(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101978270 A
(43)申请公布日 2011.02.16

(21)申请号 200980110625.0
(22)申请日 2009.03.13
(30)优先权数据
08290265.1 2008.03.20 EP
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.09.19
(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2009/001823 2009.03.13
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/115238 EN 2009.09.24
(71)申请人 赛诺菲-安万特
地址 法国巴黎
(72)发明人 T·利歇尔 S·盖贝尔 M·弗赖
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李进 李连涛
(51)Int.Cl.
G01N 33/58(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 18 页 序列表 16 页
附图 15 页

(54)发明名称

检测钠/钙交换体(NCX)“反向模式”调节化合物的基于荧光的测定法

(57)摘要

转运蛋白是一个新兴的靶标家族,具有巨大的潜力,提供了科学和经济机会。钠/钙交换体是从不同细胞中去除Ca^{2+}的重要机制。在心脏中,它排除通过Ca^{2+}通道进入的Ca^{2+}引起收缩,同时Na^{+}进入心脏细胞。鉴定不仅调节钙输出活性(正向模式)而且还调节钠/钙交换体的钙输入活性(反向模式)的化合物是相当有价值的。本发明涉及用于检测NCX“反向模式”调节化合物的基于荧光的测定法。本发明还涉及包含表达(expriming)NCX的细胞的组件试剂盒,以及所述组件试剂盒在测定化合物作为NCX激动剂或拮抗剂的活性中的用途。

CN 101978270 A

1. 一种用于测定钠 / 钙交换体的钙输入活性的测定法，所述测定法包括 ：

a) 提供表达钠 / 钙交换体的细胞 ；

b) 提供用于测定胞内钙的有色物质 ；

c) 使细胞与钠 / 钙交换体激活剂接触 ；和

d) 将钙介导的来自所述有色物质的发光信号的变化与对照实验中产生的发光信号进行比较。

2. 权利要求 1 的测定法，其中所述钠 / 钙交换体是下列 NCX 蛋白 ：NCX1、NCX2、NCX3 ；或下列 NCKX 蛋白 ：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5。

3. 权利要求 1 的测定法，其中所述钠 / 钙交换体是下列 NCX 蛋白 ：NCX1、NCX2、NCX3。

4. 权利要求 1-3 的测定法，其中所述钠 / 钙交换体来源于哺乳动物，优选来源于大鼠、小鼠、狗、牛、猪、猿或人。

5. 权利要求 1-4 的测定法，其中所述细胞选自 ：CHO、HEK、COS7 和 JURKAT 细胞。

6. 权利要求 1-5 的测定法，其中将作为能够进入细胞并能够水解成染料的染料前体的所述有色物质加入细胞中，藉此染料与钙在所述细胞中络合并且发出发光信号。

7. 权利要求 1-6 的测定法，其中所述发光信号是荧光，所述监测步骤 c) 采用 FLIPR 装置。

8. 权利要求 6 的测定法，其中所述染料前体是乙酰氧基甲基酯衍生物。

9. 权利要求 6 的测定法，其中所述染料是钙敏感荧光染料 fluo-4。

10. 权利要求 1-9 的测定法在测定化合物作为钠 / 钙交换体钙输入活性的激动剂或拮抗剂的活性中的用途。

11. 权利要求 1-9 的测定法在用于诊断与钠 / 钙交换体表达发生改变有关的疾病中的用途。

12. 一种用于测定在响应化合物的加入中钠 / 钙交换体的钙输入活性的测定法，所述测定法包括 ：

a) 提供表达钠 / 钙交换体的细胞 ；

b) 提供用于测定胞内钙的有色物质 ；

c) 使细胞与化合物接触，其中所述细胞在用所述化合物处理前已经过钠 / 钙交换体激活剂处理 ；和

d) 将钙介导的来自所述有色物质发光信号的变化与对照实验中产生的发光信号进行比较。

13. 权利要求 12 的测定法，其中所述钠 / 钙交换体是下列 NCX 蛋白 ：NCX1、NCX2、NCX3 ；或下列 NCKX 蛋白 ：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5。

14. 权利要求 12 的测定法，其中所述钠 / 钙交换体是下列 NCX 蛋白 ：NCX1、NCX2、NCX3。

15. 权利要求 12-14 的测定法，其中所述钠 / 钙交换体来源于哺乳动物，优选来源于大鼠、小鼠、狗、牛、猪、猿或人。

16. 权利要求 12-15 的测定法，其中所述细胞选自 ：CHO、HEK、COS7 和 JURKAT 细胞。

17. 权利要求 12-16 的测定法，其中将作为能够进入细胞并能够水解成染料的染料前体的所述有色物质加入细胞中，藉此染料与钙在所述细胞中络合并且发出发光信号。

18. 权利要求 12-17 的测定法，其中所述发光信号是荧光，所述监测步骤 c) 采用 FLIPR

装置。

19. 权利要求 17 的测定法，其中所述染料前体是乙酰氧基甲基酯衍生物。

20. 权利要求 17 的测定法，其中所述染料是钙敏感荧光染料 fluo-4。

21. 权利要求 12-20 的测定法，其中所述化合物是钠 / 钙交换体拮抗剂。

22. 一种组件试剂盒，所述组件试剂盒包含 ：

a) 表达 (expriming) 钠 / 钙交换体的冻干细胞 ；

b) 有色物质 ；

c) 化合物缓冲液 ；和

d) 有色物质缓冲液。

23. 权利要求 22 的组件试剂盒，其中所述有色物质是钙敏感荧光染料 fluo-4。

24. 权利要求 22 和 23 的组件试剂盒，其中所述钠 / 钙交换体是下列 NCX 蛋白 ：NCX1、NCX2、NCX3 ；或下列 NCKX 蛋白 ：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5。

25. 权利要求 22 和 23 的组件试剂盒，其中所述钠 / 钙交换体是下列 NCX 蛋白 ：NCX1、NCX2、NCX3。

26. 权利要求 22-25 的组件试剂盒，其中所述钠 / 钙交换体来源于哺乳动物，优选来源于大鼠、小鼠、狗、牛、猪、猿或人。

27. 权利要求 22-26 的组件试剂盒在测定化合物作为钠 / 钙交换体钙输入活性的激动剂或拮抗剂的活性中的用途。

28. 权利要求 22-26 的组件试剂盒在诊断与钠 / 钙交换体表达发生改变有关的疾病中的用途。

检测钠 / 钙交换体 (NCX) “反向模式”调节化合物的基于荧光的测定法

发明领域

[0001] 本发明涉及钠 / 钙交换体 (sodium/calcium exchanger, NCX) 和检测其活性的方法。更具体地讲,本发明涉及用于检测 NCX “反向模式”调节化合物的基于荧光的测定法。本发明还涉及包含表达 (expriming)NCX 的细胞的组件试剂盒 (kit of parts) 及组件试剂盒的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 生命的一个基本的必要条件是区室化 -- 以生物膜作为实现这一原则的天然工具。然而,脂双层 -- 构成细胞膜基础的结构 -- 对大多数离子和化合物是不渗透的,而这些离子和化合物的转运是维持细胞和生物体的生命机能所必需的。这种反论的答案在于细胞膜的半渗透性质 -- 必须跨过膜的溶质通过特定的膜蛋白转运。这些转运蛋白负责离子梯度的产生和维持,营养物的摄取,代谢产物的转运,信号转导分子的重摄取以及毒性和废弃化合物的清除。因此,在这种情况下,转运蛋白是允许直接影响疾病相关性异常状况的潜在的药物靶标。

[0004] 转运蛋白是一个新兴的靶标家族,具有巨大的潜力,提供了科学和经济机会。另一方面,就药物开发技术而言转运蛋白是困难的靶标类别。

[0005] 人钠 / 钙交换体基因家族 (亦称为 NCX 或 SLC8) 包括三种截然不同的蛋白质 NCX1、NCX2 和 NCX3。SLC8 与 SLC24 一起构成 Na^+/Ca^{2+} 反向转运蛋白 (countertransporter) 的超家族。SLC24 家族成员还转运 K^+,亦称为 NCKX。

[0006] NCX1 是人钠 / 钙交换体基因家族中表征最充分的成员,它的表达在人衰竭性心脏中上调,并在心肌梗死后参与缺血 - 再灌注损伤 (ischemia-reperfusion damage)。抑制 NCX1 使衰竭性心脏的心肌收缩性正常化,并且在缺血再灌注后发挥心脏保护作用 (Flesch 等, Circulation 1996 ;Komuro 和 Ohtsuka, Journal of Pharmacological. Sciences. 2004)。NCX2 主要在大脑中表达, NCX3 主要在大脑和骨骼肌中表达,其生理作用不详。

[0007] 钠 / 钙交换体根据膜电位和离子梯度可按两个方向转运 Ca^{2+} 和 Na^+。在第一个方向上,称为“正向模式”或“钙输出模式”, Ca^{2+} 被转运到细胞外, Na^+ 被转运到细胞内。在另一个方向上,称为“反向模式”或“钙输入模式”,转运方向反转过来。

[0008] 钠 / 钙交换体是从不同细胞中去除 Ca^{2+} 的重要机制。在心脏中,它排除通过 Ca^{2+} 通道进入的 Ca^{2+} 引起收缩,同时使 Na^+ 进入心脏细胞。其在心血管疾病中的关联性参见例如 Hobai, JA 和 O'Rourke, B (2004) Expert Opin. Investig. Drugs, 13, 653-664。因此,制药业已开发出抑制 NCX 的化合物,参见例如 Iwamoto, T. 等 (2004) J. Biol. Chem., 279, 7544-7553。

[0009] 心脏钠 / 钙交换体的抑制对于心脏保护十分重要 (例如 Pogwizd, 2003)。存在区分抑制 NCX 的“正向模式”的化合物和抑制 NCX 的“反向模式”的化合物的医学需求。因此,需要分析钙输入模式的测定法。另外,抑制 NCX1 的化合物应当是选择性的,因为 NCX2 和 NCX3 属于同一转运蛋白家族。因此,需要可供选择性特征分析的测定法。

[0010] 鉴定例如通过阻断钙流和/或抑制NCX的活化来调节钠/钙交换体活性的化合物是相当有价值的。这样做的一种标准方法是通过采用膜片钳实验。

[0011] 在这些实验中，必须由技术娴熟的操作人员，通过测量在响应膜电位变化和/或试验化合物应用时跨越细胞膜的钙流，依次个别地对细胞进行评价。研究了Sea0400(NCX的一种新的特异性抑制剂）对狗心室乳头肌的动作电位的作用，参见K.Acsai在“2004年ESC大会”期间发表于Munich on Poster Nr.2886的文献（标题:Effect of a specific sodium-calcium exchanger blocker Sea0400 on the ventricular action potential and triggered activity in dog ventricular muscle and Purkinje fiber(特异性钠-钙交换体阻断剂Sea0400对心室动作电位的作用和在狗心室肌和浦肯野纤维中的引发活性)）以及C.Lee等(The journal of pharmacology and experimental therapeutics；第311卷:748-757,2004；标题:Inhibitory profile of SEA0400[2-[4-[(2,5-Difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline]assessed on the cardiac Na^+/Ca^{2+} exchanger，NCX1.1(评价SEA0400[2-[4-[(2,5-二氟苯基）甲氧基]苯氧基]-5-乙氧基苯胺]对心脏Na^+/Ca^{2+}交换体NCX1.1的抑制特征））。

[0012] 采用离子选择电极技术定量测定巨膜片(giant patch)中离子流的研究表明，心脏Na^+/Ca^{2+}交换体具有多种转运模式(Tong Mook Kang和Donald W.Hilgemann;Nature；第427卷，2004年2月5日;标题:Multiple transport modes of the cardiac Na^+/Ca^{2+} exchanger(心脏Na^+/Ca^{2+}交换体的多种转运模式））。

[0013] 这些实验虽然有效并提供大量信息，但却非常耗时而且不适于对调节钙离子通道活性的化合物进行高通量分析。

[0014] 多种技术已发展成为电生理学标准方法的备选方法。例如，已采用放射性流量测定法(radioactive flux assay)，其中将细胞暴露于放射性示踪物（例如^{45}Ca）中并监测放射性标记的Ca流量。将负载有示踪物的细胞暴露于化合物中，增加或减少示踪物流出的那些化合物被鉴定为潜在的细胞膜离子通道的激活剂或抑制剂。一个具体实例参见T.Kuramochi等;Bioorganic & Medicinal Chemistry;12(2004)5039-5056;标题:Synthesis and structure-activity relationships of phenoxypyridine derivates as novel inhibitors of the sodium-calcium exchanger(作为钠-钙交换体新型抑制剂的苯氧基吡啶衍生物的合成和结构-活性关系）。EP1031556公开了其中使用肌膜囊泡测定Na^+/Ca^{2+}交换体活性的方法，通过测量^{45}Ca的放射性来测定肌膜囊泡中Ca^{2+}摄取的浓度。

[0015] 多种放射性离子转运蛋白测定法的灵敏度有限，因此数据质量不佳。另外，与放射性筛选技术有关的成本和安全问题是妨碍广泛应用的障碍。

[0016] 在上述药物开发技术中，应用放射性流量测定法来鉴定调节离子通道和离子转运蛋白活性的化合物是与本发明最接近的现有技术，因为该技术可以通过监测细胞的Ca^{2+}流量来将试验化合物鉴定为潜在激活剂或抑制剂。

[0017] 放射性测定法的主要问题出在检测每秒约1-1000个分子的离子转运蛋白的周转受限（小于大多数离子通道的约104倍）的困难上。

[0018] 因此，由现有技术水平所产生的问题是确定在高通量筛选钠/钙交换体调节剂和分析其特征方面具有极佳灵敏度的稳健测定法，可供区别化合物的“正向模式“和“反向模式”调节活性，并且可供分析已鉴定出的调节剂分别对NCX1、NCX2和NCX3的选择性的特征。

本发明解决了这个问题。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明的一个主题涉及用于测定钠 / 钙交换体的钙输入活性的测定法，其中：

[0021] a) 提供表达钠 / 钙交换体的细胞；

[0022] b) 提供用于测定胞内钙的有色物质 (colored substance)；

[0023] c) 使细胞与钠 / 钙交换体激活剂接触；和

[0024] d) 将来自所述有色物质的发光信号中钙介导的变化与对照实验中产生的发光信号相比较。

[0025] 本发明另一个主题涉及用于测定在响应化合物的加入中钠 / 钙交换体的钙输入活性的测定法，其中：

[0026] a) 提供表达钠 / 钙交换体的细胞；

[0027] b) 提供用于测定胞内钙的有色物质；

[0028] c) 使细胞与化合物接触，其中所述细胞在用所述化合物处理前已经过钠 / 钙交换体激活剂处理；和

[0029] d) 将来自所述有色物质的发光信号中钙介导的变化与对照实验中产生的发光信号相比较。

[0030] 一般而言，所使用的钠 / 钙交换体来源于哺乳动物，特别来源于人。钠 / 钙交换体选自下列钠 / 钙交换蛋白之一：NCX1、NCX2、NCX3、NCX4、NCX5、NCX6 和 / 或 NCX7，特别是 NCX1、NCX2 和 / 或 NCX3；和 / 或选自下列钠 / 钙 / 钾交换蛋白之一：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4 和 / 或 NCKX5。

[0031] 一般而言，用于本发明测定法的细胞可来源于任何真核生物。在一个优选的实施方案中，细胞是哺乳动物细胞。在一个更优选的实施方案中，细胞是 CHO(CCL-61)、HEK(CCL-1573)、COS7(CRL-1651) 和 / 或 JURKAT(CRL-1990) 细胞。

[0032] 在一个优选的实施方案中，将作为染料前体的能够进入细胞并能够水解成染料的所述有色物质加入细胞中，藉此染料与钙在所述细胞中络合并且发出发光信号。此外，所述染料前体可优选为乙酰氧基甲基酯衍生物，并且所述染料可优选为钙敏感荧光染料 fluo-4。在一个更优选的实施方案中，所述发光信号是荧光，所述监测步骤 c) 采用 FLIPR 装置。

[0033] 本发明还涉及采用前述测定法测定化合物作为钠 / 钙交换体的钙输入活性的激动剂或拮抗剂的活性。在另一个优选的实施方案中，本发明涉及采用前述测定法诊断与钠 / 钙交换体表达发生改变有关的疾病。

[0034] 本发明还涉及包含以下组件试剂盒：

[0035] a) 表达 (expriming) 钠 / 钙交换体的冻干细胞；

[0036] b) 有色物质；

[0037] c) 化合物缓冲液；和

[0038] d) 有色物质缓冲液。

[0039] 在本发明组件试剂盒的一个优选的实施方案中，所述有色物质是钙敏感荧光染料 fluo-4。在另一个优选的实施方案中，所使用的钠 / 钙交换体来源于哺乳动物，特别来源于人。钠 / 钙交换体选自下列钠 / 钙交换蛋白之一：NCX1、NCX2、NCX3、NCX4、NCX5、NCX6 和 /

或NCX7，特别是NCX1、NCX2和/或NCX3；和/或选自下列钠/钙/钾交换蛋白之一：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4和/或NCKX5。

[0040] 本发明还涉及采用前述组件试剂盒测定化合物作为钠/钙交换体钙输入活性的激动剂或拮抗剂的活性。在另一个优选的实施方案中，本发明涉及采用前述组件试剂盒诊断与钠/钙交换体表达发生改变有关的疾病。

[0041] 发明详述

[0042] 术语“测定法”是指测定某一系统或对象的性质的方法。

[0043] 测定法是常用术语生物测定法的省略形式，并且是体外实验的一种类型。通常进行测定法以测量某一物质对活生物体的作用。测定法可以是定性或定量的，它们在新药开发中是必不可少的。

[0044] 本测定法提供大的动态范围(dynamic range)，使得可测定NCX蛋白的活性。特别是本发明可提供快速有效的测定法，用于筛选与钠/钙交换体进行特异性相互作用并调节其活性的药学上有效的化合物和分析所述化合物的特征。

[0045] 在本发明的情况中，术语“钠/钙交换体”或“NCX”可以是指下列Na^+/Ca^{2+}交换蛋白中单独或彼此组合的任一种：NCX1、NCX2、NCX3、NCX4、NCX5、NCX6、NCX7；或者下列$Na^+/Ca^{2+}/K^+$交换蛋白中单独或彼此组合的任一种：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5。

[0046] 尤其优选的是SLC8家族成员NCX1、NCX2和/或NCX3，其氨基酸序列分别对应于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3。

[0047] 这类钠/钙交换体可来源于任何脊椎动物，特别是哺乳动物物种(例如狗、马、牛、小鼠、大鼠、犬科动物、兔、鸡、类人猿、人等)。钠/钙交换体可以从这类有脊椎生物的组织探查物(probes)中分离，或者可以通过能够表达钠/钙交换体的重组生物材料制备。

[0048] 术语“钠/钙交换蛋白”是指多肽、多态变体(polymorphic variant)、突变体和种间同源物，其氨基酸序列优选在至少约25、50、100、200个或500个以上氨基酸的区域内与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所含氨基酸序列相比有超过约80％氨基酸序列同一性、85％、90％、优选91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％以上氨基酸序列同一性。

[0049] 术语“生物材料”是指含有遗传信息并且能够自体复制或在生物系统中复制的任何材料。重组生物材料是通过本领域技术人员熟知的重组技术产生、改变或修饰的任何生物材料。

[0050] 下列参考文献是克隆特定NCX蛋白的实例：Nicoll,DA.等人克隆了犬Na^+/Ca^{2+}交换体NCX1(Science.250(4980):562-5,1990；标题：Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmalNa(+)-Ca^{2+} exchanger(心脏肌膜Na(+)-Ca^{2+}交换体的分子克隆和功能性表达))。Komuro,I.等(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89(10),4769-4773,1992；标题：Molecular cloning and characterization of the human cardiacNa^+/Ca^{2+} exchanger cDNA(人心脏Na^+/Ca^{2+}交换体cDNA的分子克隆与表征))和Kofuji,P.等(Am.J.Physiol.263(Cell Physiol.32):C1241-C1249,1992；标题：Expression of the Na-Ca exchanger in diverse tissues:a study using the cloned human cardiac Na-Ca exchanger(不同组织中Na-Ca交换体的表达：使用克隆的人心脏Na-Ca交换体的研究))克隆了人Na^+/Ca^{2+}交换体NCX1。Li,Z.等人克隆了人Na^+/Ca^{2+}交换体

NCX2(J.Biol.Chem.269(26):17434-9,1994;标题:Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na(+)-Ca^{2+} exchanger(质膜Na(+)-Ca^{2+}交换体的NCX2同种型的克隆))。Nicoll,DA.等人克隆了大鼠Na^+/Ca^{2+}交换体NCX3(J.Biol.Chem.271(40):24914-21,1996;标题:Cloning of a third mammalian Na^+/Ca^{2+} exchanger,NCX3(第三种哺乳动物Na^+/Ca^{2+}交换体NCX3的克隆))。Gabellini,N.等人克隆了人Na^+/Ca^{2+}交换体NCX3(Gene.298:1-7,2002;标题:The human SLC8A3gene and the tissue-specific Na^+/Ca^{2+} exchanger 3 isoforms(人SLC8A3基因和组织特异性Na^+/Ca^{2+}交换体3同种型))。

[0051] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合体。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合体,并适用于天然存在的氨基酸聚合体和非天然存在的氨基酸聚合体。

[0052] 术语“钠/钙交换体的钙输入活性”是指钠/钙交换体的“反向模式”,即将Ca^{2+}输入细胞并将Na^+输出细胞的机制。该“反向模式”转运发生在某些质膜去极化条件和高胞质Na^+浓度下。

[0053] 通过测量合适有色物质与钙络合所产生的增强的发光,来确定钠/钙交换体的活性。

[0054] 术语“表达钠/钙交换体的细胞”是指内源性表达目标交换体的细胞或重组细胞。

[0055] 当提及例如细胞、或核酸、蛋白质或载体时,术语“重组”是指通过导入异源核酸或蛋白质或者改变天然核酸或蛋白质而被修饰的细胞、核酸、蛋白质或载体,或者所述细胞来源于经如此修饰的细胞。因此,例如重组细胞表达天然(非重组)形式的细胞内不存在的基因,或者表达异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因。在本发明中,这通常是指用编码钠/钙交换体的核酸序列转染的细胞。

[0056] 仅通过使细胞生长在含有合适培养基的适当容器中,便可进行该测定法。细胞可以是天然存在的细胞、天然细胞、建立的细胞系、市售细胞、遗传修饰的细胞等,只要细胞在试验期间能够维持,并且适宜在培养基中生长即可。

[0057] 用于进行主题测定法的合适细胞包括原核生物、酵母或高等真核细胞,尤其哺乳动物细胞。原核生物包括革兰氏阴性生物和革兰氏阳性生物。细胞一般可为哺乳动物细胞,例如人细胞、小鼠细胞、大鼠细胞、中国仓鼠细胞等。被认为是合适的细胞包括CHO、COS7、JURKAT、HeLa、HEK、MDCK和HEK293细胞。

[0058] 细胞可以用众所周知的方法制备(Current protocols in cell biology,John Wiley & Sons Inc,ISBN:0471241059),或者可以购买(Invitrogen Corp.,Sigma-Aldrich Corp.,Stratagene)。

[0059] 术语“有色物质”尤其是指钙敏感荧光染料。

[0060] 染料前体的特征在于在测定条件下不发光,是一种酯,能够进入细胞并且在胞内水解成发光的含氧化合物,而且与钙络合时发光增强。选择易被胞内水解酶水解的酯。

[0061] 术语“能够进入细胞”是指前体能够跨细胞膜并且在细胞中被水解,染料前体在特定的pH、温度等条件下进入细胞,以不同的速度进入细胞,或者在特定条件下不进入细胞。

[0062] 采用众所周知的方案,将有色物质加入细胞中(Current protocols in cell biology,John Wiley & Sons Inc,ISBN:0471241059)。

[0063] 所使用的有色物质是常用的市售试剂(Invitrogen Corp.),并且可以使用在实验

室合成的试剂。

[0064] 满足上述要求的多种市售染料是已知的。用于监测 Ca^{2+} 的荧光染料是众所周知的，详情可参见Molecular Probes目录第20.1-20.4节，第9版。它们通常具有两个与荧光核（例如荧光素、罗丹明、香豆素、氨基苯基吲哚等）连接的双-羧甲基氨基。所述化合物大部分是3,6-二氧基取代的占吨，在前体中氧基是取代的，在发光染料中则是未取代的。通常存在保护酚和酸的乙酰氧基甲基。参见例如Fluo3/4、Fura2/3、钙荧光素绿(calcein green)等。乙酰基的水解产生发光产物。前体能够跨过细胞膜并在细胞中水解。

[0065] 术语“发光”是指“冷光”，光来自其它能量源，可发生在常温和较低温度下。在发光时，一些能量源将原子的电子抛出其“基”（最低能量）态进入“激发”（较高能量）态；然后电子返还光形式的能量，因此可以回到其“基”态。有若干种发光类型，各自根据能量源是什么或是什么引起发光而命名。

[0066] 术语“荧光”是指主要作为冷体(cold body)中的光学现象而存在的发光，其中分子吸收光子引起发射出另一个具有较长波长的光子。吸收光子与发出光子之间的能量差以分子振动或热结束。通常吸收光子在紫外线区，发射光在可见区，但是这取决于具体荧光团的吸光度曲线和斯托克司频移。荧光以矿物荧石(mineral fluorite)的名字命名，矿物荧石由通常具有这种现象的氟化钙组成。

[0067] 可用发光计或荧光成像仪测量来自指示剂染料的荧光。一种优选的检测仪是荧光成像读板仪(Fluorometric Imaging Plate Reader，FLIPR)(Molecular Devices，Sunnyvale，Calif.)。FLIPR非常适于应用本发明方法的高通量筛选，因为它将能够将同时移液至微量滴定板的96孔或384孔的集成液体处理与采用与电荷耦合器件摄影机连接的氩激光器进行快速动力学检测结合在一起。

[0068] 使用钙指示剂染料的一种备选方法是使用水母发光蛋白系统。水母发光蛋白系统利用蛋白质脱辅基水母发光蛋白(apoaequorin)，它与亲脂性发色团腔肠素(coelenterazine)结合，形成脱辅基水母发光蛋白与腔肠素的组合（称为水母发光蛋白）。脱辅基水母发光蛋白具有3个钙结合部位，在钙结合时，水母发光蛋白的脱辅基水母发光蛋白部分的构象发生改变。构象的这种改变使腔肠素被氧化成coelenteramide、CO_2 和蓝光(466nm)的光子。可以使用合适的仪器检测这种光子。

[0069] 有关使用水母发光蛋白的综述可参见Créton等，1999，Microscopy Research and Technique 46:390-397；Brini等，1995，J.Biol.Chem.270:9896-9903；Knight和Knight，1995，Meth.Cell.Biol.49:201-216。同样有价值的可为美国专利第5,714,666号，它描述了通过将腔肠素辅因子加入表达脱辅基水母发光蛋白的哺乳动物细胞中来测量哺乳动物细胞的胞内钙的方法。

[0070] “抑制剂”是例如结合钠/钙交换蛋白、部分或完全阻断其活性、降低、阻止钠/钙交换蛋白的活性或表达、延迟钠/钙交换蛋白活化、使钠/钙交换蛋白失活、脱敏或者下调钠/钙交换蛋白的活性或表达的化合物，例如拮抗剂。

[0071] “激活剂”是增加、开启、激活、促进钠/钙交换体活性、促进其活化、敏化、刺激或上调钠/钙交换体活性的化合物。在本发明中一种优选的激活剂是短杆菌肽，它引发胞内钠浓度升高，从而在“反向”转运模式中导致钠/钙交换体活性增加。

[0072] 抑制剂、激活剂或调节剂还包括钠/钙交换蛋白的遗传修饰形式，例如活性发生

改变的形式，以及天然存在和合成的配体、拮抗剂、激动剂、肽、环肽、核酸、抗体、反义分子、核酶、有机小分子等。

[0073] 术语“化合物”或“试验化合物”或“试验候选物 (test candidate)”或其语法等同术语是指将要被测定调节钠 / 钙交换体活性的能力的任何天然存在或合成的分子，例如蛋白质、寡肽、有机小分子、多糖、脂质、脂肪酸、多核苷酸、寡核苷酸等 (Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Inc, ISBN :0471250961)。试验化合物可以是试验化合物文库的形式，例如提供足够多样性范围的组合文库或随机文库 (Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Inc, ISBN :0471250937)。试验化合物任选与融合配偶体连接，融合配偶体例如靶向化合物、拯救化合物 (rescue compound)、二聚化合物、稳定化合物、可寻址化合物 (addressable compound) 和其它功能性部分。按惯例，通过鉴定具有某些所需性质或活性 (例如活性升高) 的试验化合物 (称为“先导化合物”)、产生先导化合物的变体以及评价这些变体化合物的性质和活性，来产生具有有益性质的新的化学实体。优选将高通量筛选 (HTS) 方法应用于这类分析。

[0074] 在细胞生长后，所述抑制剂、激活剂和试验化合物可通过注入培养基中而加入细胞内，或者它们可在细胞生长前就存在于培养基中 (Current protocols in cell biology, John Wiley & Sons Inc, ISBN :0471241059)。

[0075] 细胞可以在抑制剂、激活剂和 / 或试验化合物中生长到适当数目，或者将抑制剂、激活剂和 / 或试验化合物加入其中使用而细胞没有进一步生长。细胞可与抑制剂、激活剂和 / 或试验化合物结合，或者在将细胞置于孔中并使其在孔中生长的实施方案中，细胞可以是悬浮在孔内液体中的悬液细胞。

[0076] 术语“对照实验”是指可以同时进行的不同类型的实验。技术人员应了解的是，与本文所述方法一起进行对照实验一般是有益的。

[0077] 例如，对于测定钠 / 钙交换体活性的测定法，具有对照通常是有益的，其中细胞优选与用于该测定法的细胞基本相同，不同之处在于这些细胞不会表达目标钠 / 钙交换体。

[0078] 此外，对于测定在响应化合物的加入中钠 / 钙交换体的活性的测定法，具有对照通常是有益的，其中在本发明的测定法中测定化合物，所述化合物针对的是优选与该测定法中所用的细胞基本相同的细胞，不同之处在于这些细胞不表达目标钠 / 钙交换体。这样可以确定通过所述测定法鉴定的化合物确实是通过目标钠 / 钙交换体而不是通过某些意料之外的非特异性机制起作用。这类对照细胞的一种可能性可以是非重组亲本细胞，其中实际实验中的所述细胞表达目标钠 / 钙交换体。

[0079] 对于测定在响应化合物的加入中钠 / 钙交换体活性的测定法，其它对照可以是在不加入试验化合物 (低水平对照 (low control)) 时进行所述测定法以及用高浓度的试验化合物 (高水平对照 (high control)) 进行所述测定法。

[0080] 其它类型的对照可包括 :将通过本发明的测定法鉴定的化合物作为目标钠 / 钙交换体的激动剂或拮抗剂 ;和用现有技术的方法测定化合物以证实这些化合物在所述现有技术方法中同样也是激动剂或拮抗剂。

[0081] 此外，本领域技术人员应了解的是，还需要通过比较测定值与标准值来进行统计学分析。

[0082] 术语“激动剂”和“拮抗剂”是指通过受体调节信号转导的受体效应分子。受体效

应分子能够与受体结合，但不一定在天然配体的结合部位。受体效应子当单独使用时可调节信号转导，即可以替代配体，或者可以在天然配体存在下，通过天然配体提高或抑制信号转导来改变信号转导。例如“拮抗剂”是阻断或降低受体信号转导活性的分子，例如，它们可以竞争性、非竞争性和 / 或变构性地抑制来自受体的信号转导，而“激动剂”则增强、诱导或提高受体的信号转导活性。

[0083] 术语“与钠 / 钙交换体表达发生改变有关的疾病”是指扩张型心肌病、冠心病、心律失常、心力衰竭等。

[0084] 为方便起见，有色物质和测定法的其它组分可以试剂盒提供，其中有色物质可作为可复溶粉末存在，或者可作为冰浴中缓冲溶液的冷却溶液存在。试剂盒还可包括缓冲液、激活剂、抑制剂、试验化合物、表达 (expriming) 钠 / 钙交换蛋白的细胞等。细胞可作为冻干细胞存在。

[0085] 所述组件试剂盒可以用作诊断试剂盒，用于诊断扩张型心肌病、冠心病、心律失常、心力衰竭等。

[0086] 下列附图和实施例将更详细地说明本发明，并披露了基于荧光的细胞钠 / 钙交换体测定法的典型结果，但不限制保护的范围。

[0087] 实例

[0088] 1. 材料与方法

[0089] 1.1. 化学试剂与设备

[0090]

设备	生产商	功能
Biomek FX	Beckman Coulter	液体处理
Biomek 2000	Beckman Coulter	液体处理
16℃-CO_2-Incubator Cytomat	Heraeus	细胞处理
CO_2-Incubator Hera Cell	Heraeus	细胞处理
$FLIPR_{384}$	Molecular Devices	荧光成像读板仪 (fluorescent imaging plate reader)

[0091]

[0092]

材料	供应商	目录号	功能
CHO-hNCX1 CHO-hNCX2 CHO-hNCX3	Steinbeis Transfer Zentrum	-	用人 Na^+/Ca^{2+} 交换体(NCX1、NCX2、NCX3)转染的细胞系
A000135933	ACR	-	NCX1 阻断剂
Fluo4-AM	Molecular Probes	F14201	胞内 Ca^{2+} 的监测
普流罗尼克 F-127 (Pluronic F-127)	Sigma	P2443	去污剂
遗传霉素(Geneticin)	Gibco	10131-027	细胞选择
F-12 (Ham) + L-谷氨酰胺	Gibco	21765-029	细胞培养
PBS 油包水钙和镁	Gibco	14200-067	缓冲液
FCS	PAA	A15-649	细胞培养
短杆菌肽	Sigma	G-5002	Na/K 离子载体
96 孔 PP 微量培养板，U 型	Greiner	650201	化合物板
96 孔黑色透明平底板(经 TC 处理)	Costar	3904	测定板
胰蛋白酶	Biochrom	L2143	细胞培养

[0093] 1.2. 细胞系

[0094] 由Steinbeis-Transferzentrum für Angewandte Biologische Chemie,Mannheim 提供分别稳定表达人 NCX1、NCX2 和 NCX3 的重组 CHO-K1 细胞系。

[0095] 在标准条件下 (37℃，补充 5% CO_2 的空气) 对细胞进行连续培养。将 CHO-K1 NCX1、CHO-K1 NCX2 和 CHO-K1 NCX3 细胞维持在补充了 10% 胎牛血清 (FCS) 和 450 μg/ml G418 的 HAM'S-F12 培养基加谷氨酰胺中。在使用胰蛋白酶溶液剥离后，每 3-4 天使细胞传代，并以 150,000 个细胞 /ml 的浓度重新接种。

[0096] 1.3. 细胞系电生理学表征

[0097] 在 Iongate Biosciences GmbH, Frankfurt 中完成电生理学表征。

[0098] 在电生理学实验前至少 18 小时，使用冰冷的 PBS(磷酸缓冲盐溶液) 或胰蛋白酶使培养细胞剥离，再接种在盖玻片上。制备具有下列组成的两种槽液 (bath solution) 和移液管液 (pipette solution) 用于膜片钳实验：

[0099] 槽 (外) 液“低钙”：

[0100] 135mM NMG、5mM $MgCl_2$、2mM $CaCl_2$、4mM EGTA、30mMHEPES，pH 7.4

[0101] (HCl → pH 7.0，然后 CsOH → pH 7.4)

[0102] 槽 (外) 液“高钙”：

[0103] 139mM NMG、5mM $MgCl_2$、2mM $CaCl_2$、30mM HEPES，pH 7.4

[0104] (HCl → pH 7.0，然后 CsOH → pH 7.4)

[0105] 吸管 (内) 液：

[0106] 100mM NaCl、5mM KCl、2mM $CaCl_2$、2mM $MgCl_2$、2.1mMEGTA、35mM TEA-Cl、4mM Mg-ATP、0.5mM Na-GTP，

[0107] 5.63mM 磷酸肌酸、30mM HEPES、3.5U/ml 肌酸磷酸激酶 (70ml 移液管液 +3500U 过

滤的肌酸磷酸激酶，加 100ml 移液管液），pH 7.4(NaOH)

[0108] 为了抑制 NCX 电流 (NCX current)，将 5mM 氯化镍溶于槽液“高钙”中。在完整细胞构造中应用膜片钳技术测量 NCX 活性。在室温 (20-25℃) 下钳住 (clamp) 细胞，钳制电位 (holding potential) 为 0mV。通过使用 2mM 外钙 (槽液“高钙”)4 秒 (＝对照)，产生 NCX 电流。每 20 秒重复使用钙。在 5 次刺激后，采用同一方案，在 5mM 镍存在下用钙活化，测定由镍引起的抑制 (一式五份)。最后，再次应用 5 次钙脉冲 (calcium pulse) 用于消除研究 (washout studies)。为了表征 NCX 电流，按照所述报道对峰值电流、转运的电荷和信号衰减的时间常数进行了分析研究。全部数据都用平均值 ±SEM 表示。

[0109] 1.4. 测定试剂

[0110]

试剂	化学试剂	备注

[0111]

测定缓冲液	133.8 mM NaCl 4.7 mM KCl 1.25 mM MgCl 3.5 mM $CaCl_2$ 5 mM 葡萄糖 10 mM Hepes/NaOH， pH 7.5 0.01%普流罗尼克 F-127 2.5 mM 丙磺舒 (Probenecid)	丙磺舒必须每天新鲜配制
染料加样缓冲液	Fluo4-AM，0.02% 普流罗尼克 F-127，0.1%BSA	将 12 μl 普流罗尼克 F-127 (20%)加入 12 μM Fluo4-AM (2 mM)中，然后溶于测定缓冲液
短杆菌肽贮存液	1 mM 短杆菌肽的乙醇溶液(4℃)	每天新鲜制备并保存在 4℃下直到测量
短杆菌肽测定溶液	60 μM 短杆菌肽的测定缓冲液	接种在 PP 板上，并在 16℃下保存(可稳定 3 小时)；3 倍浓缩，20 μM 终浓度；细胞上 2%乙醇浓度；

[0112] 1.5. 最终测定步骤

[0113] 1.5.1. 细胞板的制备

[0114] 实验前一天，细胞用胰蛋白酶剥离，以 35,000 个细胞 /100μl 培养基 / 孔的密度接种在 96 孔微量培养板上，在 37℃、5% CO_2 和 90%湿度下孵育约 22 小时左右。

[0115] 1.5.2. 化合物板的制备

[0116] 以 1.5 倍终浓度的浓度在测定缓冲液中制备化合物。使化合物溶液预孵育后保存在 16℃下。对于 IC_{50} 测定，用 Biomek2000 由 45μM 起始浓度起制备稀释液系列（终浓度：30μM）。

[0117] 1.5.3. 短杆菌肽板的制备

[0118] 使用冷乙醇（4℃）作为溶剂，每天制备 1mM 短杆菌肽贮存液。从贮存液开始用测定缓冲液制备 60μM 短杆菌肽测定溶液。以 150μl/孔的短杆菌肽测定溶液装满 96 孔聚丙烯板并保存在 4℃下。加液板（addition plate）在需要重新装满之前仅可使用两次，因为短杆菌肽溶液的活性在室温下丧失得非常快。

[0119] 1.5.4. 测定步骤

[0120] 1. 从细胞板上除去培养基

[0121] 2. 加入 100μl/孔的染料加样缓冲液

[0122] 3. 将细胞在室温下孵育 90 分钟

[0123] 4. 用 100μl 测定缓冲液 / 孔洗涤 3 次，之后彻底弃去缓冲液

[0124] 5. 使用 Biomek FX 以不同的浓度（1.5 倍浓缩）加入 80μl 试验化合物

[0125] 6. 在 16℃和 5% CO_2 下，将细胞在 CO_2 培养箱中孵育 45 分钟

[0126] 7. 将细胞板转移到 FLIPR，并在测定期间加入 40μl 短杆菌肽测定溶液（终浓度：20μM 短杆菌肽）时进行记录

[0127] 使用 10μM NCX 抑制剂 A000135933 作为高水平对照，缓冲液作为低水平对照。

[0128] 1.5.5. FLIPR 设置参数

[0129]

FLIPR 实验设置参数	
暴露	1.2 秒(在 0.6 W 下)
孔径	2.8
滤光片	515-575 (“钙”)
默认(图表设置)	
扣除偏移(Subtract bias)	来自样品 1
空间一致性校正(Spatial uniformity correction)	关闭
阴性对照校正(Negative control correction)	关闭
第一次序 (First Sequence)	
初始期	2 秒
初始计数	240 (480 秒)
分幅后加入(Add After Frame)	5
加入高度	70 μl
加入速度	40 μl/秒
加入体积	40 μl
混合	2x 40 μl

[0130] 1.6. 数据分析

[0131] 下列计算以运用FLIPR软件的统计量输出功能(statistic export function)获得的数据为基础:统计量1=最大值-最小值(样品1-240)。需要时,校正计算结果的边缘效应。

[0132] 作为初步结果的NCX的抑制是指在加入短杆菌肽后荧光增强的抑制,由统计量1推导。高水平对照是指用10μM A000135933抑制NCX活性,低水平对照是指只加入缓冲液后无NCX抑制。因此,根据对照计算%抑制(0%抑制=低水平对照,100%抑制=高水平对照)。用下式由校正的原始数据和板内对照计算结果:

[0133]

$$\text{抑制}(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{(\text{样品} - \text{低水平对照})}{(\text{高水平对照} - \text{低水平对照})}\right)$$

[0134] 2. 结果

[0135] 2.1. 电生理学细胞系表征

[0136] 2.1.1. 亲本细胞系

[0137] 由Iongate GmbH获取电生理学数据。使用CHO-K1细胞建立稳定的CHO-NCX1、CHO-NCX2和CHO-NCX3细胞系。当在胞内高Na^+浓度下施加胞外Ca^{2+}时,亲本细胞不表现显著的电流响应(0.12±0.07pA/pF,图2)。在所述条件下使用镍不会产生人为电流(artifact)。典型电流见图3。

[0138] 2.1.2.CHO-NCX细胞系

[0139] CHO-NCX1细胞显示在施加Ca^{2+}后外向稳态电流(outward steady-state current)在4秒后几乎没有失活。相对峰值电流为1.40±0.18pA/pF(n=3,图4a)。通过施加5mM镍可完全并可逆地阻断电流(91.3±3.3%)。

[0140] CHO-NCX2细胞在反向模式条件下显示外向电流。相对峰值电流为2.95±0.70pA/pF(n=6,图4b)。电流衰减,时间常数为1.26±0.11秒,且施加5mM镍可被完全且可逆地阻断(消除(washout):100.2±1.9%)。

[0141] CHO-NCX3细胞在反向模式条件下显示外向电流,衰减的时间常数为0.80±0.08秒。相对峰值电流为3.46±1.11pA/pF(n=4,图4c)。施加5mM镍可完全且可逆地阻断电流(消除:111.5±2.4%)。典型电流见图5。

[0142] 2.2. 测定参数

[0143] 2.2.1.NCX1测定

[0144] 分析“反向”模式的基于HTS的NCX1测定法在参考文献中没有记载。膜片钳和荧光测量联用中也没有记载使用短杆菌肽。全部参数必须得优化。由于在同一时间进行的“正向”和“反向”模式测定法之间的机动性,因此缓冲条件(例如Ca^{2+}浓度、pH)和每孔细胞数目适用于“正向”模式测定法,并且结果非常好。

[0145] 在第一个实验中,研究了短杆菌肽浓度和贮存对NCX1的Ca^{2+}输入活性的影响(图6a、b)。

[0146] 就S/B和z′因子而论,20μM的短杆菌肽浓度对Ca^{2+}输入活性具有最佳结果。较低浓度因动力学慢而不足够,较高浓度引起细胞副作用(图6a、b)。工具化合物(tool compound)A000135933的IC_{50}(同样见图11a、b)不受不同短杆菌肽浓度的影响(图7a)。将短杆菌肽溶于乙醇,必需对溶剂的影响进行表征。高达2%乙醇对测定法的背景荧光没有

影响，而浓度增加导致荧光轻微增加（图 7b）。

[0147] 短杆菌肽溶液的制备和保存是关键步骤，因为短杆菌肽在较高温度下降解。在随后的实验中，在不同的温度下溶解并保存短杆菌肽。短杆菌肽溶液必须在 4℃下制备和保存，否则短杆菌肽降解得非常快（图 8）。

[0148] 检查有关移液管高度、预浸泡和混合的不同 FLIPR 设置以改进 S/B 和 z′ 因子（图 9a、b）。用 70μl 的移液管高度与两个混合循环获得了最佳 z′ 因子。

[0149] 利用上述参数，检查了两种温度（16℃和 22℃）下的化合物孵育（图 10a）。用 16℃获得最佳结果，就 S/B、z′ 和 IC_{50}(A000135933) 结果而论，最佳孵育时间为 45 分钟（图 10b）。

[0150] “反向”模式测定法的一个必要条件是对化合物的敏感性。用于 NCX1 方案的工具化合物是 A000135933，这是一种用“正向”模式测定法筛选得到的亚氨基噻唑。在“正向”测定法中化合物的 IC_{50} 为 5.9μM，在膜片钳实验中为 1.44μM。在“正向”测定法中化合物作为标准对照使用。为了检查效果，在不同的短杆菌肽浓度下按“反向”测定法测定了 A000135933。在用 20μM 短杆菌肽激活后，对 NCX1 活性的典型抑制作用和计算得到的剂量反应关系见图 11a 和 b。

[0151] 对于标准品 (A000135933) 的 S/B 和 IC_{50}，NCX1 细胞系可稳定达 2 个月。工具化合物 A000135933 对 NCX1 的 Ca^{2+} 输入活性的作用见图 11a，IC_{50} 约为 1μM（图 11b）。z′ 值介于 0.7 至 0.8 之间。为了将该测定法（“反向”）与基于荧光的细胞 Ca^{2+} 输出模式测定法（“正向”）以及与称为 $SURFE^2R$(Iongate Biosciences，Frankfurt) 的电生理学技术进行比较，分别测定 18 种化合物的 IC_{50}，或者 11 种化合物在 10μM 下的抑制（图 12a、b）。

[0152] “反向”测定法一般比“正向”测定法灵敏 3-5 倍（图 12a，黑色圆点），数据与 0.86 的 r^2 相关联。一些化合物的抑制并无显著增加（图 8a，红色圆点）。其它化合物抑制 NCX1 的功效要高得多（图 8a，蓝色圆点），或许表明了转运模式的特殊作用。从“反向”测定法得到的化合物在 10μM 的抑制百分比比 $SURFE^2R$ 值高（高达 20％）（图 12b），但与 $SURFE^2R$ 技术的相关性良好，r^2 为 0.83。

[0153] 2.2.2.NCX2 测定法

[0154] 参考文献中没有有关分析“正向”或“反向”模式的 NCX2 测定法。由于“正向模式”测定法的灵敏度和稳健性的局限性，因此该测定法的建立未获成功。由于清楚明了，故本报告中未显示数据。“反向模式”测定法以使用短杆菌肽为基础。短杆菌肽形成碱可渗透孔 (alkali-permeable pore)。短杆菌肽诱导的 Ca^{2+} 流入是间接的且是 NCX 依赖性的。从初级神经元上的放射性离子流或荧光测量值得知，加入短杆菌肽后激活 NCX1(Kiedrowski 等，Journal of Neurochemistryl，2004)。由于在同一时间进行的不同亚型的 NCX 测定之间的可比较性，“反向”模式 NCX1 测定法的缓冲条件（例如 Ca^{2+} 浓度、pH）、细胞数、孵育时间和短杆菌肽浓度适用于 NCX2 测定法。

[0155] 在第一个实验中，检查了缓冲条件、孵育时间、短杆菌肽浓度和贮存对 NCX2 的 Ca^{2+} 输入活性的影响（图 13a、b）。

[0156] 与 NCX1 相比，NCX2 的荧光动力学增加稍慢。测量时间不得不延长至 10 分钟。缓冲系统、细胞数、孵育时间、短杆菌肽浓度 (20μM) 和贮存显示非常好的结果。这些参数不必进一步优化。将短杆菌肽溶于乙醇，必需对溶剂的影响进行表征。高达 3％乙醇对测定的

背景荧光没有影响（图 14）。

[0157] “反向”模式测定法的一个关键必要条件是对化合物的敏感性，但是针对 NCX2 的工具化合物没有可利用的电生理学数据。用于 NCX1 方案的主要工具化合物是 A000135933，这是一种从 NCX1 筛选中得到的亚氨基噻唑。在“反向”测定法中，化合物对 NCX1 的 IC_{50} 为 1.8μM，在膜片钳实验中为 1.44μM。研究了 A000135933 在用 20μM 短杆菌肽激活后对 NCX2 活性的作用（图 16a）。计算得到的剂量反应关系见图 15b。

[0158] 对于标准品 (A000135933) 的 S/B 和 IC_{50}，NCX2 细胞系可稳定达 2 个月。工具化合物 A000135933 对 NCX2 的 Ca^{2+} 输入活性的作用见图 15a，与对 NCX1 的 IC_{50}(1.78±1.03μM，n = 55) 相比，对 NCX2 的 IC_{50}(1.25±0.19μM，n = 26，实例图 15b) 稍低，这就表明化合物对于 NCX2 更有效。z′ 值介于 0.75 至 0.85 之间。用 NCX2“反向模式”测定法检验了 NCX1 方案中的 125 种化合物，并与 NCX1 数据进行了比较。结果概括于图 16 中。

[0159] 几乎所有对 NCX1 活性有影响的化合物也都抑制 NCX2（图 16）。多种化合物抑制 NCX2 的功效比抑制 NCX1 的高两倍。只有 4 种化合物显示对 NCX1 的选择性高出两倍。这些数据表明，有可能获得 NCX1 的选择性化合物。

[0160] 2.2.3. NCX3 测定法

[0161] 参考文献中没有 NCX3 测定法的记载。由于“正向模式”测定法的灵敏度和稳健性的局限性，因此该测定法的建立未获成功。由于清楚明了，本报告中未显示数据。“反向模式”测定法以使用短杆菌肽为基础。短杆菌肽形成碱可渗透孔。短杆菌肽诱导的 Ca^{2+} 流入是间接的且是 NCX 依赖性的。从初级神经元上的放射性离子流或荧光测量值得知，加入短杆菌肽后激活 NCX1(Kiedrowski 等，Journal of Neurochemistry，2004)。由于在同一时间进行的不同亚型的 NCX 测定法之间的可比较性，“反向”模式 NCX1 测定法的缓冲条件（例如 Ca^{2+} 浓度、pH）、细胞数、孵育时间和短杆菌肽浓度适用于 NCX3 测定法。

[0162] 在第一个实验中，检查了缓冲条件、细胞数、孵育时间、短杆菌肽浓度和贮存对 NCX3 的 Ca^{2+} 输入活性的影响（图 18a、b）。

[0163] 与 NCX1 和 NCX2 相比，荧光的动力学增加较快。缓冲系统、孵育时间、短杆菌肽浓度 (20μM) 和贮存显示非常好的结果。这些参数不必进一步优化。将短杆菌肽溶于乙醇，必需对溶剂的影响进行表征。高达 2％乙醇显示对测定法的背景荧光没有影响（图 19），超过 2％导致背景荧光轻微增加。

[0164] “反向”模式测定法的一个关键必要条件是对化合物的敏感性，但是针对 NCX3 的工具化合物没有可利用的电生理学数据。用于 NCX1 方案的主要工具化合物是 A000135933，这是一种从 NCX1 筛选中得到的亚氨基噻唑。在“反向”测定法中，化合物对 NCX1 的 IC_{50} 为 1.8μM，在膜片钳实验中为 1.44μM。在“反向”测定法中，对 NCX2 的 IC_{50} 为 1.25μM。研究了 A000135933 在用 20μM 短杆菌肽激活后对 NCX3 活性的作用（图 21a），计算得到的剂量反应关系见图 19b。

[0165] 对于标准品 (A000135933) 的 S/B 和 IC_{50}，NCX3 细胞系可稳定达 2 个月。工具化合物 A000135933 对 NCX3 的 Ca^{2+} 输入活性的作用见图 19a，IC_{50} 为 1.63±0.30μM(n = 23，实例图 19b)。这些数据表明了该工具化合物对于具体亚型没有选择性 (IC_{50} NCX1 :1.78±1.03；IC_{50}NCX2 :1.25±0.19)。z′ 值介于 0.70 至 0.85 之间。用 NCX3“反向模式”测定法检验了 NCX1 方案中的 125 种化合物，并与 NCX1 和 NCX2 数据进行了比较。结果概括于图 20a 和图

20b。

[0166] 几乎所有对 NCX1 活性有影响的化合物也都抑制 NCX3（图 20a）。多种化合物抑制 NCX3 的功效比抑制 NCX1 的高两倍。6 种化合物显示对 NCX1 的选择性高出 2 倍。与 NCX2 进行了比较，9 种化合物对 NCX2 更有效，2 种物质对 NCX3 更有效（图 20b）。这些数据表明，有可能获得 NCX 亚型的选择性化合物。

[0167] 附图描述

[0168] 图 1：

[0169] (a) 由 SEQ ID NO:1 表示的 NCX1 的氨基酸序列；

[0170] (b) 由 SEQ ID NO:2 表示的 NCX2 的氨基酸序列；

[0171] (c) 由 SEQ ID NO:3 表示的 NCX3 的氨基酸序列。

[0172] 图 2：

[0173] 加入 2mM Ca^{2+} 后 CHO-K1 细胞的峰值电流 (n = 3)。

[0174] 图 3：

[0175] 加入 2mM Ca^{2+} 和使用 5mM 镍的 CHO-K1 细胞的典型电流。

[0176] 图 4：

[0177] (a) 加入 2mM Ca^{2+} 后 CHO-NCX1 细胞的峰值电流 (n = 3)；

[0178] (b) 加入 2mM Ca^{2+} 后 CHO-NCX2 细胞的峰值电流 (n = 6)；

[0179] (c) 加入 2mM Ca^{2+} 后 CHO-NCX3 细胞的峰值电流 (n = 6)。

[0180] 图 5：

[0181] (a) 加入 2mM Ca^{2+}、使用 5mM 镍和消除后，CHO-NCX1 细胞的典型电流；

[0182] (b) 加入 2mM Ca^{2+}、使用 5mM 镍和消除后，CHO-NCX2 细胞的典型电流；

[0183] (c) 加入 2mM Ca^{2+}、使用 5mM 镍和消除后，CHO-NCX3 细胞的典型电流。

[0184] 图 6：

[0185] (a) 不同浓度的短杆菌肽 (——0μM、……10μM、---15μM、••-20μM 和 --25μM) 对 NCX1 的 Ca^{2+} 输入活性的作用。在 20μM 短杆菌肽 (•--•-) 时显示出加入 NCX1 抑制剂 A000135933 的作用；

[0186] (b) 在没有 (■，高水平对照) 和有 10μM(□，低水平对照)NCX1 抑制剂 A000135933 时，不同浓度的短杆菌肽 (10μM、15μM、20μM 和 25μM) 对 NCX1 的 Ca^{2+} 输入活性的作用。z′ 因子用▼表示。

[0187] 图 7：

[0188] (a) 不同浓度的短杆菌肽 (10μM、15μM、20μM 和 25μM) 对 NCX1 抑制剂 A000135933 的 IC_{50} 的作用 (■)；

[0189] (b) 在有 NCX 抑制剂 A000135933(■) 和没有短杆菌肽刺激 (□) 时，不同浓度的乙醇对 CHO-NCX1 细胞的 Fluo4- 荧光的作用。

[0190] 图 8：

[0191] 在没有 (■，高水平对照) 和有 10μM(□，低水平对照) 的 NCX1 抑制剂 A000135933 时，在不同温度下溶解和保存的 20μM 短杆菌肽对 NCX1 的 Ca^{2+} 输入活性的作用。

[0192] 图 9：

[0193] (a) 不同移液管高度下的高水平对照（■，缓冲液）、低水平对照（□，10μM A000135933）和 z′ 因子(▼)；

[0194] (b) 具有不同混合循环数的高水平对照（■，缓冲液）、低水平对照（□，10μM A000135933）和 z′ 因子(▼)。

[0195] 图 10：

[0196] (a) 在化合物孵育期间（30 分钟）不同温度下的高水平对照（■，缓冲液）、低水平对照（□，10μM A000135933）和 z′ 因子(▼)；

[0197] (b) 在 16℃下在不同化合物孵育时间的高水平对照（■，缓冲液）、低水平对照（□，10μM A000135933）和 z′ 因子(▼)。

[0198] 图 11：

[0199] (a) 在加入 20μM 短杆菌肽（孵育：22℃，30 分钟）后，不同浓度的 A000135933（……30μM、---15μM、•• - ••-7.5μM、--3.75μM、• - • - •-1.88μM、---0.94μM、——0.5μM）对 NCX1 的 Ca^{2+} 输入活性的作用；

[0200] (b)A000135933 的剂量反应关系。IC_{50} 值为 0.97μM。

[0201] 图 12：

[0202] (a) 用基于荧光的细胞 Ca^{2+} 输出（“正向”）和 Ca^{2+} 输入（“反向”）测定法检验的 18 种化合物的 IC_{50} 的相关性；

[0203] (b) 用基于荧光的细胞 Ca^{2+} 输入测定法（“反向”）和电生理学 $SURFE^2R$ 技术测定的 11 种化合物在 10μM 下的%抑制相关性。

[0204] 图 13：

[0205] (a) 与 NCX1（• • - • • -）相比，在没有（——）和有 20μM 短杆菌肽（---）时 NCX2 的 Ca^{2+} 输入活性。在 20μM 短杆菌肽（……）时显示加入 NCX 抑制剂 A000135933 对 NCX2 活性的作用；

[0206] (b) 在没有（■，高水平对照）和有 10μM（□，低水平对照）的 NCX1 抑制剂 A000135933 时，在第 5 天 20μM 短杆菌肽对 NCX2 的 Ca^{2+} 输入活性的作用。z′ 因子用▼表示。

[0207] 图 14：

[0208] 在没有短杆菌肽刺激时不同浓度的乙醇对 CHO-NCX2 细胞的 Fluo4- 荧光的作用（■）。

[0209] 图 15：

[0210] (a) 在加入 20μM 短杆菌肽（孵育：22℃，45 分钟）后，不同浓度的 A000135933（--30μM、---15μM、---7.5μM、……3.75μM、• - • - • -1.88μM、• • - • • -0.94μM、——0.5μM 和——0μM）对 NCX2 的 Ca^{2+} 输入活性的作用；

[0211] (b)A000135933 的剂量反应关系。该实施例的 IC_{50} 值为 1.4μM。

[0212] 图 16：

[0213] 125 种化合物对 NCX2 和 NCX1 的 IC_{50} 的比较。用基于荧光的细胞 Ca^{2+} 输入测定法（“反向”）测定化合物。深灰色线条（——）是表示功效相等的线条，浅灰色短划线（---）表示特定亚型中功能有两倍的差异。

[0214] 图 17：

[0215] (a) 与 NCX1(——) 和 NCX2(……) 相比，在没有 (••-••-) 和有 20μM 短杆菌肽 (---) 时 NCX3 的 Ca^{2+} 输入活性。在 20μM 短杆菌肽 (--) 时显示加入 NCX 抑制剂 A000135933 对 NCX3 活性的作用；

[0216] (b) 在没有 (■，高水平对照) 和有 10μM(□，低水平对照) 的 NCX 抑制剂 A000135933 时，在第 5 天，20μM 短杆菌肽对 NCX3 的 Ca^{2+} 输入活性的作用。z′ 因子用▼表示。

[0217] 图 18：

[0218] 在没短杆菌肽刺激时，不同浓度的乙醇对 CHO-NCX3 细胞的 Fluo4- 荧光的作用 (■)。

[0219] 图 19：

[0220] (a) 在加入 20μM 短杆菌肽 (孵育：22 ℃，45 分钟) 后，不同浓度的 A000135933(……30μM、•-••-15μM、---7.5μM、••-••-3.75μM、---1.88μM、……0.94μM、——0.5μM 和——0μM) 对 NCX3 的 Ca^{2+} 输入活性的作用；

[0221] (b)A000135933 的剂量反应关系。该实施例的 IC_{50} 值为 1.76μM。

[0222] 图 20：

[0223] (a)125 种化合物对 NCX3 和 NCX1 的 IC_{50} 的比较。用基于荧光的细胞 Ca^{2+} 输入测定法 (“反向”) 测定化合物。深灰色线条 (——) 是表示功效相等的线条，浅灰色短划线 (---) 表示特定亚型中功能有两倍的差异；

[0224] (b)125 种化合物对 NCX3 和 NCX2 的 IC_{50} 的比较。用基于荧光的细胞 Ca^{2+} 输入测定法 (“反向”) 测定化合物。深灰色线条 (——) 是表示功效相等的线条，浅灰色短划线 (---) 表示特定亚型中功能有两倍的差异。

[0001] 序列表 [0002]

<110> 赛诺菲－安万特

<120> 检测钠/钙交换体(NCX)“反向模式”调节化合物的基于荧光的测定法

<130> DE2008/024

<150> 08290265.1
<151> 2008-03-20

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 973
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Tyr Asn Met Arg Arg Leu Ser Leu Ser Pro Thr Phe Ser Met Gly
1 5 10 15

Phe His Leu Leu Val Thr Val Ser Leu Leu Phe Ser His Val Asp His
20 25 30

Val Ile Ala Glu Thr Glu Met Glu Gly Glu Gly Asn Glu Thr Gly Glu
35 40 45

Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Cys Lys Lys Gly Val Ile Leu Pro Ile Trp
50 55 60

Glu Pro Gln Asp Pro Ser Phe Gly Asp Lys Ile Ala Arg Ala Thr Val
65 70 75 80

Tyr Phe Val Ala Met Val Tyr Met Phe Leu Gly Val Ser Ile Ile Ala
85 90 95

Asp Arg Phe Met Ser Ser Ile Glu Val Ile Thr Ser Gln Glu Lys Glu

[0003]

100 105 110

Ile Thr Ile Lys Lys Pro Asn Gly Glu Thr Thr Lys Thr Thr Val Arg
115 120 125

Ile Trp Asn Glu Thr Val Ser Asn Leu Thr Leu Met Ala Leu Gly Ser
130 135 140

Ser Ala Pro Glu Ile Leu Leu Ser Val Ile Glu Val Cys Gly His Asn
145 150 155 160

Phe Thr Ala Gly Asp Leu Gly Pro Ser Thr Ile Val Gly Ser Ala Ala
165 170 175

Phe Asn Met Phe Ile Ile Ile Ala Leu Cys Val Tyr Val Val Pro Asp
180 185 190

Gly Glu Thr Arg Lys Ile Lys His Leu Arg Val Phe Phe Val Thr Ala
195 200 205

Ala Trp Ser Ile Phe Ala Tyr Thr Trp Leu Tyr Ile Ile Leu Ser Val
210 215 220

Ile Ser Pro Gly Val Val Glu Val Trp Glu Gly Leu Leu Thr Phe Phe
225 230 235 240

Phe Phe Pro Ile Cys Val Val Phe Ala Trp Val Ala Asp Arg Arg Leu
245 250 255

Leu Phe Tyr Lys Tyr Val Tyr Lys Arg Tyr Arg Ala Gly Lys Gln Arg
260 265 270

Gly Met Ile Ile Glu His Glu Gly Asp Arg Pro Ser Ser Lys Thr Glu
275 280 285

Ile Glu Met Asp Gly Lys Val Val Asn Ser His Val Glu Asn Phe Leu
290 295 300

[0004]

Asp Gly Ala Leu Val Leu Glu Val Asp Glu Arg Asp Gln Asp Asp Glu
305 310 315 320

Glu Ala Arg Arg Glu Met Ala Arg Ile Leu Lys Glu Leu Lys Gln Lys
325 330 335

His Pro Asp Lys Glu Ile Glu Gln Leu Ile Glu Leu Ala Asn Tyr Gln
340 345 350

Val Leu Ser Gln Gln Gln Lys Ser Arg Ala Phe Tyr Arg Ile Gln Ala
355 360 365

Thr Arg Leu Met Thr Gly Ala Gly Asn Ile Leu Lys Arg His Ala Ala
370 375 380

Asp Gln Ala Arg Lys Ala Val Ser Met His Glu Val Asn Thr Glu Val
385 390 395 400

Thr Glu Asn Asp Pro Val Ser Lys Ile Phe Phe Glu Gln Gly Thr Tyr
405 410 415

Gln Cys Leu Glu Asn Cys Gly Thr Val Ala Leu Thr Ile Ile Arg Arg
420 425 430

Gly Gly Asp Leu Thr Asn Thr Val Phe Val Asp Phe Arg Thr Glu Asp
435 440 445

Gly Thr Ala Asn Ala Gly Ser Asp Tyr Glu Phe Thr Glu Gly Thr Val
450 455 460

Val Phe Lys Pro Gly Asp Thr Gln Lys Glu Ile Arg Val Gly Ile Ile
465 470 475 480

Asp Asp Asp Ile Phe Glu Glu Asp Glu Asn Phe Leu Val His Leu Ser
485 490 495

[0005]

Asn Val Lys Val Ser Ser Glu Ala Ser Glu Asp Gly Ile Leu Glu Ala
500 505 510

Asn His Val Ser Thr Leu Ala Cys Leu Gly Ser Pro Ser Thr Ala Thr
515 520 525

Val Thr Ile Phe Asp Asp Asp His Ala Gly Ile Phe Thr Phe Glu Glu
530 535 540

Pro Val Thr His Val Ser Glu Ser Ile Gly Ile Met Glu Val Lys Val
545 550 555 560

Leu Arg Thr Ser Gly Ala Arg Gly Asn Val Ile Val Pro Tyr Lys Thr
565 570 575

Ile Glu Gly Thr Ala Arg Gly Gly Gly Glu Asp Phe Glu Asp Thr Cys
580 585 590

Gly Glu Leu Glu Phe Gln Asn Asp Glu Ile Val Lys Thr Ile Ser Val
595 600 605

Lys Val Ile Asp Asp Glu Glu Tyr Glu Lys Asn Lys Thr Phe Phe Leu
610 615 620

Glu Ile Gly Glu Pro Arg Leu Val Glu Met Ser Glu Lys Lys Ala Leu
625 630 635 640

Leu Leu Asn Glu Leu Gly Gly Phe Thr Ile Thr Gly Lys Tyr Leu Phe
645 650 655

Gly Gln Pro Val Phe Arg Lys Val His Ala Arg Glu His Pro Ile Leu
660 665 670

Ser Thr Val Ile Thr Ile Ala Asp Glu Tyr Asp Asp Lys Gln Pro Leu
675 680 685

[0006]

Thr Ser Lys Glu Glu Glu Glu Arg Arg Ile Ala Glu Met Gly Arg Pro
690 695 700

Ile Leu Gly Glu His Thr Lys Leu Glu Val Ile Ile Glu Glu Ser Tyr
705 710 715 720

Glu Phe Lys Ser Thr Val Asp Lys Leu Ile Lys Lys Thr Asn Leu Ala
725 730 735

Leu Val Val Gly Thr Asn Ser Trp Arg Glu Gln Phe Ile Glu Ala Ile
740 745 750

Thr Val Ser Ala Gly Glu Asp Asp Asp Asp Asp Glu Cys Gly Glu Glu
755 760 765

Lys Leu Pro Ser Cys Phe Asp Tyr Val Met His Phe Leu Thr Val Phe
770 775 780

Trp Lys Val Leu Phe Ala Phe Val Pro Pro Thr Glu Tyr Trp Asn Gly
785 790 795 800

Trp Ala Cys Phe Ile Val Ser Ile Leu Met Ile Gly Leu Leu Thr Ala
805 810 815

Phe Ile Gly Asp Leu Ala Ser His Phe Gly Cys Thr Ile Gly Leu Lys
820 825 830

Asp Ser Val Thr Ala Val Val Phe Val Ala Leu Gly Thr Ser Val Pro
835 840 845

Asp Thr Phe Ala Ser Lys Val Ala Ala Thr Gln Asp Gln Tyr Ala Asp
850 855 860

Ala Ser Ile Gly Asn Val Thr Gly Ser Asn Ala Val Asn Val Phe Leu
865 870 875 880

Gly Ile Gly Val Ala Trp Ser Ile Ala Ala Ile Tyr His Ala Ala Asn

[0007]

885 890 895

Gly Glu Gln Phe Lys Val Ser Pro Gly Thr Leu Ala Phe Ser Val Thr
900 905 910

Leu Phe Thr Ile Phe Ala Phe Ile Asn Val Gly Val Leu Leu Tyr Arg
915 920 925

Arg Arg Pro Glu Ile Gly Gly Glu Leu Gly Gly Pro Arg Thr Ala Lys
930 935 940

Leu Leu Thr Ser Cys Leu Phe Val Leu Leu Trp Leu Leu Tyr Ile Phe
945 950 955 960

Phe Ser Ser Leu Glu Ala Tyr Cys His Ile Lys Gly Phe
965 970

<210> 2
<211> 921
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

Met Ala Pro Leu Ala Leu Val Gly Val Thr Leu Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10 15

Pro Cys Ser Gly Ala Ala Thr Pro Thr Pro Ser Leu Pro Pro Pro Pro
20 25 30

Ala Asn Asp Ser Asp Thr Ser Thr Gly Gly Cys Gln Gly Ser Tyr Arg
35 40 45

Cys Gln Pro Gly Val Leu Leu Pro Val Trp Glu Pro Asp Asp Pro Ser
50 55 60

Leu Gly Asp Lys Ala Ala Arg Ala Val Val Tyr Phe Val Ala Met Val
65 70 75 80

[0008]

Tyr Met Phe Leu Gly Val Ser Ile Ile Ala Asp Arg Phe Met Ala Ala
85 90 95

Ile Glu Val Ile Thr Ser Lys Glu Lys Glu Ile Thr Ile Thr Lys Ala
100 105 110

Asn Gly Glu Thr Ser Val Gly Thr Val Arg Ile Trp Asn Glu Thr Val
115 120 125

Ser Asn Leu Thr Leu Met Ala Leu Gly Ser Ser Ala Pro Glu Ile Leu
130 135 140

Leu Ser Val Ile Glu Val Cys Gly His Asn Phe Gln Ala Gly Glu Leu
145 150 155 160

Gly Pro Gly Thr Ile Val Gly Ser Ala Ala Phe Asn Met Phe Val Val
165 170 175

Ile Ala Val Cys Ile Tyr Val Ile Pro Ala Gly Glu Ser Arg Lys Ile
180 185 190

Lys His Leu Arg Val Phe Phe Val Thr Ala Ser Trp Ser Ile Phe Ala
195 200 205

Tyr Val Trp Leu Tyr Leu Ile Leu Ala Val Phe Ser Pro Gly Val Val
210 215 220

Gln Val Trp Glu Ala Leu Leu Thr Leu Val Phe Phe Pro Val Cys Val
225 230 235 240

Val Phe Ala Trp Met Ala Asp Lys Arg Leu Leu Phe Tyr Lys Tyr Val
245 250 255

Tyr Lys Arg Tyr Arg Thr Asp Pro Arg Ser Gly Ile Ile Ile Gly Ala
260 265 270

[0009]

Glu Gly Asp Pro Pro Lys Ser Ile Glu Leu Asp Gly Thr Phe Val Gly
275 280 285

Ala Glu Ala Pro Gly Glu Leu Gly Gly Leu Gly Pro Gly Pro Ala Glu
290 295 300

Ala Arg Glu Leu Asp Ala Ser Arg Arg Glu Val Ile Gln Ile Leu Lys
305 310 315 320

Asp Leu Lys Gln Lys His Pro Asp Lys Asp Leu Glu Gln Leu Val Gly
325 330 335

Ile Ala Asn Tyr Tyr Ala Leu Leu His Gln Gln Lys Ser Arg Ala Phe
340 345 350

Tyr Arg Ile Gln Ala Thr Arg Leu Met Thr Gly Ala Gly Asn Val Leu
355 360 365

Arg Arg His Ala Ala Asp Ala Ser Arg Arg Ala Ala Pro Ala Glu Gly
370 375 380

Ala Gly Glu Asp Glu Asp Asp Gly Ala Ser Arg Ile Phe Phe Glu Pro
385 390 395 400

Ser Leu Tyr His Cys Leu Glu Asn Cys Gly Ser Val Leu Leu Ser Val
405 410 415

Thr Cys Gln Gly Gly Glu Gly Asn Ser Thr Phe Tyr Val Asp Tyr Arg
420 425 430

Thr Glu Asp Gly Ser Ala Lys Ala Gly Ser Asp Tyr Glu Tyr Ser Glu
435 440 445

Gly Thr Leu Val Phe Lys Pro Gly Glu Thr Gln Lys Glu Leu Arg Ile
450 455 460

Gly Ile Ile Asp Asp Asp Ile Phe Glu Glu Asp Glu His Phe Phe Val

[0010]

465 470 475 480

Arg Leu Leu Asn Leu Arg Val Gly Asp Ala Gln Gly Met Phe Glu Pro
485 490 495

Asp Gly Gly Gly Arg Pro Lys Gly Arg Leu Val Ala Pro Leu Leu Ala
500 505 510

Thr Val Thr Ile Leu Asp Asp Asp His Ala Gly Ile Phe Ser Phe Gln
515 520 525

Asp Arg Leu Leu His Val Ser Glu Cys Met Gly Thr Val Asp Val Arg
530 535 540

Val Val Arg Ser Ser Gly Ala Arg Gly Thr Val Arg Leu Pro Tyr Arg
545 550 555 560

Thr Val Asp Gly Thr Ala Arg Gly Gly Gly Val His Tyr Glu Asp Ala
565 570 575

Cys Gly Glu Leu Glu Phe Gly Asp Asp Glu Thr Met Lys Thr Leu Gln
580 585 590

Val Lys Ile Val Asp Asp Glu Glu Tyr Glu Lys Lys Asp Asn Phe Phe
595 600 605

Ile Glu Leu Gly Gln Pro Gln Trp Leu Lys Arg Gly Ile Ser Ala Leu
610 615 620

Leu Leu Asn Gln Gly Asp Gly Asp Arg Lys Leu Thr Ala Glu Glu Glu
625 630 635 640

Glu Ala Arg Arg Ile Ala Glu Met Gly Lys Pro Val Leu Gly Glu Asn
645 650 655

Cys Arg Leu Glu Val Ile Ile Glu Glu Ser Tyr Asp Phe Lys Asn Thr
660 665 670

[0011]

Val Asp Lys Leu Ile Lys Lys Thr Asn Leu Ala Leu Val Ile Gly Thr
675 680 685

His Ser Trp Arg Glu Gln Phe Leu Glu Ala Ile Thr Val Ser Ala Gly
690 695 700

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Ser Arg Glu Glu Arg Leu Pro Ser
705 710 715 720

Cys Phe Asp Tyr Val Met His Phe Leu Thr Val Phe Trp Lys Val Leu
725 730 735

Phe Ala Cys Val Pro Pro Thr Glu Tyr Cys His Gly Trp Ala Cys Phe
740 745 750

Gly Val Ser Ile Leu Val Ile Gly Leu Leu Thr Ala Leu Ile Gly Asp
755 760 765

Leu Ala Ser His Phe Gly Cys Thr Val Gly Leu Lys Asp Ser Val Asn
770 775 780

Ala Val Val Phe Val Ala Leu Gly Thr Ser Ile Pro Asp Thr Phe Ala
785 790 795 800

Ser Lys Val Ala Ala Leu Gln Asp Gln Cys Ala Asp Ala Ser Ile Gly
805 810 815

Asn Val Thr Gly Ser Asn Ala Val Asn Val Phe Leu Gly Leu Gly Val
820 825 830

Ala Trp Ser Val Ala Ala Val Tyr Trp Ala Val Gln Gly Arg Pro Phe
835 840 845

Glu Val Arg Thr Gly Thr Leu Ala Phe Ser Val Thr Leu Phe Thr Val
850 855 860

[0012]

Phe Ala Phe Val Gly Ile Ala Val Leu Leu Tyr Arg Arg Arg Pro His
865 870 875 880

Ile Gly Gly Glu Leu Gly Gly Pro Arg Gly Pro Lys Leu Ala Thr Thr
885 890 895

Ala Leu Phe Leu Gly Leu Trp Leu Leu Tyr Ile Leu Phe Ala Ser Leu
900 905 910

Glu Ala Tyr Cys His Ile Arg Gly Phe
915 920

<210> 3
<211> 924
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

Met Ala Trp Leu Arg Leu Gln Pro Leu Thr Ser Ala Phe Leu His Phe
1 5 10 15

Gly Leu Val Thr Phe Val Leu Phe Leu Asn Gly Leu Arg Ala Glu Ala
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Asp Val Pro Ser Thr Gly Gln Asn Asn Glu Ser Cys
35 40 45

Ser Gly Ser Ser Asp Cys Lys Glu Gly Val Ile Leu Pro Ile Trp Tyr
50 55 60

Pro Glu Asn Pro Ser Leu Gly Asp Lys Ile Ala Arg Val Ile Val Tyr
65 70 75 80

Phe Val Ala Leu Ile Tyr Met Phe Leu Gly Val Ser Ile Ile Ala Asp
85 90 95

Arg Phe Met Ala Ser Ile Glu Val Ile Thr Ser Gln Glu Arg Glu Val

[0013]

100 105 110

Thr Ile Lys Lys Pro Asn Gly Glu Thr Ser Thr Thr Thr Ile Arg Val
115 120 125

Trp Asn Glu Thr Val Ser Asn Leu Thr Leu Met Ala Leu Gly Ser Ser
130 135 140

Ala Pro Glu Ile Leu Leu Ser Leu Ile Glu Val Cys Gly His Gly Phe
145 150 155 160

Ile Ala Gly Asp Leu Gly Pro Ser Thr Ile Val Gly Ser Ala Ala Phe
165 170 175

Asn Met Phe Ile Ile Ile Gly Ile Cys Val Tyr Val Ile Pro Asp Gly
180 185 190

Glu Thr Arg Lys Ile Lys His Leu Arg Val Phe Phe Ile Thr Ala Ala
195 200 205

Trp Ser Ile Phe Ala Tyr Ile Trp Leu Tyr Met Ile Leu Ala Val Phe
210 215 220

Ser Pro Gly Val Val Gln Val Trp Glu Gly Leu Leu Thr Leu Phe Phe
225 230 235 240

Phe Pro Val Cys Val Leu Leu Ala Trp Val Ala Asp Lys Arg Leu Leu
245 250 255

Phe Tyr Lys Tyr Met His Lys Lys Tyr Arg Thr Asp Lys His Arg Gly
260 265 270

Ile Ile Ile Glu Thr Glu Gly Asp His Pro Lys Gly Ile Glu Met Asp
275 280 285

Gly Lys Met Met Asn Ser His Phe Leu Asp Gly Asn Leu Val Pro Leu
290 295 300

[0014]

Glu Gly Lys Glu Val Asp Glu Ser Arg Arg Glu Met Ile Arg Ile Leu
305 310 315 320

Lys Asp Leu Lys Gln Lys His Pro Glu Lys Asp Leu Asp Gln Leu Val
325 330 335

Glu Met Ala Asn Tyr Tyr Ala Leu Ser His Gln Gln Lys Ser Arg Ala
340 345 350

Phe Tyr Arg Ile Gln Ala Thr Arg Met Met Thr Gly Ala Gly Asn Ile
355 360 365

Leu Lys Lys His Ala Ala Glu Gln Ala Lys Lys Ala Ser Ser Met Ser
370 375 380

Glu Val His Thr Asp Glu Pro Glu Asp Phe Ile Ser Lys Val Phe Phe
385 390 395 400

Asp Pro Cys Ser Tyr Gln Cys Leu Glu Asn Cys Gly Ala Val Leu Leu
405 410 415

Thr Val Val Arg Lys Gly Gly Asp Met Ser Lys Thr Met Tyr Val Asp
420 425 430

Tyr Lys Thr Glu Asp Gly Ser Ala Asn Ala Gly Ala Asp Tyr Glu Phe
435 440 445

Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Lys Pro Gly Glu Thr Gln Lys Glu Phe
450 455 460

Ser Val Gly Ile Ile Asp Asp Asp Ile Phe Glu Glu Asp Glu His Phe
465 470 475 480

Phe Val Arg Leu Ser Asn Val Arg Ile Glu Glu Glu Gln Pro Glu Glu
485 490 495

[0015]

Gly Met Pro Pro Ala Ile Phe Asn Ser Leu Pro Leu Pro Arg Ala Val
500 505 510

Leu Ala Ser Pro Cys Val Ala Thr Val Thr Ile Leu Asp Asp Asp His
515 520 525

Ala Gly Ile Phe Thr Phe Glu Cys Asp Thr Ile His Val Ser Glu Ser
530 535 540

Ile Gly Val Met Glu Val Lys Val Leu Arg Thr Ser Gly Ala Arg Gly
545 550 555 560

Thr Val Ile Val Pro Phe Arg Thr Val Glu Gly Thr Ala Lys Gly Gly
565 570 575

Gly Glu Asp Phe Glu Asp Thr Tyr Gly Glu Leu Glu Phe Lys Asn Asp
580 585 590

Glu Thr Val Lys Thr Ile Arg Val Lys Ile Val Asp Glu Glu Glu Tyr
595 600 605

Glu Arg Gln Glu Asn Phe Phe Ile Ala Leu Gly Glu Pro Lys Trp Met
610 615 620

Glu Arg Gly Ile Ser Ala Leu Leu Leu Ser Pro Asp Arg Lys Leu Thr
625 630 635 640

Met Glu Glu Glu Glu Ala Lys Arg Ile Ala Glu Met Gly Lys Pro Val
645 650 655

Leu Gly Glu His Pro Lys Leu Glu Val Ile Ile Glu Glu Ser Tyr Glu
660 665 670

Phe Lys Thr Thr Val Asp Lys Leu Ile Lys Lys Thr Asn Leu Ala Leu
675 680 685

[0016]

Val Val Gly Thr His Ser Trp Arg Asp Gln Phe Met Glu Ala Ile Thr
690 695 700

Val Ser Ala Ala Gly Asp Glu Asp Glu Asp Glu Ser Gly Glu Glu Arg
705 710 715 720

Leu Pro Ser Cys Phe Asp Tyr Val Met His Phe Leu Thr Val Phe Trp
725 730 735

Lys Val Leu Phe Ala Cys Val Pro Pro Thr Glu Tyr Cys His Gly Trp
740 745 750

Ala Cys Phe Ala Val Ser Ile Leu Ile Ile Gly Met Leu Thr Ala Ile
755 760 765

Ile Gly Asp Leu Ala Ser His Phe Gly Cys Thr Ile Gly Leu Lys Asp
770 775 780

Ser Val Thr Ala Val Val Phe Val Ala Phe Gly Thr Ser Val Pro Asp
785 790 795 800

Thr Phe Ala Ser Lys Ala Ala Ala Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asp Ala
805 810 815

Ser Ile Gly Asn Val Thr Gly Ser Asn Ala Val Asn Val Phe Leu Gly
820 825 830

Ile Gly Leu Ala Trp Ser Val Ala Ala Ile Tyr Trp Ala Leu Gln Gly
835 840 845

Gln Glu Phe His Val Ser Ala Gly Thr Leu Ala Phe Ser Val Thr Leu
850 855 860

Phe Thr Ile Phe Ala Phe Val Cys Ile Ser Val Leu Leu Tyr Arg Arg
865 870 875 880

Arg Pro His Leu Gly Gly Glu Leu Gly Gly Pro Arg Gly Cys Lys Leu

[0017]

885 890 895

Ala Thr Thr Trp Leu Phe Val Ser Leu Trp Leu Leu Tyr Ile Leu Phe
900 905 910

Ala Thr Leu Glu Ala Tyr Cys Tyr Ile Lys Gly Phe
915 920

(a) SEQ ID NO: 1

```
MYNMRRLSLS PTFSMGFHLL VTVSLLFSHV DHVIAETEME GEGNETGECT GSYYCKKGVI      60
LPIWEPQDPS FGDKIARATV YFVAMVYMFL GVSIIADRFM SSIEVITSQE KEITIKKPNG     120
ETTKTTVRIW NETVSNLTLM ALGSSAPEIL LSVIEVCGHN FTAGDLGPST IVGSAAFNMF     180
IIIALCVYVV PDGETRKIKH LRVFFVTAAW SIFAYTWLYI ILSVISPGVV EVWEGLLTFF     240
FFPICVVFAW VADRRLLFYK YVYKRYRAGK QRGMIIEHEG DRPSSKTEIE MDGKVVNSHV     300
ENFLDGALVL EVDERDQDDE EARREMARIL KELKQKHPDK EIEQLIELAN YQVLSQQQKS     360
RAFYRIQATR LMTGAGNILK RHAADQARKA VSMHEVNTEV TENDPVSKIF FEQGTYQCLE     420
NCGTVALTII RRGGDLTNTV FVDFRTEDGT ANAGSDYEFT EGTVVFKPGD TQKEIRVGII     480
DDDIFEEDEN FLVHLSNVKV SSEASEDGIL EANHVSTLAC LGSPSTATVT IFDDDHAGIF     540
TFEEPVTHVS ESIGIMEVKV LRTSGARGNV IVPYKTIEGT ARGGGEDFED TCGELEFQND     600
EIVKTISVKV IDDEEYEKNK TFFLEIGEPR LVEMSEKKAL LLNELGGFTI TGKYLFGQPV     660
FRKVHAREHP ILSTVITIAD EYDDKQPLTS KEEEERRIAE MGRPILGEHT KLEVIIEESY     720
EFKSTVDKLI KKTNLALVVG TNSWREQFIE AITVSAGEDD DDDECGEEKL PSCFDYVMHF     780
LTVFWKVLFA FVPPTEYWNG WACFIVSILM IGLLTAFIGD LASHFGCTIG LKDSVTAVVF     840
VALGTSVPDT FASKVAATQD QYADASIGNV TGSNAVNVFL GIGVAWSIAA IYHAANGEQF     900
KVSPGTLAFS VTLFTIFAFI NVGVLLYRRR PEIGGELGGP RTAKLLTSCL FVLLWLLYIF     960
FSSLEAYCHI KGF                                                        973
```

(b) SEQ ID NO: 2

```
MAPLALVGVT LLLAAPPCSG AATPTPSLPP PPANDSDTST GGCQGSYRCQ PGVLLPVWEP      60
DDPSLGDKAA RAVVYFVAMV YMFLGVSIIA DRFMAAIEVI TSKEKEITIT KANGETSVGT     120
VRIWNETVSN LTLMALGSSA PEILLSVIEV CGHNFQAGEL GPGTIVGSAA FNMFVVIAVC     180
IYVIPAGESR KIKHLRVFFV TASWSIFAYV WLYLILAVFS PGVVQVWEAL LTLVFFPVCV     240
VFAWMADKRL LFYKYVYKRY RTDPRSGIII GAEGDPPKSI ELDGTFVGAE APGELGGLGP     300
GPAEARELDA SRREVIQILK DLKQKHPDKD LEQLVGIANY YALLHQQKSR AFYRIQATRL     360
MTGAGNVLRR HAADASRRAA PAEGAGEDED DGASRIFFEP SLYHCLENCG SVLLSVTCQG     420
GEGNSTFYVD YRTEDGSAKA GSDYEYSEGT LVFKPGETQK ELRIGIIDDD IFEEDEHFFV     480
RLLNLRVGDA QGMFEPDGGG RPKGRLVAPL LATVTILDDD HAGIFSFQDR LLHVSECMGT     540
VDVRVVRSSG ARGTVRLPYR TVDGTARGGG VHYEDACGEL EFGDDETMKT LQVKIVDDEE     600
YEKKDNFFIE LGQPQWLKRG ISALLLNQGD GDRKLTAEEE EARRIAEMGK PVLGENCRLE     660
VIIEESYDFK NTVDKLIKKT NLALVIGTHS WREQFLEAIT VSAGDEEEEE DGSREERLPS     720
CFDYVMHFLT VFWKVLFACV PPTEYCHGWA CFGVSILVIG LLTALIGDLA SHFGCTVGLK     780
DSVNAVVFVA LGTSIPDTFA SKVAALQDQC ADASIGNVTG SNAVNVFLGL GVAWSVAAVY     840
WAVQGRPFEV RTGTLAFSVT LFTVFAFVGI AVLLYRRRPH IGGELGGPRG PKLATTALFL     900
```

图 1

GLWLLYILFA SLEAYCHIRG F 921

(c) SEQ ID NO: 3

MAWLRLQPLT SAFLHFGLVT FVLFLNGLRA EAGGSGDVPS TGQNNESCSG SSDCKEGVIL 60
PIWYPENPSL GDKIARVIVY FVALIYMFLG VSIIADRFMA SIEVITSQER EVTIKKPNGE 120
TSTTTIRVWN ETVSNLTLMA LGSSAPEILL SLIEVCGHGF IAGDLGPSTI VGSAAFNMFI 180
IIGICVYVIP DGETRKIKHL RVFFITAAWS IFAYIWLYMI LAVFSPGVVQ VWEGLLTLFF 240
FPVCVLLAWV ADKRLLFYKY MHKKYRTDKH RGIIIETEGD HPKGIEMDGK MMNSHFLDGN 300
LVPLEGKEVD ESRREMIRIL KDLKQKHPEK DLDQLVEMAN YYALSHQQKS RAFYRIQATR 360
MMTGAGNILK KHAAEQAKKA SSMSEVHTDE PEDFISKVFF DPCSYQCLEN CGAVLLTVVR 420
KGGDMSKTMY VDYKTEDGSA NAGADYEFTE GTVVLKPGET QKEFSVGIID DDIFEEDEHF 480
FVRLSNVRIE EEQPEEGMPP AIFNSLPLPR AVLASPCVAT VTILDDDHAG IFTFECDTIH 540
VSESIGVMEV KVLRTSGARG TVIVPFRTVE GTAKGGGEDF EDTYGELEFK NDETVKTIRV 600
KIVDEEEYER QENFFIALGE PKWMERGISA LLLSPDRKLT MEEEEAKRIA EMGKPVLGEH 660
PKLEVIIEES YEFKTTVDKL IKKTNLALVV GTHSWRDQFM EAITVSAAGD EDEDESGEER 720
LPSCFDYVMH FLTVFWKVLF ACVPPTEYCH GWACFAVSIL IIGMLTAIIG DLASHFGCTI 780
GLKDSVTAVV FVAFGTSVPD TFASKAAALQ DVYADASIGN VTGSNAVNVF LGIGLAWSVA 840
AIYWALQGQE FHVSAGTLAF SVTLFTIFAF VCISVLLYRR RPHLGGELGG PRGCKLATTW 900
LFVSLWLLYI LFATLEAYCY IKGF 924

	C-慢[pF]	峰值电流[pA]	相对峰值电流[pA/pF]
平均值	13.00	1.00	0.12
SEM	4.73	0.58	0.07

图 2

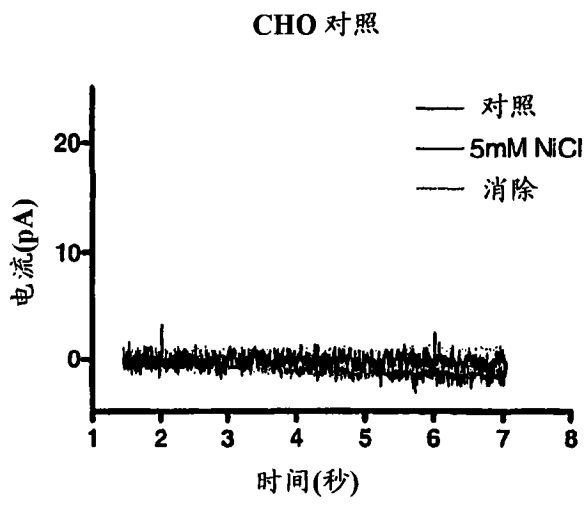


图 3

(a)

	C-慢[pF]	峰值电流[pA]	相对峰值电流 [pA/pF]	转运的电荷 [pC]	相对电荷 [pC/pF]
平均值	26.20	38.33	1.40	146.48	5.36
SEM	1.93	2.85	0.18	12.49	0.78

(b)

	C-慢[pF]	峰值电流[pA]	相对峰值电流 [pA/pF]	转运的电荷 [pC]	相对电荷 [pC/pF]
平均值	22.17	59.50	2.95	119.23	5.99
SEM	2.57	10.90	0.70	27.10	1.67

(c)

	C-慢[pF]	峰值电流[pA]	相对峰值电流 [pA/pF]	转运的电荷 [pC]	相对电荷 [pC/pF]
平均值	32.35	105.75	3.46	171.53	5.84
SEM	5.60	28.25	1.11	52.93	2.25

图 4

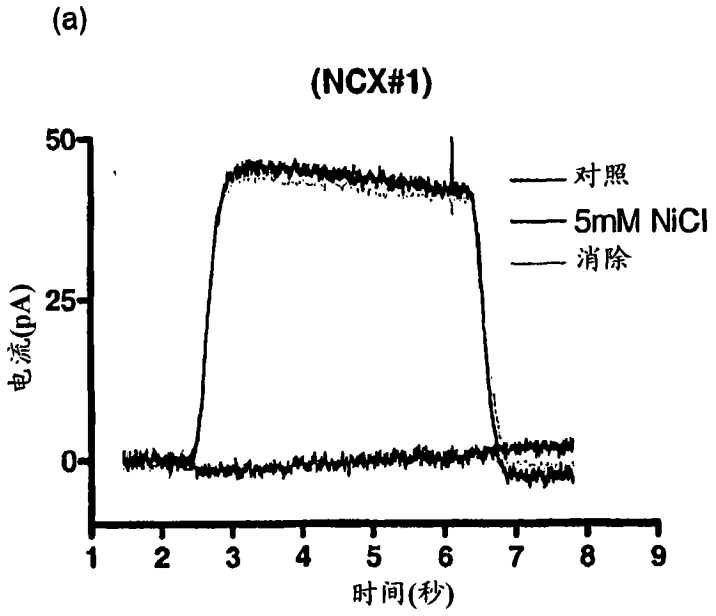
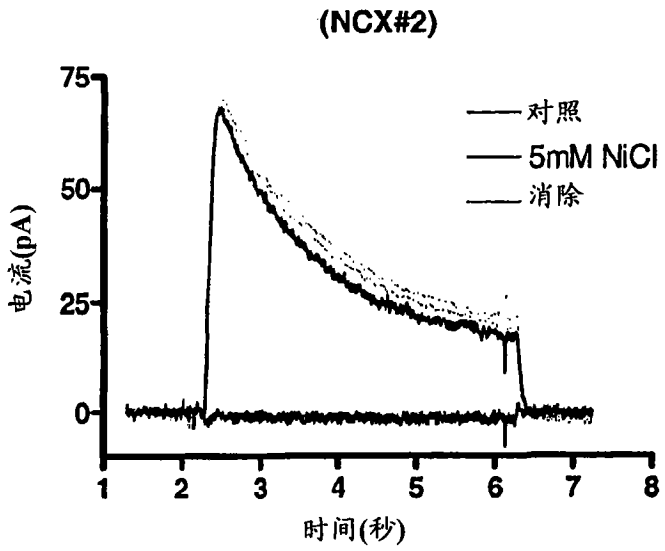
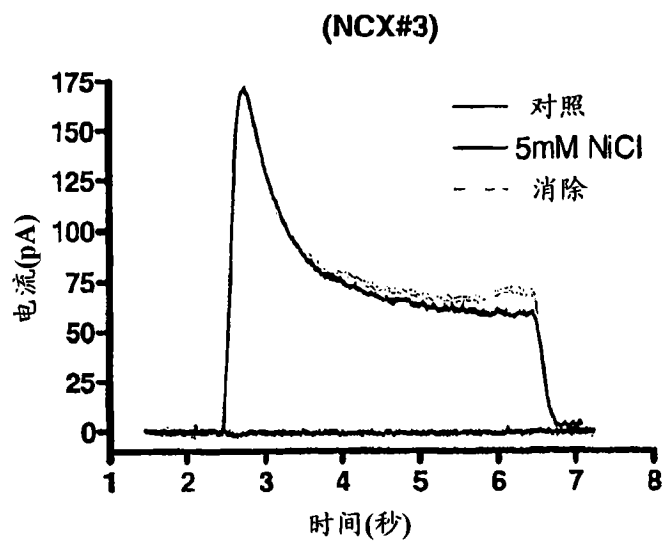


图 5

(b)


(NCX#2)
75
50
25
0
电流(pA)
对照
5mM NiCl
消除
1
2
3
4
5
6
7
8
时间(秒)

(c)


(NCX#3)
175
150
125
100
75
50
25
0
电流(pA)
对照
5mM NiCl
消除
1
2
3
4
5
6
7
8
时间(秒)

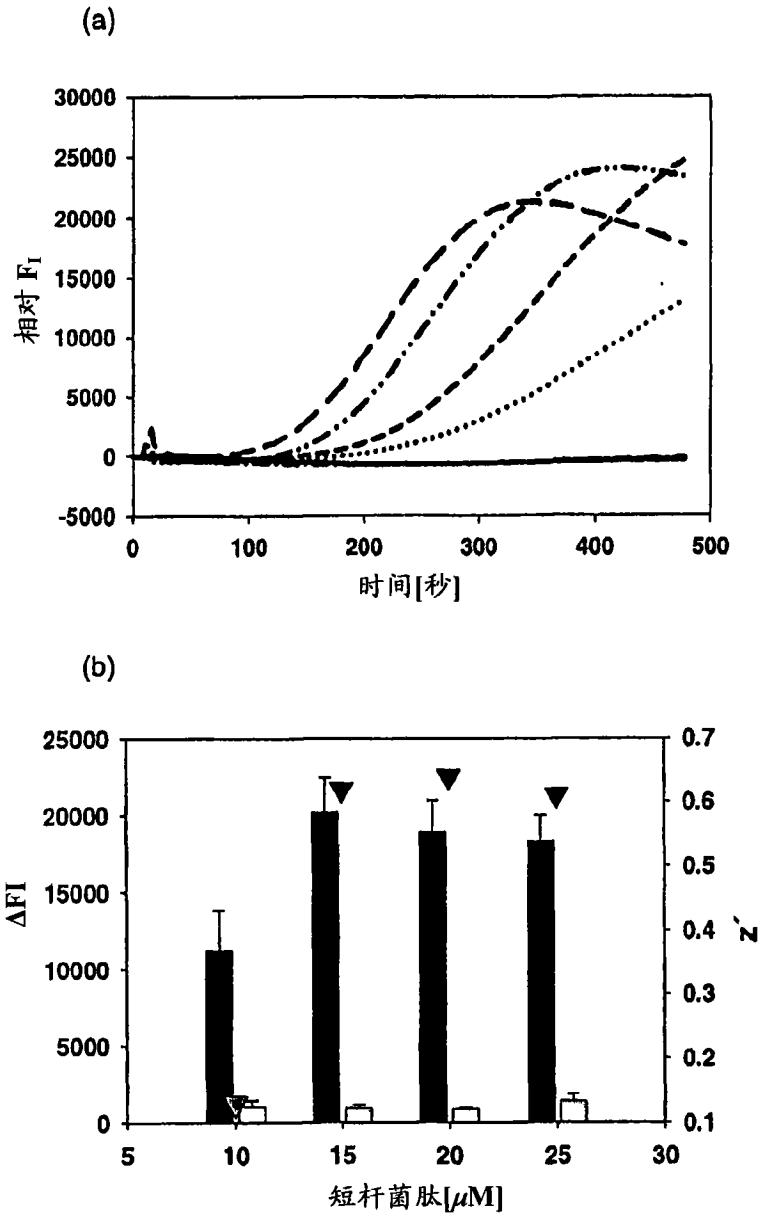

(a)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
相对 F_1
0
100
200
300
400
500
时间[秒]
(b)
25000
20000
15000
10000
5000
0
ΔFI
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
N
5
10
15
20
25
30
短杆菌肽[μM]

图 6

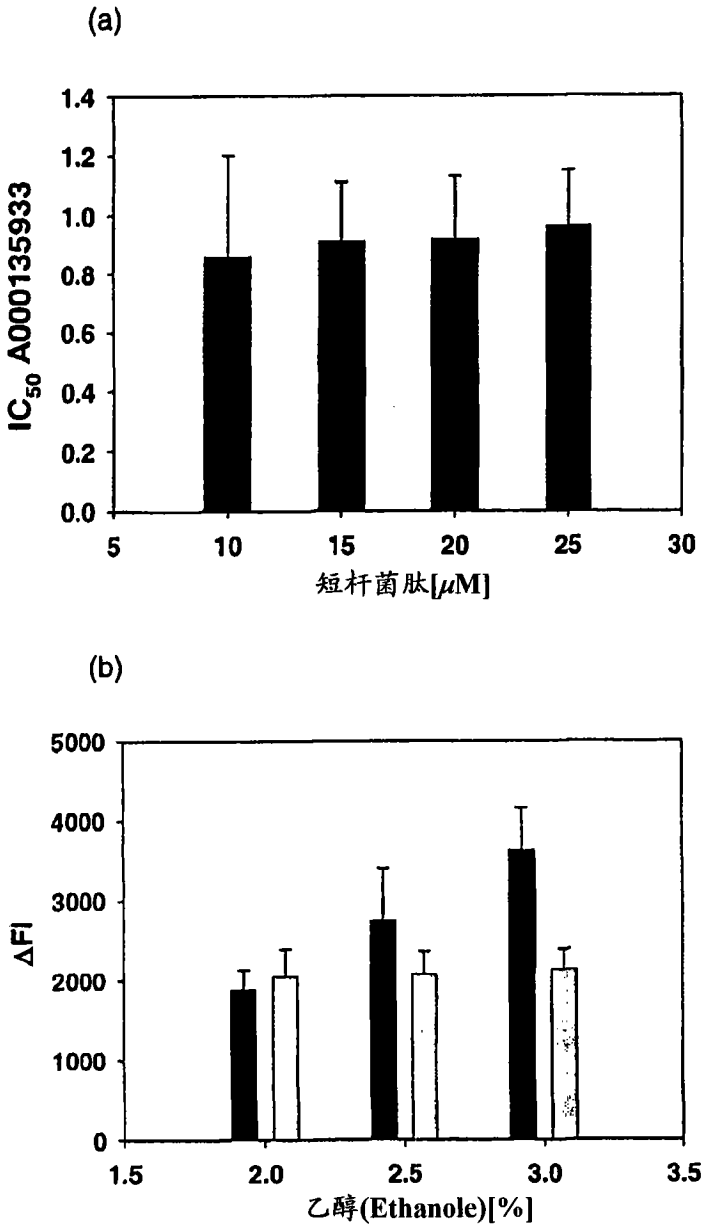

(a)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
IC50 A000135933
5
10
15
20
25
30
短杆菌肽[μM]
(b)
5000
4000
3000
2000
1000
0
ΔFI
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
乙醇(Ethanole)[%]

图 7

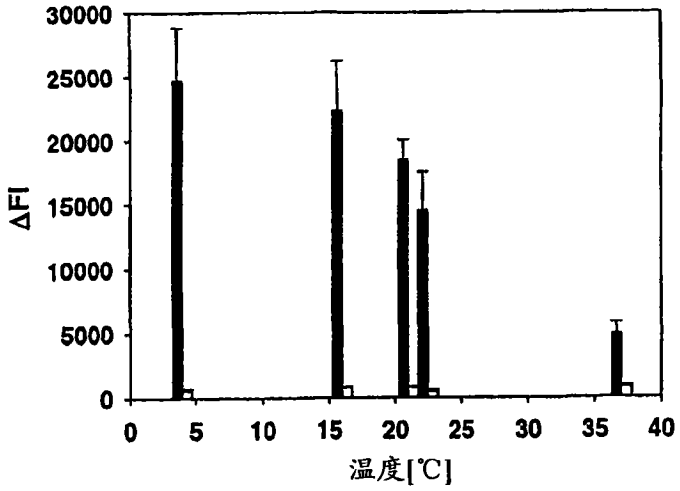

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
ΔFI
0 5 10 15 20 25 30 35 40
温度[℃]

图 8

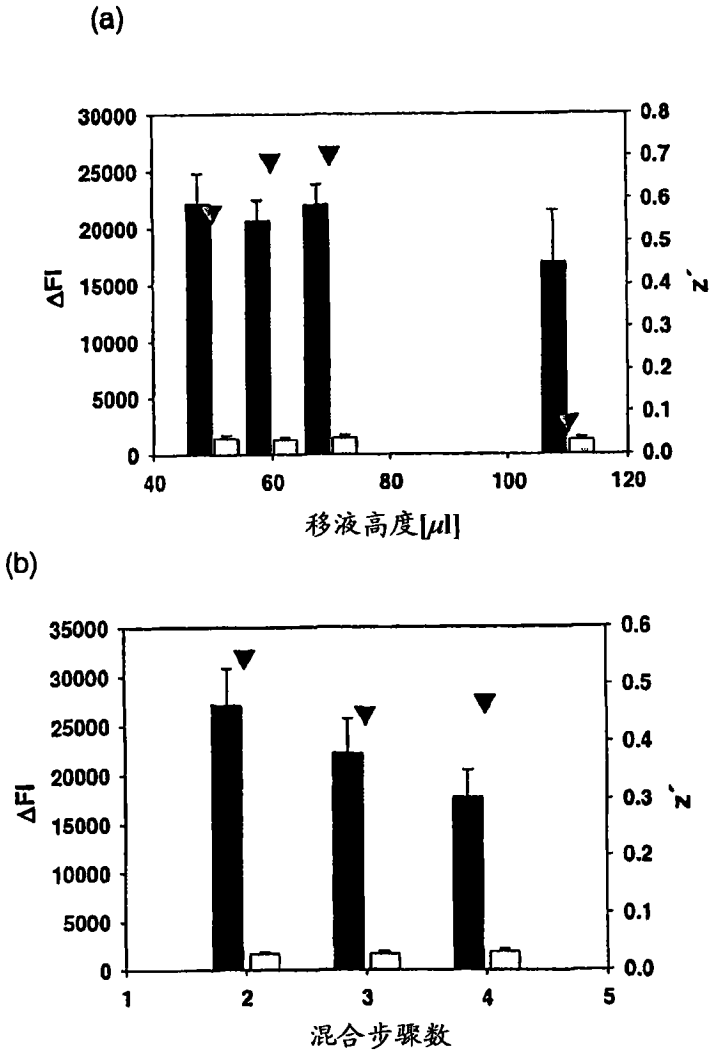

(a)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
ΔFI
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
N
40 60 80 100 120
移液高度[μl]
(b)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
ΔFI
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
N
1 2 3 4 5
混合步骤数

图 9

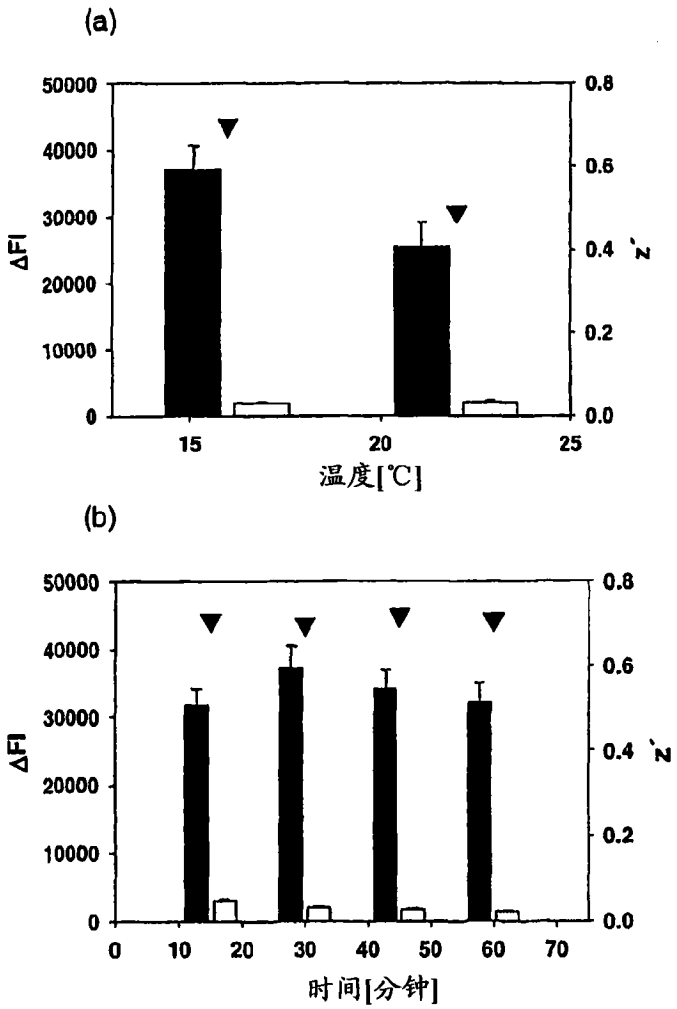

(a)
50000
40000
30000
20000
10000
0
ΔFI
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
N
15
20
25
温度[℃]
(b)
50000
40000
30000
20000
10000
0
ΔFI
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
N
0
10
20
30
40
50
60
70
时间[分钟]

图 10

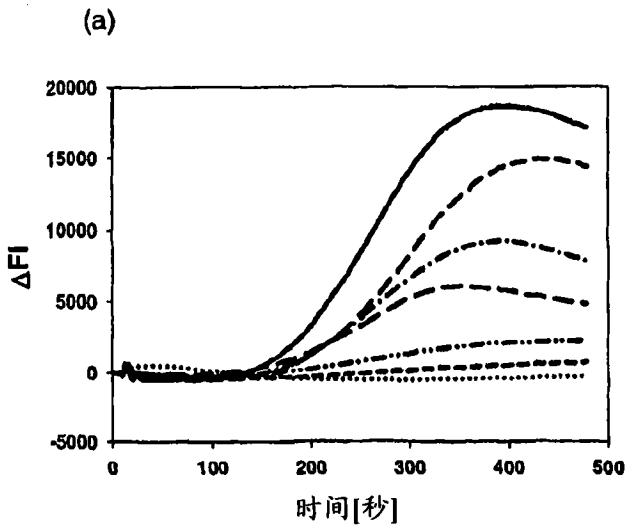
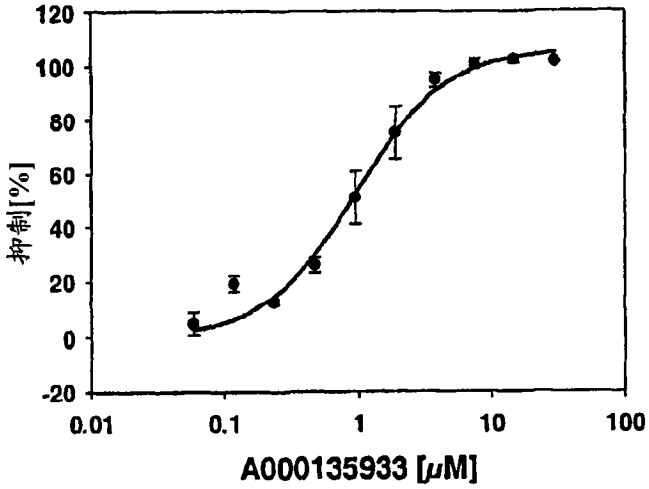

(a)
20000
15000
10000
5000
0
-5000
ΔFI
0
100
200
300
400
500
时间[秒]

图 11

(b)



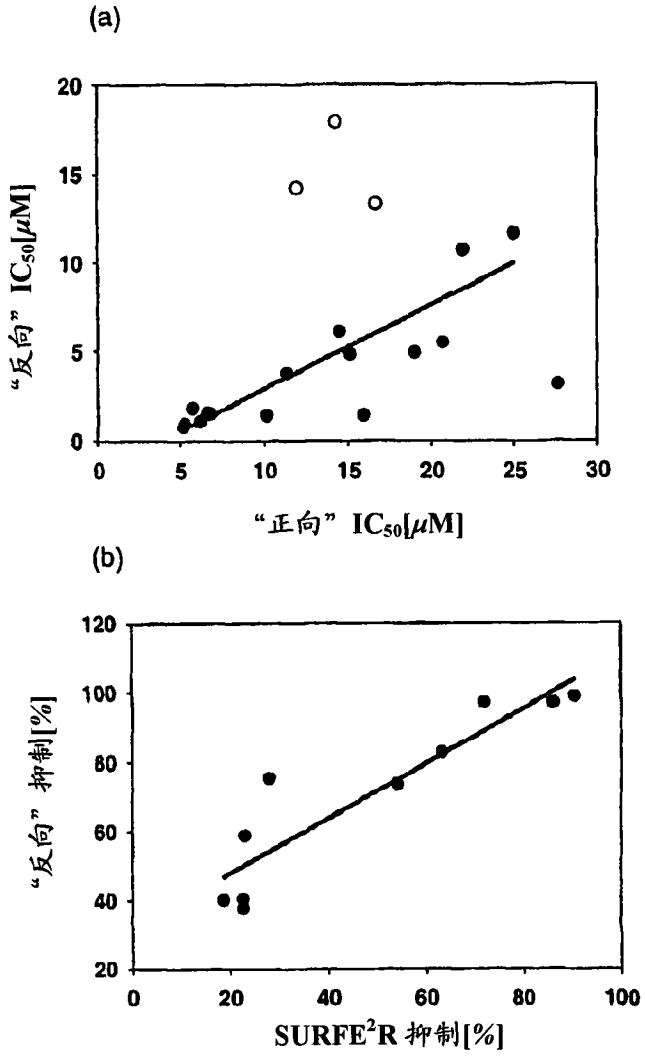

(a)
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
“反向” IC50[μM]
“正向” IC50[μM]
(b)
120
100
80
60
40
20
0
20
40
60
80
100
“反向” 抑制[%]
SURFE2R 抑制[%]

图 12

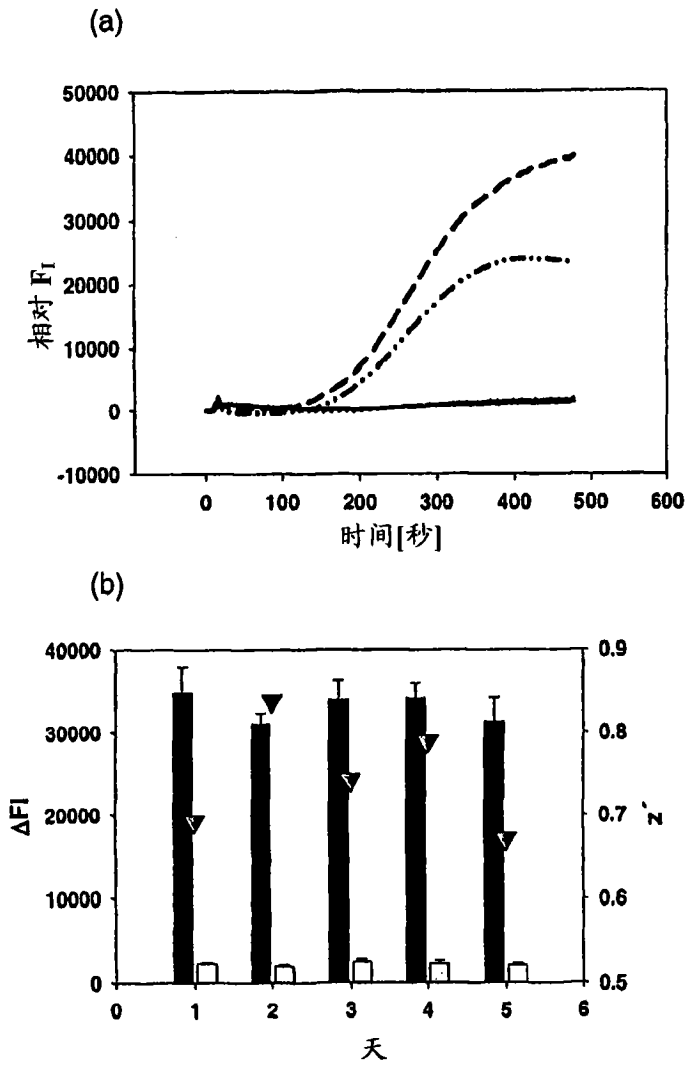

(a)
50000
40000
30000
20000
10000
0
-10000
相对 F_1
0
100
200
300
400
500
600
时间[秒]
(b)
40000
30000
20000
10000
0
ΔFI
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
N
0
1
2
3
4
5
6
天

图 13

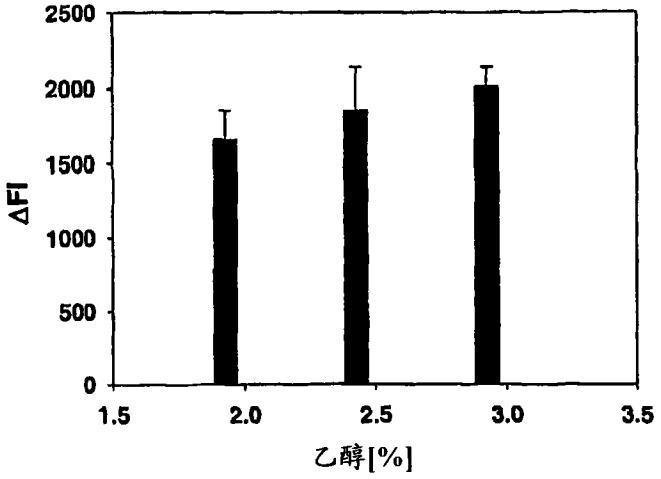
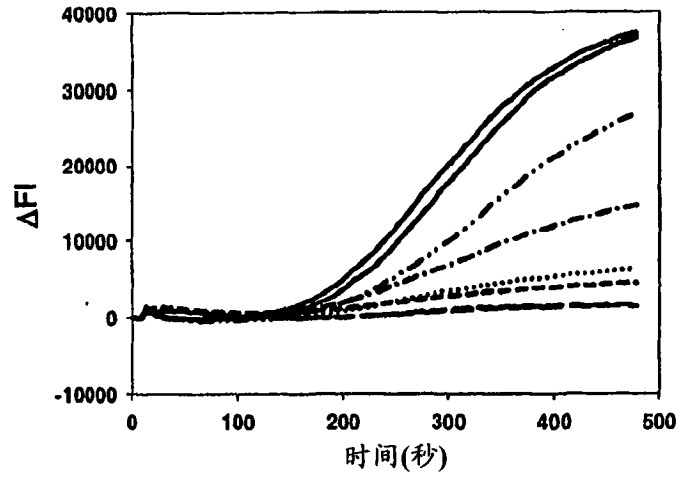

2500
2000
1500
1000
500
0
ΔFI
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
乙醇[%]

图 14

(a)


40000
30000
20000
10000
0
-10000
ΔFI
0
100
200
300
400
500
时间(秒)

(b)

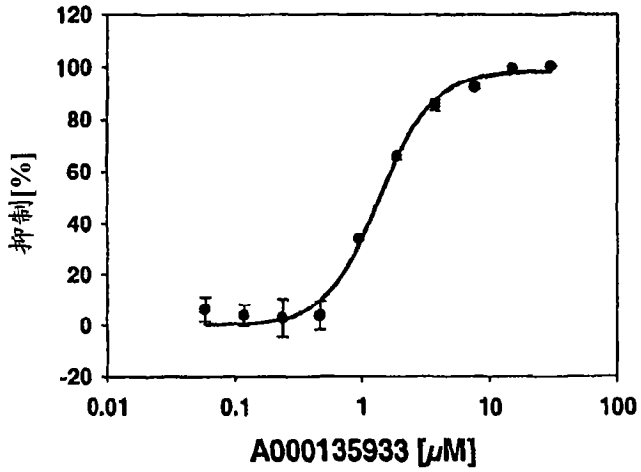

120
100
80
60
40
20
0
-20
抑制[%]
0.01
0.1
1
10
100
A000135933 [μM]

图 15

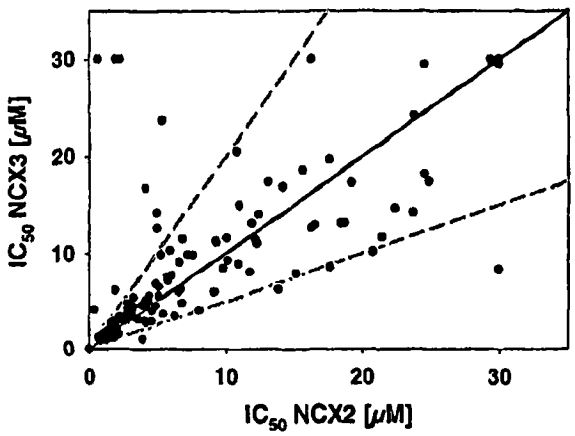

30
20
10
0
IC50 NCX3 [μM]
0
10
20
30
IC50 NCX2 [μM]

图 16

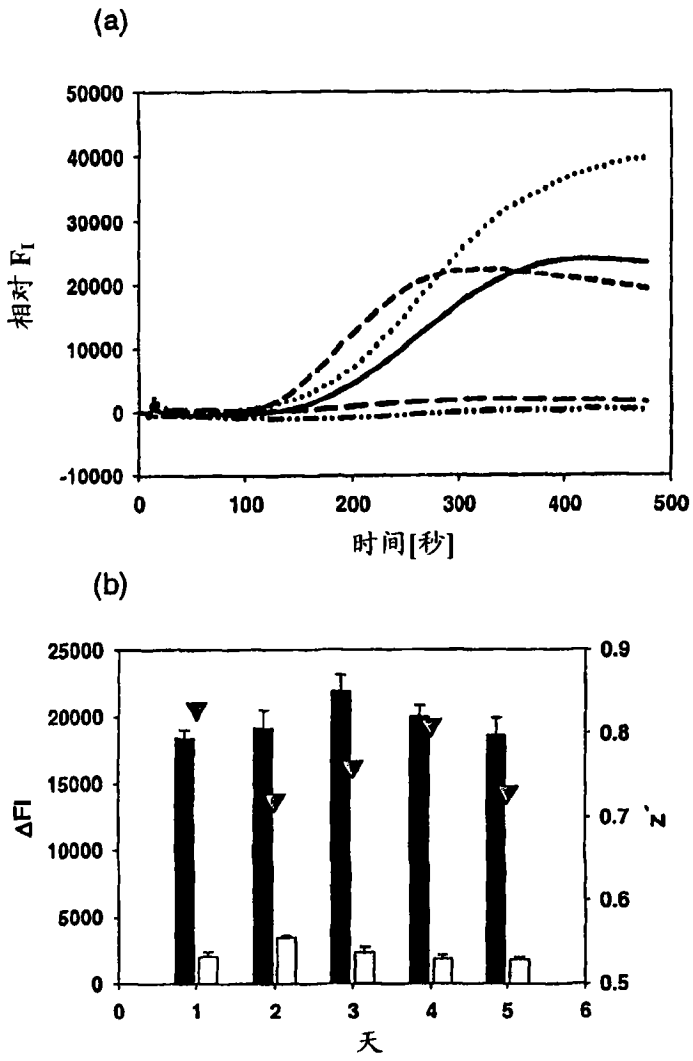

(a)
50000
40000
30000
20000
10000
0
-10000
相对 F_I
0
100
200
300
400
500
时间[秒]
(b)
25000
20000
15000
10000
5000
0
ΔFI
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
N
0
1
2
3
4
5
6
天

图 17

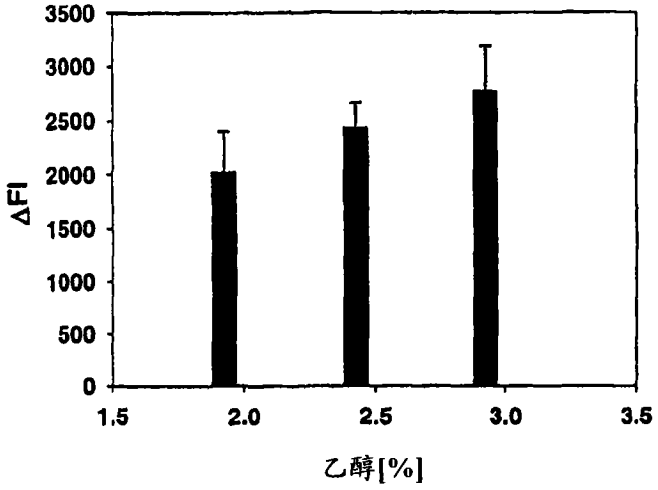

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
ΔFI
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
乙醇[%]

图 18

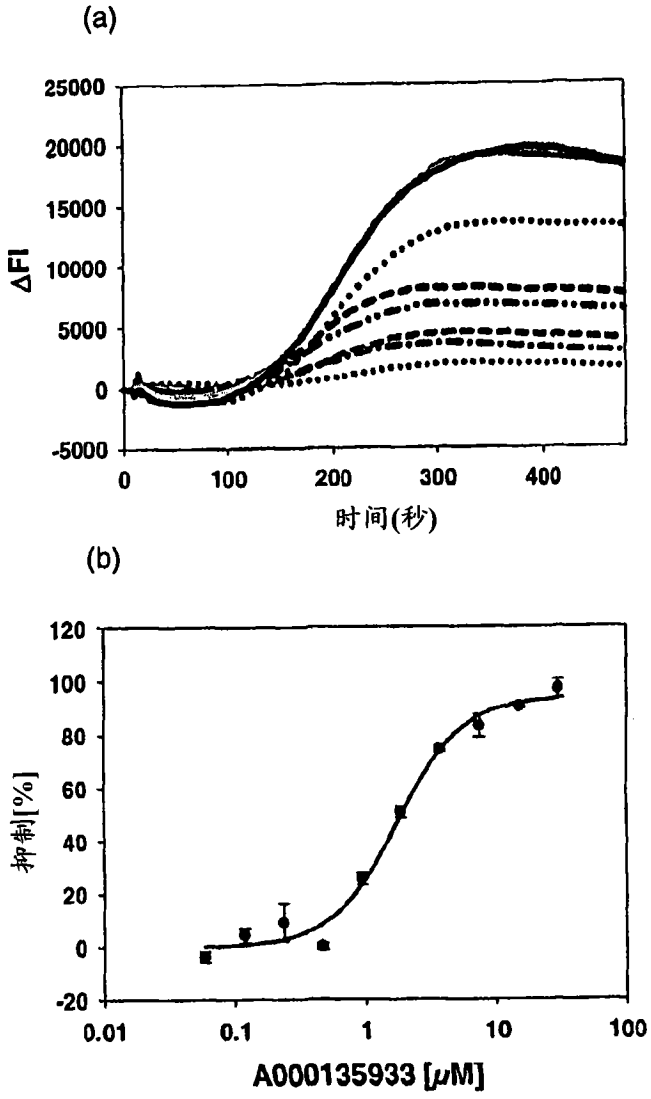

(a)
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
ΔFI
0
100
200
300
400
时间(秒)
(b)
120
100
80
60
40
20
0
-20
抑制[%]
0.01
0.1
1
10
100
A000135933 [μM]

图 19

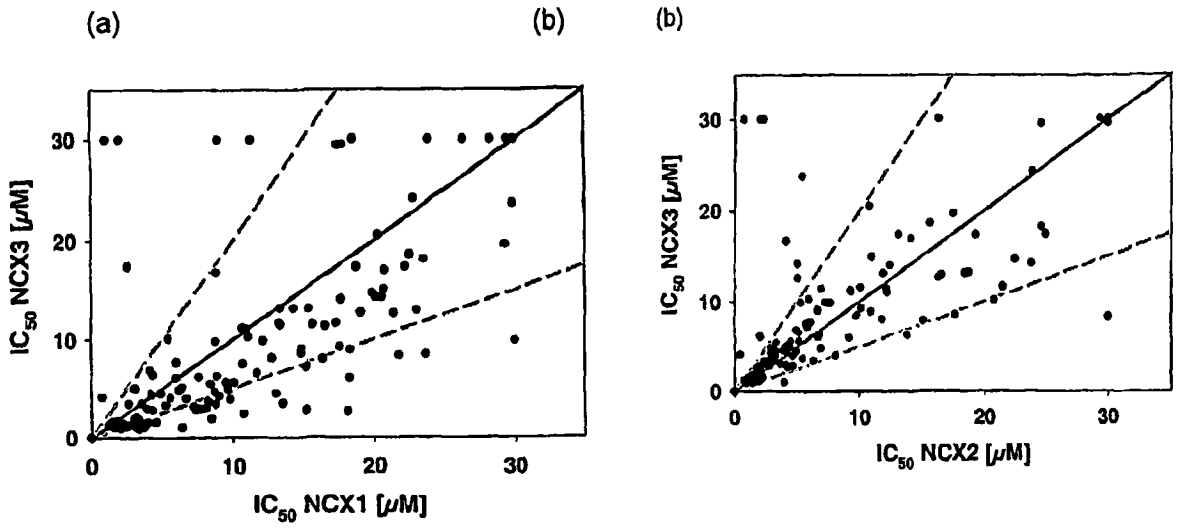


图 20