інтерес, і термінатор транскрипції.

Еукаріотичними промоторами можуть бути будь-які промотори, що функціонують в еукаріотичній клітині-хазяїні, в тому числі вірусні промотори і промотори еукаріотичних генів. Приклади еукаріотичних промоторів включають в себе, без обмеження: промотор генної послідовності мишачого металотіонеїну I (Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288, 1982); промотор ТК вірусу герпеса (McKnight, Cell 31:355-365, 1982); ранній промотор SV40 (Benoist et al., Nature (London) 290: 304-310, 1981); промотор генної послідовності дріжджового gall (Johnston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975, 1982); Silver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:5951-5955, 1984), промотор CMV, промотор EF-1, екдизон-чутливий промотор(и), тетрациклін-чутливий промотор і т.п. Вірусні промотори можуть представляти особливий інтерес, оскільки вони, як правило, є високоефективними. У деяких втіленнях використовують промотор патогена-мішені. У даному винаході використовують промотори, які можуть функціонувати в клітинах (і/або тварин), в які їх вводять. У деяких втіленнях промотор являє собою промотор CMV.

У деяких втіленнях вектор також може забезпечувати експресію маркера селекції. Відповідні вектори і маркери селекції добре відомі в даній галузі і описані в Ausubel, et al., (Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995) і Sambrook, et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (2001) Cold Spring Harbor, N.Y.). Як маркери селекції використовують ряд різних генів, причому вибір конкретного гена, що використовується у векторах, що розглядаються як маркер селекції, залежить від зручності. Відомі гени маркерів селекції включають в себе: ген тимідинкінази, ген дигідрофолатредуктази, ген ксантин-гуанінфосфорибозилтрансферази, CAD, ген аденозиндеамінази, ген аспарагінсинтетази, гени стійкості до антибіотиків, наприклад tetr, ampr, Cm^r або cat, kanr або neor (гени аміноглікозидфосфотрансферази), ген гідроміцин В-фосфотрансферази і т.п. Як вказано вище, поліпептиди, що представляють інтерес, можуть являти собою гібридні білки, які містять афінний домен і/або репортерний домен. Способи отримання гібридів репортера або маркера і GPCR, наприклад, по С- або N-кінцю GPCR, знаходяться в компетенції фахівців в даній галузі (наприклад, McLean et al., Mol. Pharma. Mol. Pharmacol. 1999 56:1182-91; Ramsay et al., Br. J. Pharmacology, 2001, 315-323) і в даному документі детально не описуються. Спеціально передбачається, що такий гібридний білок може містити гетерологічний N-кінцевий домен (наприклад, епітопний маркер), сполучений в рамці зчитування з

GPCR, у якого N-кінцевий залишок метіоніну видалений або замінений на альтернативну амінокислоту. Представляючий інтерес поліпептид спочатку може бути отриманий з нативного поліпептиду і потім функціонально пов'язаний з відповідним описаним вище репортером/маркером.

Нуклеїнові кислоти, що розглядаються, також можуть містити ділянки рестрикції, декілька ділянок клонування, ділянки зв'язування праймерів, ліговані кінці, центри рекомбінації і інш., які звичайно розташовані так, щоб забезпечити конструювання нуклеїнової кислоти, що кодує представляючий інтерес поліпептид.

b. Клітини-хазяї

Даний винахід також пропонує клітини-хазяї, що містять вектор, до складу якого входить нуклеїнова кислота, що досліджується. Відповідні клітини-хазяї включають в себе прокаріотичні, наприклад, бактерійні клітини (наприклад, E. coli), а також еукаріотичні клітини, наприклад, клітини тварин (такі як клітини комах, ссавців, риб, амфібій, птахів або рептилій), клітини рослин (такі як клітини кукурудзи або Arabidopsis) або клітини грибів (такі як клітини S. cerevisiae). У деяких втіленнях як клітину-хазяїна можна використати будь-яку клітину, відповідну для експресії нуклеїнової кислоти, що кодує представляючий інтерес поліпептид. Звичайно використовують лінії тваринних клітин-хазяїв, прикладами яких є: клітини нирки мавпи (клітини COS), клітини нирки мавпи CV1, трансформовані SV40 (COS-7, ATCC CRL 165 1); клітини нирки людського ембріона (HEK-293 ["293"], Graham et al. J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клітини HEK-293T ["293T"]; клітини нирки дитинча хом'яка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216, (1980); клітини сірийського золотого хом'ячка MCB3901 (ATCC CRL-9595); мишачі клітини Сертоллі (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини карциноми шийки матки людини (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки щура buffalo (BRL 3 A, ATCC CRL 1442); клітини легені людини (W1 38, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL 51); клітини TRI (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci 383:44-68 (1982)); клітини NIH/3T3 (ATCC CRL-1658); і мишачі L-клітини (ATCC CCL-1). У деяких втіленнях використовують меланофори. Меланофори являють собою клітини шкіри, виявлені у нижчих хребетних. Опис відповідних матеріалів і методів можна знайти в патенті США № 5462856 і патенті США № 6051386. Зміст даних патентів включений в даний опис як посилання у всій повноті.

Фахівцям в даній галузі відомі і інші лінії клітин, причому широкий ряд клітинних ліній можна отримати від Американської колекції типових культур, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209.

С. Скринінг сполук-кандидатів

1. Способи аналітичного скринінга загального GPCR

Якщо асоційований з G-білком рецептор стає активним, він зв'язується з G-білком (наприклад, Gq, Gs, Gi, Gz, Go) і стимулює зв'язування ГТФ з G-білком. Потім G-білок діє як ГТФ-аза і повільно гідролізує ГТФ до ГДФ, внаслідок чого в нормальних умовах відбувається дезактивація рецептора. Однак активовані рецептори продовжують перетворювати ГДФ в ГТФ. Негідролізований аналог ГТФ, [³⁵S]ГТФγS, можна використати для моніторингу підвищеного зв'язування з мембранами, на яких експресуються активовані рецептори. Описано, що [³⁵S]ГТФγS можна використати для моніторингу зв'язування G-білка з мембранами за відсутності і присутності ліганду. Приклад такого моніторингу, в числі інших прикладів, добре відомих і доступних фахівцям в даній галузі, описаний Traynor and Nahorski в 1995. Переважно дану систему аналізу використовують для первинного скринінгу сполук-кандидатів, оскільки дана система, як правило, застосовна до всіх G-білок-зв'язаних рецепторів, незалежно від типу конкретного G-білка, взаємодіючого з внутрішньоклітинним доменом рецептора.

2. Способи аналітичного скринінга конкретних GPCR

Після ідентифікації сполук-кандидатів за допомогою аналізу "загальний" G-білок-зв'язаного рецептора (тобто аналізу, що дозволяє вибрати сполуки, що є агоністами або зворотними агоністами) в деяких втіленнях переважно проводять додатковий скринінг, щоб підтвердити, що сполуки взаємодіють по рецепторній ділянці. Наприклад, сполука, ідентифікована в "загальному" аналізі, може не зв'язуватися з рецептором, а лише "від'єднувати" G-білок від внутрішньоклітинного домена.

a. Gs, Gz і Gi

Gs стимулює фермент аденілатциклазу. Gi (а також Gz і Go), навпаки, інгібує аденілатциклазу. Аденілатциклаза каталізує перетворення ATP в цАМФ; отже, активація GPCR, зв'язаних з білком Gs, пов'язана із збільшенням рівня внутрішньоклітинного цАМФ. З іншого боку, активація GPCR, зв'язаних з білком Gi (або Gz, Go), пов'язана із зменшенням рівня внутрішньоклітинного цАМФ. Загальний опис можна знайти в "Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission", Chpt. 8, From Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J.G. et al eds. Sinauer Associates, Inc. (1992). Таким чином, за допомогою аналізів, що дозволяють детектувати цАМФ, можна визначити, чи є сполука-кандидат, наприклад, зворотним агоністом рецептора (тобто сполукою, яка зменшує рівень цАМФ). Для вимірювання цАМФ можна використати ряд способів, відомих в даній галузі; в деяких втіленнях переважний спосіб оснований на застосуванні антитілу проти цАМФ в форматі ELISA. Можна використати і аналіз іншого типу, наприклад, аналіз репортерної системи вторинного месенджера на цілих клітинах. Промотори генів регулюють експресію білків, що кодуються конкретними генами. Циклічний АМФ регулює експресію генів, стимулюючи зв'язування цАМФ-залежного ДНК-зв'язуючого білка або фактора транскрипції

(CREB) з промотором по специфічних ділянках, які називаються цАМФ-залежні елементи. Можна сконструювати репортерні системи, в яких перед репортерним геном, наприклад, β-галактозидази або люциферази, знаходиться промотор, що містить декілька цАМФ-залежних елементів. Таким чином, активація Gs-зв'язаного рецептора спричиняє накопичення цАМФ, який згодом активує ген і експресію репортерного білка. Потім репортерний білок, такий як β-галактозидаза або люцифераза, можна детектувати за допомогою стандартних біохімічних аналізів (Chen et al. 1995).

b. Co і Gq

Gq і Go пов'язані з активацією ферменту фосфоліпази C, який, в свою чергу, гідролізує фосфоліпід PIP2, вивільняючи два внутрішньоклітинних месенджера: діацилгліцерин (DAG) і інозитол 1,4,5-трифосфат (IP3). Підвищене накопичення IP3 пов'язане з активацією Gq- і Go-асоційованих рецепторів. Загальний опис можна знайти в "Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission", Chpt. 8, From Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J.G. et al eds. Sinauer Associates, Inc. (1992). За допомогою аналізів, що дозволяють детектувати IP3, можна визначити, чи є сполука-кандидат, наприклад, зворотним агоністом Gq- або Go-асоційованого рецептора (тобто сполукою, яка зменшує рівень IP3). Gq-асоційовані рецептори можна визначити за допомогою аналізу репортера API, в якому Gq-залежна фосфоліпаза C викликає активацію генів, що містять елементи API; оскільки активація Gq-асоційованих рецепторів приводить до збільшення експресії таких генів, зворотні агоністи зменшують таку експресію, а агоністи збільшують таку експресію. Аналізи, за допомогою яких можна здійснити вказану детекцію, є комерційно доступними.

3. Гібридний білок GPCR

Застосування ендогенного, конститутивно активного GPCR, або неендогенного, конститутивно активованого GPCR в скринінгу сполук-кандидатів з безпосередньою ідентифікацією зворотних агоністів або агоністів, є цікавим способом скринінгу, в якому, по визначенню, рецептор активний навіть за відсутності пов'язаного з ним ендогенного ліганда. Так, щоб виявити відмінність між, наприклад, неендогенним рецептором в присутності сполуки-кандидата і неендогенним рецептором за відсутності такої сполуки, і, керуючись такою відмінністю, зрозуміти, чи є така сполука зворотним агоністом, агоністом або сполукою, що не надає впливу на такий рецептор, переважно використати спосіб, що дозволяє ефективно виявити таку відмінність. У деяких втіленнях переважний спосіб полягає в застосуванні гібридного білка GPCR.

Як правило, після того, як за допомогою описаних методів аналізу (а також інших методів, відомих фахівцям в даній галузі) визначено, що неендогенний GPCR конститутивно активується, можна детектувати переважаючий G-білок, пов'язаний з ендогенним GPCR. З'єднання G-білка з GPCR ініціює сигнальний шлях, який можна оцінити. У деяких втіленнях скринінг переважно проводити з використанням системи експресії, отриманої з клітин ссавців, або з меланофорів, оскільки така система приблизно містить ендогенний G-

білок. Таким чином, по визначенню, в такій системі неендогенний, конститутивно активований GPCR забезпечує безперервний сигнал. У деяких втіленнях переважно, щоб такий сигнал посилювався так, щоб в присутності, наприклад, зворотного агоніста рецептора, можна було б легше розрізнити, особливо в процесі скринінга, рецептор, що знаходиться в контакті із зворотним агоністом.

Передбачається, що гібридний білок GPCR збільшує ефективність поєднання G-білка з GPCR. Гібридний білок GPCR може бути переважним для скринінга, що проводиться з використанням ендogenous конститутивно активного GPCR або неендогенного конститутивно активованого GPCR, оскільки він забезпечує збільшення сигналу, що генерується в процесі скринінга. Це важливо для отримання значущого відношення "сигналу до шуму"; при скринінгу сполук-кандидатів, як описано в даному документі, таке співвідношення переважно повинно бути значущим.

Отримання конструкції, що забезпечує експресію гібридного білка GPCR, стосується сфери компетенції фахівців даної галузі. З використанням комерційно доступних векторів і систем експресії такі конструкції можна отримати за допомогою ряду способів, які можуть бути пристосовані до конкретних потреб дослідника. Важливі умови при отриманні такої конструкції гібридного білка GPCR включають в себе, без обмеження, об'єднання послідовності GPCR з послідовністю G-білка в одній рамці читування (переважно, послідовність ендogenous GPCR знаходиться вище за послідовність G-білка), і делецію або заміну "стоп"-кодона GPCR, щоб при експресії GPCR також експресува-

вся і G-білок. GPCR може бути пов'язаний з G-білком безпосередньо або через спейсерні залишки (переважно приблизно не більше 12, хоча дане число може бути уточнене фахівцем в даній галузі). Для зручності переважно використовувати спейсер. У деяких втіленнях переважно, щоб G-білок, зв'язаний з неендогенним GPCR, був ідентифікований перед отриманням конструкції гібридного білка GPCR. Як показано вище, активовані GPCR, зв'язані з Gi, Gz і Go, можуть інгібувати утворення цАМФ, роблячи аналізи з використанням даних типів GPCR перспективними (тобто сигнал, що опосередковується цАМФ меншає при активації, що робить безпосередню ідентифікацію, наприклад, агоністів (які додатково зменшують даний сигнал) перспективною). Як описано в даному документі, при спробі розробити здійснений циклазний аналіз, було встановлено, що для вказаних типів рецепторів можна отримати гібридний білок GPCR, який не містить G-білок, ендogenous для GPCR. Так, наприклад, ендogenous Gi-зв'язаний рецептор можна гібридизувати з білком Gs, причому отримана гібридна конструкція при експресії "примушує" або "змушує" ендogenous GPCR переважніше сполучатися, наприклад, з Gs, ніж з "природним" Gi-білком, що робить можливим проведення циклазного аналізу. Таким чином, у випадку Gi-, Gz- і Go-зв'язаних рецепторів, при використанні гібридного білка і проведенні аналізу на основі визначення аденілатциклазної активності, в деяких втіленнях переважно, щоб гібридна конструкція містила Gs (або еквівалентний G-білок, який стимулює утворення ферменту аденілатциклази).

Таблиця С

| G-білок | Зміна продукції цАМФ при активації GPCR (наприклад, при конститутивній активації, або при зв'язуванні агоніста) | Зміна накопичення IP ₃ при активації GPCR (наприклад, при конститутивній активації, або при зв'язуванні агоніста) | Зміна продукції цАМФ при контакті із зворотним агоністом | Зміна накопичення IP ₃ при контакті із зворотним агоністом |
|---------|---|--|--|---|
| Gs | Збільшення | N/A | Зменшення | N/A |
| Gi | Зменшення | N/A | Збільшення | N/A |
| Gz | Зменшення | N/A | Збільшення | N/A |
| Go | Зменшення | Збільшення | Збільшення | Зменшення |
| Gq | N/A | Збільшення | N/A | Зменшення |

Однаково ефективними є G-білок-гібридні конструкції, які містять білок Gq, гібридизований з білком Gs; Gi, Gz або Go. У деяких втіленнях переважна гібридна конструкція може містити білок Gq, в якому перші шість (6) амінокислот α -субодиниці G-білка ("Ga_q") видалені, а останні п'ять (5), амінокислот на C-кінці Ga_q замінені на відповідні амінокислоти Ga G-білка, що представляє інтерес. Наприклад, гібридна конструкція може містити Gq (6 амінокислот видалені), гібридизований з білком Gi з отриманням "гібридної" конструкції Gq/Gi". Дана гібридна конструкція змушує ендogenous Gi-зв'язаний рецептор зв'язуватися з неендогенним по відношенню до нього G-білком, Gq, так що замість продукції цАМФ можна вимірювати рівень такого вторинного месенджера, як, наприклад, інозитолтрифосфат або діацилгліцерин.

4. Спільна трансфекція цільового Gi-зв'язаного GPCR і сигнального енхансера Gs-зв'язаного GPCR (аналіз на основі вимірювання цАМФ)

Відомо, що Gi-зв'язаний рецептор інгібує аденілатциклазу і, отже, зменшує рівень продукції цАМФ, що може зробити визначення рівня цАМФ перспективним аналізом. У деяких втіленнях ефективний спосіб вимірювання зменшення продукції цАМФ як показника активації рецептора, який переважно зв'язується з Gi при активації, можна провести шляхом спільної трансфекції сигнального енхансера, наприклад, неендогенного, конститутивно активованого рецептора, який переважно зв'язується з Gs при активації (наприклад, TSHR-A6231; див. нижче), і Gi-пов'язаним GPCR. Очевидно, що активацію Gs-зв'язаного рецептора можна визначити по збільшенню продукції цАМФ. Активність Gi-зв'язаного рецептора приводить до змен-

шення продукції цАМФ. Таким чином, спільну трансфекцію роблять з метою успішного застосування вказаних "протилежних" ефектів. Наприклад, спільна трансфекція неендогенного, конститутивно активованого Gs-зв'язаного рецептора ("сигнальний енхансер") з одним вектором експресії дає фоновий сигнал цАМФ (тобто хоч Gi-зв'язаний рецептор зменшує рівень цАМФ, дане "зменшення" порівнянно з істотним збільшенням рівня цАМФ, що викликається конститутивно активованим Gs-зв'язаним сигнальним енхансером). При подальшій спільній трансфекції сигнального енхансера і "цільового рецептора" зворотний агоніст Gi-зв'язаного цільового рецептора збільшує сигнал, що вимірюється цАМФ, хоча агоніст Gi-зв'язаного цільового рецептора зменшує даний сигнал.

Сполуки-кандидати, які безпосередньо ідентифікують за допомогою даного способу, слід аналізувати незалежно, щоб пересвідчитися, що вони не зв'язуються з сигнальним енхансерним рецептором (такий аналіз можна провести до або після скринінга проти спільно трансфікованих рецепторів).

Композиції/склади і способи лікування

На основі агоніста GPR119, використовуючи відомі в даній галузі методи, можна отримати фармацевтичні композиції і лікарські засоби для застосування відповідно до даного винаходу. Склад, що використовується, залежить від вибраного способу введення. У деяких втіленнях вказане введення здійснюють відмінному від людини хребетному або відмінному від людини ссавцеві.

Відповідно до способів лікування даного винаходу, а саме, способів лікування, пов'язаними із застосуванням агоніста GPR119, сполуки даного винаходу можна вводити будь-яким відповідним способом. Відповідні способи введення включають в себе пероральний, назальний, ректальний, через слизову оболонку, черезшкірний або кишковий способи введення, парентеральну доставку, в тому числі, внутрішньом'язовий, підшкірний, внутрішньомозковий ін'єкції, а також інтратекальні, безпосередні внутрішньошлункові, внутрішньовенні, внутрішньочеревинні, інтраназальні, внутрішньолегеневі (шляхом вдихування) або внутрішньоочні ін'єкції, здійснювані за допомогою відомих в даній галузі способів. Інші відповідні способи введення включають в себе застосування аерозолів і композицій-депо. Окремо розглядаються композиції з уповільненим вивільненням, зокрема композиції-депо, що містять лікарські засоби даного винаходу. У деяких переважних втіленнях сполуки даного винаходу вводять перорально. Сполуки даного винаходу можна отримати в твердій або рідкій формі, такий як таблетки, капсули, порошки, сиропи, еліксири і т.п., аерозолі, стерильні розчини, суспензії або емульсії і т.п. В деяких втіленнях агоніст GPR119 вводять перорально.

Композиції для перорального введення можуть знаходитися у вигляді водних розчинів і суспензій, крім твердих композицій таблеток і капсул. Водні розчини і суспензії можна отримати з стерильних порошоків або гранул. Сполуки можна розчинити у воді, поліетиленгліколі, пропіленгліколі,

етанолі, кукурудзяній олії, бавовняній олії, арахісовій олії, кунжутній олії, бензиловому спирті, розчині хлориду натрію і/або різних буферах. Інші допоміжні засоби добре відомі і широко застосовуються в даній галузі.

Фармацевтичні композиції агоніста GPR119 можна отримати за допомогою добре відомих в даній галузі способів, наприклад, з використанням традиційних процесів змішування, розчинення, гранулювання, отримання драже, розтирання в порошок, емульгування, взяття в капсули, уловлювання, ліофілізації або сушіння розпиленням.

Фармацевтичні композиції для застосування відповідно до даного винаходу можна отримати традиційним способом з використанням одного або декількох фізіологічно прийнятних носіїв, що включають в себе наповнювачі і допоміжні засоби, що полегшують обробку активних сполук з отриманням фармацевтичних препаратів. Відповідні фармацевтично прийнятні носії досієнні для фахівців в даній галузі (див., наприклад, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Gennaro et al., eds.), 20th Edition, 2000, Lippincott Williams & Wilkins; і Handbook of Pharmaceutical Excipients (Rowe et al., eds), 4th Edition, 2003, Pharmaceutical Press; зміст яких включений в даний опис як посилання у всій повноті). Склад, що використовується, залежить від вибраного способу введення. Термін речовина-"носій" або речовина-"наповнювач" в даному описі стосується будь-якої речовини, яка сама не є терапевтичним засобом, але використовується як носій, і/або розріджувача, і/або допоміжного засобу, або середовища для доставки терапевтичного засобу суб'єкту, або додається до фармацевтичної композиції для надання властивостей, що полегшують маніпулювання або поліпшують зберігання, або для забезпечення або полегшення отримання з композиції лікарської форми у вигляді дискретних виробів, такого як капсули або таблетки, відповідні для перорального введення. Приклади наповнювачів можуть включати в себе, без обмеження, розріджувачі, дезінтегруючі засоби, зв'язуючі засоби, склеюючі засоби, зволожуючі засоби, полімери, змашувальні засоби, засоби, що забезпечують ковзання, засоби, що додаються для маскування або нейтралізації неприємного смаку або запаху, ароматизатори, барвники, віддушки і речовини, що додаються для поліпшення зовнішнього вигляду композиції. Прийнятні носії включають в себе стеаринову кислоту, стеарат магнію, оксид магнію, натрієві і кальцієві солі фосфорної і сірчаної кислот, карбонат магнію, тальк, желатин, гуміарабік, альгінат натрію, пектин, декстрин, маніт, сорбіт, лактозу, сахарозу, крохмаль, желатин, похідні целюлози, такі як ефіри целюлози і алканових кислот і алкільні складні ефіри целюлози, низькоплавкий віск, олію або порошок какао, полімери, такі як полівінілпіролідон, полівініловий спирт і поліетиленгліколі, а також інші фармацевтично прийнятні речовини. Компоненти фармацевтичної композиції можуть бути взяті в капсули або таблетки, відповідні для конкретного способу введення.

Термін "фармацевтично прийнятний" стосується властивостей і/або речовин, які є прийнят-

ними для пацієнта з точки зору фармакології/токсикології, а також для одержуючого їх хіміка-фармацевта з точки зору фізичних/хімічних властивостей, пов'язаних з композицією, складом, стабільністю, схваленням пацієнта і біодоступністю.

Внутрішню частину драже звичайно забезпечують відповідним покриттям. Для отримання таких покриттів можна використати концентровані розчини цукрів, які необов'язково містять гуміарабік, тальк, полівінілпіролідон, гелеподібний карбон, поліетиленгліколь і/або діоксид титану, лакові розчини, а також відповідні органічні розчинники або суміші розчинників. Покриття таблеток або драже також можуть містити барвники або пігменти, що дозволяють ідентифікувати або відрізнити різні поєднання доз активних сполук.

Фармацевтичні композиції для перорального застосування можуть бути укладені у вставні капсули, отримані з желатину, а також в м'які, герметично закриті капсули, отримані з желатину і пластифікатора, такого як гліцерин або сорбіт. Вставні капсули можуть містити активні інгредієнти в суміші з наповнювачем, таким як лактоза, зв'язуючим засобом, таким як крохмаль, і/або змащувальним засобом, таким як тальк або стеарат магнію, і, необов'язково, стабілізаторами. У м'яких капсулах активні сполуки можуть бути розчинені або суспендовані у відповідних рідинах, таких як жирні масла, рідкий парафін, рідкі поліетиленгліколи, кремофор, Сартул, середньо- або довголанцюжкові моно-, ди- або тригліцериди. Такі композиції також можуть містити стабілізатори.

Крім того, агоніст GPR119 також можна доставляти за допомогою системи, що забезпечує уповільнене вивільнення. Уповільнене вивільнення можуть забезпечувати різні речовини, добре відомі фахівцям в даній галузі. Особливо переважні таблетки або капсули з уповільненим вивільненням. Наприклад, можна використати речовини, що забезпечують затримку вивільнення, такі як моностеарат гліцерину або дистеарат гліцерину. На лікарську форму також можна нанести покриття за допомогою способів, описаних в патентах США №№ 4256108, 4166452 і 4265874, з отриманням осмотичних терапевтичних таблеток з контрольованим вивільненням.

Спеціально передбачається, що способи лікування даного винаходу, а саме, способи лікування, пов'язані із застосуванням агоніста GPR119, можна здійснювати або проводити окремо, або в поєднанні із застосуванням однієї або декількох інших фармацевтично або фізіологічно прийнятних сполук. В одному аспекті даного винаходу інша фармацевтично або фізіологічно прийнятна сполука не є агоністом GPR119. В одному аспекті даного винаходу інша фармацевтично або фізіологічно прийнятна сполука являє собою фармацевтичний засіб, вибраний з групи, що складається з кальцію, вітаміну D, естрогену, тиболону, селективного модулятора рецептора естрогену (SERM; такого як ралоксифен, тамоксифен), біфосфонату (такого як етидронат, алендронат, ризедронат), кальцитоніну, 1 α -гідроксильованого метаболіту вітаміну D, фториду, тиазиду, анаболічного стероїда, іпріфлафона, вітаміну K, парашитовидного гормону

(PTH), стронцію, статину, остеопротерину, селективного агоніста рецептора EP4, селективного агоніста рецептора канабіноїдів типу 2 (CB2) і інгібітора кінази MAP p38. (див., наприклад, World Health Organization Technical Report Series 921 (2003), Prevention and Management of Osteoporosis).

В одному аспекті даний винахід описує композицію, що містить кількість агоніста GPR119 даного винаходу, або по суті, що складається з кількості такого агоніста. В одному аспекті даний винахід пропонує фармацевтичну композицію, що містить кількість агоніста GPR119 даного винаходу, або по суті, що складається з кількості такого агоніста, і, щонайменше, один фармацевтично прийнятний носій.

В одному аспекті даний винахід описує композицію, що містить кількість агоніста GPR119 даного винаходу, або по суті, що складається з кількості такого агоніста. В одному аспекті даний винахід описує композицію, що містить кількість агоніста GPR119 даного винаходу, або по суті, що складається з кількості такого агоніста, і, щонайменше, один фармацевтично прийнятний носій. Даний винахід також стосується лікарської форми композиції або фармацевтичної композиції, яка містить агоніст GPR119 в кількості, достатній для надання ефекту при лікуванні або профілактиці стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, і/або при збільшенні кісткової маси у суб'єкта.

В одному аспекті даний винахід описує композицію, що містить кількість агоніста GPR119 даного винаходу, або по суті, що складається з кількості такого агоніста. В одному аспекті даний винахід описує композицію, що містить кількість агоніста GPR119 даного винаходу, або по суті, що складається з кількості такого агоніста, і, щонайменше, один фармацевтично прийнятний носій. Даний винахід також стосується лікарської форми композиції або фармацевтичної композиції, яка містить агоніст GPR119 в кількості, достатній для збільшення рівня GIP у суб'єкта.

Фармацевтичні композиції, відповідні для застосування в даному винаході, включають в себе композиції, які містять активні інгредієнти в кількостях, ефективних для досягнення передбачуваної мети. У деяких втіленнях фармацевтична композиція даного винаходу розглядається як придатна для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, або для збільшення кісткової маси суб'єкта. Умови, що характеризуються зниженням кісткової маси, входять в об'єм даного винаходу. У деяких втіленнях фармацевтична композиція даного винаходу розглядається як придатна для збільшення рівня GIP у суб'єкта. Відповідно до даного винаходу, визначення кількості агоніста GPR119, достатньої для досягнення передбачуваної відповідно до даного винаходу мети, стосується компетенції фахівців в даній галузі, особливо з урахуванням приведеного в даному документі докладного опису.

При визначенні діапазону доз, що застосовуються для людей, використовують результати,

отримані в дослідженнях на тваринах, що включають в себе, без обмеження, дослідження, що проводяться з використанням мишей, щурів, кроликів, свиней і відмінних від людини приматів. Як правило, фахівці в даній галузі розуміють, як екстраполювати дані, отримані *in vivo* на системі тваринної моделі, на іншу тварину, таку як людина. У деяких випадках такі екстраполяції можна здійснювати тільки на основі порівняння маси тваринної моделі з масою іншої тварини, такої як людина; в інших випадках при такій екстраполяції враховують не тільки масу, але і ряд інших факторів. Приклади таких факторів включають в себе тип, вік, масу, стать, дієту і медичний стан пацієнта, тяжкість захворювання, спосіб введення, фармакологічні параметри, такі як активність, ефективність, фармакокінетичні і токсикологічні профілі конкретної сполуки, що використовується, застосування системи доставки лікарського засобу, проведення лікування гострого або хронічного хворобливого стану або профілактики, а також введення інших активних сполук крім сполук даного винаходу, як частина поєднання лікарських засобів. Дозувальний режим для лікування хворобливого стану за допомогою сполук і/або композицій даного винаходу вибирають з урахуванням ряду факторів, як вказано вище. Таким чином, реальний дозувальний режим, що використовується, може широко варіювати і, отже, відхилитися від переважного дозувального режиму, причому фахівцям в даній галузі потрібно розуміти, що дозу і дозувальний режим, що знаходяться поза вказаними типовими діапазонами, можна використати в способах даного винаходу, якщо тестування покаже, що вони придатні для цього.

Прикладом системи тваринної моделі є модель розрідження кістки щурів після оварієктомії (OVX). Щур після оварієктомії є чудовою передклінічною тваринною моделлю, яка коректно імітує клінічний стан скелета людини при недоліку естрогенів і відповідь на терапевтичні засоби. У даній моделі терапевтична ефективність досягається, якщо розрідження кістки, пов'язане з оварієктомією, частково або повністю запобігається (див., наприклад, Bollag et al., *Mol Cell Endocrinol* (2001) 177:(35-41); (i) Jee et al., *J Musculoskel Neuron Interact* (2001) 1: 193-207). У деяких втіленнях терапевтична ефективність досягається, якщо розрідження кістки, пов'язане з оварієктомією, запобігається, щонайменше, приблизно на 10%, щонайменше, приблизно на 20%, щонайменше, приблизно на 30%, щонайменше, приблизно на 40%, щонайменше, приблизно на 50%, щонайменше, приблизно на 60%, щонайменше, приблизно на 70%, щонайменше, приблизно на 75%, щонайменше, приблизно на 80%, щонайменше, приблизно на 85%, щонайменше, приблизно на 90%, щонайменше, приблизно на 95%, або на 100%.

Іншим прикладом системи тваринної моделі є збільшення рівня GIP в крові мишей після введення глюकोзи. У деяких втіленнях рівень GIP в крові являє собою рівень GIP в плазмі. У деяких втіленнях рівень GIP являє собою глюकोзо-незалежний рівень GIP. У деяких втіленнях рівень GIP являє собою глюकोзо-залежний рівень GIP. У деяких вті-

леннях GIP являє собою загальний GIP. У деяких втіленнях загальний GIP вимірюють за допомогою центрального або С-кінцевого аналізу. У деяких втіленнях GIP являє собою біоактивний GIP. У деяких втіленнях біоактивний GIP вимірюють методом N-кінцевого аналізу. У деяких втіленнях біоактивний GIP стимулює кісткоутворення. У деяких втіленнях терапевтична ефективність досягається, якщо рівень GIP в крові збільшується, щонайменше, приблизно на 10%, щонайменше, приблизно на 25%, щонайменше, приблизно на 50%, щонайменше, приблизно на 100%, щонайменше, приблизно на 150%, щонайменше, приблизно на 200%, щонайменше, приблизно на 300%, щонайменше, приблизно на 400%, або, щонайменше, приблизно на 500%.

Величину і діапазон доз можна коректувати, щоб отримати передбачуваний терапевтичний ефект. Зрозуміло, що точна доза агоніста GPR119 відповідно до даного винаходу залежить від агоніста GPR119, його активності, способу введення, віку і маси пацієнта, а також тяжкості стану, що підлягає лікуванню. Точну композицію, спосіб введення і дозу може вибрати лікуючий лікар з урахуванням стану пацієнта. Наприклад, кількість агоніста GPR119 відповідно до даного винаходу, складає, без обмеження, менше ніж приблизно 0,001 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,005 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,01 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,05 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,1 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,5 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 1 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 5 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 10 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 50 мг/кг маси тіла, або менше ніж приблизно 100 мг/кг маси тіла. У деяких втіленнях кількість агоніста GPR119 відповідно до даного винаходу складає менше ніж приблизно 0,001-100 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,001-50 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,001-10 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,001-5 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,001-1 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,001-0,5 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,001-0,1 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,001-0,05 мг/кг маси тіла, менше ніж приблизно 0,001-0,01 мг/кг маси тіла, або менше ніж приблизно 0,001-0,005 мг/кг маси тіла.

Переважаючий діапазон доз модулятора даного винаходу (наприклад, агоніста GPR119), які можна вводити щодня або з регулярними інтервалами часу з досягненням бажаного результату, становить 0,1-100 мг/кг маси тіла. Інший переважний діапазон доз становить 0,1-30 мг/кг маси тіла. Інший переважний діапазон доз становить 0,1-10 мг/кг маси тіла. Інший переважний діапазон доз становить 0,1-3,0 мг/кг маси тіла. Звичайно, вказані добові дози можна доставляти або вводити в невеликих кількостях періодично протягом дня. Потрібно зазначити, що вказані дозувальні діапазони є тільки переважними діапазонами і не призначаються для обмеження даного винаходу.

Величину і діапазон доз можна коректувати індивідуально до отримання рівня агоніста GPR119 даного винаходу в плазмі, що забезпечує перед-

бачуваний терапевтичний ефект. Дозувальні діапазони також можна визначати з використанням значення вибраного інтервалу концентрації агоніста GPR119 так, щоб досягнути передбачуваного терапевтичного ефекту. Агоніст GPR119 потрібно вводити з використанням режиму, який дозволяє підтримувати рівні в плазмі у вибраному діапазоні концентрацій агоніста GPR119 протягом 10-90% часу, переважно 30-99% часу, найбільш переважно 50-90% часу. У випадках локального введення або селективного поглинання діапазон концентрацій агоніста GPR119, що забезпечує передбачуваний терапевтичний ефект, може не відповідати концентрації в плазмі.

Зрозуміло, кількість композиції, що вводиться залежить від суб'єкта, що підлягає лікуванню, маси суб'єкта, тяжкості пошкодження, способу введення і висновку лікуючого лікаря.

В одному аспекті даний винахід, відповідно, описує спосіб лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, або збільшення кісткової маси, що включає в себе введення суб'єкту, потребує цього, терапевтично ефективної кількості композиції, що містить кількість агоніста GPR119 даного винаходу, або по суті, що складається з кількості такого агоніста. У деяких втіленнях композиція являє собою фармацевтичну композицію.

В одному аспекті даний винахід стосується способу лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, або збільшення кісткової маси, що включає в себе введення суб'єкту, потребує цього, терапевтично ефективної кількості композиції, що містить кількість агоніста GPR119 даного винаходу, або по суті, що складається з кількості такого агоніста. У родинному аспекті даний винахід описує такий спосіб, в якому агоніст GPR119 вводять в кількість, достатній для збільшення рівня GIP у суб'єкта. У деяких втіленнях композиція являє собою фармацевтичну композицію.

Способи лікування даного винаходу, а саме, способи лікування, пов'язані із застосуванням агоніста GPR119, можна використати для лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси суб'єкта, а також для збільшення кісткової маси суб'єкта.

Стани, що характеризуються низькою кістковою масою, включають в себе, без обмеження, остеопенію, остеопороз, ревматоїдний артрит, остеоартрит, періодонтальне захворювання, розрідження альвеолярної кістки, остеотомічне розрідження кістки, дитяче ідіопатичне розрідження кістки, хворобу Педжета, розрідження кістки внаслідок метастатичного раку, остеолітичні пошкодження, викривлення хребта і втрату маси. У деяких втіленнях стан, що характеризується низькою кістковою масою, являє собою остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою первинний остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою вторинний остеопороз. Стани, що характеризуються низькою кістковою масою, також включають в себе, без обмеження, довгострокові

ускладнення остеопороза, такі як викривлення хребта, втрата маси і наслідки протезної хірургії. Потрібно розуміти, що стани, що характеризуються зниженням кісткової маси, можуть входити в об'єм втілень даного винаходу окремо, або в будь-яких поєднаннях. У деяких втіленнях стан, що характеризується низькою кістковою масою, являє собою первинний остеопороз.

У деяких втіленнях мінеральна щільність кістки (МЩК) суб'єкта, потребує збільшення кісткової маси, нижче типового значення для молодого дорослого суб'єкта більше ніж на 1 (Т-показник <-1), не менше ніж на 1,5 (Т-показник <-1,5), не менше ніж на 2 (Т-показник <-2), або не менше ніж на 2,5 (Т-показник <-2,5) стандартних відхилень. У деяких втіленнях суб'єкт, потребує збільшення кісткової маси, потребує лікування перелому кістки. У деяких втіленнях суб'єкт, потребує лікування перелому кістки, має травматичний перелом кістки, довготривалий перелом кістки або остеопоротичний перелом кістки. У деяких втіленнях суб'єкт потребує лікування захворювання кістки. У деяких втіленнях суб'єкт, потребує лікування захворювання кістки, має остеопенію, остеопороз, ревматоїдний артрит, остеоартрит, періодонтальне захворювання, розрідження альвеолярної кістки, остеотомічне розрідження кістки, дитяче ідіопатичне розрідження кістки, хворобу Педжета, розрідження кістки внаслідок метастатичного раку, остеолітичні пошкодження, викривлення хребта або втрату маси. У деяких втіленнях суб'єкт, потребує лікування захворювання кістки, має остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою первинний остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою вторинний остеопороз. Деструктивні захворювання кісток, які можна лікувати за допомогою способу даного винаходу, включають в себе, без обмеження, остеопороз, остеоартрит і остеолітичні пошкодження, наприклад, викликані новоутворенням, променевою терапією або хіміотерапією. У деяких втіленнях остеопороз являє собою первинний остеопороз. У деяких втіленнях остеопороз являє собою вторинний остеопороз.

Способи лікування даного винаходу, а саме, способи лікування, пов'язані із застосуванням агоніста GPR119, також використовують для прискорення загоєння кістки після лицьової хірургії, верхньощелепної хірургії, нижньощелепної хірургії, періодонтального захворювання або видалення зуба, прискорення подовження довгої кістки, прискорення зростання всередині протеза і прискорення зрощення кісток у суб'єкта.

У деяких втіленнях суб'єкт являє собою хребетне. У деяких втіленнях суб'єкт, що є хребетним, являє собою рибу, амфібію, рептилію, птаха або ссавця. У деяких втіленнях суб'єкт або хребетне являє собою ссавця. У деяких втіленнях суб'єкт або хребетне, що є ссавцем, являє собою мишу, щура, хом'яка, кролика, свиню, собаку, кішку, коня, корову, вівцю, козу, відмінного від людини ссавця, відмінного від людини примата або людину. У деяких втіленнях суб'єкт являє собою людину. У деяких втіленнях людина являє собою жінку в постменопаузі або чоловіка старшого 50 років.

Передбачається, що за допомогою приведеного вище опису фахівець в даній галузі зможе здійснити даний винахід в найбільш повній мірі без додаткових досліджень. Оскільки вищевикладений докладний опис наведений тільки для наочного пояснення і не призначений для зайвого обмеження, фахівці в даній галузі можуть здійснювати модифікації в межах об'єму даного винаходу.

Приклади

Передбачається, що за допомогою наведеного вище опису фахівець в даній галузі зможе здійснити даний винахід в найбільш повній мірі без додаткових досліджень. Нижченаведені докладні приклади приведені тільки для ілюстрації, але не для обмеження яким-небудь чином попереднього опису. Фахівці в даній галузі зможуть легко здійснити відповідні модифікації описаних способів.

Приклад 1: Фармакодинамічний аналіз впливу агоніста GPR119 на рівень GIP в крові мишей дикого типу

А. Самців мишей C57bl/6 тримають на голодній дієті протягом 18 годин і випадковим чином розподіляють в чотирнадцять груп по 6 тварин в кожній групі (n=6). Мишам перорально вводять середовище (PET; 80% PEG400, 10% етанолу, 10% твін 80) або агоніст GPR119 даного винаходу (сполука 1; (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)-амін) в дозі 20 мг/кг, як вказано на Фіг. 1А. Через тридцять хвилин після обробки перорально вводять болюс глюкози в дозі 3 г/кг, і через 0 (відсутність болюса глюкози), 2, 5, 10, 20, 40 і 60 хвилин після введення болюса глюкози збирають плазму. Рівні GIP в плазмі вимірюють за допомогою набору ELISA для визначення GIP у гризунів, отриманого від Unco Research Laboratory [ELISA для визначення шурячого/мишачого шлункового інгібіторного поліпептида (загального), № по каталогу EZRMGIP-55K], відповідно до інструкцій постачальника. З результатів, показаних на Фіг. 1А, видно, що введення агоніста GPR119 приводить до збільшення як глюкозо-залежного, так і глюкозо-незалежного рівня GIP в крові мишей. Сполука 1 стимулює загальний GIP в плазмі мишей. Сполука 1 ідентична сполучі, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 2004/065380).

В. Самців мишей C57bl/6 тримають на голодній дієті протягом 18 годин і випадковим чином розподіляють в чотирнадцять груп по 6 тварин в кожній групі (n=6). Мишам перорально вводять середовище (20% гідроксипропіл-β-циклодекстрин (HPCD)) або агоніст GPR119 даного винаходу (сполука 3) в дозі 10 мг/кг, як вказано на Фіг. 1В. Через тридцять хвилин після обробки перорально вводять болюс глюкози в дозі 3 г/кг, і через 0 (відсутність болюса глюкози), 5, 10, 20, 60 і 120 хвилин після введення болюса глюкози збирають плазму. Рівні GIP в плазмі вимірюють за допомогою набору ELISA для визначення GIP у гризунів, отриманого від Linco Research Laboratory [ELISA для визначення шурячого/мишачого шлункового інгібіторного поліпептида (загального), № по каталогу EZRMGIP-55K], відповідно до інструкцій постачальника. Статистичний аналіз проводять за

допомогою програми Excel. Середні значення концентрації GIP розраховують на основі результатів, отриманих від шести мишей в кожній групі, і виражають у вигляді середнього значення±SEM. З результатів, показаних на Фіг. 1В, видно, що введення агоніста GPR119 приводить до збільшення як глюкозо-залежного, так і глюкозо-незалежного рівня GIP в крові мишей. Сполука 3 стимулює загальний GIP в плазмі мишей. Сполука 3 ідентична сполучі, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 2005/007647).

С. Самців мишей C57bl/6 тримають на голодній дієті протягом 18 годин і випадковим чином розподіляють в чотирнадцять груп по 6 тварин в кожній групі (n=6). Мишам перорально вводять середовище (20% гідроксипропіл-β-циклодекстрин (HPCD)) або агоніст GPR119 даного винаходу (сполука 3) в дозі 1, 3 або 10 мг/кг. Через тридцять хвилин після обробки перорально вводять болюс глюкози в дозі 3 г/кг, і через 0 (відсутність болюса глюкози) або 5 хвилин після введення болюса глюкози збирають плазму. Рівні GIP в плазмі вимірюють за допомогою набору ELISA для визначення GIP у гризунів, отриманого від Linco Research Laboratory [ELISA для визначення шурячого/мишачого шлункового інгібіторного поліпептида (загального), № по каталогу EZRMGIP-55K], відповідно до інструкцій постачальника. Статистичний аналіз проводять за допомогою програми Excel. Середні значення концентрації GIP, приведені на Фіг. 1С, розраховують на основі результатів, отриманих від шести мишей в кожній групі. З результатів, показаних на Фіг. 1С, видно, що агоніст GPR119 (сполука 3) стимулює загальний GIP в плазмі мишей в дозо-залежній манері. Сполука 3 ідентична сполучі, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022327 (опублікованої як WO 2005/007647).

Приклад 2: Вплив агоніста GPR119 на рівень GIP в крові GPR119-дефіцитних (з нокаутом по гену GPR119) мишей в порівнянні з мишами дикого типу

А. Самців GPR119-дефіцитних мишей і дитинчат одного помета дикого типу тримають на голодній дієті протягом 18 годин. Мишам перорально вводять середовище (PET; 80% PEG400, 10% етанол, 10% твін 80) або агоніст GPR119 даного винаходу (сполука 1; (2-фтор-4-метансульфонілфеніл)-(6-[4-(3-ізопропіл-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)піперидин-1-іл]-5-нітропіримідин-4-іл)-амін) в дозі 20 мг/кг, як вказано (n=5). Через тридцять хвилин після обробки збирають кров (100 мікролітрів) через ретроорбітальну вену ока (час 0) і потім вводять (перорально) болюс глюкози в дозі 3 г/кг. Через п'ять хвилин після введення глюкози збирають інший зразок крові (100 мікролітрів) (час 5 хвилин). Після центрифугування збирають плазму і вимірюють рівні GIP в плазмі за допомогою набору ELISA для визначення GIP у гризунів, отриманого від Linco Research Laboratory [ELISA для визначення шурячого/мишачого шлункового інгібіторного поліпептида (загального), № по каталогу EZRMGIP-55K], відповідно до інструкцій постачальника. З резуль-

татів, показаних на Фіг. 2А, видно, що присутність функціонального рецептора GPR119 необхідна для збільшення глюкозо-незалежного і глюкозо-залежного рівня GIP в крові мишей під дією агоніста GPR119. Сполука 1 стимулює загальний GIP в плазмі мишей дикого типу. Сполука 1 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/001267 (опублікованої як WO 2004/065380).

В. Самців GPR119-дефіцитних мишей і дитинчат одного помета дикого типу тримають на голодній дієті протягом 18 годин. Мишам перорально вводять середовище (40% гідроксипропіл- β -циклодекстрин (HPCD)) або агоніст GPR119 даного винаходу (сполука 2) в дозі 30 мг/кг, як указано (n=5). Через тридцять хвилин після обробки збирають кров (100 мікролітрів) через ретроорбітальну вену ока (час 0) і потім вводять (перорально) болюс глюкози в дозі 3 г/кг. Через п'ять хвилин після введення глюкози збирають інший зразок крові (100 мікролітрів) (час 5 хвилин). Після центрифугування збирають плазму і вимірюють рівні GIP в плазмі за допомогою набору ELISA для визначення GIP у гризунів, отриманого від Linco Research Laboratory [ELISA для визначення щурячого/мишачого шлункового інгібіторного поліпептида (загального), № по каталогу EZRMGIP-55K], відповідно до інструкцій постачальника. Середні значення концентрації GIP розраховують на основі результатів, отриманих від п'яти мишей в кожній групі. З результатів, показаних на Фіг. 2В, видно, що присутність функціонального рецептора GPR119 необхідна для збільшення глюкозо-незалежного і глюкозо-залежного рівня GIP в крові мишей під дією агоніста GPR119. Сполука 2 стимулює загальний GIP в плазмі мишей дикого типу. Сполука 2 ідентична сполуці, розкритій в міжнародній патентній заявці № PCT/US2004/022417 (опублікованої як WO 2005/007658).

Приклад 3: Вплив агоніста GPR119 на кісткову масу щурів з видаленими яєчниками

За допомогою описаної нижче щурячої моделі з видаленими яєчниками (OVX) (див., наприклад, Bollag et al., *Mol Cell Endocrinol* (2001) 177: 35-41) можна показати, що агоніст GPR119 даного винаходу є ефективним при лікуванні або профілактиці стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, і/або при збільшенні кісткової маси у суб'єкта.

Двадцять незайманих самиць OVX і 20 незайманих не OVX щурів Sprague-Dawley (150-175 г) віком 8 тижнів отримують від Harlan Sprague-Dawley, Inc. (Indianapolis, IN). Тварин досхочу годують комерційним сухим кормом, дієта для гризунів Teklab (1,46% кальцію), з вільним доступом до води. Щурів випадковим чином розподіляють в чотири експериментальні групи, що містять тварин схожої маси, після чого їм вводять ієрорально середовище або агоніст GPR119 даного винаходу. Введення здійснюють щодня протягом 6 тижнів.

1. Контроль. Десять не OVX щурів отримують перорально середовище.

2. Контроль+обробка. Десять не OVX щурів отримують перорально агоніст GPR119.

3. OVX. Десять OVX щурів отримують ієрорально середовище.

4. OVX+обробка. Десять OVX щурів отримують перорально агоніст GPR119.

Щурів зважують щодня, а довжину вимірюють в початковий момент і потім через 6 тижнів. Всіх тварин піддають аналізу методом двоенергетичної рентгенівської абсорбціометри (DXA) з допомогою Hologic QDR 1000/W (Waltham, MA) перед початком обробки і через 6 тижнів, отримані результати обробляють за допомогою програмного забезпечення Rat Whole Body, версія 5.53. Вимірюють мінеральну щільність кістки хребта (МЩК).

Через 6 тижнів після початку обробки визначають процент зміни щільності кістки хребта. Показано, що введення агоніста GPR119 приводить до зменшення негативного впливу оварієктомії на щільність кістки хребта. Зменшення негативного впливу оварієктомії на щільність кістки хребта вказує на те, що обробка є ефективною з точки зору лікування або профілактики стану, що характеризується зниженням кісткової маси, такого як остеопороз, і/або збільшення кісткової маси суб'єкта.

Приклад 4: Вплив агоніста GPR119 на загоєння перелому кістки

За допомогою описаного нижче аналізу in vivo можна показати, що агоніст GPR119 даного винаходу є ефективним для лікування перелому кістки.

Спосіб отримання перелому

Щурів Sprague-Dawley віком 3 місяці анестезують кетаміном. Розріз довжиною 1 см роблять на передньомедіальній стороні проксимальної частини над правою великогомілковою кісткою або стегною кісткою. Нижче описаний спосіб хірургії великогомілкової кістки. Роблять розріз до кістки і просвердлюють отвір розміром 1 мм на 4 мм проксимальніше дистальної поверхні горбика великогомілкової кістки і на 2 мм медіальніше переднього відростку. Вводять інтрамедулярний штифт у вигляді трубки з неіржавіючої сталі діаметром 0,8 мм (максимальне навантаження 36,3 Н, максимальна жорсткість 61,8 Н/мм, тестують в тих же умовах, що і кістки). Розсвердлювання кісткоомозкової порожнини не проводять. Стандартизований закритий перелом проводять на 2 мм вище за з'єднання великогомілкової і малоомілкової кісток шляхом трьохточкового вигину за допомогою спеціально сконструйованих регульованих щипців з тупими кінцями. Щоб мінімізувати пошкодження м'якої тканини, треба постаратися уникнути зміщення перелому. Шкіру зашивають нейлоновими мононітками. Операцію проводять в стерильних умовах. Відразу після штифтування роблять рентгенівські знімки всіх переломів, і виключають щурів з переломами поза вказаною діафізарною ділянкою або зі зміщеними штифтами. Тварин, що залишилися, випадковим чином розподіляють на групи по 10-12 тварин в кожній підгрупі, відповідній часовій точці при тестуванні загоєння перелому. Щуром кожний день перорально вводять середовище або агоніст GPR119. Агоніст GPR119 використовують в кількості від 0,001 мг/кг маси тіла до 100 мг/кг маси тіла. Обробку проводять протягом 10, 20, 40 і 80 днів.

Через 10, 20, 40 і 80 днів 10-12 щурів з кожної групи анестезують кетаміном і умертвляють шляхом знекровлення. Обидва зчленування великогомілкової і малогомілкової кісток видаляють після розтину і очищають від м'яких тканин. Кістки від 5-6 щурів з кожної групи зберігають в 70% етанолі для подальшого гістологічного аналізу, а кістки від інших 5-6 щурів з кожної групи зберігають в забуференому розчині Рінгера (+4°C, pH 7,4) для отримання рентгенівських знімків і біомеханічного тестування.

Гістологічний аналіз

Способи гістологічного аналізу зламанної кістки раніше описані Mosekilde and Bak (Bone (1993) 14: 19-27). Коротко кажучи, в ділянці перелому роблять розпили на відстані 8 мм з кожної сторони лінії перелому, не проводячи декальцинування, занурюють в метилметакрилат і роблять фронтальні зрізи товщиною 8 мкм з допомогою мікротома Reichert-Jung Polycut. Середньо-фронтальні зрізи, забарвлені Masson-Trichome (як великогомілкової кістки, так і малогомілкової кістки), використовують для візуалізації клітинної і тканинної відповіді, пов'язаної із загоєнням перелому, в присутності і за відсутності лікування. Зрізи, забарвлені сіріусом червоним, використовують для демонстрації характеристик структури кісткової мозолі і для розрізнення суцільної кістки і кістки, що розшаровується в ділянці перелому. Проводять вимірювання наступних параметрів: (1) зазор перелому - найкоротша відстань між кінцями кортикального шара кістки в ділянці перелому, (2) довжина і діаметр кісткової мозолі, (3) загальний об'єм кістки в ділянці кісткової мозолі, (4) кісткова тканина на ділянці тканини поза зоною кісткової мозолі, (5) фіброзна тканина в кістковій мозолі, і (6) площа хряща в кістковій мозолі.

Біомеханічний аналіз

Способи біомеханічного аналізу описані раніше Bak and Andreassen (Calcif Tissue Int (1989) 45: 292-297). Коротко кажучи, перед біомеханічним тестуванням роблять рентгенівські знімки всіх переломів. Механічні властивості заживаючих переломів аналізують шляхом деструктивного трьох- або чотирьох-точкового вигину. Визначають максимальне навантаження, жорсткість, енергію при максимальному навантаженні, деформацію при максимальному навантаженні і максимальне зусилля.

Приклад 5

Клонування повнорозмірного ендогенного людського GPR119

Полінуклеотид, що кодує ендогенний людський GPR119, клонують методом ПЛР з використанням GPR119-специфічних праймерів 5'-GTCCTGCCACTTCGAGACATGG-S' (SEQ ID NO: 3; смислова послідовність, ATG - ініціюючий кодон) 5'-GAAACTTCTCTGCCCTTACCGTC-S' (SEQ ID NO: 4; антисмислова послідовність, 3' - стоп-кодон) і людською геномною ДНК як матриця. Для проведення ампліфікації використовують ДНК-полімеразу TaqPlus Precision™ (Stratagene) і нижченаведений цикл, що повторюється 35 разів від стадії 2 до стадії 4: 94°C, 3 хвилини; 94°C, 1 хвилина; 58°C, 1 хвилина; 72°C, 2 хвилини; 72°C, 10

хвилин. Отриманий методом ПЛР фрагмент з передбаченим розміром 1,0 т.о. виділяють і клонують у векторі pCRII-TOPOTM (Invitrogen), після чого його піддають повному секвенуванню з використанням набору, що містить ДНК-секвеназу T7 (Amersham). Нуклеотидна послідовність описана як SEQ ID NO: 1, а амінокислотна послідовність, що кодується нею описана як SEQ ID NO: 2.

Приклад 6

Експресія рецептора

Хоча в даній галузі доступний ряд клітин, придатних для експресії G-білок-зв'язаних рецепторів, найбільш переважно використати еукаріотичні клітини. У деяких втіленнях використовують клітини ссавців або меланофори. Нижченаведений опис є ілюстративним; фахівці в даній галузі можуть визначити, які методи краще усього підходять для рішення конкретних задач. Застосування меланофорів описане, наприклад, нижче в прикладі 9.

а. Транз'єнтна трансфекція

У перший день клітини 293 висівають в чашки з щільністю 6×10^4 /10 см. На другий день отримують реакційні суміші для двох пробірок (пропорції, приведені для кожної чашки, відповідають одній чашці): суміш для пробірки А містить 4 мкг ДНК (наприклад, вектора pCMV; вектора pCMV, що містить кДНК, що кодує рецептор і інш.) в 0,5 мл безсироваткового середовища DMEM (Gibco BRL); суміш для пробірки В містить 24 мкл ліпофектаміну (Gibco BRL) в 0,5 мл безсироваткового середовища DMEM. Пробірки А і В змішують шляхом перевернення (декілька разів) і інкубують при кімнатній температурі протягом 30-45 хв. Отриману суміш називають "сумішшю для трансфекції". Клітини, що знаходяться на чашках 293 промивають $1 \times$ PBS і додають 5 мл безсироваткового середовища DMEM. До клітин додають 1 мл суміші для трансфекції і інкубують протягом 4 год. при 37°C/5% CO₂. Суміш для трансфекції видаляють відсмоктуванням, потім додають 10 мл DMEM/10% фетальної бичачої сироватки. Клітини інкубують при 37°C/5% CO₂. Через 48 год. клітини збирають і використовують для аналізу.

б. Стабільні клітинні лінії

Приблизно 12×10^4 клітин 293 вміщують в чашку для культивування тканин діаметром 15 см. Вирощують в середовищі DME з високою концентрацією глюкози, що містить десять процентів фетальної бичачої сироватки і один процент пірувату натрію, L-глутамін і антибіотики. Через двадцять чотири години після початку культивування клітин 293 (або після досягнення ~80% злиття) клітини трансфікують, використовуючи 12 мкг ДНК (наприклад, вектор pCMV-neoR, що містить кДНК, що кодує рецептор). 12 мкг ДНК об'єднують з 60 мкл ліпофектаміну і 2 мл безсироваткового середовища DME з високим вмістом глюкози. Середовище відсмоктують з чашок і клітини промивають один раз безсироватковим середовищем. У чашки додають суміш ДНК, ліпофектаміну і середовища, а також 10 мл безсироваткового середовища. Після інкубації при 37°C протягом чотирьох-п'яти годин середовище відсмоктують і додають 25 мл середовища, що містить сироватку. Через двадцять

чотири години після трансфекції середовище знов відсмоктують і додають свіже середовище з сироваткою. Через сорок вісім годин після трансфекції середовище відсмоктують і додають нове середовище, що містить сироватку і генетин (лікарський засіб G418) в кінцевій концентрації 500 мкг/мл. Приблизно 12×10^6 клітин 293 вміщують в чашку для культивування тканин діаметром 15 см. Вирощують в середовищі DME з високою концентрацією глюкози, що містить десять процентів фетальної бичачої сироватки і один процент пірувату натрію, L-глутамін і антибіотики. Через двадцять чотири години після початку культивування клітин 293 (або після досягнення ~80% злиття) клітини трансфікують, використовуючи 12 мкг ДНК (наприклад, вектор pCMV, що містить кДНК рецептора). 12 мкг ДНК об'єднують з 60 мкл ліпофектаміну і 2 мл безсироваткового середовища DME з високим вмістом глюкози. Середовище відсмоктують з чашок і клітини промивають один раз безсироватковим середовищем. У чашки додають суміш ДНК, ліпофектаміну і середовища, а також 10 мл безсироваткового середовища. Після інкубації при 37°C протягом чотирьох-п'яти годин середовище відсмоктують і додають 25 мл середовища, що містить сироватку. Через двадцять чотири години після трансфекції середовище знов відсмоктують і додають свіже середовище з сироваткою. Через сорок вісім годин після трансфекції середовище відсмоктують і додають нове середовище, що містить сироватку і генетин (лікарський засіб G418) в кінцевій концентрації 500 мкг/мл. Трансфіковані клітини піддають селекції, вибираючи позитивно трансфіковані клітини, що містять ген стійкості до G418. При проведенні селекції середовище міняють кожні 4-5 днів. У процесі селекції клітини вирощують до отримання стабільних пулів або ділять на частини для проведення селекції стабільних клонів.

Приклад 7

Аналізи, що використовуються при проведенні скринінга сполук-кандидатів, таких, як, наприклад, агоністи GPR119

Існує ряд способів скринінга сполук-кандидатів, таких як, наприклад, GPR119 агоністи. Нижченаведений опис є ілюстративним; фахівці в даній галузі можуть визначити, які методи краще усього підходять для рішення конкретних задач. Аналізи, що використовуються для проведення скринінга сполук, таких як агоністи G-білок-зв'язаного рецептора, добре відомі кваліфікованим фахівцям (див., наприклад, міжнародну заявку WO 02/42461).

1. Аналізи зв'язування з мембраною: Аналіз [35 S]ГТФ γ S

Якщо G-білок-зв'язаний рецептор знаходиться в активному стані, або внаслідок зв'язування ліганда, або внаслідок конститутивної активації, рецептор зв'язується з G-білком і стимулює вивільнення ГДФ і подальше зв'язування ГТФ з G-білком. Альфа-субодиниця комплексу G-білок-рецептор діє як ГТФ-аза, повільне гідролізує ГТФ до ГДФ, після чого звичайно відбувається дезактивація рецептора. Активовані рецептори продовжують перетворювати ГДФ в ГТФ. Негідролізований ана-

лог ГТФ, [35 S]ГТФ γ S, можна використати для демонстрації збільшення зв'язування [35 S]ГТФ γ S з мембранами, на яких експресуються активовані рецептори. Перевага визначення активації шляхом вимірювання зв'язування [35 S]ГТФ γ S полягає в тому, що: (а) воно, як правило, застосовне до всіх G-білок-зв'язаних рецепторів; (б) його проводять поблизу мембранної поверхні, що зменшує імовірність поглинання молекул, що впливають на внутрішньоклітинний каскад.

У даному аналізі використовується здатність G-білок-зв'язаних рецепторів стимулювати зв'язування [35 S]ГТФ γ S з мембранами, на яких експресуються рецептори, що розглядаються. Аналіз є загальним і застосовується для розробки лікарських засобів, діючих на всі G-білок-зв'язаний рецептори.

Отримання мембран

У деяких втіленнях мембрани, що містять G-білок-зв'язаний рецептор даного винаходу, і що застосовуються для ідентифікації сполук-кандидатів, таких як, наприклад, агоністи рецептора, переважно отримують таким чином:

а. Матеріали

"Буфер для зішкрібання мембран" містить 20 мМ HEPES і 10 мМ EDTA, pH 7,4; "буфер для промивання мембран" містить 20 мМ HEPES і 0,1 мМ EDTA, pH 7,4; "буфер для зв'язування" містить 20 мМ HEPES, 100 мМ NaCl і 10 мМ MgCl₂, pH 7,4.

б. Метод

Під час проведення методу всі матеріали тримають на льоду. Спочатку з моношару клітин, що злилися, видаляють середовище, потім промивають 10 мл холодного PBS з подальшим відсмоктуванням буфера. Потім, щоб зішкрібати клітини, додають 5 мл буфера для зішкрібання мембран; після цього клітинний екстракт переносять в центрифужні пробірки об'ємом 50 мл (центрифугують при 20000 об./хв. протягом 17 хвилин при 4°C). Супернатант видаляють, а осад ресуспендують в 30 мл буфера для промивання мембран з подальшим центрифугуванням при 20000 об./хв. протягом 17 хвилин при 4°C. Супернатант видаляють, а осад ресуспендують в буфері для зв'язування. Потім отриману суспензію гомогенізують за допомогою гомогенізатора Brinkman PolytronTM (з використанням 15-20-секундних імпульсів до суспендування всієї речовини). Отриманий препарат в даному описі називають "мембранний білок".

Аналіз білка по Бредфорду

Після гомогенізації концентрацію мембранного білка визначають по методу Бредфорда (білок розбавляють приблизно до 1,5 мкг/мл, беруть аліквоти, заморожують (-80°C) і зберігають до подальшого застосування; у випадку замороженого препарату використовують наступну методику: в день аналізу заморожений мембранний білок відтають при кімнатній температурі, струшують і гомогенізують за допомогою Polytron приблизно при 12×1000 об./хв. протягом приблизно 5-10 секунд; потрібно зазначити, що у разі обробки декількох препаратів гомогенізатор треба ретельно промити перед гомогенізацією іншого препарату.

а. Матеріали

Буфер для зв'язування (як описано вище); забарвлюючий реагент для аналізу Бредфорда; стандартний білок для аналізу Бредфорда використовують відповідно до інструкцій виробника (Biorad, № по каталогу 500-0006).

b. Метод

Готують пробірки з дублікатами, одна пробірка містить мембранний препарат, а інша містить контрольний "пустий" розчин. Кожна пробірка містить 800 мкл буферу для зв'язування. Потім в кожную пробірку додають 10 мкл розчину стандартного білка для аналізу Бредфорда (1 мг/мл), а 10 мкл мембранного білка додають тільки в одну пробірку (не контрольну). Потім у всі пробірки додають 200 мкл забарвлюючого реагенту для аналізу Бредфорда і струшують. Через п'ять (5) хвилин пробірки знов струшують і речовину, що знаходиться в них, переносять в кювети. Кювети прочитують на спектрофотометрі CECIL 3041 при довжині хвилі 595.

Ідентифікаційний аналіз

a. Матеріали

Отримують буфер ГДФ шляхом змішування 37,5 мл буфера для зв'язування і 2 мг ГДФ (Sigma, № по каталогу G-7127) і потім роблять серійні розбавлення буфером для зв'язування до отримання концентрації ГДФ 0,2 мкМ (кінцева концентрація ГДФ в кожній ямці становить 0,1 мкМ); кінцевий об'єм реакційної суміші в кожній ямці, що містить сполуку-кандидат, становить 200 мкл і включає в себе 100 мкл буфера ГДФ (кінцева концентрація ГДФ 0,1 мкМ), 50 мкл мембранного білка в буфері для зв'язування і 50 мкл [³⁵S]ГТФγS (0,6 нМ) в буфері для зв'язування (2,5 мкл [³⁵S]ГТФγS на 10 мл буферу для зв'язування).

b. Метод

Переважно, скринінг сполук-кандидатів проводять в форматі 96-ямкового планшета (сполуки можуть бути заморожені при -80°C). Мембранний білок (або мембрани з вектором експресії, що не містять цільового GPCR, як контроль) швидко гомогенізують до отримання суспензії. Потім за допомогою описаного вище методу Бредфорда визначають концентрацію білка. Мембранний білок (і контроль) розбавляють буфером для зв'язування до отримання концентрації 0,25 мг/мл (кінцева концентрація в аналітичній суміші 12,5 мкг/ямка). У кожную ямку Wallac Scintistrip™ (Wallac) додають 100 мкл буферу ГДФ. Потім за допомогою піпетки на 5 мкл в кожную ямку вносять 5 мкл сполуки-кандидата (5 мкл становить 1:40 частину від загального об'єму аналітичної суміші, отже, кінцева концентрація сполуки-кандидата, що використовується в скринінгу, становить 10 мкМ). Знову ж, щоб уникнути забруднення, після кожного перенесення піпетку потрібно промивати в трьох резервуарах, що містять воду (1×), етанол (1×) і воду (2×), причому після кожного промивання надлишок рідини треба видаляти і сушити піпетку за допомогою паперу і безворсових серветок. Потім в кожную ямку додають 50 мкл мембранного білка (контрольна ямка містить мембрани без цільового GPCR) і прейнкубують протягом 5-10 хвилин при кімнатній температурі. Після цього в кожную ямку додають 50 мкл [³⁵S]ГТФγS (0,6 нМ) в буфері для зв'язування і ін-

кубують на шейкері протягом 60 хвилин при кімнатній температурі (в даному прикладі планшети накривають фольгою). Реакцію зупиняють шляхом центрифугування планшетів при 4000 об./хв. протягом 15 хвилин при 22°C. Середовище з ямок відсмоктують 8-канальним колектором, і планшети закривають кришками для планшетів. Потім планшети прочитують на Wallac 1450, використовуючи установку "Prot. #37" (відповідно до інструкцій виробника).

2. Аденілатциклазний аналіз

Набір для визначення аденілатциклази Flash Plate™ (New England Nuclear; № по каталогу SMP004A), розроблений для аналізів клітин, можна модифікувати в застосуванні до неочищених плазматичних мембран. Ямка Flash Plate може містити сцинтиляційне покриття, до складу якого також входить антитіло, що специфічно розпізнає цАМФ. Кількість цАМФ, що утворюється в ямках, можна визначити шляхом аналізу безпосередньої конкуренції з радіоактивноміченим цАМФ за зв'язування з антитілом проти цАМФ. Нижче наведений короткий опис методики вимірювання змін рівнів цАМФ в клітинах, що експресують рецептори.

У деяких втіленнях для ідентифікації сполук-кандидатів, таких як, наприклад, агоністи GPR119, використовують модифікований набір для визначення аденілатциклази Flash Plate™ (New England Nuclear; № по каталогу SMP004A) відповідно до нижченаведеної методики.

Клітини, трансфіковані геном, що кодує G-білок-зв'язаний рецептор даного винаходу, збирають приблизно через три дні після трансфекції. Мембрани отримують шляхом гомогенізації клітин, суспендованих в буфері, що містить 20 мМ HEPES, pH 7,4 і 10 мМ MgCl₂. Гомогенізацію проводять на льоду з допомогою Brinkman Polytron™ протягом приблизно 10 секунд. Отриманий гомогенат центрифугують при 49000×g протягом 15 хвилин при 4°C. Потім отриманий осад ресуспендують в буфері, що містить 20 мМ HEPES, pH 7,4 і 0,1 мМ EDTA, гомогенізують 10 секунд і центрифугують при 49000×g протягом 15 хвилин при 4°C. Отриманий осад зберігають при -80°C до використання. Безпосередньо в день ідентифікаційного аналізу мембранний осад повільно відтають при кімнатній температурі і ресуспендують в буфері, що містить 20 мМ HEPES, pH 7,4, і 10 мМ MgCl₂, з отриманням кінцевої концентрації 0,60 мг/мл (ресуспендовані мембрани вмішують на лід до застоування).

Стандартні розчини цАМФ і буфер для детекції (що містить 2 мкКи мітки [¹²⁵I]цАМФ (100 мкл) в 11 мл буферу для детекції) отримують і зберігають відповідно до інструкцій виробника. Для скринінга використовують свіжоотриманий буфер для аналізу, що містить 20 мМ HEPES, pH 7,4, 10 мМ MgCl₂, 20 мМ фосфокреатин (Sigma), 0,1 одиниць/мл креатинфосфокінази (Sigma), 50 мкМ ГТФ (Sigma) і 0,2 мМ АТФ (Sigma); буфер для аналізу зберігають на льоду до використання.

Переважно, сполуки-кандидати додають, наприклад, в ямки 96-ямкового планшета (3 мкл/ямка; кінцева концентрація в аналітичній су-

міші 12 мкМ) разом з 40 мкл препарату мембранного білка (30 мкг/ямка) і 50 мкл буферу для аналізу. Потім отриману суміш інкубують протягом 30 хвилин при кімнатній температурі при легкому струшуванні.

Після інкубації в кожну ямку додають 100 мкл буферу для детекції і інкубують протягом 2-24 годин. Потім планшети зчитують з допомогою планшет-рідера Wallac MicroBetaTM, використовуючи "Prot. #31" (відповідно до інструкцій виробника).

3. Аналіз репортера CRE-Luc

Клітини 293 і 293T висівають на 96-ямкові планшети з щільністю 2×10^4 клітин на ямку і на наступний день проводять трансфекцію з використанням реагенту ліпоектаміна (BRL) відповідно до інструкцій виробника. Суміш ДНК/ліпід для кожної 6-ямкової трансфекції отримують таким чином: 260 нг плазмідної ДНК в 100 мкл DMEM обережно змішують з 2 мкл ліпиду в 100 мкл DMEM (260 нг плазмідної ДНК включають в себе 200 нг репортерної плазмиди 8XCRE-Luc, 50 нг pCMV, що містить послідовність, що кодує G-білок-зв'язаний рецептор даного винаходу, або тільки pCMV, і 10 нг експресійної плазмиди GPRS (GPRS в pCDNA3 (Invitrogen))). Репортерну плазмиду 8XCRE-Luc отримують таким чином: вектор SRIF- β -gal отримують шляхом клонування промотора щурячого соматостатину (-71/+51) в ділянці BglI-HindIII вектора p β gal-Basic (Clontech). Вісім (8) піків цАМФ-чутливого елемента, отриманих методом ПЛР з використанням як матриця аденовірусу AdpCF126CCRE8 [див., Suzuki et al., Hum Gene Ther (1996) 7: 1883-1893; зміст якої включений в даний опис як посилання у всій повноті], клонують у векторі SRIF- β -gal в ділянці Kpn-BglI і отримують репортерний вектор 8XCRE- β -gal. Репортерну плазмиду 8XCRE-Luc отримують шляхом заміни гена бета-галактозидази в репортерному векторі 8XCRE- β -gal геном люциферази, отриманим з вектора pGL3-basic (Promega), ділянка HindIII-BamHI. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі суміш ДНК/ліпід розбавляють 400 мкл DMEM і 100 мкл розбавленої суміші вносять в кожну ямку. Після 4 год. інкубації в інкубаторі для клітинних культур в кожну ямку додають 100 мкл DMEM, що містить 10% FCS. На наступний день середовище для трансфікованих клітин замінюють на 200 мкл/ямка DMEM, що містить 10% FCS. Через вісім (8) годин середовище в ямках замінюють на 100 мкл/ямка DMEM, що не містить фенолового червоного, після одного промивання PBS. Активність люциферази вимірюють на наступний день, використовуючи набір для аналізу репортерного гена LucLiteTM (Packard), відповідно до інструкцій виробника, планшети підраховують на сцинтиляційному і люмінесцентному лічильнику 1450 MicroBetaTM (Wallac).

Приклад 8

Аденілатциклазний аналіз на цілих клітинах, наприклад, активності агоніста GPR119

Вимірювання циклічного АМФ проводять з використанням набору для визначення аденілатциклазної активності Flash PlateTM (New England Nuclear) відповідно до інструкцій постачальника. Клітини HEK293 висівають в чашки для культиву-

вання тканин діаметром 15 см з щільністю 12×10^6 клітин на чашку в звичайному поживному середовищі (DMEM/10% FBS). На наступний день 10 мкл або пустого ДНК-вектора, або експресійної ДНК-плазмиди трансфікують в клітини з використанням ліпоектаміна (Invitrogen, Carlsbad, CA) відповідно до інструкцій виробника. Після культивування протягом 24 годин трансфіковані клітини збирають і вміщують в буфер для дисоціації клітин GIBCO (№ по каталогу 13151-014), осаджують шляхом центрифугування протягом 5 хвилин при 1100 об./хв. і обережно ресуспендують у відповідному об'ємі буфера для аналізу (50% $1 \times$ PBS і 50% буферу для стимуляції) до отримання кінцевої щільності клітин 2×10^6 /мл. Отримують препарати сполук, що тестуються в 50 мкл буферу для аналізу з бажаною концентрацією, якщо вона вказана, і вносять їх в ямки 96-ямкового планшета Flash Plate. Потім додають отриману раніше суспензію клітин (50 мкл на ямку). Після інкубації протягом 60 хвилин при кімнатній температурі в ямки додають 100 мкл суміші для детекції, що містить мічений [125 I]-цАМФ. Планшети інкубують ще 2 години і підраховують в сцинтиляційному лічильнику Wallac MicroBeta. Значення кількості цАМФ/ямка визначають з допомогою стандартної кривої цАМФ, яка додається до кожного аналітичного планшета.

Підвищення рівня цАМФ в GPR119-трансфікованих клітинах HEK293 в порівнянні з клітинами HEK293, трансфікованими пустим вектором, вказує на те, що сполука, що тестується, стимулює функціонування рецептора GPR119.

Приклад 9

Аналіз, наприклад, агоністическої активності GPR119 з використанням меланофорів

Меланофори культивують, як описано Potenza et al [Pigment Cell Research (1992) 5:372-378], і трансфікують вектором експресії, що кодує рецептор GPR119 (GPR119; наприклад, людський GPR119, GenBank®, № доступу AAP72125, і його алелі), використовуючи метод електропорації. Після електропорації трансфіковані клітини вміщують в 96-ямкові аналітичні планшети. Потім клітини залишають рости протягом 48 годин, щоб вони відновилися після процедури електропорації, а експресія рецептора досягла максимального рівня.

У день аналізу поживне середовище замінюють на безсироватковий буфер, що містить 10 нМ мелатоніну. Мелатонін діє в меланофорах через ендогенний Gi-зв'язаний GPCR, знижуючи рівень внутрішньоклітинного цАМФ. У відповідь на зниження рівня цАМФ пігмент в меланофорах переміщається в центр клітини. Результатом цього є зменшення поглинання, що вимірюється для моношару клітин в ямці при 600-650 нМ.

Після інкубації протягом 1 години в середовищі, що містить мелатонін, в клітинах спостерігається завершення агрегації пігменту. У даний момент вимірюють початковий рівень поглинання. Потім в планшет додають серійні розведення сполук, що тестуються; сполуки, що володіють агоністичною активністю у відношенні GPR119, спричиняють збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ. У відповідь на збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ пігмент в меланофорах пе-

реміщається зворотно до периферії клітин. Через годину в стимульованих клітинах завершується диспергування пігменту. Моношар клітин з диспергованим пігментом абсорбує набагато більше світла в діапазоні 600-650 нМ. Вимірювання збільшення поглинання в порівнянні з початковим рівнем дозволяє кількісно оцінити міру стимуляції рецептора і побудувати криву доза-відповідь.

Опис матеріалів і методів, що використовуються в аналізі меланофорів, можна знайти в патентах США №№ 5462856 і 6051386, зміст кожного з них включений в даний опис як посилання у всій повноті.

Збільшення диспергування пігменту в GPR119-трансфікованих меланофорах в порівнянні з меланофорами, трансфікованими пустим вектором, вказує на те, що сполука, що тестується, стимулює функціонування рецептора GPR119.

Фахівцям в даній галузі відомі і інші аналізи, які можна використати для ідентифікації сполуки, такої як агоніст GPR119 (див., наприклад, наведеной вище приклад 7).

Приклад 10

Аналіз, наприклад, активності агоніста GPR119 з використанням дріжджового репортера

Аналіз репортера на основі дріжджових клітин описаний в літературі (наприклад, див. Miret et al., *J Biol Chem* (2002) 277:6881-6887; Campbell et al., *Bioorg Med Chem Lett* (1999) 9:2413-2418; King et al., *Science* (1990) 250:121-123; WO 99/14344; WO 00/12704; і US 6100042). Коротко кажучи, методом генної інженерії отримують дріжджові клітини, в яких ендегенний дріжджовий G-альфа (GPA1) замінений на сконструйовані різними способами химерні G-білки. Крім того, ендегенний GPCR дріжджових альфа-клітин, Ste3, видаляють, щоб забезпечити гомологічну експресію GPCR ссавців, що представляє інтерес. У дріжджах елементи шляху передачі сигналу феромону, які є консервативними для еукаріотичних клітин (наприклад, шлях мітоген-активованої протеїнкінази), управляють експресією Fus1. Шляхом вміщення гена β -галактозидази (LacZ) під контроль промотору Fus1 (Fus1p) отримують систему, в якій активація рецептора приводить до зчитування ферменту.

Дріжджові клітини трансформують за допомогою адаптованого способу з використанням ацетату літію, описаного Agatep et al (Agatep et al., 1998, Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online, Trends Journals, Elsevier). Коротко кажучи, дріжджові клітини вирощують протягом ночі на планшетах з дріжджовим триптоном (YT). Носій одноланцюжкову ДНК (10 мкг), 2 мкг кожні з двох репортерних плазмід Fus1p-LacZ (одна містить маркер селекції URA, а інша - TRP), 2 мкг GPR119 (наприклад, людського рецептора) в дріжджовому векторі експресії (2 мкг точки початка реплікації) і буфер, що містить ацетат літію/поліетиленгліколь/ТЕ, вносять піпеткою в пробірку Епандорфа. У склад дріжджової експресійної плазмиди, що містить рецептор, або контрольної плазмиди, що не містить рецептор, входить маркер LEU. Дріжджові клітини вносять в отриману

суміш і інкубують при 30°C протягом 60 хв. Потім дріжджові клітини піддають тепловому удару при 42°C протягом 15 хв. Потім клітини промивають і переносять на планшети для селекції. Планшети для селекції містять синтетичне дріжджове середовище певного складу, що не містить LEU, URA і TRP (SD-LUT). Після інкубації при 30°C протягом 2-3 днів колонії, вирощені на планшетах для селекції, тестують, використовуючи аналіз LacZ.

Щоб провести флуориметричний ферментативний аналіз β -галактозидази, дріжджові клітини, що несуть досліджуваний рецептор GPR119, вирощують протягом ночі в рідкому середовищі SD-LUT до концентрації, що не досягає насичення (тобто клітини ще діляться, не досявши стаціонарної фази). Потім клітини розбавляють свіжим середовищем до оптимальної для аналізу концентрації і 90 мкл суспензії дріжджових клітин вносять в 96-ямові чорні планшети з полістиролу (Costar). У планшети додають сполуки, що тестуються, розчинені в DMSO і розбавлені 10× 10% розчином DMSO, після чого планшети інкубують при 30°C протягом 4 год. Через 4 год. в кожну ямку додають субстрат β -галактозидази. У даних експериментах використовують ди-(β -D-галактопіранозид) флуоресцеїну (FDG), субстрат ферменту, що вивільняє флуоресцеїн, що дозволяє провести флуориметричні вимірювання. У кожну ямку додають 20 мкл суміші, що містить 500 мкМ FDG/2,5% тритон X100 (детергент необхідний для придання клітинам проникності). Після інкубації клітин з субстратом протягом 60 хв. в кожну ямку додають 20 мкл 1М розчину карбонату натрію, щоб зупинити реакцію і збільшити флуоресцентний сигнал. Потім планшети зчитують на флуориметрі при 485/535 нМ.

Збільшення флуоресцентного сигналу в GPR119-трансформованих дріжджових клітинах в порівнянні з дріжджовими клітинами, трансформованими пустим вектором, вказує на те, що сполука, що тестується, стимулює функціонування рецептора GPR119 (наприклад, сполука, яка являє собою агоніст або частковий агоніст GPR119). У деяких втіленнях сполуки даного винаходу збільшують флуоресцентний сигнал до рівня, що перевищує початковий сигнал (сигнал, отриманий в присутності тільки середовища).

Приклад 11

Сполука, мічена радіоактивним ізотопом

У деяких втіленнях сполуку, що явно є лігандом G-білок-зв'язаного рецептора даного винаходу, мітять радіоактивною міткою. Як вказано в даному описі, мічену радіоактивним ізотопом сполуку можна використати в скринінгу, що проводиться з метою ідентифікації/характеристики сполук. У загальних рисах, здатність уперше синтезованої або ідентифікованої сполуки (тобто, сполуки, що тестується) зменшувати зв'язування міченого радіоактивним ізотопом відомого ліганда рецептора можна оцінити по зменшенню утворення комплексу міченого радіоактивним ізотопом відомого ліганда з рецептором. Відповідні радіонукліди, які можна ввести до складу сполук даного винаходу, включають в себе, без обмеження ^3H (що також позначається Т), ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{15}O , ^{13}N , ^{35}S і ^{77}Br . Частіше за все вико-

ристовують сполуки, що містять ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S або ^{82}Br .

Потрібно розуміти, що "мічена радіоактивним ізотопом сполука" являє собою сполуку, яка містить, щонайменше, один радіонуклід. У деяких втіленнях радіонуклід вибраний з групи, що складається з ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S і ^{82}Br . У деяких втіленнях радіонуклід являє собою ^3H або ^{14}C . Крім того, потрібно розуміти, що всі атоми, присутні в сполуці, що явно є лігандами G-білок-зв'язаного рецептора даного винаходу, можуть являти собою або ізогони таких атомів, що найчастіше зустрічаються, або радіоактивні ізотопи або нерадіоактивні ізотопи, що рідше зустрічаються.

Синтетичні способи введення радіоактивних ізоотопів до складу органічних сполук, наприклад, тритію в цільові молекули, в тому числі способи, застосовні до сполук, що явно є лігандами G-білок-зв'язаного рецептора даного винаходу, добре відомі в даній галузі і включають в себе: А. Каталітичне відновлення газоподібним тритієм - даний спосіб звичайно дозволяє отримувати продукти з високою питомою активністю і вимагає наявності галогенованих або ненасичених попередників. В. Відновлення боргідромом [^3H] натрію - даний спосіб є більш дешевим і вимагає наявності попередників, що містять функціональні групи, що відновлюються, такі як альдегіди, кетони, лактони, складні ефіри і т.п. С. Відновлення гідромом [^3H] літію алюмінію - даний спосіб дозволяє отримувати продукти майже з теоретичною питомою активністю. Він також вимагає наявності попередників, що містять функціональні групи, що відновлюються, такі як альдегіди, кетони, лактони, складні ефіри і т.п. D. Мічення шляхом впливу газоподібного тритію - даний спосіб включає в себе вплив на попередники, що містять протони, що замінюються, газоподібного тритію в присутності відповідного каталізатора. E. N-метилування в присутності метилйодиду [^3H] - даний спосіб звичайно використовують для отримання O-метильованих або N-метильованих (^3H) продуктів шляхом обробки відповідних попередників метилйодидом [^3H] з високою питомою активністю. Даний спосіб, як правило, дозволяє отримувати сполуки з високою питомою активністю, такою як приблизно 80-87 Кі/ммоль.

Синтетичні способи введення ізоотопів ^{125}I в цільові молекули включають в себе: А. Спосіб Сандмейєра і подібні реакції - даний спосіб дозволяє перетворити арил або гетероариламін в сіль діазонію, таку як тетрафторборат, і потім в ^{125}I -мічену сполуку з використанням Na^{125}I . Даний спосіб описаний Zhu, D.-G. з співавторами в J. Org. Chem. 2002, 67, 943-948. В. Орто- ^{125}I йодинування фенолів - даний спосіб дозволяє здійснювати введення ^{125}I в орто-положення фенолу, як описано Collier, T. L. з співавторами в J. Labelled Compd Radiopharm. 1999, 42, S264-S266. С. Заміна бромом в арил- і гетероарилбромідах на ^{125}I - даний спосіб звичайно проводять в дві стадії. Перша стадія включає в себе перетворення арил- або гетероарилброміду у відповідну проміжну сполуку триалкілолова, з допомогою, наприклад, каталізованої Pd реакції (наприклад, $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$), або через арил або гетероа-

рил літію, в присутності галогеніду триалкілолова або гексаалкілдіолова (наприклад, $(\text{CH}_3)_3\text{SnSn}(\text{CH}_3)_3$). Даний спосіб описаний Bas, M.-D. з співавторами в J. Labelled Compd Radiopharm. 2001, 44, S280-S282.

Описані вище способи призначаються для ілюстрації, але не для обмеження. Інші методи радіоактивного мічення сполук, що явно є лігандами G-білок-зв'язаного рецептора даного винаходу, добре відомі кваліфікованим фахівцям.

Приклад 12

Аналіз зв'язування рецептора

Сполуку, що тестується, можна охарактеризувати по її здатності зменшувати утворення комплексу сполуки, що явно є лігандом G-білок-зв'язаного рецептора даного винаходу, з рецептором. У деяких втіленнях відомий ліганд містить радіоактивний ізоотоп. Мічений радіоактивним ізоотопом відомий ліганд можна використати в скринінгу, що проводиться для ідентифікації/характеристики сполук. У загальних рисах, здатність уперше синтезованої або ідентифікованої сполуки (тобто сполуки, що тестується) зменшувати зв'язування міченого радіоактивним ізоотопом відомого ліганда рецептора можна оцінити по зменшенню утворення комплексу міченого радіоактивним ізоотопом відомого ліганда з рецептором.

Зменшення рівня специфічного зв'язування міченого радіоактивним ізоотопом відомого ліганда в присутності сполуки, що тестується, в порівнянні з рівнем специфічного зв'язування міченого радіоактивним ізоотопом відомого ліганда за відсутності сполуки, що тестується, вказує на те, що в присутності сполуки, що тестується, утвориться менше комплексу вказаного міченого радіоактивним ізоотопом відомого ліганда з вказаним рецептором, ніж за відсутності сполуки, що тестується.

Спосіб детекції комплексу сполуки, що явно є лігандом G-білок-зв'язаного рецептора даного винаходу, з рецептором

А. Отримання рецептора

Клітини 293 транзійтно трансфікують 10 мкг вектора експресії, що містить полінуклеотид, який кодує G-білок-зв'язаний рецептор даного винаходу, з використанням 60 мкл ліпофектаміну (на 15-см чашці). Після вирощування транзійтно трансфікованих клітин на чашках протягом 24 годин (до 75% злиття) середовище видаляють і замінюють буфером Hepes-EDTA 10 мл/чашка (20 mM HEPES+10 mM EDTA, pH 7,4). Потім клітини центрифугують в центрифугу Beckman Coulter протягом 20 хвилин при 17000 об./хв. (ротор JA-25.50). Осад ресуспендують в 20 mM HEPES+1 mM EDTA, pH 7,4, гомогенізують з допомогою 50-мл гомогенізатора Dounce і знов центрифугують. Після видалення супернатанта осади зберігають при -80°C до використання в аналізі зв'язування. Для проведення аналізу мембрани відтають на льоду протягом 20 хвилин і потім додають 10 мл буферу для інкубації (20 mM Hepes, 1 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, pH 7,4). Потім мембрани струшують, щоб суспендувати осад неочищених мембран і гомогенізують за допомогою гомогенізатора Brinkmann PT-3100 Polytron протягом 15 секунд в режимі 6.

Концентрацію мембранного білка визначають методом Бредфорда BRL.

В. Аналіз зв'язування

Для визначення загального зв'язування в 96-ямкові поліпропіленові планшети для мікротитрування вносять відповідним чином розбавлені мембрани в загальному об'ємі 50 мкл (розбавляють буфером для аналізу, що містить 50 mM Tris HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ і 1 mM EDTA; 5-50 мкг білка), потім 100 мкл буферу для аналізу і 50 мкл міченого радіоактивним іотоном відомого ліганда. При визначенні неспецифічного зв'язування додають не 100, а 50 мкл буферу для аналізу і перед додаванням 50 мкл міченого радіоактивним ізотопом відомого ліганда додають 50 мкл 10 мкМ розчину неміченого вказаного відомого ліганда. Потім планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 60-120 хвилин. Реакцію зв'язування зупиняють шляхом фільтрування аналітичних планшетів з використанням пристрою для фільтрування мікропланшетів GF/C і колектора для 96-ямкових планшетів Brandell, з подальшим промиванням холодним буфером 50 mM Tris HCl, pH 7,4, що містить 0,9% NaCl. Потім дно фільтраційних планшетів герметично закривають, в кожну ямку додають 50 мкл Optiphasе Supermix, закривають верх і планшети підраховують в сцинтиляційному лічильнику Trilux MicroBeta. Щоб визначити, чи дійсно в присутності сполуки, що тестується, утвориться менше комплексу міченого радіоактивним ізотопом відомого ліганда з вказаним рецептором, у відповідну ямку замість 100 мкл буфера для аналізу додають 100 мкл відповідним чином розбавленого розчину вказаної сполуки, що тестується, і потім 50 мкл вказаного міченого радіоактивним ізотопом відомого ліганда.

С. Обчислення

Сполуки, що тестуються, спочатку аналізують в концентраціях 10, 1 і 0,1 мкМ, потім в діапазоні концентрацій, вибраному так, щоб середня доза викликала приблизно 50% інгібування зв'язування мічених радіоактивним ізотопом відомого ліганда (тобто відповідала IC₅₀). Специфічне зв'язування за відсутності сполуки, що тестується (B₀), визначають як різницю загального зв'язування (B_T) і неспецифічного зв'язування (NSB), аналогічно специфічне зв'язування (в присутності сполуки, що тестується) (B) визначають як різницю заміщеного зв'язування (BD) і неспецифічного зв'язування (NSB). IC₅₀ визначають за допомогою кривої інгібування, залежність logit-log %B/B₀ від концентрації сполуки, що тестується.

K_i розраховують шляхом трансформації Ченга і Прустофа:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_D)$$

де [L] означає концентрацію, що використовується в аналізі міченого радіоактивним ізотопом відомого ліганда, а K_D означає константу дисоціації міченого радіоактивним ізотопом відомого ліганда, що визначається незалежно в таких же умовах зв'язування.

Приклад 13

Вплив агоніста GPR119 на секрецію GIP в лінії enteroендокринних клітин або в клітинах тканини, отриманої із збагаченої К-клітинами ділянки тонкого кишечника

За допомогою описаного тут аналізу *in vitro* можна показати, що агоніст GPR119 даного винаходу стимулює секрецію GIP в лінії enteroендокринних клітин або в клітинах тканини, отриманої із збагаченої К-клітинами ділянки тонкого кишечника [наприклад, тканини дванадцятипалої кишки або худі кишки; див., наприклад, Sondhi et al., Pharmacogenetics J (2006) 6: 131-140]. В перший день enteroендокринні клітини або клітини тканини, отриманої із збагаченої К-клітинами ділянки тонкого кишечника, вміщують в 24-ямкові планшети в повному культуральному середовищі (DMEM/10% FBS). На другий день культуральне середовище замінюють середовищем з низьким вмістом глюкози (DMEM/3 mM глюкоза/10% FBS). На третій день клітини двічі промивають 1×PBS. Промиті клітини стимулюють середовищем, агоністом GPR119 в різних концентраціях (наприклад, в інтервалі від 1 nM до 20 мкМ) або форсколіном (1 мкМ) як позитивним контролем, в безсироватковому середовищі, що містить 15 mM глюкозу, протягом 1 години при 37°C і 5% CO₂, в інкубаторі для тканинних культур. Потім супернатанти збирають і освітлюють шляхом центрифугування при 500 g і 4°C протягом 5 хвилин. Вивільнення GIP в супернатант визначають методом ELISA з використанням реагентів, отриманих від LINCO Research Laboratory [ELISA для визначення щурячого/мишачого шлункового інгібіторного поліпептида (загального), № по каталогу EZRMGIP-55K], відповідно до інструкцій постачальника.

Вищевикладений опис роз'яснює принципи даного винаходу нарівні з прикладами, наведеними з метою ілюстрації, однак потрібно розуміти, що здійснення даного винаходу включає в себе всі традиційні варіації, адаптації або модифікації, що входять в об'єм нижченаведеної формули винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Arena Pharmaceuticals, Inc.

Chu, Zhi-Liang

Leonard, James

<120> СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ РЕЦЕПТОРА GPR119 ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ СПОЛУК,
ЯКІ МОЖНА ВИКОРИСТОВУВАТИ ДЛЯ ЗБІЛЬШЕННЯ КІСТКОВОЇ МАСИ СУБ'ЄКТА

<130> 122.WO1

<150> 60/791,550

<151> 2006-04-11

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1008

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggaatcat ctttctcatt tggagtgatc cttgctgtcc tggcctccct catcattgct 60

actaacacac tagtggtgtg ggctgtgctg ctgttgatcc acaagaatga tgggtgcagt 120

ctctgcttca ccttgaatct ggctgtggct gacaccttga ttggtgtggc catctctggc 180

ctactcacag accagctctc cagcccttct cgcccacac agaagaccct gtgcagcctg 240

cggatggcat ttgtcacttc ctccgcagct gcctctgtcc tcacgggcat gctgatcacc 300

tttgacaggt accttgccat caagcagccc ttccgtact tgaagatcat gagtgggttc 360

| 119 | 97479 | 120 | |
|---|-------|-----|------|
| gtggcgggg cctgcattgc cgggctgtgg ttagtgtctt acctcattgg ctctctccca | | | 420 |
| ctcggaatcc ccatgttcca gcagactgcc tacaaagggc agtgcagctt ctttgctgta | | | 480 |
| tttcaccctc acttcgtgct gaccctctcc tgcgttggt tcttcccagc catgctctc | | | 540 |
| tttgtcttct tctactgcga catgctcaag attgcctcca tgcacagcca gcagattcga | | | 600 |
| aagatggaac atgcaggagc catggctgga ggttatcgat cccacaggac tcccagcgac | | | 660 |
| ttcaaagctc tccgtactgt gtctgttctc attgggagct ttgctctatc ctggaccccc | | | 720 |
| tctcttatca ctggcattgt gcagggtggc tgccaggagt gtcacctcta cctagtgtg | | | 780 |
| gaacggtacc tgtggtgct cggcgtgggc aactcctgc tcaaccact catctatgcc | | | 840 |
| tattggcaga aggaggtgcg actgcagctc taccacatgg ccctaggagt gaagaaggta | | | 900 |
| ctcacctcat tctctctctt tctctcgcc aggaattgtg gccagagag gccagggaa | | | 960 |
| agttcctgtc acatcgtcac tatctccagc tcagagtttg atggetaa | | | 1008 |

<210> 2

<211> 335

<212> БИЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Ala Ser

1

5

10

15

121

97479

122

Leu Ile Ile Ala Thr Asn Thr Leu Val Ala Val Ala Val Leu Leu Leu

20

25

30

Ile His Lys Asn Asp Gly Val Ser Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala

35

40

45

Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Leu Thr Asp

50

55

60

Gln Leu Ser Ser Pro Ser Arg Pro Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu

65

70

75

80

Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val

85

90

95

Met Leu Ile Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Phe Arg

100

105

110

Tyr Leu Lys Ile Met Ser Gly Phe Val Ala Gly Ala Cys Ile Ala Gly

115

120

125

Leu Trp Leu Val Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Ile Pro

130

135

140

Met Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Gly Gln Cys Ser Phe Phe Ala Val

145

150

155

160

123

97479

124

Phe His Pro His Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Phe Phe Pro

165

170

175

Ala Met Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala

180

185

190

Ser Met His Ser Gln Gln Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met

195

200

205

Ala Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Asp Phe Lys Ala Leu

210

215

220

Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Ala Leu Ser Trp Thr Pro

225

230

235

240

Phe Leu Ile Thr Gly Ile Val Gln Val Ala Cys Gln Glu Cys His Leu

245

250

255

Tyr Leu Val Leu Glu Arg Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser

260

265

270

Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Lys Glu Val Arg Leu

275

280

285

Gln Leu Tyr His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Val Leu Thr Ser Phe

290

295

300

125

97479

126

Leu Leu Phe Leu Ser Ala Arg Asn Cys Gly Pro Glu Arg Pro Arg Glu
305 310 315 320

Ser Ser Cys His Ile Val Thr Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asp Gly
325 330 335

<210> 3

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Праймер

<400> 3

gtcctgccac ttcgagacat gg

22

<210> 4

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

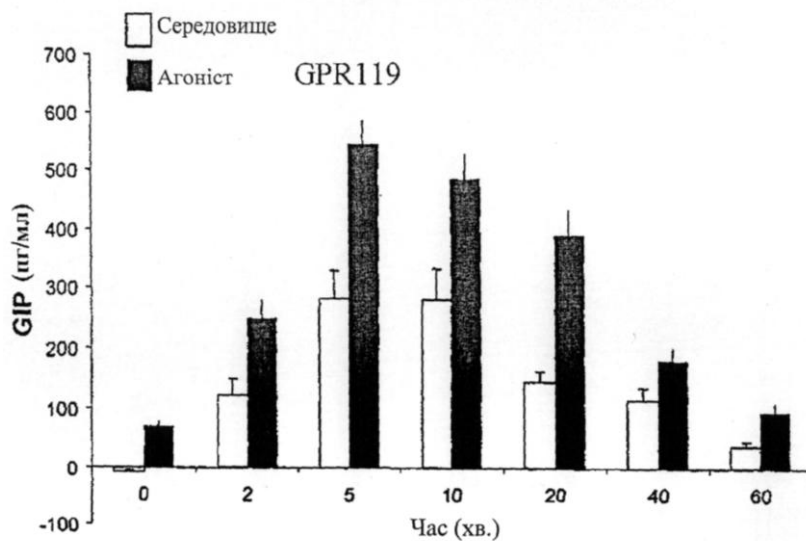
<223> Праймер

<400> 4

gaaacttctc tgcccttacc gtc

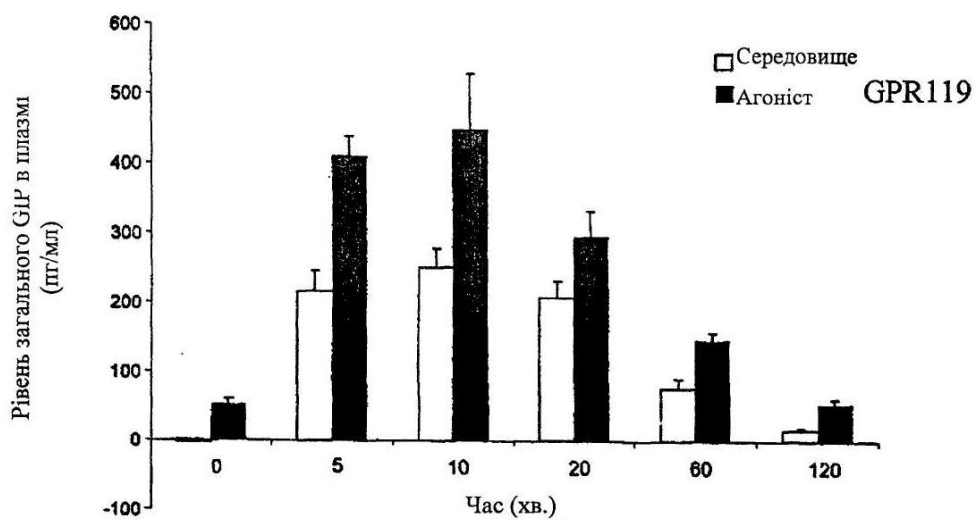
23

Фармакодинамічний аналіз GIP у мишей, оброблених агоністом GPR119, в порівнянні з необробленими мишами



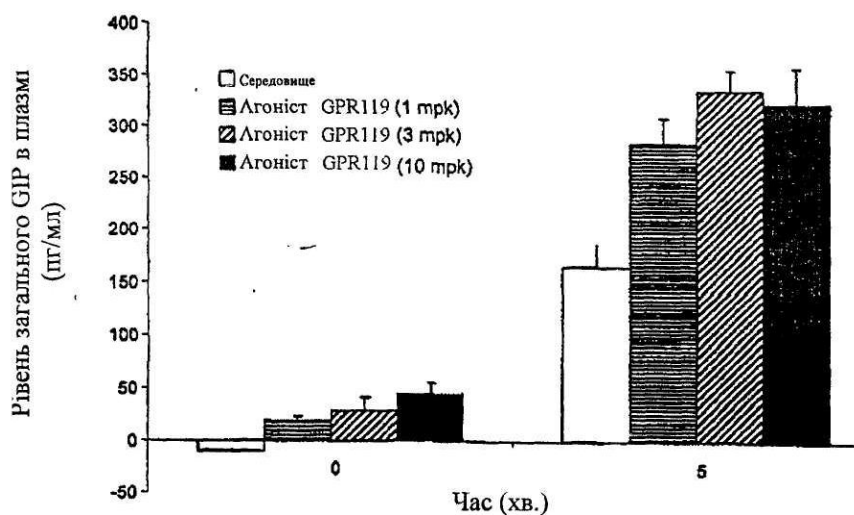
Фіг. 1А

Фармакодинамічний аналіз GIP у мишей, оброблених агоністом GPR119, в порівнянні з необробленими мишами



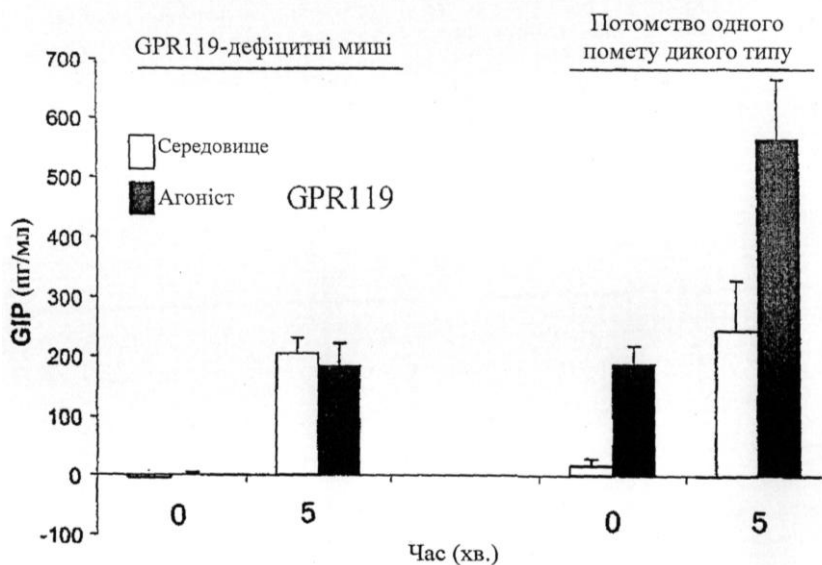
Фіг. 1В

Дозо-залежна стимуляція загального GIP в плазмі мишей під дією агоніста GPR119



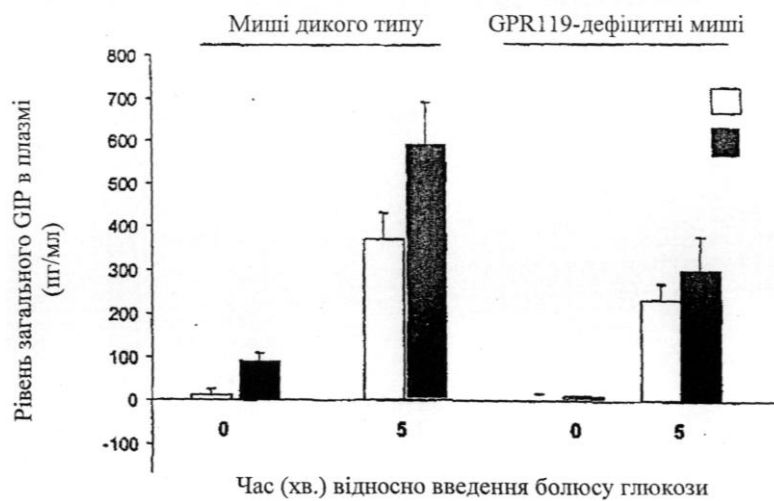
Фіг. 1С

Зменшення стимуляції глюкозо-залежного і глюкозо-незалежного вивільнення GIP під дією агоніста GPR119 у GPR119-дефіцитних (з нокаутом по гену GPR119) мишей



Фіг. 2А

Зменшення стимуляції загального GIP в плазмі під дією
агоніста GPR119 у GPR119-дефіцитних (з нокаутом по гену
GPR119) мишей



Фіг. 2В