

發明專利說明書 200413722

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 92120760

※ 申請日期： 92.10.27 ※IPC 分類： G01N 33/50

壹、發明名稱：(中文/英文)

用於鑑定降低內化跨膜受體激動劑之方法

METHODS OF IDENTIFYING REDUCED INTERNALIZATION
TRANSMEMBRANE RECEPTOR AGONISTS

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商諾拉克生物科學公司

NORAK BIOSCIENCES, INC.

代表人：(中文/英文)

詹姆士 G 帕斯

PASSE, JAMES G.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國北卡羅萊那州研究三角公園市郵政信箱 14769 號

P.O. BOX 14769, RESEARCH TRIANGLE PARK, NORTH
CAROLINA 27709, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國

U.S.A.

參、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1.卡爾森 R 洛米斯

LOOMIS, CARSON R.

2.羅伯 H 歐克萊

OAKLEY, ROBERT H.

3.王向泰

WANG, SHUNTAI

4.亞倫 E 伊克哈德

ECKHARDT, ALLEN E.

住居所地址：(中文/英文)

1.美國北卡羅萊那州杜漢市東橡樹道 903 號

903 EAST OAK DRIVE, DURHAM, NORTH CAROLINA 27705,
U.S.A.

2.美國北卡羅萊那州杜漢市布拉登道 703 號

703 BRADEN DRIVE, DURHAM, NORTH CAROLINA 27713,
U.S.A.

3.美國北卡羅萊那州教堂丘市溫赫佛廣場 109 號

109 WINDHOVER PLACE, CHAPEL HILL, NORTH
CAROLINA 27514, U.S.A.

4.美國北卡羅萊那州杜漢市金寶道 908 號

908 KIMBALL DRIVE, DURHAM, NORTH CAROLINA 27705,
U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

1.2.4.美國 U.S.A.

3.中國 PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

☒ 本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

1. 美國； 2002 年 10 月 25 日； 60/421,538

2.

3.

4.

5.

☒ 主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國； 2002 年 10 月 25 日； 60/421,538

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本案揭示用於鑑定降低內化跨膜受體激動劑之方法。

【先前技術】

跨膜受體(TMRs)為跨膜的蛋白質，且具有可與配體交互作用或結合之能力，配體可以是一種激素、小分子、脂質、核酸或肽。G蛋白質-偶合的受體(GPCRs)為細胞表面之跨膜蛋白質，其可將激素或配體結合轉譯成細胞內訊號，如大多數之TMRs。TMRs或GPCRs，見於所有動物，昆蟲及植物。TMR或GPCR之傳訊在調控各種生理功能上扮演重要角色，包括光轉導作用，嗅覺，神經傳送，血管張力，心輸出，消化，疼痛及流體及電解質之平衡。GPCRs，雖然涉及於各種生理功能中，共有許多共同的結構特色。其含有七個膜功能部位。由交替的細胞內及細胞外環帶所橋接，及一個細胞內可變長度之羧基末端尾部。

GPCRs及其他跨膜受體已知涉及許多疾病狀況，包括下列但不限於：心臟適應症如心痛，基礎型高血壓，心肌梗塞，心室上及心室心律不整，充血性心衰竭，動脈粥樣硬化，腎衰竭，糖尿病，吸收適應症如氣喘，慢性支氣管炎，支氣管痙攣，氣腫，呼吸道阻塞，上呼吸道適應症如鼻炎，季節性過敏，發炎性疾病，因反映受傷之發炎，類風濕性關節炎，慢性發炎性腸疾，青光眼，胃泌素過多症，胃腸適應症如酸/胃泌素失調症，腐蝕性食道炎，胃腸分泌過度，肥大細胞病，胃腸迴流，胃潰瘍，Zollinger-Ellison徵

候群，疼痛，肥胖，神經性貪食，抑鬱，強迫行為-強迫觀念失調症，器官畸形(如心臟畸形)，神經退化性疾病，如巴金森氏病及阿滋海默氏病，多發性硬化，EB感染及癌症。

為TMRs所控制之生理反應幅度，與TMR傳訊及訊號終止間之平衡有關。GPCRs及其他某些TMRs之傳訊由稱之為遏止蛋白(arrestins)之一族細胞內蛋白質所控制。GPCRs為跨膜受體之實例，其可結合遏止蛋白活化傳訊，及其他。遏止蛋白結合經活化之GPCRs，包括已被激動劑所活化者，及基本上已被G蛋白質-偶合之受體激酶(GRKs)所磷酸化者。

受體，包括GPCRs，歷史性地已是藥物發現及治療作用物之標的，因為其可以高度特異性結合配體、激素及藥物。目前所使用之治療性藥物中約有50%可對準GPCRs或與之直接交互作用。如見，Jurgen Drews, (2000)" Drug Discovery: A Historical Perspective," Science 287: 1960-1964。

TMRs，其中GPCRs僅是一實例，可用於此中所述之方法中。

TMRs及傳訊

TMRs，或GPCRs，可活化細胞內之傳訊。GPCRs可補充及調控細胞內異三元G蛋白質之活性。經活化之受體在與G蛋白質 α -亞單位結合下通常可誘生構型的變化，造成GDP之釋出繼而與GTP結合。接下來， α -亞單位之GTP-結合型式再自受體及自穩定的 $\beta\gamma$ -二體中解離。GTP-結合之 α -亞單位及釋出之 $\beta\gamma$ -二體二者均可調控許多細胞傳訊路徑。這些

包括腺苷酸環化酶之刺激或抑制，及磷脂酶之活化，以及鉀及鈣道活性之調控。GPCRs同時也無法經由異三元之G蛋白質單獨地作用。

跨膜受體(TMRs)及內化作用

內化之TMRs，或GPCRs，並不反映激動劑或配體。在激動劑或配體曝露後，內化作用之最初步驟是產生TMR或GPCR傳訊能力之減弱，其可能涉及GPCR與其關聯異三元G-蛋白質之解偶聯。調介激動劑-特異性內化作用最初步驟之細胞機制是一種二步驟過程，其中為激動劑-占據之受體為激酶所磷酸化，如GPCR激酶(GRK)，再結合至遏止素蛋白質。TMRs，其中GPCRs僅是一實例，可與遏止素蛋白質結合，再被內化。III型TGF- β 受體是TMR的一個實例，和GPCR不同的其可結合遏止蛋白並進行接續之內化及傳訊下降調控(Chen et al., 2003, Science 301:1394-1397)。

已知，在激動劑與GPCRs結合後，G-蛋白質偶聯之受體激酶(GRKs)可將GPCRs之細胞內功能部位磷酸化。於磷酸化後，遏止素蛋白質結合GRK-磷酸化受體，並自其關聯的G蛋白質中解偶聯受體。遏止蛋白與磷酸化GPCR之交互作用可終止GPCR傳訊，啟動內化作用，並產生非傳訊之受體。

遏止蛋白與GPCR結合可將GPCR對準至塗佈有籠形蛋白(clathrin)之凹窪或其他攝粒機制上(即內化作用)，其係作用如同接合體蛋白質(或稱適配蛋白 adaptor protein)，並將GPCR與攝粒機制之組份結合，例如適配蛋白-2(AP-2)及籠形蛋白。內化之GPCRs被去磷酸化，或再循環回細胞表面

或留在細胞內。並被降解。遏止蛋白與GPCR交互作用之穩定性，是指令GPCR去磷酸化及再循環之速率的一個因素。在內化過程中GPCR磷酸化及去磷酸化之涉入，示範於U.S.S.N. 09/933,844，公告於2001年11月5日，其揭示已以全文列為本案參考。

此中需有可鑑定可活化TMR傳訊或GPCR傳訊，但TMR內化減少之化合物之方法。此化合物有增加之傳訊但減低訊號之終止。

【發明內容】

本發明是有關用於鑑定可活化TMR傳訊但降低TMR內化之化合物之方法。考量TMR或GPCR活性調控在藥物發現及疾病治療上之重要性，用於鑑定這些化合物之方法可滿足極大需求。

此揭示是有關用於鑑定可活化TMR傳訊但降低TMR內化之化合物之方法。

【實施方式】

依據本發明，可應用精藝者已知之傳統分子生物學，微生物學，免疫學及重組DNA技術。此類技術在文獻中有完整解釋。如見 Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J.

Gait ed. 1984)" Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (2000)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984); Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1, Harlow, Ed and Lane. David (Cold Spring Harbor Press, 1988); Using Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow, Ed and Lane, David (Cold Spring Harbor Press, 1999)。

除非另有所示，以下在本說明書及申請專利範圍中所使用之術語具下示之意義：

"DNA分子"指去氧核糖核苷酸(腺嘌呤、鳥糞嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶)之聚合型式，呈其單股型或雙股螺旋型。此術語僅指分子之一及二級結構，且不限於任何特殊之三級型式。因此，此術語包括雙股DNA，尤其見於線型DNA分子中(如限制片段)，病毒，質體及染色體。在討論特殊雙股DNA分子結構中，所述之序列可依據正常的慣例，僅示出5'至3'方向之序列，加上DNA之未轉錄股(即此股具有與mRNA同質之序列)。

"遏止蛋白(arrestin)"表示遏止蛋白自然發生及經遺傳操作版本之所有型式，但不限於一般遏止蛋白(有時稱為遏止蛋白1)，圓錐遏止蛋白(有時稱遏止蛋白-4)， β -遏止蛋白1(有時稱遏止蛋白2)及 β -遏止蛋白2(有時稱遏止蛋白3)。也包括

經修飾之遏止蛋白，如可與 TMRs 或 GPCRs 原構地結合之遏止蛋白。

" β AR" 是稱為 β -腎上腺素能受體之 GPCR。

"羧基-末端尾" 表示 GPCR 之羧基末端，之後是膜徑距 7。許多 GPCRs 之羧基末端尾在保留性 NPXXY 基序後即開始，其標出第七個跨膜功能部位之末端(即在 NPXXY 基序後的是 GPCR 之羧基末端尾)。羧基末端尾可相當長(約數十至數百個胺基酸)，相當短(約數十個胺基酸)或實質上不存在(少於十個胺基酸)。如此中所用的"羧基末端尾"應表示所有三種變型(不論是相當長，相當短或實質上不存在)，且可或可不含有棕櫚醯化之半胱胺酸殘基。

"A 類受體" 較好不會與遏止蛋白一起轉位至胞吞囊或內囊胞，而與 HEK-293 細胞中之遏止蛋白-GFP 聯合。

" β 類受體" 較好可與遏止蛋白一起轉位至胞吞囊或內囊胞，而與 HEK-293 細胞中之遏止蛋白-GFP 聯合。

"可測及分子" 或 "標幟" 或 "標記" 表示可以分光法，光化學，生化，免疫化學，電流，放射活性及光學方法偵測之任何分子，包括螢光、磷光及生物發光及放射活性衰變，但不限於此。可測及之分子包括 GFP、蟲螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、若丹明-共軛之抗體等，但不限於此。可測及之分子包括放射性同位素、表位標幟、親和力標記、酵素、螢光基團、化學發光基團等，但不限於此。可測及分子包括由於其與其他分子交互作用之功能，而可直接或間接測及之分子。可測及光子可用於偵測用他法難以測知之細胞分

子。例如，若予以可測及地標記，遏止蛋白或GPCR均可被容易地測及。可偵測標記可用來決定所標記分子之所在。例如，可測及地標記之遏止蛋白或GPCR，可助於決定分子或相關分子，在漿膜、凹窪、胞液、胞吞囊或內囊胞等處之所在。

"GFP"表示綠螢光之蛋白質，其指GFP各種自然生成型式，其可分離自自然來源或經遺傳操作，以及人工修飾之GFPs。GFPs係技藝中熟知的。如見U.S. Pat. Nos. 5,625,048；5,777,079；及6,066,476。技藝中已熟知，GFP易與其他螢光蛋白質交替，分離自自然來源或經遺傳操作，包括下列但不限於此：黃色螢光蛋白質(YFP)、紅色螢光蛋白質(RFP)、青色螢光蛋白質(CFP)、藍色螢光蛋白質、螢光素、UV可激發螢光蛋白或在之間任何波長。如此中所用之"GFP"應表示技藝中已知之所有螢光蛋白質。

"未知或孤兒受體(Orphan Receptor)"表示TMR或GPCR，其功能及/或配體是未知的。

也可引入胺基酸置換，以將特佳特性之胺基酸替換。如，可將Cys引入一個可能位置，使其與另一個Cys形成雙硫鍵橋。His可以特別"催化性"殘基般引入(即His可作用如酸或鹼，且是生化催化作用中最普遍之胺基酸)。Pro之引入因其有特殊之平面結構，其可在蛋白質結構中引入 β -轉。

當胺基酸殘基有至少約70%(較好至少約80%，且最好至少約90或95%)是相同之時，二胺基酸序列係"實質上同質的"，或代表固有的取代。

"拮抗劑"包括可干擾野生型及/或經修飾TMR或GPCR，結合至激動劑，野生型及/或經修飾TMR或GPCR，內化作用，野生型及/或經修飾TMR或GPCR，結合遏止蛋白，野生型及/或經修飾TMR或GPCR，內囊胞定位，內化等之所有作用物，包括可影響野生型及/或經修飾TMRs，包括GPCRs，之作用物，以及可影響涉及於野生型及/或經修飾TMR或GPCR傳訊、內化、內囊胞定位等之其他蛋白質之作用物。

"經修飾之GPCR"或"經修飾之TMR"表示在胺基酸序列上有一或多個修飾之GPCR或TMR。如此，GPCR或TMR可全部或部份地修飾。這些在胺基酸序列上之修飾包括一或多個胺基酸之突變、嵌入、刪除及置換，其中一或多個胺基酸被刪除且一或多個胺基酸被加入以取代所刪除之胺基酸。此經修飾之GPCRs如此中所述，以及如U.S.S.N. 09/993,844及U.S.S.N. 10/054,616所述，二者已全文列為本案參考。

"GPCR"表示G蛋白質-偶合之受體，且包括GPCRs自然生成者，以及GPCRs經修飾者。

"TMR"表示跨膜蛋白質，且包括TMRs自然生成者以及經修飾者。GPCRs為TMRs之一實例。

"內化之TMR"表示TMR已進行內化作用。內化之TMR可位在內化路徑之任一點上。其目前無能力與激動劑結合及活化傳統之傳訊。TMR可為一種GPCR。傳訊可以是G蛋白質傳訊。

"內化路徑"表示內化過程之任何細胞組份，以及涉及於

內化過程及接續過程中之任何細胞結構，包括如遏止蛋白、GRKs、GPCRs、AP-2蛋白質、籠形蛋白、蛋白質磷酸酯酶等，但不限於此。在分析本發明之方法中，多肽可在如胞質、細胞膜、被覆有籠形蛋白之凹窪、胞吞囊、內囊胞，其間任何階段等處被測及。

"TMR傳訊"表示TMR誘使之傳訊活化。此可造成如cAMP之產製。TMR可為GPCR。傳訊可為G蛋白質傳訊。

"G蛋白質-偶合之受體激酶"(GRK)包括有能力磷醯化GPCR的任何激酶。包括剪接變型、具生物活性之片段、經修飾之GRKs及來自動物及其他有機體之GRKs。

"人類TMR"表示在人類中自然生成之TMR。TMR可為GPCR。

"自然生成之TMR"表示存在於大自然之TMR。TMR可為GPCR。

"有味配體"表示配體化合物一旦與受體結合可生成氣味之感知，包括合成化合物及/或重組產生之化合物，包括激動劑及拮抗劑化合物。

"有味受體"表示通常見於嗅覺神經元表面之受體蛋白質，其當活化(通常經由與有味配體之結合)可造成氣味之感知。

"調控"表示蛋白質表現之至少上升-調節或下降-調節，或蛋白質活性上之增加或減少。蛋白質之調控包括蛋白質或調節蛋白質之化合物之上升調節、下降調節及活性之增加或減少。調控也包括基因、mRNA之調節，或重點蛋白質合

成之其他任一步驟之調節。

"超表現的"蛋白質指蛋白質表現之水平高於野生型表現水平。

"經修飾之GRK"表示在GRK C-末端胺基酸序列中有一或多個修飾之GRK。經修飾之GRK原構地位在漿膜處。較好，GRK因加入CAAX基序而修飾。

"CAAX"基序表示四個胺基酸之序列，其中C是半胱胺酸；A是脂族胺基酸；且X是蛋白質之C-末端胺基酸。

"原構的"活性表示於激動劑不存在下發生之活性。例如，經修飾的GRK原構地位在漿膜表示經修飾的GRK於激動劑不存在下位於漿膜。

"降低內化"表示TMR或GPCR，內化已降低或延緩係與TMR，或GPCR為對照化合物所內化活化的比較而言。對照化合物可為TMR天然的激動劑或天然配體，但也可為充作對照之其他任一者。降低的內化可由許多因素明示。例如，可由受體內化之Max減低來證明降低的內化，係與為天然激動劑或天然的TMR配體所刺激之內化比較而言。在另一實例中，可由TMR內化之 EC_{50} 增加來證明降低的內化，係與為天然激動劑或天然的TMR配體所刺激之內化比較而言。在進一步實例中，若活化內化所需之化合物量較活化內化所需之天然激動劑或天然配體之量還大，則內化可降低。又在另一實例中，若為了活化內化，曝於化合物所需之TMR時間長度大於曝於天然激動劑或天然配體所需之TMR時間時，則內化可降低。

EC₅₀代表化合物有效濃度中值；是產生最大所述作用所需之最小濃度。

"所述作用"表示受注目之作用。所述作用，如可為傳訊之活化，傳訊之抑制，傳訊之量、內化之活化、內化之抑制、內化之量，或配體之結合。

"Max"代表最大所述作用。Max可由經驗決定或外插而來。Bmax及Vmax均為Max之實例。例如，Max可以是劃在反應曲線上之最大反應。例如，在測度傳訊時，cAMP產製可就受試化合物不同濃度而劃圖，以產生劑量反應曲線；Max代表在劑量反應曲線上之最大cAMP產製。至於另一實例，在轉位之測度中，轉位可就受試化合物不同濃度劃圖，以產生劑量反應曲線；Max代表在劑量反應曲線上之最大轉位。

"對照組"化合物是與受試化合物比較之化合物。較好，在本發明之對照化合物可活化並內化TMR或GPCR。較好，對照化合物可為TMR或GPCR之激動劑或配體。

"劑量反應曲線"代表於不同濃度化合物存在下所述之作用。在本發明之劑量反應曲線中，所述之作用較好是TMR或GPCR之傳訊或內化作用。

"TMR轉位之偵測"表示偵測細胞中TMR之定位。TMR可為GPCR。較好，TMR或GPCR，可由具象化TMR，遏止蛋白，GRK或另一分子而測及。欲偵測之分子可被可測及地標記。可偵測標記分子之實例如此中所述，較好分子是位在細胞膜，在凹窪，內囊胞，胞吞囊，及/或在胞液中。偵

測轉位之方法包括：Transfluor、BRET、FRET、偏振顯微鏡、漸逝波激發顯微鏡及標準或共軛焦顯微鏡。有用的TMRs、GPCRs、方法及偵測方法如此中所述，於U.S.S.N. 08/869,568(目前公告於U.S. Pat. No. 5,891,646)，09/233,530(目前公告於U.S. Pat. No. 6,110,693)，09/469,554(目前公告於U.S. Pat. No. 6,528,271)，10/054,616，09/993,884，10/095,620，10/101,235，09/631,468，10/141,725，10/161,916，09/772,644，10/336,276，60/421,538，60/442,403，60/470,325，60/401,698，60/275,339，60/263,406，60/245,772，60/260,363，60/295,945，60/393,789及60/379,986，及PCT案PCT/U.S. 03/20838及PCT/U.S. 03/14581，已列為此中參考。

"定量決定之"內化可包括偵測TMR或GPCR內化量之任何分析方法，包括如偵測立體像素強度，螢光量， EC_{50} ，Max，劑量反應曲線或精藝者已知之用於比較的其他任何定量分析。定量決定內化之實例述於此。各種偵測法，包括此中所述但不限於此，均可用於定量決定內化作用。

"TMRA"表示跨膜受體(TMR)激動劑，其可活化TMR傳訊，同時較對照化合物可呈現降低之TMR活化。若在受試化合物存在下TMR之內化較在對照化合物存在下TMR之內在還降低，則可謂內化降低。若在受試化合物存在下TMR之傳訊與激動劑不存在下比較是活化的，則謂傳訊被活化。

此中需有可用於鑑定可活化TMR或GPCR傳訊同時降低TMR或GPCR內化之化合物之方法。此化合物在反映特定劑

量之化合物下可增加傳訊，減少訊號之終止，及維持住特定TMR或GPCR對特定劑量化合物之反應性。

本發明是有關篩選TMRA之方法。也包括決定化合物是否可活化傳訊但有改變之內化特性之方法。

基於各樣理由TMRAs是有用的。雖然可活化傳訊同時活化內化路徑之化合物是已知的，這些中有許多並無欲求之特性，包括某些副作用。TMRs內化增加可造成在膜或細胞表面可供運用之受體較少，較無法與激動劑交互作用，此可能超過重複劑量。TMRs內化降低可造成在膜或細胞表面有更多可供運用之受體，以致可與激動劑或TMRA交互作用。此降低之內化可減少活化傳訊所必需之TMRA或激動劑之量及/或頻率。鑑定TMRAs之方法是必要的。鑑定這些化合物之方法在治療各種疾病上是有用的。

本發明利用內化之定量偵測。內化之定量偵測在鑑定此中所述之降低內化之激動劑方法中是必要的。

定量TMR傳訊之方法

TMR或GPCR傳訊，可利用許多TMR或GPCR傳訊之指示劑中任一者來定量。這些包括定量許多傳訊路徑，GPCR二聚化作用，中任一成員之活性。如此中所用的"傳訊路徑"指一旦配體與TMR或GPCR結合下，細胞功能/活性之調控(如刺激或抑制)。此功能實例包括移動參與於訊號轉導路徑之細胞內分子，如磷脂醯基肌醇4,5-雙磷酸酯，肌醇1,4,5-三磷酸酯及腺苷酸環化酶；漿膜之極化作用；分子之產製或分泌；細胞組份結構上之變化；細胞增殖，如DNA之合

成；細胞移動；細胞分化；及細胞存活。

欲偵測之特殊路徑可依所注目之特異TMR或GPCR而定。定量傳訊路徑成員活性的許多方法是精藝者已知的。

當針對化合物生物活性篩選時，細胞內二次傳訊之產生可直接地測定。各樣的細胞內效應物已被鑑知為G-蛋白質-調控的，包括cAMP、環狀GMP、鈣、脂質、磷脂醯基肌醇、氫離子、離子運送分子等。此外，G蛋白質可與各種離子道交互作用，且可抑制某些對電壓-敏感之 Ca^{++} 瞬時子，以及刺激心臟 K^{+} 道。另外，也可偵測酵素，如腺甘醯環化酶，磷酸二酯酶，磷酸脂酶C，蛋白質激酶，磷酸脂酶 A_2 等。

在一個具體實例中，G蛋白質之GTPase酵素活性可在漿膜上偵測，即利用技藝中已知技術決定 $\gamma^{32}\text{P}$ GTP之瓦解（如，見Signal Transduction: A Practical Approach. G. Milligan, Ed. Oxford University Press, Oxford England）。當測試可調控cAMP之受體時，可使用cAMP測度之標準技術，如在未標記cAMP存在下定量 $[\text{}^3\text{H}]\text{cAMP}$ 之競爭分析法。

"環狀AMP轉換及代謝"，可偵測涉及於環狀AMP(cAMP)轉換及代謝之分子，以及這些分子之活性。環狀AMP是反映某些TMRs或G蛋白質偶合受體之配體-誘生之刺激而產生之二次信使。在cAMP傳訊路徑中，配體與TMR或GPCR之結合可造成酵素核苷酸環化酶之活化，其再催化cAMP之合成。新合成之cAMP再活化與cAMP-有關之蛋白質激酶。此活化之激酶再磷醯化有電壓-管制之鉀道蛋白質，或與之結合之蛋白質，並導致在作用電勢下鉀道無法打開。鉀道

無法打開使鉀之向外流動減少，此通常會再極化神經元之膜，造成延長之膜去極化。

某些受體可刺激磷酸脂酶C之活性，其刺激磷脂醯基肌醇4,5-雙磷酸酯瓦解成1,4,5-IP₃(其使細胞內之Ca⁺⁺移動)及二乙醯基甘醇(DAG)(其活化蛋白質激酶C)。肌醇脂可利用標準的脂質萃取技術萃取及分析。DAG也可利用薄層層析偵測。利用放射標記技術或HPLC也可定量所有三種肌醇脂質(IP₁、IP₂、IP₃)之水溶性衍生物。

"磷脂醯基肌醇轉化及代謝"，也可測出涉及於磷脂醯基肌醇4,5-雙磷酸酯(PIP₂)轉換及代謝之分子，以及這些分子之活性。PIP₂是見於漿膜胞液小葉中之磷脂。配體與受體結合，在某些細胞中，可活化漿膜酵素磷脂酶C，其再將PIP₂水解產生1,2-二乙醯基甘醇(DAG)及肌醇1,4,5-三磷酸酯(IP₃)。一旦形成，IP₃可擴散至內質網表面，在此與IP₃受體結合，如含有IP₃結合位置之鈣道蛋白質。IP₃結合誘使道打開，令鈣離子釋出至胞漿內。IP₃也可為特殊激酶所磷醯化，形成肌醇1,3,4,5-四磷酸酯(IP₄)，一種使鈣可自細胞外介質中進入胞漿之分子。IP₃及IP₄再快速地分別水解成無活性產物，肌醇1,4-雙磷酸酯(IP₂)及肌醇1,3,4-三磷酸酯。這些無活性產物再循環回細胞以合成PIP₂。另外由PIP₂水解產生之二次信使，即1,2-二醯基甘油(DAG)，仍留在細胞膜中，於此用於活化酵素蛋白質激酶C。蛋白質激酶C常見可溶於細胞之胞質內，但一旦細胞內鈣濃度增加時，酵素可移至其可為DAG活化之漿膜處。蛋白質激酶C在不同細胞中之活化作用

可造成各種細胞反應，如肝醣合成酶，或各種轉錄因子之磷酸化作用，如NF- κ B。"磷脂酰肌醇活性"如此中所用指PIP₂或其代謝物之一之活性。

細胞內鈣之移動或鈣自細胞外之流入可利用標準技術測定。適合的鈣指示劑，螢光，生物發光，金屬發色或對Ca⁺⁺-敏感的微電極之選用，依研究之細胞型式及事件之幅度及時間常數而定(Borle (1990) Environ Health Perspect 84: 45-56)。至於Ca⁺⁺偵測之示範方法，細胞可填以對Ca⁺⁺敏感的螢光染料fura-2或indo-1，利用標準方法，及利用螢光計測度Ca⁺⁺任何變化。

另一示範之高輸出鈣分析，涉及告知者基因之誘導，其操作性連結至對鈣有反應之啟動子。在此方法中，因TMR或GPCR活化造成之鈣流可啟動啟動子，其再驅動告知者基因之表現，基因可編碼具酵素活性之蛋白質，其可被容易地測及，較好利用比色或螢光分析法。常用的告知者蛋白質包括： β -半乳糖苷酶， β -內酯胺酶，氯黴素乙酯轉移酶(CAT)，蟲螢光素酶，綠螢光蛋白質(GFP)及其衍生物。告知者蛋白質也可連接至其他蛋白質，而其表現係與TMRs或GPCRs之刺激有關。一個說明實例是融合蛋白質，其中蟲螢光素酶序列與經活化之T細胞核因子之開放讀譯架構在架構上(NFAT)。由於NFAT之轉錄需鈣及作用在TMRs或GPCRs下游之蛋白質激酶C傳訊路徑之共活化作用，異三元G蛋白質與受體之有效偶合可由分析NFAT-調介之蟲螢光素酶活性而測知。此系統可用來證明有葯毒鹼m3受體及嵌

合的 α_q 突變子i5q共表現細胞中，碳醯膽鹼相關之蟲螢光素酶反應(Boss et al., J. Biol. Chem., 271:10429-10482, 1996)。在實行本方法中，較佳的宿主細胞是源自淋巴或神經元者，如Jurkat細胞及嗜鉻細胞瘤PC12細胞。然而，宿主細胞之選用並不限於此二型式，如NFAT及NFAT同型係存在於包括內皮細胞及骨髓樣細胞(id)之各樣細胞中。

本發明以告知者基因為基礎之分析法，可測出上述事件聯級之末端階段，如轉錄調控作用。因此，在實行本分析法的一個具體實例中，告知者基因構體嵌入試劑細胞中，以產生和告知者傳訊有關之偵測訊號。典型而言，告知者基因構體包括一個告知者，操作連結以一或多個轉錄調控元件，其可反應標的受體之訊號轉導活性，其中告知者基因之表現水平可提供與受體-有關之偵測訊號。由告知者基因轉錄之量，可利用精藝者已知之任何適合方法測度。例如，可利用南方吸漬法偵測特異的mRNA表現，或特異的蛋白質產物可以具特色之染色或內部活性鑑定之。

同時，磷脂酶A2之活化作用可利用已知技術容易地定量，包括如在細胞中產生花生四烯酸酯。

在某些受體例子中，希望可篩選細胞磷醯化中之變化。此分析型式於重點受體是受體酪胺酸激酶時有用。例如，為FGF受體及可與FGF受體結合之配體所轉形之酵母，可利用集落免疫吸漬法篩選(Lyons and Nelson (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 81:7426-7430)，其中利用抗-磷脂醯酪胺酸。當受體本身非酪胺酸激酶時針對磷醯化作用之試驗是

有用的，其活化作用在訊號轉導路徑下游之蛋白質激酶。另外，可注意到，蛋白質磷醯化作用在擴大受體產生之訊號之聯級上也扮演關鍵性角色。多重激酶聯級不僅可擴大訊號，同時訊號分歧至多重效應物，其常是細胞-型式特異的，令生長因子可刺激專一細胞之有絲分裂及另一者之分化。

此種聯級之一是MAP激酶路徑，其似乎可調介不同細胞型式中之促有絲分裂，分化及壓力反應。生長因子受體之刺激造成Ras活化，繼之c-Raf、MEK及p44及p42 MAP激酶(ERK1及ERK2)之相繼活化。被活化之MAP激酶再磷醯化許多關鍵性調控蛋白質，包括p90 RSK及Elk-1，其當MAP激酶轉位至核時被磷醯化。同質之路徑存在於哺乳動物及酵母細胞中。如，釀酒酵母(*S. cerevisiae*)外激素傳訊路徑的基本部份是由包括STE11，STE7及FUS3/KSS1意識股(後一對是不同的且功能上豐富的)產物組成之蛋白質激酶聯級。因此，可測及此激酶聯級成員之磷醯化作用及/或活化作用，並用以定量受體之義務。用於偵測酪胺酸磷醯化作用增加之磷酸酪胺酸-特異性抗體及磷酸-特異性抗體均已商品化(New England Biolabs, Beverly, Mass)。

由受體蛋白質調介之反應依細胞型式而定。例如，在某些細胞中，配體與受體蛋白質之結合可刺激活性，如化合物之釋放，管道之開口，細胞黏附，移動，分化等，其中經由磷脂酰肌醇或環狀AMP之代謝及轉換，而在其他細胞中，配體之結合則會產生不同的結果。姑且不論受體蛋白

質所調介之細胞活性/反應，普遍知道蛋白質是一種TMR或GPCR，且可與G蛋白質交互作用產生一或多個二次訊號，於細胞中各種細胞內訊號轉導路徑中，如經由磷脂鹽肌醇或環狀AMP代謝及轉換。

傳訊分析法可使用光譜-編碼分析珠粒系統。決定TMR或GPCR活化之方法不只一種：如其可依序或平行地被偵測。

存在有不同的受體-調介之訊號轉導測法，且精藝者應確認可用於替換所列之示範方法之適合方式。

內化之測定法

內化之測定法可用於本發明中。以可定量測定者為較佳方法。以可光學測定及可定量者為較佳。任何經由追蹤TMR或GPCR之所在或可與內化路徑中之TMR或GPCR交互作用之任何分子，而偵測TMR或GPCR內化之方法均可使用。實例包括Transfluor，BRET，FRET。

用於本發明的某些測法述於U.S. Pat. No. 5,891,646，U.S. Pat. No. 6,110,693，U.S.S.N. 09/631,468，U.S.S.N. 10/141,725，U.S.S.N. 10/161,916，09/469,554，U.S.S.N. 09/772,644，U.S.S.N. 09/993,844，U.S.S.N. 10/054,616，U.S.S.N. 10/095,620，U.S.S.N. 10/101,235，U.S.臨時案60/393,789，U.S.臨時案60/379,986及U.S.臨時案60/401,698，在此以全文列為本案參考。用於本發明之其他方法述於U.S.S.N. 09/759,152，U.S.S.N. 09/654,499，WO 99/66324，WO 01/46691，WO 01/46694，WO 98/00715及WO 02/46763。

可偵測標記之遏止蛋白之細胞內所在，可偵測標記之

TMR或GPCR之細胞內所在，或可偵測標記之遏止蛋白之交互作用，或TMR或GPCR其他成員/遏止蛋白與TMR或GPCR或其他任何細胞結構之複合物，如包括遏止蛋白或TMR或GPCR在細胞膜上之濃度，遏止蛋白與TMR或GPCR於核內體之共同所在，及遏止蛋白或TMR或GPCR於籠形蛋白被覆凹窪之濃度等之偵測方法，均依所使用之可偵測分子而定。

精藝者可針對適於所使用之可偵測分子建議偵測方法。於光學上可偵測之分子方面，可使用任何光學方法，其中因發射光之再分佈或再適應，可測及螢光，生物發光或磷光之變化。此方法包括如極化顯微鏡，BRET，FRET，漸逝波激發顯微鏡及標準或共軛焦顯微鏡。

在較佳具體實例中，遏止蛋白可共軛至GFP，且遏止蛋白GFP共軛物可以共軛焦顯微鏡偵測。在另一較佳具體實例中，遏止蛋白可共軛至GFP，且TMR或GPCR可共軛至免疫螢光分子，且共軛物再以共軛焦顯微鏡偵測。又在另一較佳具體實例中，遏止蛋白可共軛至GFP，且TMR或GPCR之羧基末端可共軛至蟲螢光素酶，且共軛物以生物發光共振發射技術偵測。在進一步較佳具體實例中，遏止蛋白可共軛至蟲螢光素酶，且TMR或GPCR可共軛至GFP，且共軛物再以生物發光共振發射技術偵測。又一進一步較佳具體實例中，遏止蛋白可共軛至可偵測之分子片段(或部份，功能部位及其他)，TMR或GPCR可共軛至可偵測之分子片段(或部份，功能部位及其他)，且可偵測二片段之交互作用。在進一步具體實例中，TMR或GPCR或遏止蛋白可標以可偵

測之分子，其一旦定位在某些細胞所在可予以特異地偵測。本發明方法是直接有關於偵測TMR或GPCR活性。本發明方法可即時對GPCR路徑有加強之追蹤。

在一個較佳具體實例中，決定可偵測分子之定位型式。在進一步較佳具體實例中，可決定可偵測分子定位型式之改變。定位型式可示出可偵測分子之細胞分佈。某些偵測方法述於U.S.S.N. 10/095,620，公告於2002年3月12日，其主張2001年3月13日申請之美國臨時專利申請案第60/275,339號之權利，該案之全文以引用方式併入本文中。可偵測分子之定量也述於U.S.SN 10/161,916號中。

分子可經由其與另一可偵測標記分子之交互作用而測知，如抗體。

依據本發明可使用另外的定量內化方法。

鑑定可調控TMR或GPCR傳訊及/或內化反應之化合物之方法

下述鑑定TMRA之方法。TMRA可活化TMR傳訊，同時降低TMR內化作用。方法包括提出一種包括有至少一種TMR或其生物活性片段之細胞。細胞也可包括遏止蛋白或其生物活性片段，及/或GRK或其生物活性片段。細胞之組份可予以可偵測地標記。標幟可因與另一可偵測標記分子交互作用而測及。可偵測標記分子可在漿膜、內囊胞、胞吞囊或在胞液中被測及。可偵測分子可以是放射性同位素，表位標幟，親和力標幟，酵素，螢光基團或化學發光基團。方法中可包括有提出TMR之激動劑或配體之額外步驟，再

修飾激動劑或配體。

TMR可以是一種GPCR。某些GPCRs可用於本發明中係列於圖1。GPCR可為A類受體，B類受體， μ 類鴉片， β_1 AR， β_2 AR或多巴胺受體。可用於本發明的某些配體或激動劑列於圖3中。化合物可為經修飾之天然配體或天然激動劑。化合物可為已知之藥學相關化合物，或可衍自已知之藥學相關化合物。細胞可曝於化合物下。化合物可衍自天然配體或天然激動劑。化合物可存在於化合物庫中。

傳訊可予以測定。此中描述偵測傳訊的某些方法，但其他方法也可使用。傳訊之偵測可用於不論傳訊是否被活化之定量決定當中。也可決定傳訊之劑量反應曲線。傳訊之定量可偵測細胞內效應物，其中該效應物可以是cAMP、環狀GMP、鈣、脂質、磷脂醯基肌醇、氫離子或離子運送分子。在化合物存在下之傳訊可與無化合物下之傳訊比較，以決定傳訊是否被活化。以TMRA刺激後傳訊活化之時間較以天然配體或天然激動劑所刺激後之時間還長。

內化作用也可測度。此中描述某些偵測內化之方法，但其他偵測內化之方法也可使用。內化之偵測可用於定量決定內化是否有降低。與對照化合物存在下TMRA內化比較，內化可降低。也可決定傳訊之劑量反應曲線。

TMRs之激動劑及配體可予以修飾。此處理修飾造成化合物有改變之化學及/或物理特性。經修飾之激動劑及配體可以本發明方法分析，以鑑定TMRA。經修飾之激動劑及配體可用來產生一整列化合物。此化合物列可用於此中所述之

方法中，以鑑定出TMRA。

在此中所述方法中，細胞中之TMR或GPCR可以是人類TMR或GPCR，大鼠TMR或GPCR，老鼠TMR或GPCR，豬TMR或GPCR，靈長類TMR或GPCR，或來自任何種屬之TMR或GPCR。對某些TMR或GPCRs而言，來自特殊種屬之TMR或GPCR，在本發明方法中係較佳者。本發明方法可重複；重複方法中可使用含有來自較第一方法細胞不同種屬之TMRs或GPCRs之細胞。受試化合物所具有之TMRA特性，使方法中所使用之細胞包括有來自特殊種類之TMRs或GPCRs。相同受試化合物可以是其TMRs或GPCRs為特定種屬之TMRA，但也可以或可非其相同之TMR或GPCR為不同種屬之TMRA。重複方法可用於決定可應用於方法中之較佳TMR或GPCR種屬，方法中使用含該TMR或GPCR之細胞。

用於蛋白質表現之載體及核酸，宿主細胞

如技藝中所熟知的，DNA序列之表現可將之操作連結至適當表現載體中之表現控制序列，並應用該表現載體來轉形適合的單細胞宿主。轉形DNA可以或可不整合(共價連結)至染色體DNA而組成細胞之基因體。

本發明DNA序列此種操作連結至表現控制序列，假若並非DNA序列之部份，則在DNA序列正確讀譯架構上游當然包括啟動密碼子-ATG。

在表現此中所述之DNA序列時，可應用各種的宿主/表現載體組合。有用的表現載體可由染色體、非染色體及合成的DNA序列片段組成。適合的載體包括SV40衍生物及已知

之細菌質體，如 *E. coli* 質體 col E1，pCR1，pBR322，pMB9 及其衍生物，質體如 RP4；噬菌體 DNAs，如噬菌體 λ 的許多衍生物，如 NM989，及其他噬菌體 DNA，如 M13 及絲狀單股噬菌體 DNA；酵母質體，如 2 μ 質體或其衍生物；可用於真核細胞之載體，如可用於昆蟲或哺乳動物細胞之載體；由質體及噬菌體 DNAs 組合衍生之載體，如質體經修飾可用於噬菌體 DNA 或其他表現控制序列；及其他。

各樣的表現控制序列任一者-可控制與之操作連結之 DNA 序列之表現之序列-可用於這些載體內以表現本發明的 DNA 序列。此有用的表現控制序列包括如，SV40 之早或晚啟動子，CMV，牛痘苗，多瘤病毒或腺病毒，lac 系統，trp 系統，TAC 系統，TRC 系統，LTR 系統，噬菌體 λ 之主操作子及啟動子區域，fd 衣膜蛋白質之控制區，用於 3-磷酸甘油激酶或其他糖解酵素之啟動子，酸式磷酸酶之啟動子(如 Pho5)，酵母 α -配對因子之啟動子及已知可控制原核或真核細胞基因表現之其他序列或其病毒及其各種組合。

各樣的單細胞宿主細胞也可用於表現此中所述之 DNA 序列。這些宿主包括熟知之真核及原核宿主，如 *E. coli* 株，假單胞菌，芽孢桿菌，鏈球菌，真菌如酵母，植物細胞，線蟲細胞及動物細胞，如 HEK-293，U2OS，CHO，RI.1，B-W 及 L-M 細胞，非洲綠猴腎細胞(如 COS 1，COS 7，BSC1，BSC40 及 BMT10)，昆蟲細胞(如 Sf9)，及人類細胞及在組織培養中之植物細胞。在本發明一方面，宿主細胞包括 GRK-C20 及遏止蛋白。在進一步方面，宿主細胞包括 GRK，遏止蛋白

及 GPCR，

應了解並非所有的載體，表現控制序列及宿主均可同樣運作良好以表現此中所述之 DNA 序列。也並非所有宿主在相同表現系統下同樣運作良好。然而，精藝者可選出適合的載體，表現控制序列及宿主，而不致不當地實驗並在不偏離本發明範圍內完成欲求之表現。例如，在選擇載體上，必須考量到宿主，因為載體必須在其中有所作用。載體之套數，控制套數之能力，及為載體所編碼之其他任何蛋白質之表現，如抗生素標幟，也都要考量到。

在選擇表現控制序列方面，各樣的因素通常都要考量。這些包括如系統之相對強度，其可控制力及其與欲表現之特殊 DNA 序列或基因之相容性，特別就潛在之二級結構而言。選擇適合的單細胞宿主可考量如：其與所選用載體之相容性，其分泌特性，其正確折疊蛋白質之能力，其發酵要求，以及由欲表現 DNA 序列所編碼之產物對宿主之毒性，以及表現產物純化之難易。

考量這些及其他因素，精藝者可構築各樣的載體/表現控制序列/宿主組合，其可在發酵或大規模動物培養中表現出此中所述之 DNA 序列。

進一步希望，同系物可由蛋白質複合物/亞單位之核苷酸序列中製備。同系物如片段，可由肽水解產生。其他同系物，如突變蛋白質，可由編碼序列之標準位置-指令之突變所產生。呈現出生物活性之同系物，如小分子，不論作用如啟動子或抑制劑，均可以活體內及/或試管內已知之分析

法鑑定。

如上述，DNA序列可予以合成地製備而非選殖。DNA序列可針對胺基酸序列以適合的密碼子來設計。一般而言，吾等可針對意欲宿主選擇較佳的密碼子，若該序列將用於表現時。完全序列由標準方法製備之重疊寡核苷酸組合，並組合成完全的編碼序列。如見，Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair et al., Science, 223:1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259:6311 (1984)。

合成的DNA序列可用於合宜地構築基因，此基因係可表現同系物或"突變蛋白質"。另外，編碼突變蛋白質之DNA可由天然的或經修飾基因或cDNAs行位置-指令之突變作用而製成，且突變蛋白質可利用傳統的多肽合成法直接製作。

將非天然胺基酸位置-特異地納入蛋白質之一般方法述於Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, Science, 244:182-188 (April 1989)。此方法可用來生成有非天然胺基酸之同系物。

另外的基序，如有助於純化之表位標幟或序列，也可納入核酸內。較好，編碼基序之核酸係在核酸之5'或3'端，是基序係位在蛋白質之N或C末端處。

用於此中所述方法之細胞，可含有遏止蛋白及可偵測分子之共軛物。在這些方法中，細胞也含有GPCR及可偵測分子之共軛物。

GPCR可經修飾，以具有為GRK磷酸化之加強能力。GPCR可以是 β_2 AR(Y326A)，GPCR列於圖1，孤兒GPCR，經修飾

之 GPCR，味覺受體，A類 GPCR，B類 GPCR，突變的 GPCR 或其具生物活性之片段。

所有型式之遏止蛋白，自然生成的及遺傳操作變型，包括視覺遏止蛋白， β 遏止蛋白 1 及 β 遏止蛋白 2，但不限於此，均可用於本發明中。

可與遏止蛋白共軛之可偵測分子包括下列，但不限於此：可為分光鏡，光化學，生化，免疫化學，電流，放射活性及光學方法測及之分子，包括生物發光，磷光及螢光。可測及分子包括 GFP，蟲螢光素酶， β -半乳糖苷酶，若丹明-共軛之抗體等，但不限於此。可偵測之分子包括放射性同位素，表位標幟，親和力標幟，酵素，螢光基團，化學發光基團等但不限於此。可測及分子包括因其與其他分子交互作用而可被直接或間接測及之分子。這些可測及分子應該是生物上可相容之分子，且應不危及遏止蛋白與 GPCR 系統之交互作用，且遏止蛋白與 GPCR 系統之交互作用應不可危及可偵測分子被測及之能力。較佳的可測及分子是光學上可偵測分子，包括光學上可偵測之蛋白質，如此其可被化學地、機械地、電流地或放射活性地激發出而放出螢光、磷光或生物發光。較佳之可偵測分子是固有的螢光分子，如具螢光之蛋白質，包括如綠螢光蛋白質(GFP)。可偵測分子可以如 Barak 等人所述之方法共軛至遏止蛋白(U.S. Pat. Nos. 5,891,646 及 6,110,693)。可偵測分子可在面向末端，在背側末端或在中段處共軛至遏止蛋白。

TMR 或 GPCR 或其具生物活性之片段也可與可偵測分子

共軛。較好，TMR或GPCR之羧基末端可與可偵測分子共軛。共軛或黏附至可偵測分子之羧基末端尾，可應用於羧基-末端尾交換中，以生成可測及之經標記GPCR。

若TMR或GPCR與可偵測分子共軛，則加有遏止蛋白之TMR或GPCR之近端可被容易地偵測。此外，若TMR或GPCR與可偵測分子共軛，則有遏止蛋白之TMR或GPCR之劃分可被容易地證實。用於共軛TMRs或GPCRs之可偵測分子可包括如上述者，如光學上可測及之分子，如此其可被化學地，機械地，電流地或具放射活性地發射出螢光、磷光或生物發光。較佳之光學上可偵測分子可以免疫螢光、冷光、螢光及磷光偵測。

例如，TMRs或GPCRs可為抗體，標有共軛至免疫螢光分子之抗體，或TMRs或GPCRs可共軛以冷光供者。特言之，TMRs或GPCRs可共軛以如蟲螢光素酶，如Renilla蟲螢光素酶，或與若丹明-共軛之抗體，如若丹明-共軛之抗-HA老鼠單株抗體。較好，GPCR之羧基末端尾可共軛以冷光供者，如蟲螢光素酶。GPCR，較好羧基末端也可共軛以GFP，如在L. S. Barak et al., "Internal Trafficking and Surface Mobility of a Functionally Intact β_2 -Adrenergic Receptor-Green Fluorescent Protein Conjugate", Mol. Pharm. (1997) 51, 177-184。

細胞型式及受質

衍自不同種屬之細胞可用於本發明中。細胞可衍自大鼠、老鼠、豬、靈長類或人類。為了偵測本發明所述之降

低的內化，可能需要由特殊動物衍生之細胞，如較高等靈長類。在本發明某些方面，衍自特殊種屬之細胞可能有用，或係較佳的。在本發明某些方面，衍自哺乳動物之細胞是有用的。在本發明某些方面，以衍自大鼠、老鼠、豬、靈長類或人類之細胞為有用的。

本發明之細胞可表現至少一種GPCR。細胞可進一步包含遏止蛋白及可偵測分子之共軛物。有用的細胞包括真核及原核細胞，如細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、昆蟲細胞、線蟲細胞、植物細胞及動物細胞，但不限於此。適合的動物細胞包括HEK-293細胞、U2OS細胞、HeLa細胞、COS細胞及各種主要的哺乳動物細胞，但不限於此。也可使用可經由其組織或在特殊器官或組織型式中表現遏止蛋白及可偵測分子之動物模式。

本發明之細胞可表現一種經修飾之蛋白質，其造成TMRs或GPCRs至胞吞囊或內囊胞之與激動劑無關之定位。

受質也可貯置在此中各種細胞上。受質可以是任何適合的生物受質，包括玻璃、塑膠、陶瓷、半導體、砂石、光纖、鑽石、生物可相容之單體或生物可相容之聚合物。

本發明另一方面是有關治療罹患有GPCR-相關疾病之人類或非人類個體之方法，如心血管疾病、心臟衰竭、氣喘、腎原性尿崩症或高血壓。此治療之進行或對需此療法之個體投予本發明所鑑定之化合物，其劑量足以治療與GPCR-有關之疾病，或至少可減輕其症狀。

示出以下實例以更完全說明本發明之較佳具體實例。然

而，其不應以任何方式限制本發明之廣大範圍。

實例

實例 1

鑑定跨膜受體(TMR)激動劑之方法

提出含有人類或大鼠 GPCR 及遏止蛋白-GFP 之細胞。細胞曝於 11 種受試化合物及 1 種對照化合物之下。曝於化合物後 30 分鐘、60 分鐘及 120 分鐘後偵測訊號。曝於化合物後 30 分鐘、60 分鐘及 120 分鐘後偵測轉位。可在各受試化合物存在下，定量決定 GPCR 內化作用，並與對照化合物存在下之 GPCR 內化比較。如見圖 4-7。與對照化合物比較下，在某些化合物存在下，GPCR 內化可降低。可決定知傳訊於某些受試化合物存在下被活化，此與激動劑不存在下之傳訊比較而言。在多重化合物濃度下，測出傳訊及轉位。產生傳訊及轉位之劑量反應曲線。這些實驗證明，以本方法是可鑑定 TMRAs 的。

傳訊偵測法

GPCR 傳訊利用 PerkinElmer 的 AlphaScreen™ 測定。

實驗之前日，二個 125 毫升之 CHO 細胞紡錘型燒瓶，以 100,000/毫升種入，於 90 毫升的 Ex-Cell 培養基(懸液培養基)+10% FBS+2 mM 穀胺鹽胺+10 mM Hepes 於 125 毫升紡錘型燒瓶。在 #1 燒瓶，加入有 pFastBac 質體之桿病毒，質體中含有人類 GPCR DNA，以生成每細胞 75 個病毒粒子(75 MOI)。於 #2 燒瓶，加入有 pFastBac 質體之桿病毒，質體內含有大鼠 GPCR DNA，以生成每細胞 250 個病毒粒子(250 MOI)。在 37

℃下培育一夜。

實驗前日，二個U2OS Rr#7細胞之125毫升紡錘型燒瓶，以200,000/毫升種入，於120毫升的Ex-Cell培養基(懸液培養基)+10% FBS+2 mM穀胺醯胺+10 mM Hepes於125毫升紡錘型燒瓶內。在#3燒瓶，加入有pFastBac質體之桿病毒，質體中含有人類GPCR DNA，以生成每細胞75個病毒粒子(75 MOI)。於#4燒瓶，加入有pFastBac質體之桿病毒，質體含有大鼠GPCR DNA，以生成每細胞250個病毒粒子(250 MOI)。在37℃下培育一夜。

實驗當日，所有試驗利用矽烷化之實驗器具製備，由冷凍貯品使達室溫。藥物培養基：EMEM添加以2 mM 穀胺醯胺，9% DMSO，10 mM Hepes，0.1% BSA。細胞培養基：EMEM添加有500 μ M IBMX。cAMP：加入盤內之cAMP起始濃度為1 μ M，並連續稀釋1：3共16種總濃度。受者珠粒：272微升之3.75毫克/毫升抗-cAMP受者珠粒。供者珠粒混合物：a.，於U2OS Rr#7：在EMEM中加入5 μ M 穀胺醯胺，0.6% Tween 20，3.3 nM生物素化之cANP，6.67 nM鏈抗生物素蛋白質供者珠粒，b.，於CHO：在EMEM中加入5 μ M穀胺醯胺，0.3% Tween 20，3.3 nM生物素化之cAMP，6.67 nM鏈抗生物素供者珠粒。化合物：化合物1-12連續稀釋(1：3)由1 μ M於EMEM加上10 mM Hepes，2 mM穀胺醯胺及0.1% BSA之起始濃度開始。經稀釋的化合物使堅固在Greiner深孔384盤中，使經由Minitrak可容易地分配。

步驟：四種條件各自為30、60及120分鐘之時間過程(CHO/

人類 GPCR，CHO/大 鼠 GPCR，U2OS Rr#7/人類 GPCR及 U2OS Rr#7/大 鼠 GPCR)。1.針對各條件在3個時間點，標記13個清潔的384孔洞Perkin Elmer Optiplates(12個盤於化合物，1個盤於cAMP標準曲線)。2.製備藥物培養基。3.製備細胞培養基。4.製備cAMP連續稀釋液。5.針對4個紡錘型燒瓶各自計數細胞。6.離心二份(人類GPCR及大 鼠 GPCR)4.5e6 CHO細胞，並再懸浮於30毫升的細胞培養基中(終濃度為150000細胞/毫升)。7.離心二份(人類GPCR及大 鼠 GPCR)的12e6 U2OS Rr#7細胞，並再懸浮於30毫升細胞培養基中(終濃度為400000細胞/毫升)。8.加入1.1微升化合物連續稀釋液，利用Minitrak由384深孔洞Greiner盤至無水的Optiplates。9.加入1.1微升cAMP連續稀釋至無水的Optiplates，利用BioHit手動式吸量器。所有接下來的步驟均對光敏感，且所有盤及試劑均保持在綠色過濾光或暗處。10.製備供者珠粒混合物(使用前30分鐘才製備)。11.在30毫升細胞/細胞培養基四種中各加入65.2微升，3.75毫克/毫升之抗-cAMP受者珠粒。12.加10.9微升的3.75毫克/毫升抗-cAMP受者珠粒至5毫升細胞培養基。13.加20微升/孔洞之細胞/細胞培養基/受者珠粒至化合物連續稀釋液，利用Multidrop。14.加20微升/孔洞的細胞培養基/受者珠粒至cAMP連續稀釋液。15.在37℃下培育，再開始計時。16.30分鐘後，加10微升/孔洞供者珠粒混合物至第一組四個盤上，利用供者珠粒混合相當於細胞型式。17.60分鐘後，加10微升/孔洞供者珠粒混合物至第二組四個盤上，及cAMP標準曲線對照盤，利用供者珠粒混

合相當於細胞型式。18.120分鐘後，手動加10微升/孔洞供者珠粒混合物至第三組四盤上，利用供者珠粒混合物相當於細胞型式。19.以乾淨的黏膠TopSeal(PerkinElmer)封好。20.在分析後12小時，以AlphaFusion™(PE)讀盤。盤留在室溫下之暗處，直到讀取時間。21.激動劑曲線再以cAMP標準曲線往回估算。

轉位偵測方法

利用Transfluor™偵測GPCR轉位。

實驗前日，六個IPA洗過之384孔洞Matrical盤，依據人類GPCR在3個時間點(30，60，120分鐘)及大鼠GPCR在3個時間點(30，60，120分鐘)標記。在35毫升細胞生長培養基中之U2OS Rr#7細胞(5.6e6)以人類GPCR轉導，經由桿病毒達到每細胞75個病毒粒子(75 MOI)。U2OS Rr#7細胞(5.6e6)於35毫升細胞生長培養基*以大鼠GPCR轉導，經由桿病毒達到每細胞250個病毒粒子(250 MOI)。U2OS Rr#7/人類GPCR細胞以25微升/孔洞塗佈至三個IPA洗過之384-孔洞Matrical盤(4,000細胞/孔洞，終濃度)。U2OS Rr#7/大鼠GPCR細胞以25微升/孔洞塗佈至三個IPA洗過之384孔洞Matrical盤(4,000細胞/孔洞，終濃度)。在37℃下培育一夜。細胞生長培養基：MEM加上10% FBS，10 mM Hepes，2 mM 穀胺醯胺，10微克/毫升健大霉素，0.4毫克/毫升G418。

實驗當日：試劑及化合物製劑：所有試劑利用矽烷化之實驗器具製備，由冷凍貯品至室溫。所列的所有數值均為終濃度。細胞培養基：EMEM添加2 mM 穀胺醯胺，10 mM

Hepes, 0.1% BSA。 化合物：化合物 1-12 連續稀釋 (1 : 3)，由 1 μ M 於 EMEM 加有 10 mM Hepes, 2 mM 穀胺醯胺及 0.1% BSA 之起始濃度開始。經稀釋之化合物堅固在 Greiner 深孔 384 盤中，使易於以 Minitrak 分配用。 固定及染色：1 μ M DRAQ5 染料及 2% 甲醛。

步驟：二種條件各自為 30、60 及 120 分鐘之時間過程 (U2OS Rr#7 人類 GPCR 及 U2OS Rr#7 大鼠 GPCR)。1. 製備細胞培養基。2. 製備化合物連續稀釋曲線，並使堅固在 384 深孔 Greiner 盤上。3. 移去細胞生長培養基。4. 加 25 微升/孔洞之細胞培養基，利用 Multidrop 進行。5. 在 37°C 下培育 30 分鐘。6. 加入 1.3 微升化合物連續稀釋液，由 384 深孔 Greiner 盤至六個 Matrical 盤上，利用 Minitrak。7. 在 37°C 下培育。8. 製備固定劑及染料。9. 30 分鐘後，手動加入 25 微升/孔洞之固定劑及染料至第一組二個盤上。10. 60 分鐘後，手動加入 25 微升/孔洞之固定劑及染料至第二組二個盤上。11. 120 分鐘後，手動加入 25 微升/孔洞之固定劑及染料至第三組二個盤上。12. 以箔片密封盤子，黏合密閉。13. 在 InCell Analyzer 3000, Generation 1 上讀取，並分析 f-顆粒。

實例 2

鑑定跨膜受體 (TMR) 激動劑之方法 - 以嗎啡為例

提出含有 μ 類鴉片受體及遏止蛋白 - GFP 之細胞。細胞曝於受試化合物 - 嗎啡之下。細胞曝於對照化合物 - DAMGO 之下。此傳訊在曝於化合物後 30 分鐘、60 分鐘及 120 分鐘時偵測。曝於化合物後 30 分鐘、60 分鐘及 120 分鐘後偵測轉位。

再定量決定，於DAMGO存在下(對照化合物)MOR內化相較於在受試化合物-嗎啡存在下之MOR內化有所降低。此中是決定在嗎啡存在下(受試化合物)傳訊被活化，並與無激動劑下之傳訊比較。在多重化合物濃度下偵測傳訊及轉位。也產生傳訊及轉位之劑量反應曲線。結果示於圖8。這些實驗證明，嗎啡是一種TMRA。雖然嗎啡是TMRA，其可被衍生化以形成MOR內化更進一步降低之化合物。

傳訊偵測方法

利用 AlphaScreen™(來自 PerkinElmer)偵測 μ 類鴉片受體之傳訊。

實驗前日，CHO細胞以100,000/毫升種入70毫升Ex-Cell培養基(懸液培養基)+10% FBS+2 mM穀胺醯胺+10 mM Hepes，於125毫升紡錘型燒瓶中；4.2毫升(1×10^9 貯液)，在種入時加入桿病毒，如此可每細胞生成600個病毒粒子(600 MOI)。在37°C下培育一夜。

實驗當日，所有試劑均在分析當日才新鮮製備，除非另有所示。激動劑來自冷凍貯品。緩衝溶液：EMEM(SFM)加上10 mM Hepes，2 mM穀胺醯胺。藥物培養基：4.5毫升100% DMSO；45.5毫升EMEM(SFM)加上10 mM Hepes，2 mM穀胺醯胺(1：11稀釋)；(1%=1克/100毫升)0.5克BSA；生成10% DMSO，1% BSA操作濃度。細胞培養基：35毫升EMEM(SFM)加上10 mM Hepes，2 mM穀胺醯胺；加35微升(500 μ M)IBMX(1：1000稀釋)。毛喉(Forskolin)培養基：1微升(1 mM)毛喉加至62.7微升EMEM(SFM)，加上10 mM Hepes，2 mM穀胺

醯胺(1: 63.7稀釋)。可生成 1.57×10^{-3} 操作濃度。36微升(1.57×10^{-3} M毛喉)加至17.96毫升EMEM(SFM)，加上10 mM Hepes，2 mM 穀胺醯胺(1: 500稀釋)；生成 3.15×10^{-6} M操作濃度。
DAMGO: 2微升(10 mM)DAMGO加上93.2微升藥物培養基中(1: 47.6稀釋)；可生成 2.1×10^{-4} M操作濃度。 2.1×10^{-4} M高濃度DAMGO(1: 3)連續稀釋，16 pts；40微升加至80微升藥物培養基(利用矽烷化之管尖且在各種稀釋之間要更換管尖)。
嗎啡: 2微升(10 mM)嗎啡加至93.2微升藥物培養基中(1: 47.6稀釋)；可生成 2.1×10^{-4} M操作濃度。 2.1×10^{-4} M高濃度DAMGO(1: 3)連續稀釋，16 pts；40微升加至80微升藥物培養基(利用矽烷化之管尖且在各種稀釋之間要更換管尖)。
cAMP: 1微升5 mM cAMP加至179.7微升藥物培養基中(1: 180.7稀釋)；生成 2.8×10^{-5} M操作cAMP濃度。 2.8×10^{-5} M高濃度cAMP (1: 3)連續稀釋，16 pts；40微升加至80微升藥物培養基(利用矽烷化之管尖且在各種稀釋之間要更換管尖)。
受者珠粒: 71.76微升(3.75毫克/毫升)珠粒加至26毫升細胞+細胞培養基(1: 362.3)稀釋液。11微升(3.75毫克/毫升)珠粒加至4毫升細胞培養基(用於cAMP孔洞)。供者珠粒: (1: 8)2毫升10%吐溫-20；(1: 730)29微升(10 μ M)經生物素化之cAMP(1: 180.5)88.6微升(5毫克/毫升)供者珠粒；13.89毫升EMEM(SFM)加上10 mM Hepes，2 mM 穀胺醯胺。

步驟: 1. 製備藥物培養基。2. 製備細胞培養基(充份渦旋IBMX至溶液內)。3. 製備DAMGO，嗎啡及cAMP連續稀釋液於藥物培養基中(利用Biohit吸量管)。4. 加入10微升各

濃度至經矽烷化之384-孔洞之Remp聚丙烯盤之經指定孔洞中。5. 加10微升緩衝溶液(藥物培養基)至基礎孔洞，及僅接受最高毛喉濃度之孔洞(貯存盤)。6. 至貯存盤中吸取適量，並轉移1.5微升藥物/緩衝溶液至三個Optiplates(PE)各盤中，利用Minitrack儀器(PE)。7. 計數紡錘型燒瓶內之細胞。將細胞成團塊，並再懸浮於26毫升細胞培養基中(26毫升是 3×384 盤之充份體積)。最終的細胞濃度為每20微升有6,000個細胞。8. 置4毫升細胞培養基至分別的管中(無細胞)。此可用於cAMP連續稀釋。9. 所有接續的步驟均對光敏感，且所有盤及試劑均置綠色濾鏡光或暗處。10. 加71.76微升受者珠粒至再懸浮之細胞中並緩和地混合。11. 加11微升受者珠粒至細胞培養基(不含細胞)並混合。12. 利用多取樣器，所有孔洞均加入20微升細胞+受者，除了cAMP孔洞例外。13. 加20微升單純的細胞培養基+受者至cAMP孔洞，利用BioHit吸量管。14. 輕敲盤以緩和地混合。15. 盤在室溫下培育30分鐘。16. 於培育中，製備毛喉培養基。17. 30分鐘後，加10微升操作濃度之毛喉至所有孔洞，除了基礎及cAMP孔洞是利用多取樣儀器。18. 加10微升至基礎及cAMP孔洞，利用多取樣儀器。19. 輕敲盤以緩和地混合。20. 盤在37°C下培育。21. 開始計時。(時間定在30分鐘、60分鐘及120分鐘)。22. 製備供者珠粒培養基，並在室溫下之抽屜中培育(完全黑暗)。此培育至少30分鐘，之後加至第一分析盤中。23. 分配10微升供者混合物至整個分析盤，利用多取樣儀器，此當各盤時間到時進行。24. 輕敲盤以

緩和混合。25. 以乾淨的黏膠TopSeal(PerkinElmer)密封。26. 在AlphaFusionTM(PE)上讀取，此時分析已進行12小時。盤留在室溫下之暗處，直到讀取為止。27. 利用MDL's LSW數據分析奇才配合曲線。28. 激動劑曲線再對著cAMP標準曲線往回估計。

最終濃度：DAMGO：連續稀釋，始自 $1\text{e-}5\text{M}$ (1：3，16 pts)，嗎啡：連續稀釋液，始自 $1\text{e-}5\text{M}$ (1：3，16 pts)，cAMP：連續稀釋液，始自 $1\text{e-}6\text{M}$ (1：3，16 pts)，受者：5微克/毫升，毛喉(Forskolin)： $1\text{e-}6\text{M}$ ，供者：0.3% Tween-20；3.3 nM生物素化之-cAMP；6.67微克/毫升供者珠粒，細胞：6,000/20微升，DMSO：0.36%，BSA：0.036%。

轉位偵測法

利用TransfluorTM偵測 μ 類鴉片受體(MOR)之轉位。

實驗之前一日，U2OS-GFP-MOR穩定細胞株，含有MOR及遏止蛋白-GFP，塗佈在3個IPA洗過之384-孔洞Matrical盤各盤中，5000細胞/25微升。生長培養基：MEM加上10% FBS，10 mM Hepes，2 mM 穀胺醯胺。在37°C下培育一夜。

分析當日：試劑製備及稀釋。所有試劑除非另有所示，均在分析當日才新鮮製備。激動劑來自冷凍貯品。所有稀釋均以經矽烷化之管尖進行，且在各稀釋間要更換管尖。
1. 稀釋DAMGO：20微升($1\text{e-}2$)貯液DAMGO加至180微升EMEM(SFM)，其中加上10 mM Hepes，10% DMSO(1：100稀釋)，1% BSA(1克/100毫升)。生成： $1\text{e-}3\text{M}$ DAMGO操作濃度。 $1\text{e-}3\text{M}$ 操作貯液(16 pts)連續稀釋(1：3)於96-孔洞之

聚丙稀，經矽烷化之盤中(40微升於80微升中)。2. 稀釋嗎啡：20微升($1e-2$)貯液嗎啡加至180微升EMEM(SFM)，並加上10 mM Hepes，10% DMSO(1：100稀釋)，1% BSA(1克/100毫升)。生成： $1e-3$ M嗎啡操作濃度。 $1e-3$ M操作貯液(16 pts)之連續稀釋(1：3)於96孔洞聚丙稀且矽烷化盤中(40微升至80微升中)。3. 加2微升連續稀釋液至經矽烷化，聚丙稀之Remp 384-孔洞盤經指定之孔洞中。4. 加2微升緩衝溶液EMEM(SFM)，加上10 mM Hepes，10% DMSO，1% BSA至基礎孔洞。5. 加入2微升高濃度，由連續稀釋液至一排孔洞(最大激動劑)，以進行統計估算。6. 利用多取樣器，將15微升緩衝溶液EMEM(SFM)加上10 mM Hepes，10% DMSO，1% BSA分配至含有2微升的整個盤中。此使連續稀釋，高濃度達 $1.18e-4$ M。7. 輕敲盤以混合。8. 取出細胞中25微升之生長培養基，並以23微升EMEM(SFM)加上10 mM Hepes更換。(Minitrack儀器(PE))。9. 自經稀釋之藥物盤中吸取2微升，並捺按此23微升至分析盤中。(Minitrack儀器(PE))。10. 利用10微升吸取及分配步驟混合(Minitrack儀器(PE))。11. 開始計時(時間於第1盤定在30分鐘，第2盤在60分鐘及第3盤在120分鐘)。12. 當各盤之時間到時，加25微升4%甲醛+2 μ M DRAQ5核染料至各分析盤。(終濃度：2%甲醛，1 μ M DRAQ5)。13. 以箔片封盤，黏膠密封。14. 在InCell Analyzer 3000，Generation 1上讀取，並分析f-顆粒。15. 由MDL's LSW數據分析鬼才中配合曲線。

雖然本發明已經由參考各種特異材質、步驟及實例而加

以描述及說明，但應了解，本發明並不限於材質特殊之組合，及針對該目的之步驟。可包含有此詳細說明中各種變化，如精藝者所了解的。

以下列出與上述揭示有關之文獻，且特別是有關於實驗步驟及討論。以下文獻，以及在上文內所參考的，應以全文列為參考文獻。

Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina. J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992) J. Biol. Chem. 267, 17882-17890

Barak, L. S., Oakley, R. H., Laporte, S. A. and Caron, M. G. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98, 93-98

Barak, L. S., Warabi, K. Feng, X., Caron, M. G. & Kwatra, M. M. (1999) J. Biol. Chem. 274, 7565-7569

Barak, L. S., Ferguson, S. S., Zhang, J & Caron, M. G. (1997) J. Biol. Chem. 272, 27497-27500

Barak, L. S., Ferguson, S. S., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T. & Caron, M. G. (1997) Mol. Pharmacol. 51, 177-184

Barak, L.S., Menard, L., Ferguson, S. S., Colapietro, A. M. & Caron, M. G. (1995) Biochemistry 34, 15407-15414

Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J. & Caron, M. G. (1996) Can. J. Physiol, Pharmacol. 74, 1095-1110

Ferguson, S. S., Menard, L., Barak, L. S., Koch, W. J., Colapietro, A. M. & Caron, M. G. (1995) J. Biol. Chem. 270, 24782-24789

- Inglese, J., Koch, W. J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1992) Nature 359:147-150
- Kim, K.-M., Valenzano, K. J., Robinson, S. R., Yao, W. D., Barak, L. S., Caron, M. G. (2001) J. Biol. Chem. 276:37409-37414
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. (2000) J. Biol. Chem. 275, 23120-23126
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S.S., Caron, M. G. & Barak, L. S. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 96, 3712-3717
- Menard, L., Ferguson, S. S., Zhang, J., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. & Barak, L. S. (1997) Mol. Pharmacol. 51, 800-808
- Mhaouty-Kodja, S. Barak, L. S., Scheer, A., Abuin, L., Diviani, D., Caron, M. G. & Cotecchia, S. (1999) Mol. Pharmacol. 55, 339-347
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., Caron, M.G. (2001), J. Biol. Chem. 276:19452-19460
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. & Barak, L.S. (2000) J. Biol. Chem. 275, 17201-17210
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. (1999) J. Biol. Chem. 274, 32248-32257
- Zhang, J., Barak, L. S., Anborgh, P. H., Laporte, S. A., Caron, M. G. & Ferguson, S. S. (1999) J. Biol. Chem. 274, 10999-

11006

Zhang, J., Barak, L. S., Winkler, K. E., Caron, M. G. & Ferguson, S. S. (1997) J. Biol. Chem. 272, 27005-27014

【圖式簡單說明】

本發明的主題及優點可由詳細說明並配合附圖加以了解，其中：

圖1是GPCRs表列，可用於本發明中。

圖2是A型及B型GPCRs某些表列。

圖3是可用於本發明的某些GPCR激動劑或配體。

圖4A-L示出人類GPCR傳訊及在CHO細胞中轉位之劑量反應曲線，於一個實驗中，化合物1-12存在達30分、60分及120分鐘。圖4M-X示出人類GPCR傳訊及在CHO細胞中轉位之劑量反應曲線，在第二個實驗中，化合物1-12存在達30分、60分及120分鐘。

圖5A-L示出人類GPCR傳訊及在U2OS細胞中轉位之劑量反應曲線，在一個實驗中於化合物1-12存在下，歷30分、60分及120分鐘。圖5M-X示出人類GPCR傳訊及U2OS細胞中之轉位之劑量反應曲線，於第二個實驗中，在化合物1-12存在下歷30分、60分及120分鐘。

圖6A-L示出大鼠GPCR傳訊及在CHO細胞中轉位之劑量反應曲線，於一個實驗中於化合物1-12存在下歷30分、60分及120分鐘。圖6M-X示出大鼠GPCR傳訊及在CHO細胞中轉位之劑量反應曲線，於第二個實驗中，於化合物1-12存在下歷30分、60分及120分鐘。

圖 7A-L 示出大鼠 GPCR 傳訊及在 U2OS 細胞中轉位之劑量反應曲線，於一個實驗中於化合物 1-12 存在下歷 30 分、60 分及 120 分鐘。圖 7M-X 示出大鼠 GPCR 傳訊及在 U2OS 細胞中轉位之劑量反應曲線，於第二個實驗中，於化合物 1-12 存在下歷 30 分、60 分及 120 分鐘。

圖 8A 示出 MOR 傳訊在 U2OS 細胞中轉位之劑量反應曲線，於 DAMGO 存在下歷 30 分、60 分及 120 分鐘，以在嗎啡存在下之最大反應 % 表示。圖 8B 示出 MOR 傳訊及在 U2OS 細胞中轉位之最大反應曲線，於嗎啡存在下歷 30 分、60 分及 120 分鐘，以嗎啡存在下之最大反應 % 表示。圖 8C 示出 MOR 傳訊及在 U2OS 細胞中轉位之劑量反應曲線，於 DAMGO 存在下歷 30 分、60 分及 120 分鐘，以在 DAMGO 存在下之最大反應 % 表示。圖 8D 示出 MOR 傳訊及在 U2OS 細胞中轉位之劑量反應曲線，於嗎啡存在下歷 30 分、60 分及 120 分鐘，以在 DAMGO 存在下之最大反應 % 表示。

伍、中文發明摘要：

本案是有關鑑定跨膜受體(TMR)激動劑之方法，及經此方法鑑定之化合物。TMR激動劑(TMRA)可活化TMR訊號，同時呈現較對照化合物減低的TMR內化作用。

陸、英文發明摘要：

Described herein are methods of identifying a transmembrane receptor (TMR) agonist and compounds identified by this method. The TMR agonist (TMRA) is capable of activating TMR signaling while exhibiting reduced TMR internalization over a control compound.

拾、申請專利範圍：

1. 一種鑑定跨膜受體(TMR)激動劑之方法，其中的TMR激動劑(TMRA)可活化TMR傳訊同時呈現降低之TMR內化甚於對照化合物，此方法包括：
 - (a)提出含有至少一種TMR，或其生物活性片段之細胞，其中細胞進一步含有遏止蛋白，或其生物活性片段，
 - (b)細胞曝露於至少一種受試化合物下，
 - (c)在二或多個時間點上偵測傳訊，
 - (d)在二或多個時間點上偵測TMR之轉位，及
 - (e)定量決定內化是否降低，係將受試化合物存在下之TMR內化與對照化合物存在下之TMR內化作比較，且在與無激動劑下之TMR傳訊比較下傳訊係被活化的。
2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中的TMR是GPCR。
3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中TMR轉位之偵測係追蹤與遏止蛋白或TMR結合之可偵測分子之定位。
4. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中傳訊的定量是偵測細胞內效應物，其中該效應物可為cAMP，環狀GMP，鈣，脂質，磷脂酰肌醇，氫離子或離子運送分子。
5. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中的對照化合物是一種天然配體或天然激動劑。
6. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中的受試化合物是經修飾之天然配體或經修飾之天然激動劑。
7. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中的受試化合物是已知的醫藥上相關化合物，或係衍生自己知之醫藥上相關

化合物。

8. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中以TMRA刺激後傳訊被活化之時間較以對照化合物刺激後之活化時間還長。
9. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中TMR轉位的偵測係決定於漿膜，凹窪，內囊胞，胞吞囊或胞液中之定位。
10. 根據申請專利範圍第2項之方法，其中GPCR是A類或B類受體。
11. 根據申請專利範圍第2項之方法，其中GPCR是 μ 類鴉片， β_1 AR， β_2 AR或多巴胺受體。
12. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中TMR轉位之偵測係具象化放射性同位素，表位標幟，親和力標幟，酵素，螢光基團，或化學發光基團黏附至遏止蛋白或TMR。
13. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中傳訊之偵測係在偵測轉位之同時。
14. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中細胞曝於化合物下一次，且細胞並不曝於化合物下第二次。
15. 一種為根據申請專利範圍第1項之方法所發現之化合物。
16. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中的TMR是大鼠、人類、老鼠、豬或靈長類TMR。
17. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該方法重複進行，且其中在重複方法中之TMR來自與原先方法不同之種屬。
18. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中的受試化合物在

原先方法中是TMRA，但在重複方法中非TMRA，且其中重複方法含來自不同種屬之TMR。

19. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中的受試化合物來自組合庫。
20. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中在受試化合物存在下之傳訊約相同於或大於在對照化合物存在下之傳訊。
21. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中方法在不同化合物濃度下重複，以針對傳訊之測度生成劑量反應曲線，及針對受試化合物存在下之轉位測度生成劑量反應曲線。
22. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中的定量決定包括針對傳訊偵測之劑量反應曲線與針對轉位偵測之劑量反應曲線之比較。
23. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中在對照化合物存在下決定針對傳訊偵測之第二次劑量反應曲線及針對轉位偵測之第二次劑量反應曲線。
24. 根據申請專利範圍第23項之方法，其中在受試化合物存在下針對轉位偵測之劑量反應曲線，與在對照化合物存在下針對轉位偵測之劑量反應曲線比較前者有所降低。
25. 根據申請專利範圍第23項之方法，其中在受試化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線，大約等於或大於在對照化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線。
26. 根據申請專利範圍第24項之方法，其中轉位降低係在受試化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之Max降低所決定，此與對照化合物存在下，於轉位偵測時劑量反

應曲線之Max比較而言。

27. 根據申請專利範圍第24項之方法，其中轉位降低係在受試化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之 EC_{50} 增加所決定，此與對照化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之 EC_{50} 值比較而言。
28. 一種鑑定經修飾TMR激動劑之方法，其中經修飾之TMRA可活化TMR傳訊而較未修飾化合物呈現降低之TMR內化，此方法包括以下步驟：
 - (a)提出TMR之激動劑或配體，
 - (b)修飾激動劑或配體，
 - (c)提出含有至少一種TMR或其生物活性片段之細胞，其中細胞進一步含有遏止蛋白，或其生物活性片段，
 - (d)細胞曝於經修飾之激動劑或經修飾之配體下，
 - (e)在二或多個時間點下偵測傳訊，
 - (f)在二或多個時間點上偵測TMR之轉位，及
 - (g)定量決定內化是否降低，係比較受試化合物存在下之TMR內化與未修飾化合物存在下之TMR內化，及其中傳訊之活化與無激動劑下之TMR傳訊作比較。
29. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中的TMR是GPCR。
30. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中TMR轉位之偵測係追蹤與遏止蛋白或TMR結合之可偵測分子之定位。
31. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中經由細胞內效應物之測定來定量傳訊，其中的效應物可以是cAMP，環狀GMP，鈣，脂質，磷脂醯肌醇，氫離子或離子運送分子。

32. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中的對照化合物是天然配體或天然激動劑。
33. 根據申請專利範圍第32項之方法，其中的天然配體或天然激動劑是已知之醫藥上相關化合物，或衍自己知之醫藥上相關化合物。
34. 一種為根據申請專利範圍第28項之方法所發現之化合物。
35. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中為TMRA刺激後傳訊活化之時間較以對照化合物刺激後活化之時間為長。
36. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中TMR轉位之測定是決定於漿膜，凹窪，內囊胞，胞吞囊或胞液中之定位。
37. 根據申請專利範圍第29項之方法，其中的GPCR是A類或B類受體。
38. 根據申請專利範圍第29項之方法，其中的GPCR是 μ 類鴉片， β_1 AR， β_2 AR或多巴胺受體。
39. 根據申請專利範圍第30項之方法，其中TMR轉位之測定是具象化放射性同位素，表位標幟，親和力標幟，酵素，螢光基團，或黏附至遏止蛋白或TMR之化學發光基團。
40. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中傳訊之偵測在轉位偵測之同時。
41. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中細胞曝於化合物下一次，且其中細胞並不曝於化合物下第二次。
42. 一種為根據申請專利範圍第28項之方法所發現之化合物。

43. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中的TMR是大鼠、人類、老鼠、豬或靈長類TMR。
44. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中方法重複，且其中在重複方法中之TMR與在原先方法的係來自不同種屬。
45. 根據申請專利範圍第44項之方法，其中受試化合物在原先方法中的是TMRA，但在重複方法中的非TMRA，且其中重複方法含的TMR來自不同種屬。
46. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中的受試化合物來自組合庫。
47. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中在受試化合物存在下之傳訊大約相同於或大於在對照化合物存在下之傳訊。
48. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中方法在化合物不同濃度下重複，以生成針對傳訊偵測之劑量反應曲線，及針對受試化合物存在下轉位偵測之劑量反應曲線。
49. 根據申請專利範圍第48項之方法，其中的定量決定包括針對傳訊偵測之劑量反應曲線與針對轉位偵測之劑量反應曲線之比較。
50. 根據申請專利範圍第48項之方法，其中在對照化合物存在下針對傳訊偵測決定第二次劑量反應曲線，及針對轉位偵測決定第二次劑量反應曲線。
51. 根據申請專利範圍第50項之方法，其中在受試化合物存在下針對轉位偵測之劑量反應曲線與在對照化合物存在

下轉位偵測之劑量反應曲線比較係降低的。

52. 根據申請專利範圍第50項之方法，其中在受試化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線大約相同於或大於在對照化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線。
53. 根據申請專利範圍第51項之方法，其中轉位降低係在受試化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之Max降低所決定，此與對照化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之Max比較而言。
54. 根據申請專利範圍第51項之方法，其中轉位降低係在受試化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之EC₅₀增加所決定，此與對照化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之EC₅₀值比較而言。
55. 一種鑑定跨膜受體(TMR)激動劑之方法，其中的TMR激動劑(TMRA)可活化TMR傳訊同時較對照化合物呈現降低之TMR內化，此方法包括以下步驟：
 - (a)提出含有至少一種TMR，或其生物活性片段之細胞，其中細胞進一步含有遏止蛋白，或其生物活性片段，
 - (b)細胞曝於至少一種受試化合物下，
 - (c)在一或多個化合物濃度下偵測傳訊，
 - (d)在一或多個化合物濃度下偵測TMR之轉位，
 - (e)定量決定內化是否降低，係將受試化合物存在下之TMR內化與對照化合物存在下之TMR內化比較，且其中傳訊之活化與無激動劑下之TMR傳訊比較。
56. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中的TMR是GPCR。

57. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中TMR轉位之偵測係追蹤與遏止蛋白或TMR結合之可偵測分子之定位。
58. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中傳訊之定量係偵測細胞內效應物，其中效應物可以是cAMP，環狀GMP，鈣，脂質，磷脂醯肌醇，氫離子或離子運送分子。
59. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中的對照化合物是天然配體或天然激動劑。
60. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中的受試化合物是經修飾的天然配體或經修飾之天然激動劑。
61. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中的受試化合物是已知的醫藥上相關化合物，或係衍生自已知之醫藥上相關化合物。
62. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中於TMRA刺激後，傳訊被活化之時間較為對照化合物刺激後的還長。
63. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中TMR轉位之偵測係決定於漿膜，凹窪，內囊胞，胞吞囊或胞液中之定位。
64. 根據申請專利範圍第56項之方法，其中GPCR是A類或B類受體。
65. 根據申請專利範圍第56項之方法，其中的GPCR是 μ 類鴉片， β_1 AR， β_2 AR或多巴胺受體。
66. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中TMR轉位之偵測是具象化放射性同位素，表位標幟，親和力標幟，酵素，螢光基團，或黏附至遏止蛋白或TMR之化學發光基團。
67. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中傳訊偵測與轉位

偵測同時。

68. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中細胞曝於化合物下一次，且其中細胞不曝於化合物下第二次。
69. 一種為根據申請專利範圍第55項之方法所發現之化合物。
70. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中的TMR是大鼠、人類、老鼠、豬或靈長類TMR。
71. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中方法重複進行，且其中在重複方法中之TMR與在原先方法中的係來自不同種屬。
72. 根據申請專利範圍第71項之方法，其中受試化合物在原先方法中是TMRA，在重複方法中非TMRA，且其中重複方法中含有來自不同種屬之TMR。
73. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中受試化合物來自組合庫。
74. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中在受試化合物存在下之傳訊大約相同於或大於在控制化合物存在下之傳訊。
75. 根據申請專利範圍第55項之方法，其中方法在化合物不同濃度下重複，以針對傳訊偵測生成劑量反應曲線，及針對受試化合物存在下轉位偵測生成劑量反應曲線。
76. 根據申請專利範圍第75項之方法，其中定量決定包括傳訊偵測之劑量反應曲線與轉位偵測之劑量反應曲線之比較。

77. 根據申請專利範圍第75項之方法，其中針對傳訊偵測之第二劑量曲線，及針對轉位偵測之第二劑量曲線係在對照化合物存在下決定的。
78. 根據申請專利範圍第77項之方法，其中在受試化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線，與在受試化合物存在下轉位偵測之劑量反應曲線比較，前者有所降低。
79. 根據申請專利範圍第77項之方法，其中在受試化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線大約相同於或大於在對照化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線。
80. 根據申請專利範圍第78項之方法，其中轉位降低係在受試化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之Max降低所決定，此與對照化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之Max比較而言。
81. 根據申請專利範圍第78項之方法，其中轉位降低係在受試化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之EC₅₀增加所決定，此與對照化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之EC₅₀值比較而言。
82. 一種鑑定經修飾之TMR激動劑之方法，其中經修飾之TMRA可活化TMR傳訊而較未修飾化合物可呈現較為降低之TMR內化，此方法包括以下步驟：
 - (a)提出TMR之激動劑或配體，
 - (b)修飾激動劑或配體，
 - (c)提出含有至少一種TMR或其生物活性片段之細胞，其中細胞進一步含有遏止蛋白，或其生物活性片段，

- (d)將細胞曝於經修飾之激動劑或經修飾之配體下，
 - (e)在二或多種化合物濃度下偵測傳訊，
 - (f)在二或多個化合物濃度下偵測TMR之轉位，及
 - (g)定量決定內化是否降低，係將受試化合物存在下之TMR內化與在未修飾化合物存在下之TMR內化作比較，且其中傳訊之活化與無激動劑下之TMR傳訊作比較。
83. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中的TMR是GPCR。
84. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中TMR轉位之偵測係追蹤與遏止蛋白或TMR結合之可偵測分子之定位。
85. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中傳訊之定量係偵測細胞內效應物，其中該效應物可以是cAMP，環狀GMP，鈣，脂質，磷脂醯肌醇，氫離子或離子運送分子。
86. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中的對照化合物是天然配體或天然激動劑。
87. 根據申請專利範圍第86項之方法，其中的天然配體或天然激動劑是已知之醫藥相關化合物，或係衍生自己知之醫藥相關化合物。
88. 一種為根據申請專利範圍第82項之方法所發現之化合物。
89. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中為TMRA刺激後傳訊活化之時間較為對照化合物刺激後活化之時間為長。
90. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中TMR轉位之偵測係決定於漿膜，凹窩，內囊胞，胞吞囊或胞液中之定位。
91. 根據申請專利範圍第83項之方法，其中的GPCR是A類或B

類受體。

92. 根據申請專利範圍第83項之方法，其中的GPCR是 μ 類鴉片， β_1 AR， β_2 AR或多巴胺受體。
93. 根據申請專利範圍第84項之方法，其中TMR轉位之偵測係具象化放射性同位素，表位標幟，親和力標幟，酵素，螢光基團，或黏附至遏止蛋白或TMR之化學發光基團。
94. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中傳訊之偵測與轉位偵測同時。
95. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中細胞曝於化合物下一次，且其中細胞不曝於化合物下第二次。
96. 一種為根據申請專利範圍第82項之方法所發現之化合物。
97. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中的TMR是大鼠、人類、老鼠、豬或靈長類TMR。
98. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中方法重複進行，且其中在重複方法中之TMR與在原先方法的係來自不同種屬。
99. 根據申請專利範圍第98項之方法，其中受試化合物在原先方法中是TMRA，而重複方法中的非TMRA，且其中重複方法中含有來自不同種屬之TMR。
100. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中的受試化合物來自組合庫。
101. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中在受試化合物存在下之傳訊大約相同於或大於在對照化合物存在下之傳

訊。

102. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中方法在不同化合物濃度下重複，以在受試化合物存在下針對傳訊偵測生成劑量反應曲線，及針對轉位偵測生成劑量反應曲線。
103. 根據申請專利範圍第102項之方法，其中的定量決定包括針對傳訊偵測之劑量反應曲線與針對轉位偵測之劑量反應曲線之比較。
104. 根據申請專利範圍第102項之方法，其中針對傳訊偵測之第二劑量反應曲線，及針對轉位偵測之第二劑量反應曲線係在對照化合物存在下決定的。
105. 根據申請專利範圍第104項之方法，其中在受試化合物存在下針對轉位偵測之劑量反應曲線，與在對照化合物存在下針對轉位偵測之劑量反應曲線比較，前者有所降低。
106. 根據申請專利範圍第104項之方法，其中在受試化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線大約相同於或大於在對照化合物存在下針對傳訊偵測之劑量反應曲線。
107. 根據申請專利範圍第105項之方法，其中轉位降低係在受試化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之Max降低所決定，此與對照化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之Max比較而言。
108. 根據申請專利範圍第105項之方法，其中轉位降低係在受試化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之EC₅₀增加所決定，此與對照化合物存在下，於轉位偵測時劑量反應曲線之EC₅₀值比較而言。

人類G蛋白質偶合受體族

(受體得知於1999年1月)

類型	配體	數目	組織	生理學	治療應用
*I類 類視紫紅質					
*胺					
●乙醯膽鹼					
(革毒鹼&菸鹼)					
●腎上腺受體		5	腦、神經、心臟	神經遞質	敏度，阿滋海默氏症
●α腎上腺受體		6	腦、腎、肺	葡萄糖生作用	糖尿病，心血管疾病
●β腎上腺受體		3	腎、心臟	肌肉收縮	心血管，呼吸
●多巴胺		5	腦、腎、GI	神經遞質	心血管，帕金森氏病
●組織胺		2	血管、心臟、腦	血管通透	抗-發炎，潰瘍
●5-羥色胺(5-HT)		16	大多組織	神經遞質	抑鬱，失眠症，鎮痛
*肽					
●血管加壓素		2	血管、肝、腎	血管收縮	心血管，內分泌
●舒緩激肽		1	肝、血液	血管擴張	抗發炎，氣喘
●C5a過敏毒素		1	血液	免疫系統	抗發炎
●Fmet-leu-Phe		3	血液	化學引誘素	抗發炎
●問白素-8		1	血液	化學引誘素	抗發炎
●化學激肽		6	血液	化學引誘素	抗發炎
●Orexin		2	腦	脂肪代謝	肥胖
●孤啡肽		1	腦	支氣管擴張，疼痛	呼吸道疾病，麻醉
●CCCK(胃激素)		2	胃腸	活動性、脂肪吸收	胃腸，肥胖，帕金森氏症
●內皮素		2	心臟，支氣管，腦	肌肉收縮	心血管，呼吸
●黑色皮素		5	腎，腦	新陳代謝調控	抗-發炎，鎮痛
●神經肽Y		1	神經，腸，血液	神經遞質	行為，記憶，心血管
●神經加壓素		3	腦	CNS	心血管、鎮痛
●類鴉片		5	腦，胃腸	CNS	抑鬱，鎮痛
●生長激素阻生素				神經遞質	腫瘤，阿滋海默氏症

：式圖，拾壹

圖 1

●速激肽					
(物質P, NKA)					
●凝血酶	3	腦, 神經	神經激素	抑鬱, 鎮痛	
●類-血管加壓素	4	血小板, 血管	凝血	抗凝血劑, 抗-發炎劑	
●Galanin	1	動脈, 心臟, 膀胱	水平衡	抗-利尿, 糖尿病併發症	
●激素蛋白質		腦, 胰臟	神經遞質	鎮痛, 阿滋海默氏症	
●濾泡刺激激素	1	卵巢, 睪丸	內分泌	不孕	
●促黃體激素-絨膜促性腺激素	1	卵巢, 睪丸	內分泌	不孕	
●促甲狀腺激素	1	甲狀腺	內分泌	甲狀腺疾病, 新陳代謝	
●(紫紅)視蛋白					
●視蛋白	5	眼	光的感受	眼疾	
●嗅	4(~1000)	鼻	嗅覺	嗅覺疾病	
●類前列腺素					
●前列腺素	5	動脈, 胃腸	血管擴張, 疼痛	心血管, 鎮痛	
●溶血磷脂酸	2	血管, 心臟, 肺	發炎	癌症, 抗炎	
●神經鞘氨醇-1-磷酸酯	2	大多數細胞	細胞增殖	癌症	
●白三烯	1	白血球, 支氣管	發炎	氣喘, 類風濕性關節炎	
●前列環素	1	動脈, 胃腸	血小板調控	心血管	
●凝血噁烷	1	動脈, 支氣管	血管收縮	心血管, 呼吸	
●類核苷酸					
●腺苷	4	血管, 支氣管	多重作用	心血管, 呼吸	
●嘌呤受體	4	血管, 血小板	放鬆肌肉	心血管, 呼吸	
●大麻	2	腦	感覺接收	鎮痛, 記憶	
●血小板活化因子	1	大多數周邊組織	發炎	抗炎, 抗氣喘	
●類促性腺激素釋放激素					
●促性腺激素釋放激素	1	生殖器官, 腦下垂體	生殖	前列腺癌, 子宮內膜異位症	
●促甲狀腺素-釋放激素	1	腦下垂體, 腦	甲狀腺調控	新陳代謝調控	
●生長激素-抑制因子	1	胃腸	神經內分泌	腫瘤學, 阿滋海默氏病	
●黑色素	1	腦, 眼, 腦下垂體	神經內分泌	生理循環之調控	

圖 1

*II類
類分泌活素

●分泌活素	1	胃腸，心臟	消化	肥胖，胃腸
●降血鈣素	1	骨骼，腦	鈣再吸收	骨質疏鬆症
●促皮質(激素)釋放因子/尿皮質素	1	腎上腺，血管，腦	神經內分泌	壓力，情緒，肥胖
●胃抑制肽(GIP)	1	腎上腺，脂肪細胞	糖/脂肪代謝	糖尿病，肥胖
●胰高血糖素	1	肝，脂肪細胞，心臟	糖原異生作用	心血管
●類胰高血糖素肽1(GLP-1)	1	胰臟，胃，肺	糖原異生作用	心血管，糖尿病，肥胖
●生長激素-釋放激素	1	腦	神經內分泌	生長調控
●促甲狀腺激素	1	骨骼，腎	鈣調控	骨質疏鬆症
●PACAP	1	腦，胰，腎上腺	新陳代謝	代謝調控
●血管活性腸多肽(VIP)	1	胃腸	活動力	胃腸
*III類				
●促代謝穀胺酸鹽/胺	7	腦	感覺接收	聽，視覺
●GABA _B	1	腦	神經遮質	情緒失調症
●細胞外鈣敏化因子	1	副甲狀腺，腎，GI道	鈣調控	白內障，GI腫瘤

圖 1

G蛋白質-偶合的受體
(分成A類或B類)

1. A1腺苷受體[人類], 編號AAB25533
npivyafriqkfrvtflkiwndhfrqppappedlpcerpdd
A類
2. 腎上腺素能, α -1B-, 受體[人類], 編號NP_000670
npiiypcsskefkrafvrlgcqcrgrgmnmrrlggcaytyrptwtrggslersq:rkdslddsgscslsgsqrtlpsaspspylgrgap
ppvelcafpwkapgallsipapcpgrgrhdsgplftfklltepspgtdggasnggceaaadvangqpqgksnmplapggf
A類
3. 腎上腺素能受體 α -2A[人類], 編號AAG00447
npviytfmhdfirafkkilcrgdrkriv
A類
4. α -2B-腎上腺素能受體-人類, 編號A37223
npviytfmqdfirafirilcrpwtqtaw
A類
5. α -2C-腎上腺素能受體-人類, 編號A31237
npviytfvqdfirpsfkhlfrmgfrq
A類
6. β -1-腎上腺素能受體[人類], 編號NP_000675
npiiycrspdfrkafqglccarraarrhathgdrpragclarpgpppspgaaasdddddvvgatpparllpewagcnggaaads
dssldpcrpgfaseskv
A類
7. β -2腎上腺素能受體, 編號P07550
npliyrcspdfriaqellclrrsslkayngyssngmtgeqsgyhyeqekenkllcedlpgetdfvghqgtvpsdnidsqgmcsnd
sll
A類
8. 多巴胺受體D1[人類], 編號NP_000785
npiiyafnadfrkafstllgcyrpcatmnaietvsinnngaamfsshheprgsiskecnylyliphavgseddllkeesaagiaplekls
palsvildydtvslckipitqngqbpt
A類
9. D(2)多巴胺受體, 編號P14416
npiiyttfnicfrkafkllhc
A類

圖2

10. d3多巴胺受體-人類, 編號G01977
npviyttfniefkafkils
A類
11. 多巴胺受體D4-人類, 編號DYHUD4
npviytfvnaefmrvfrkalracc
Class A
12. 多巴胺受體D5-人類, 編號DYHUD5
npviyafnadfqkvfaqlgcsfhcsrtptvctvnisnelisynqdivfhkeiaaayihmmpnavtpgnrevdndecogpfdmrfqi
yqtspdgdpvaesvweldcegeisldkitpftpngfh
A類
13. 草毒鹼的乙醯膽鹼受體M1[人類], 編號NP_000729
npmcyalcnpkafdrtdfrlllcrwdkrrwrkipkrpgsvhrtpsraqc
A類
14. 草毒鹼的乙醯膽鹼受體M2[人類], 編號NP_000730
npacyalcnatfkktfkhlmlmchyknigatr
A類
15. 草毒鹼的乙醯膽鹼受體M3[人類].
npvcyalcnktrftttfkmlllcqcdkkrkqyqqrsvfthkrapeqal
A類
16. 草毒鹼的乙醯膽鹼受體M4[人類], 編號NP_000732
npacyalcnatfkktfrhlmlcqymigtar
A類
17. m5草毒鹼受體。所在HUMACHRM編號AAA51569
npicyalcnrtrfkttfkmlllcrwkkkkveeklywqgnsklp
A類
18. 5-羥基色胺(血清張力素)受體1A[人類], 編號BAA90449
npviyayfnkdfqnatfkkiickf
A類
19. 5-羥基色胺(血清張力素)受體1B[人類], 編號BAA94455
npiiytmsnedfkqafhklirfkcts
A類
20. 5-羥基色胺(血清張力素)受體1E[人類], 編號BAA94458
npillytsfnedfklaflklircr
A類
21. 嗅覺受體6A1, 編號095222

圖2

- npiiyclmqevkralccühlyqhqdppkkgsmv
A類
22. 嗅覺受體2C1, 編號095371
npliytlrnmekgalrrllgkgrevg
A類
23. 血管收縮素受體1[人類], 編號NP_033611
nplfygflgkfkryflqllkyippkakshsnlsdkmsdlsyrpsdnvsssttkpapcfve
B類
24. 血管收縮素受體2[人類], 編號NP_000677
npflycfvgnrfqqklrsvfrvpitwlqgkresmscrkssslremetfvs
B類
25. 間白素8受體β(CXCR2)[人類], 編號NM_001557
NPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLKDSRPSFVGSSSGHTSTTL
B類
26. cx3c化學激肽受體1(cx3cr1)(fractalkine受體)
編號P49238
npliyafagckfrylyhlygkclavlcgrsvhvdffssesqsrhgsvlssnftyatsdgdallll
B類
27. 神經收縮素受體-人類, 編號S29506
n pilynlvsanfihlflatlacipvwrrrkrapfsrkadsvssnhflssnatrey
B類
28. P物質受體(SPR)(NK-1受體)(NK-1R)編號P25103
npiiyccldnrfrlgfkhafrccpfasagdyeglemkstrylqtqgsvykvsrlctistvgaheepedgpkarpssldltsncssrsd
sktrntesfsssnvls
B類
29. 血管加壓素受體2型[人類], 編號AAD 16444
npwiyasfsssvsselsllccargrtppslgpqdescitassslakdts
B類
30. 促甲狀腺素-釋放激素受體-人類, 編號JN0708
npviynlmsqkfraafklcnckqkptekpanysvalnysvikesdhfselddirvtdrylsafkvsfddtclasevvsfsqs
B類
31. 催產素受體-人類, 編號A55493
npwiymlftghlfhelvqrfccsasyllgrrlgtsaskksnsssfvlshrssscrcsqpsta
B類

圖2

32. 神經介質U受體1[人類], 編號AAG24793
npvlyslmssrfretfqaclcgacchrlrprhssshslsrmttgstlcdvgsigswvhplagndgpeaqgetdps
B類
33. 胃激素受體, 編號AAC37528
nplvyafmhrfrfqaclelcarceprpprarpralpdedpypsiassrlsyttistlgpg
B類
34. 甘丙肽受體3[人類], 編號10879541
nplvyalasrhfrfrlwpcegrmrhraralrtrpassgppgpcgdarpsgrllaggqgqpcprcgvhggeaargpe
A類
35. edg-1-人類, 編號A35300
npiiytltnkemrrafmrmscckcpgdsagkfkpiagmefsrsksdnsshpqkdegdnpetimssgnvnss
A類
36. 中樞類大麻受體[人類], 編號NP_057167
npiiyalrskdlrhafmrmscckcpgdsagkfkpiagmefsrsksdnsshpqkdegdnpetimssgnvnss
A類
37. δ 類鴉片受體-人類, 編號I38532
npvlyafidenfkrfrqlcrkpcgrdpssfsrpreatarervtactpsdgpqgggraa
A類
38. 蛋白酶活化之受體2(PAR-2)人類, 編號P55085
dpfvyvfvahdfdbaknallcrsvrtvkqmqvsltskksrksyssssttvktsy
B類
39. 後葉加壓素之腸肽受體(VIPR), 大鼠, 編號NM_012685
NGEVQAELRRKWRRWHLQGVLGWSSKSQHPWGGGNGATCSTQVSMLTRVSPSARR
SSSFQAEVSLV
B類

圖2

	A	B	C
1	GPCR激動劑	學名	商品名
2	5-HT		
3	5-HT-1B/1D	佐米曲普坦	佐米克
4		利扎曲普坦	Maxalt
5		依來曲普坦	Relpax
6		三唑酮	Desyrel
7	5-HT-1D	舒馬普坦	Imitrex (P)
8		納拉普坦	Amerge
9		阿莫曲坦	Axert
10	5-HT-1B/1A	夫羅曲坦	Frova
11			
12	5-HT-1A	丁螺旋酮	BuSpar
13	5-HT-1A	丁螺旋酮	Generic
14	5-HT-1A	齊拉西酮	Geodon
15			
16	5-HT-4	替加色羅	Zelnorm
17	5-HT-4	莫沙必利	Gasmotin
18	5-HT-4	普魯普	Propulsid
19			
20	5-HT-2A/2C	氯氮平	Clozaril
21			
22	5-HT-2 / 多巴D1	非莫多旁	Corlopam
23			
24	5-HT/ 類鴉片u	乙醯胺基酚片	Ultram
25	5-HT/ 類鴉片u	乙醯胺基酚片	Ultracet
26	5-HT/ 類鴉片u	乙醯胺基酚片	Generic
27			
28	類鴉片		
29	類鴉片	可待因	Generic
30		氫可體松	Generic
31		氫嗎啡酮	Dilaudid
32		左旋嗎啡	Levo-Dromoran
33		嗎啡	MS Contin
34		嗎啡	Generic
35		羥基二氫特因酮	OxyContin
36		羥基二氫特因酮/APAP	Generic
37		氫嗎啡酮	Numorphan
38		阿芬太尼(Alfentanil)	Alfenta
39		芬太尼	Duragesic
40		芬太尼	Sublimaze
41		嗎啡	Demarol
42		舒芬太尼	Sufenta
43		乙醯美沙酮	Orlaam
44		美沙酮	Dolophine
45		丙氧吩	Darvon
46		丁丙諾啡	Transfex
47		瑞芬太尼(Remifentani)	Ultiva
48			
49	5-HT/類鴉片u	乙醯胺基酚片	Ultram
50	5-HT/類鴉片u	乙醯胺基酚片	Ultracet
51	5-HT/類鴉片u	乙醯胺基酚片	Generic
52		圖3, 第1頁	

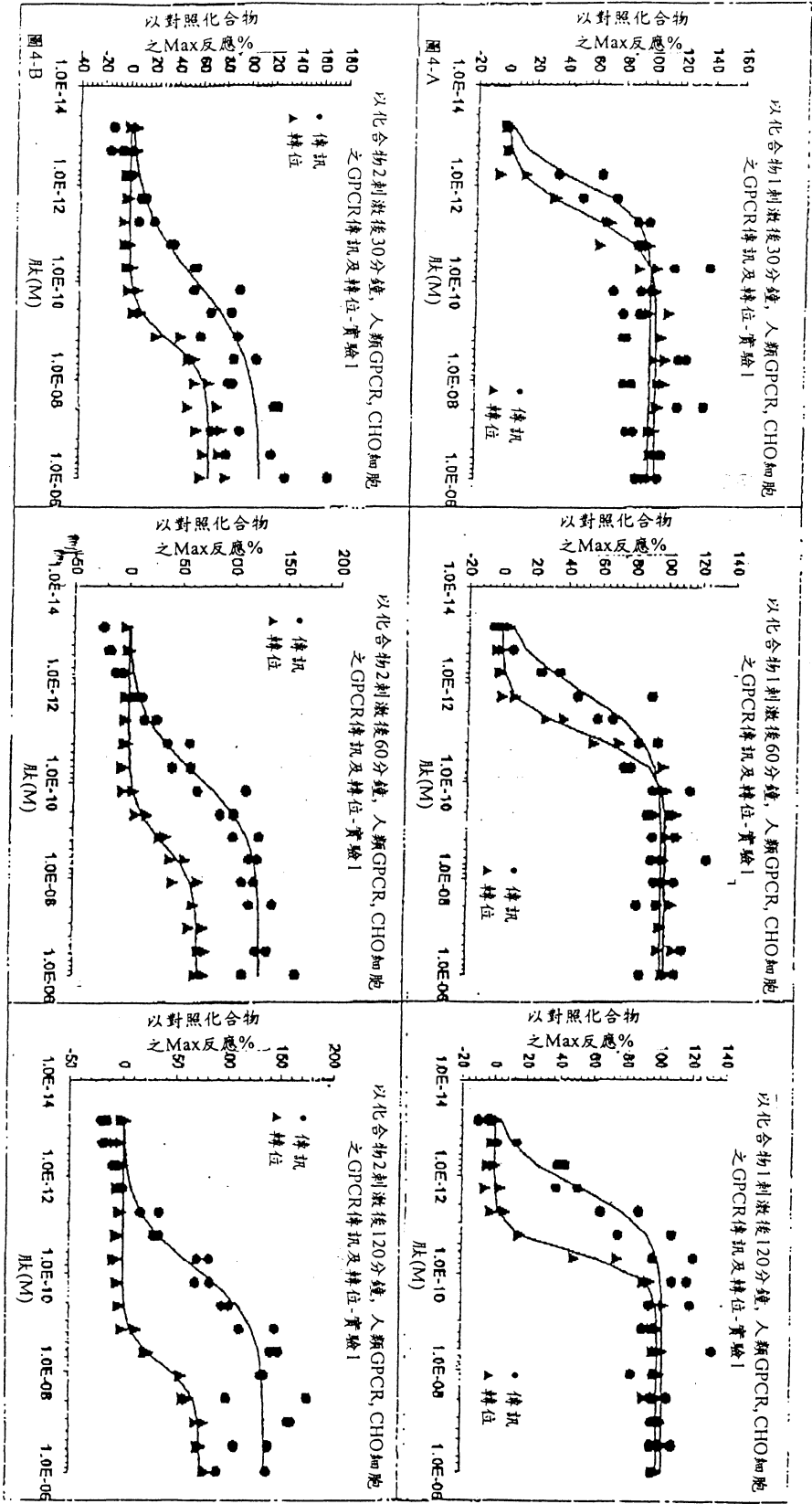
圖3

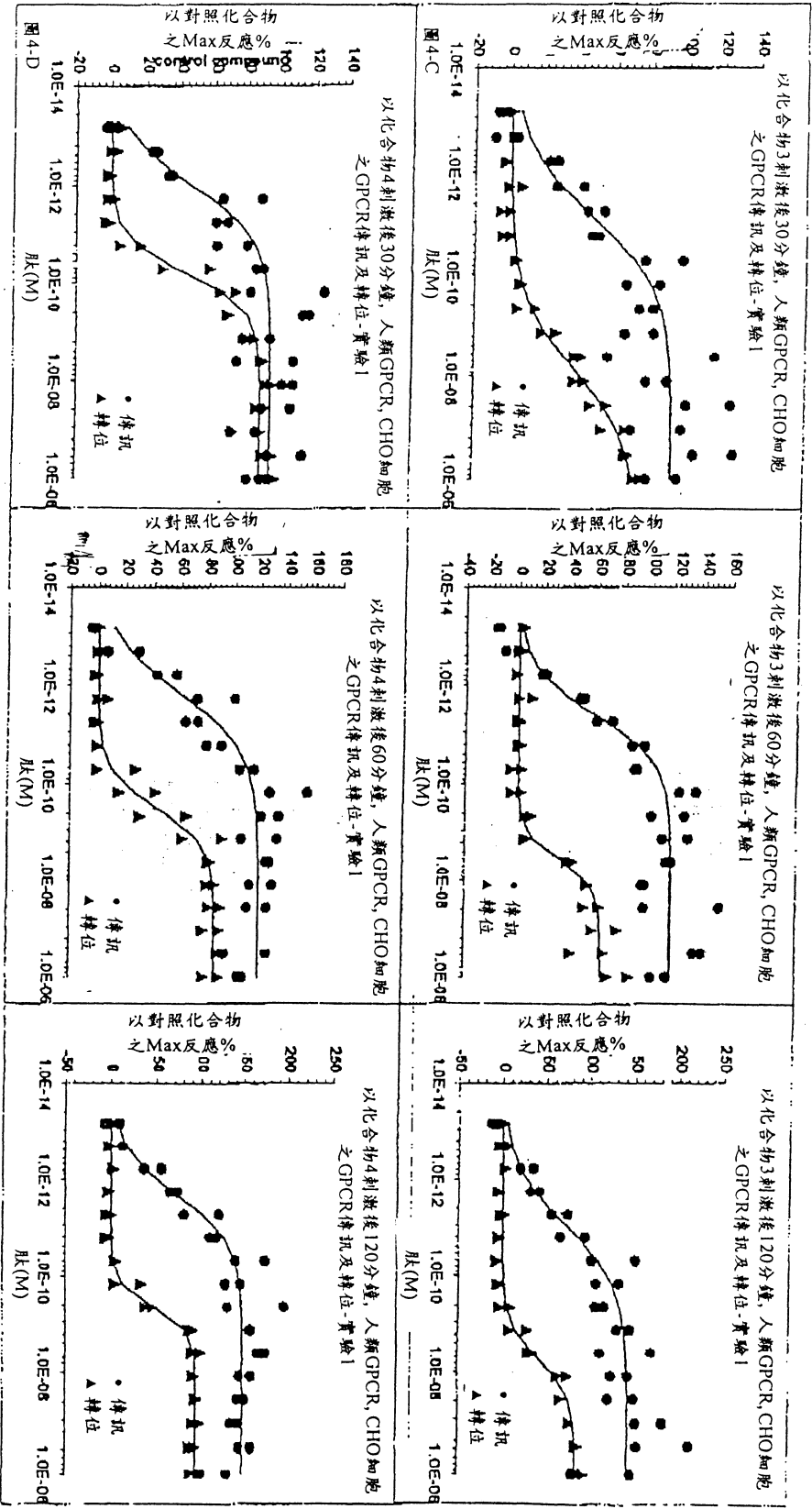
	A	B	C
1	GPCR激動劑	學名	商品名
53	ADO		
54	ADO(混合)	腺苷	Adenocard
55		腺苷	Adenoscan
56			
57	腎上腺受體		
58	腎上腺受體	哌醋甲酯	Generic
59	β (混合)	異丙腎上腺素	Isuprel
60		麻黃素	Generic
61		甲苯丁胺	Wyamine
62	β -1	去甲腎上腺素	Levophed
63			
64	β -2	沙美特羅	Serevent
65		和氣替卡松	Advair
66		舒喘寧, 氣霧劑	Generic
67		舒喘寧, 硫酸鹽	Generic
68		舒喘寧	Proventil
69		比托特羅	Tornalate
70		新異丙腎上腺素	Isoetharine
71		間羟異丙腎上腺素	Alupent
72		吡布特羅	Maxair
73		福莫特羅	Foradil
74		福莫特羅	Oxis
75		舒喘寧	Ventolin HFA
76		班布特若	Bambec
77		沙丁胺醇	Inspiryl Turbuhaler
78		間羟叔丁腎上腺素	Brethine
79		間羟叔丁腎上腺素	Terbutaline
80	H1 (-) / β -2(+)	氯雷他定	Claritin-D
81	H1 (-) / β -2(+)	艾米	Allegra-D
82		間羟叔丁腎上腺素	Brethine
83	α - β (混合)	間羟胺	Aramine
84		腎上腺素	Generic
85	α (混合)	甲氧胺	Vasoxyl
86		苯腎上腺素	Neo-Synephrine
87	α -1	莫達芬尼	Provigil
88		甲氧胺福林	ProAmatine
89			
90	α -2	氯苯醋胺肟	Tenex
91		替扎尼定	Sirdalud CR
92		莫索尼定	Physiotens
93		右美托咪定	Precedex
94		阿發根	Alphagen
95		阿泊可樂定	Iopidine
96		圖3, 第2頁	

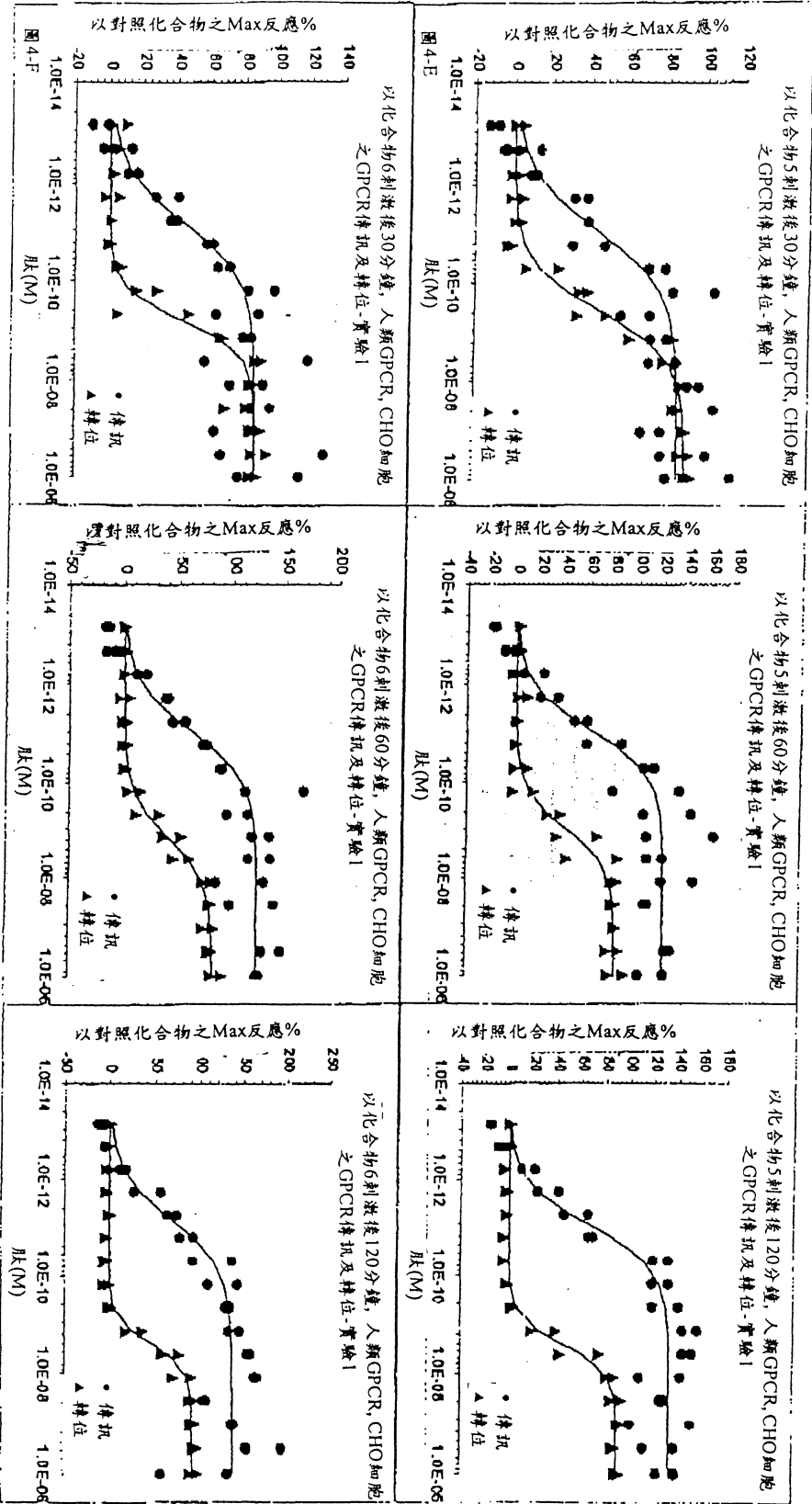
圖3

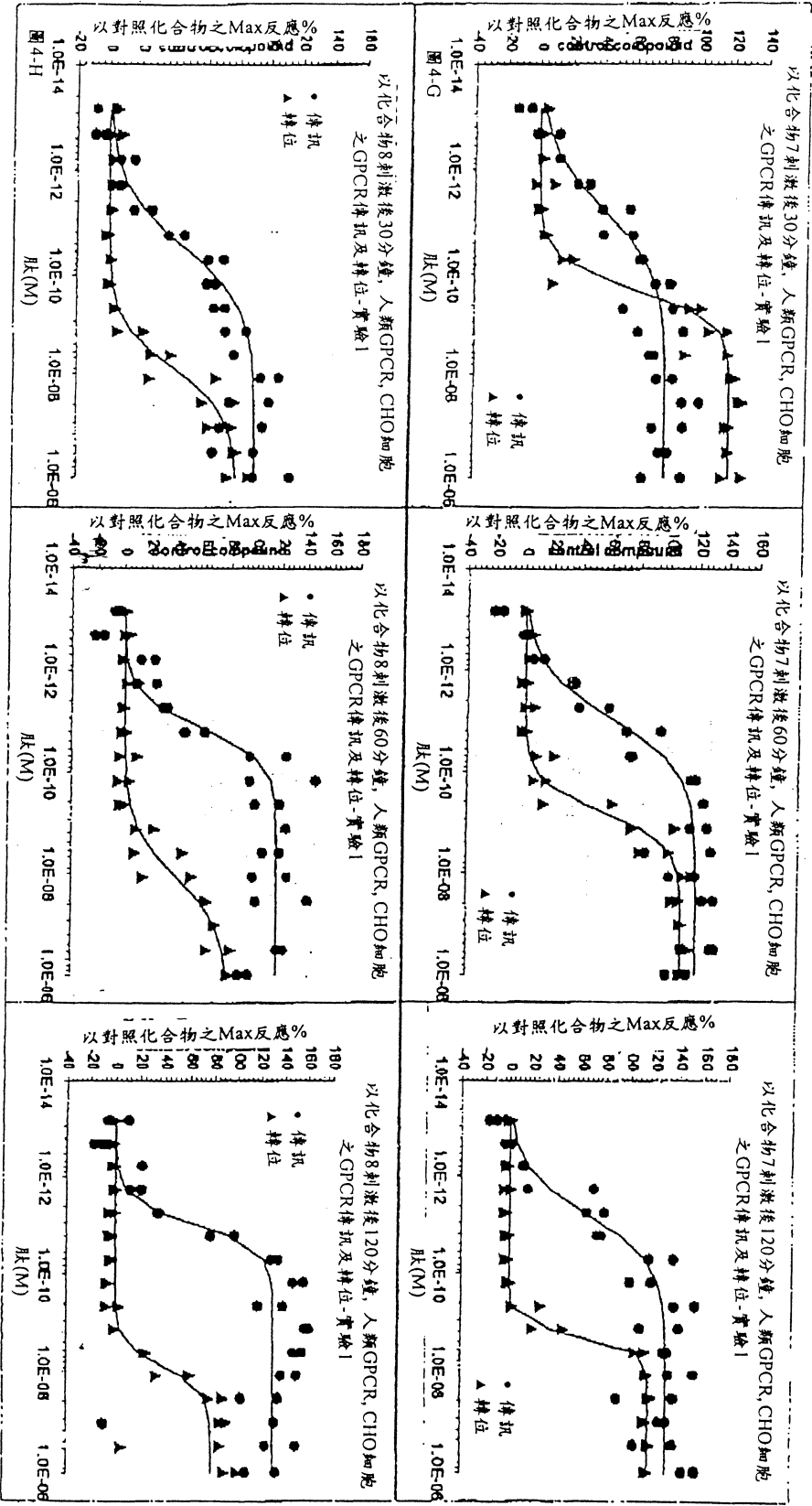
	A	B	C
1	GPCR激動劑	學名	商品名
97			
98	乙硫膽鹼	氯甲硫甲膽鹼	Generic
99	莨菪鹼AC	毛果莨菪鹼	Salagen
100	莨菪鹼AC	左乙拉西坦	Keppra
101			
102	多巴胺		
103	多巴胺(混合)	多巴胺	Intropin
104	D1	非莫多旁(Femoidopam)	Corlopam
105	D2	阿模嗎啉	Ixense
106	D2/D3	羅匹尼羅	Requip
107	D2/D3	米拉帕	Mirapex
108	D2/D3	苄利安	Solian
109	D2 型	溴麥角環肽	Parlodel
110	D1/D2	培高利特	Permax
111			
112	前列腺素F2a (PG F2a)	拉坦前列素	Xalatan
113	前列腺素F2a (PG F2a)	青服平	Travatan
114	前列腺素E1 (PGE1)	勃發	Befar
115			
116	促性腺激素釋放激素 (GnRH)	LHRH激動素	TRELSTAR LA
117	GnRH	亮丙瑞林	Lupron Depot
118			
119			
120	降血鈣素	降血鈣素	
121		圖3, 第3頁	

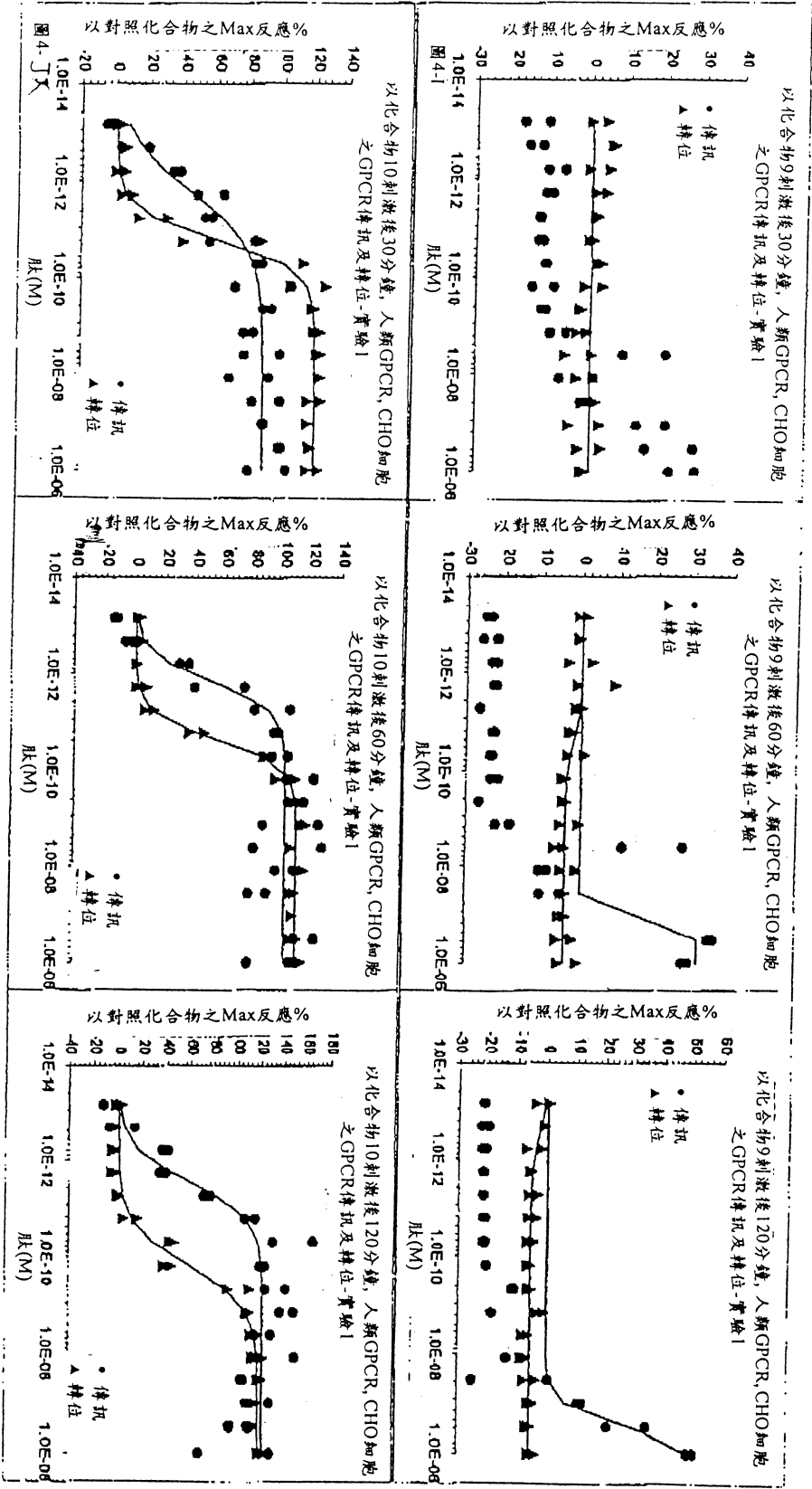
圖3

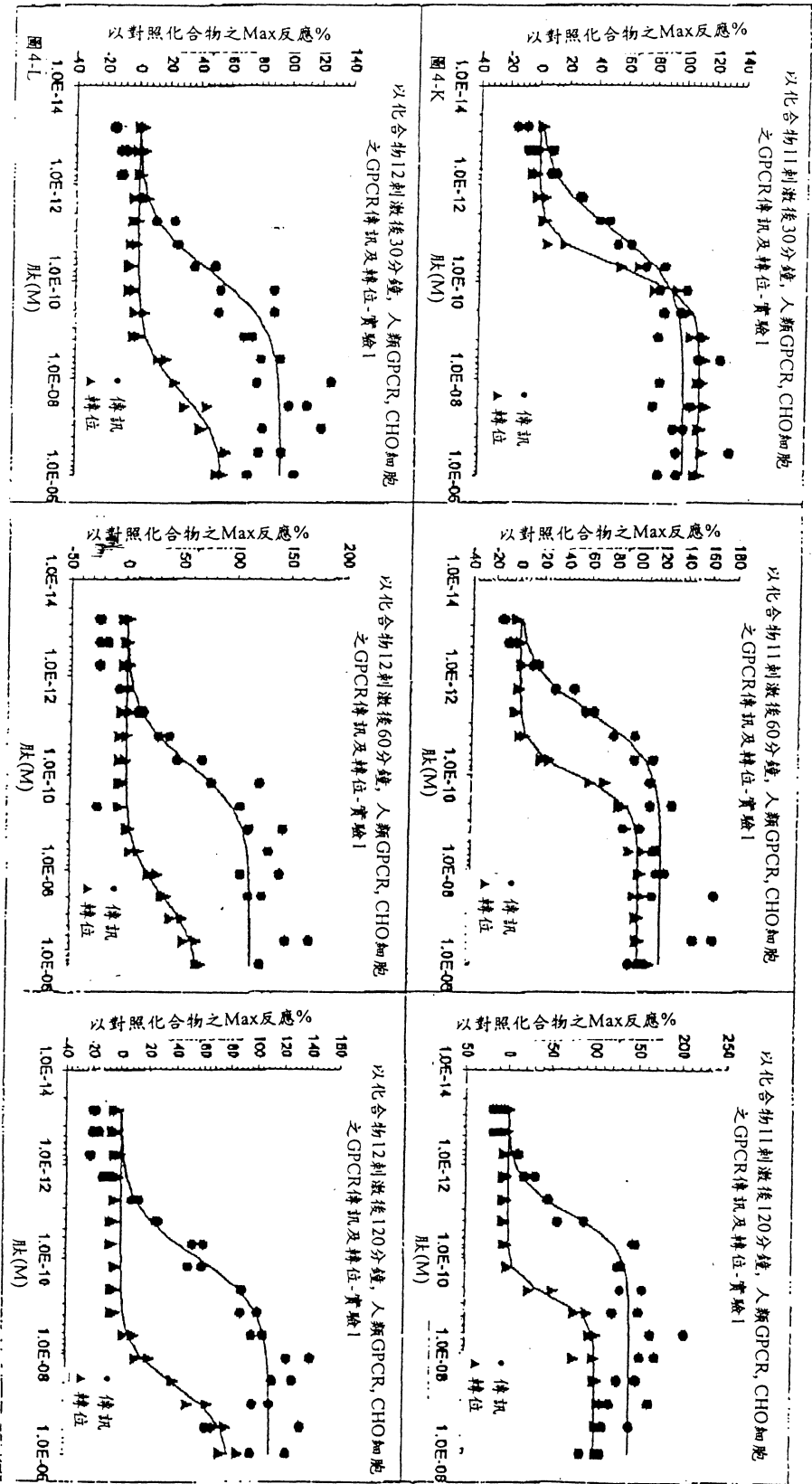


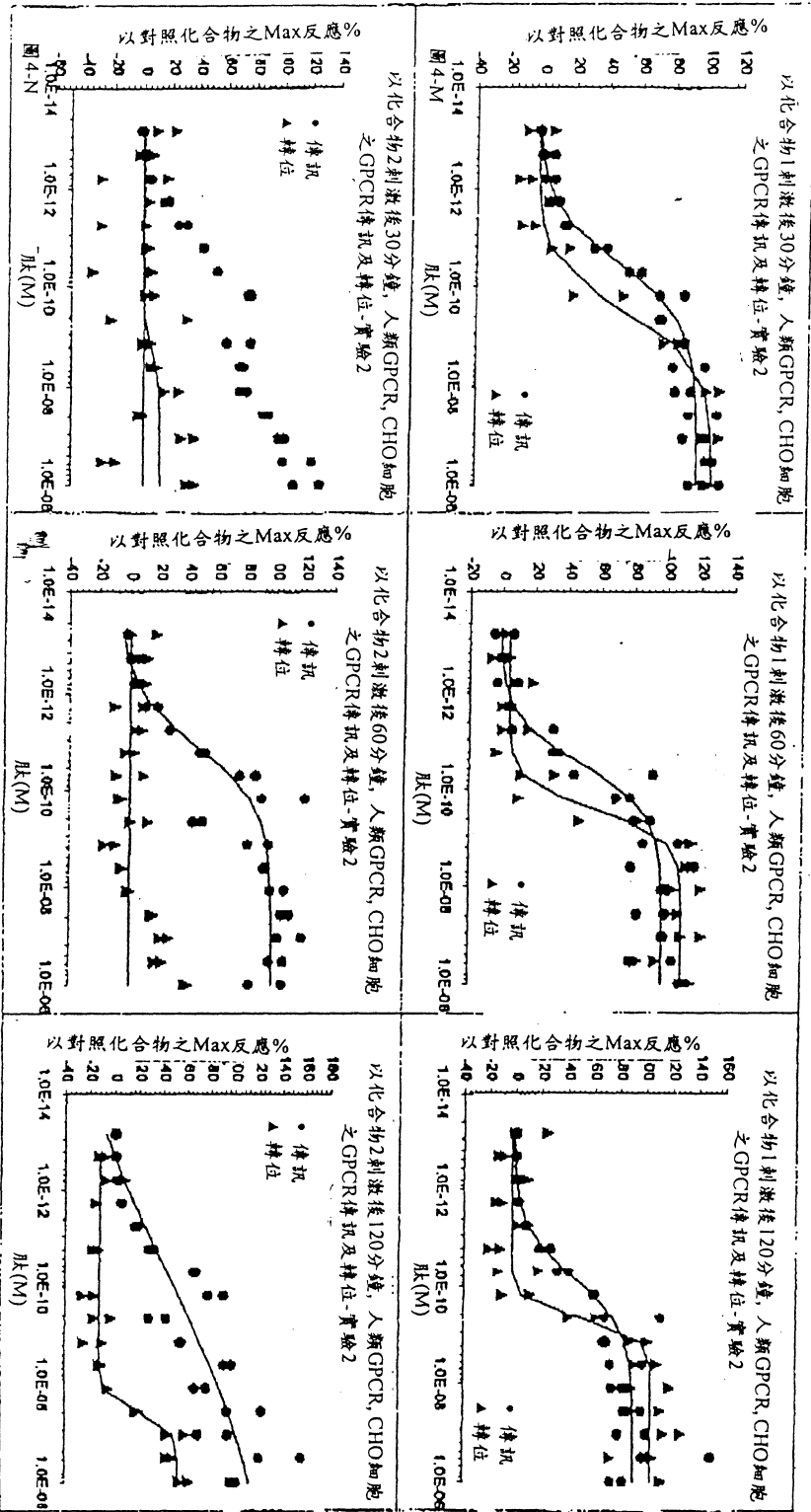


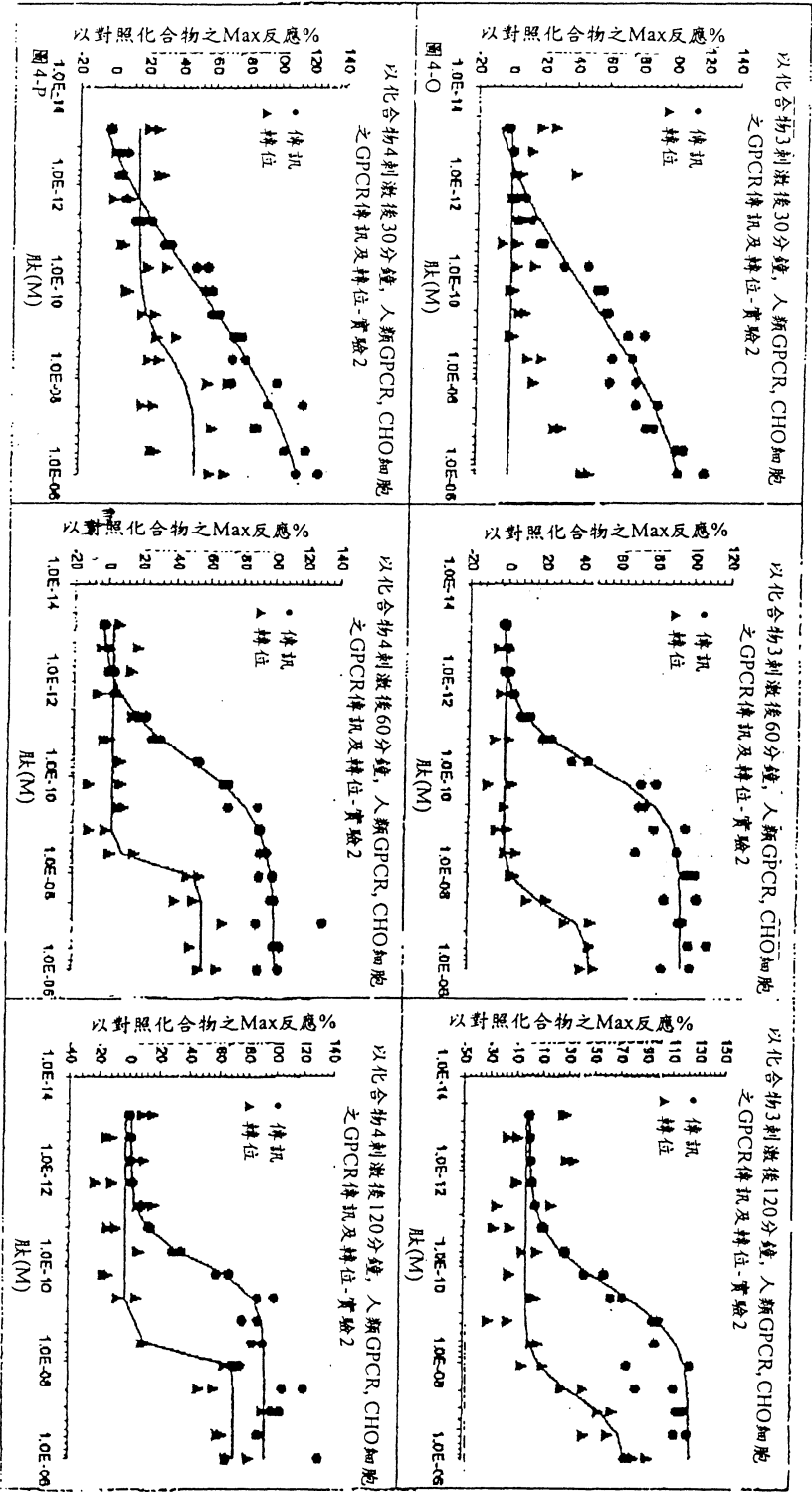


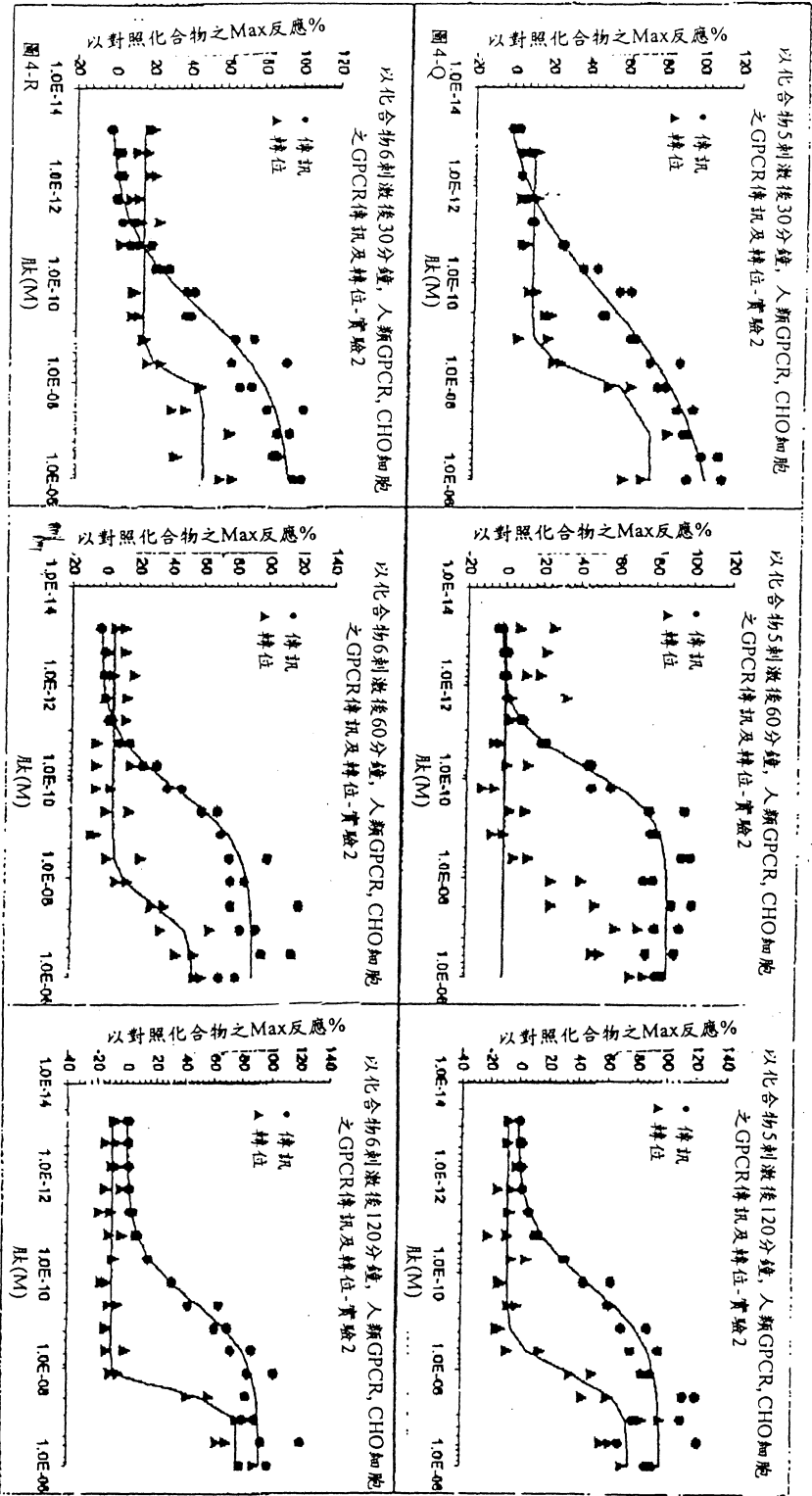


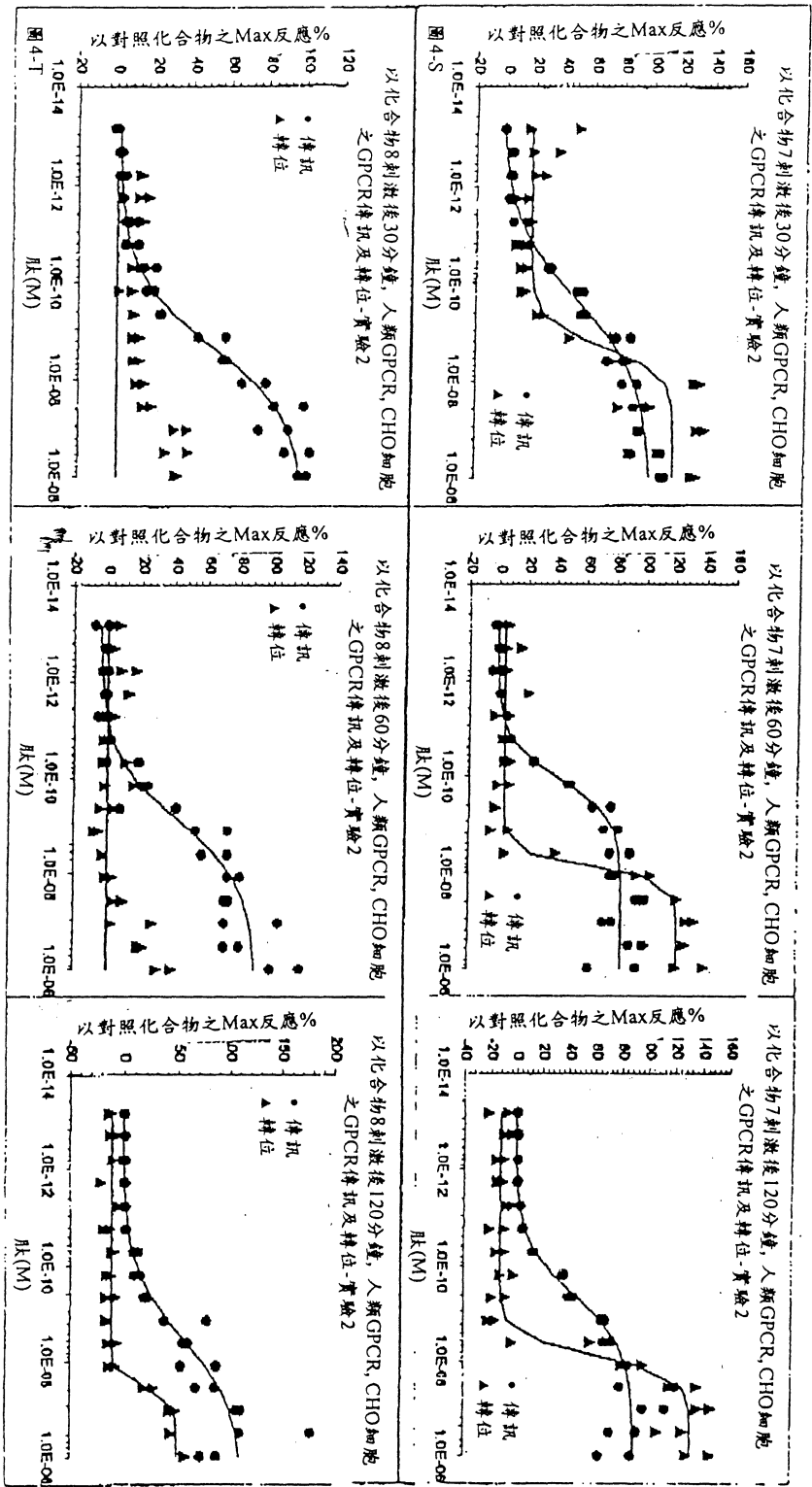


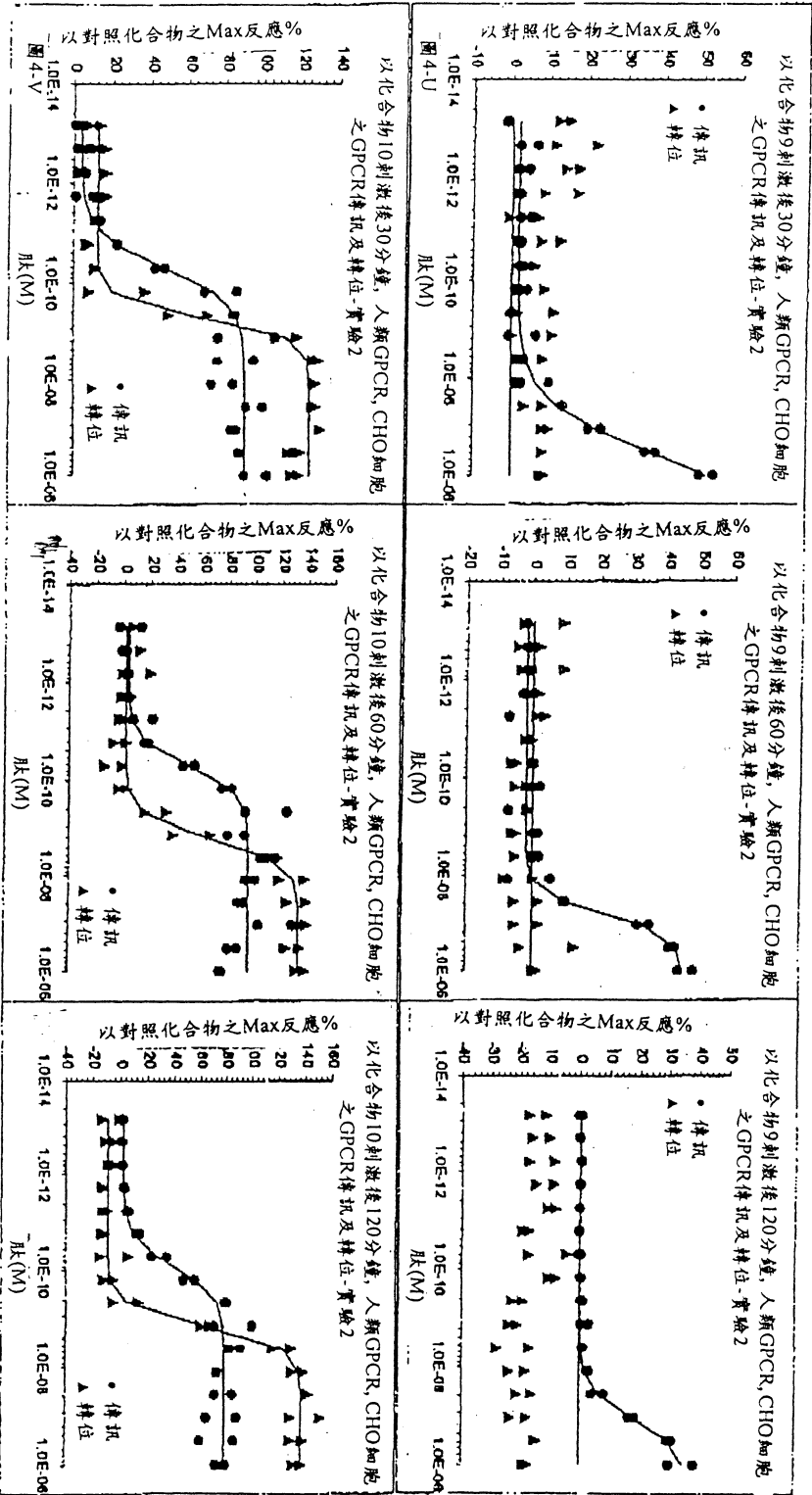


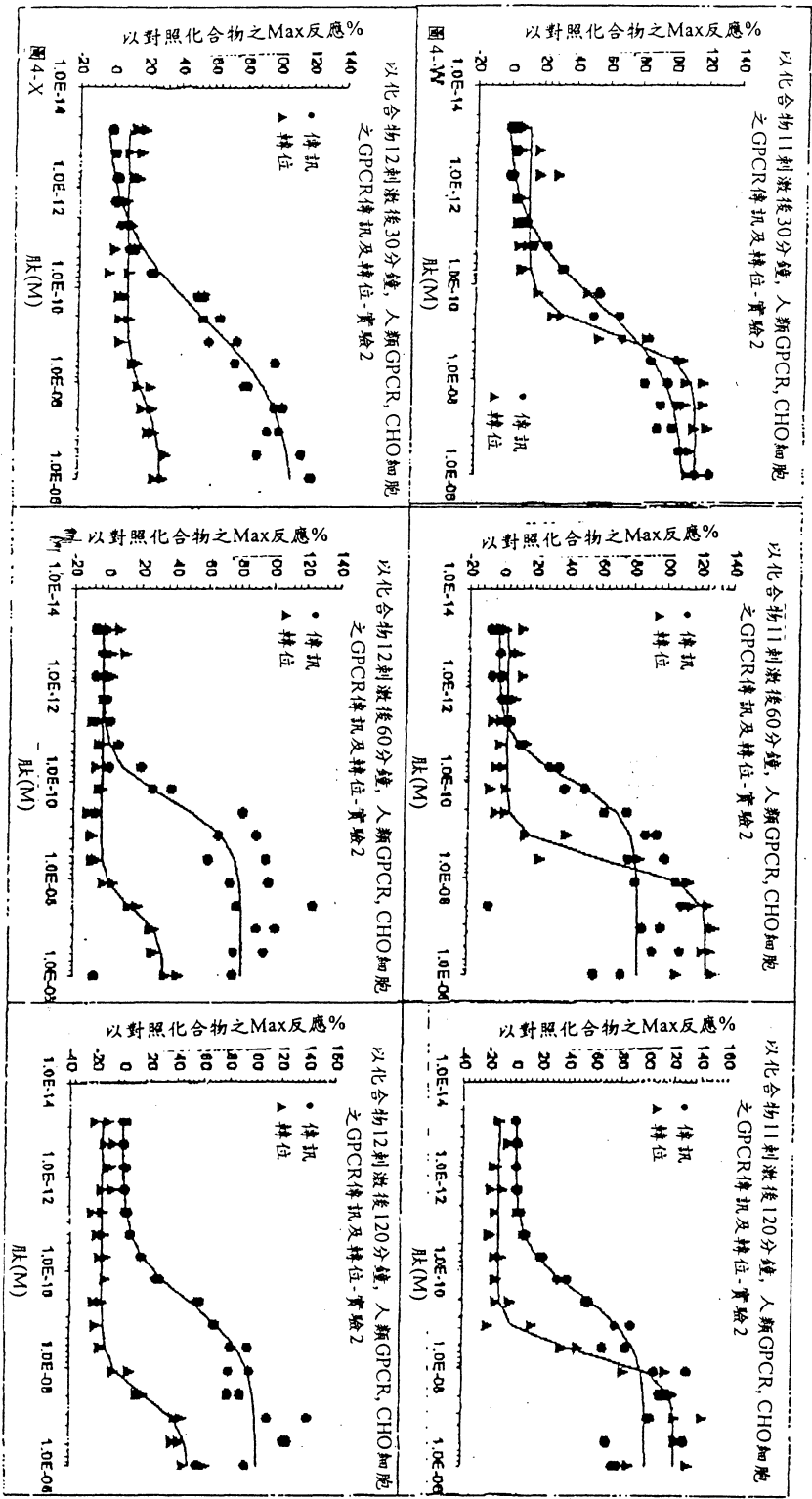


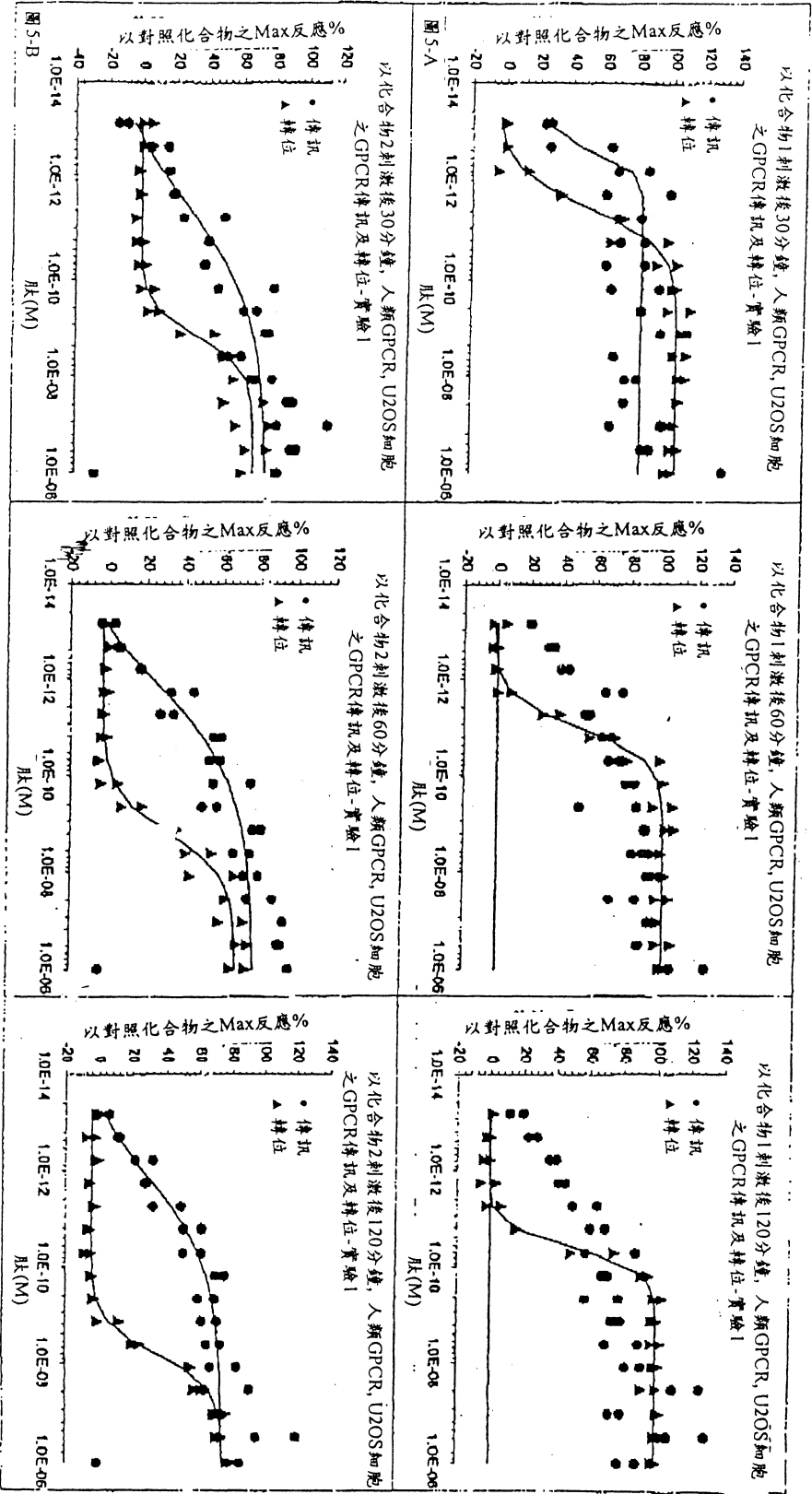


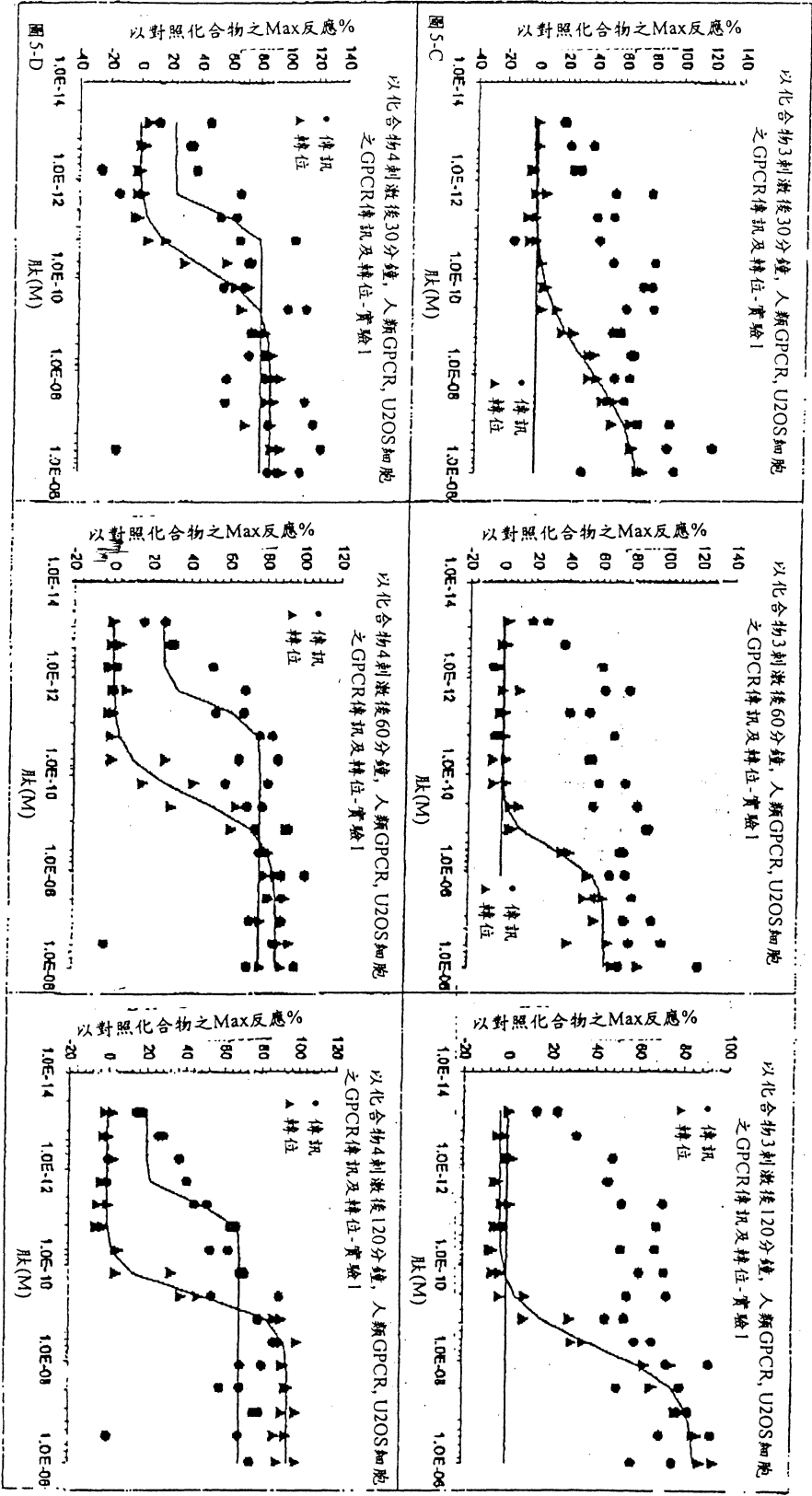


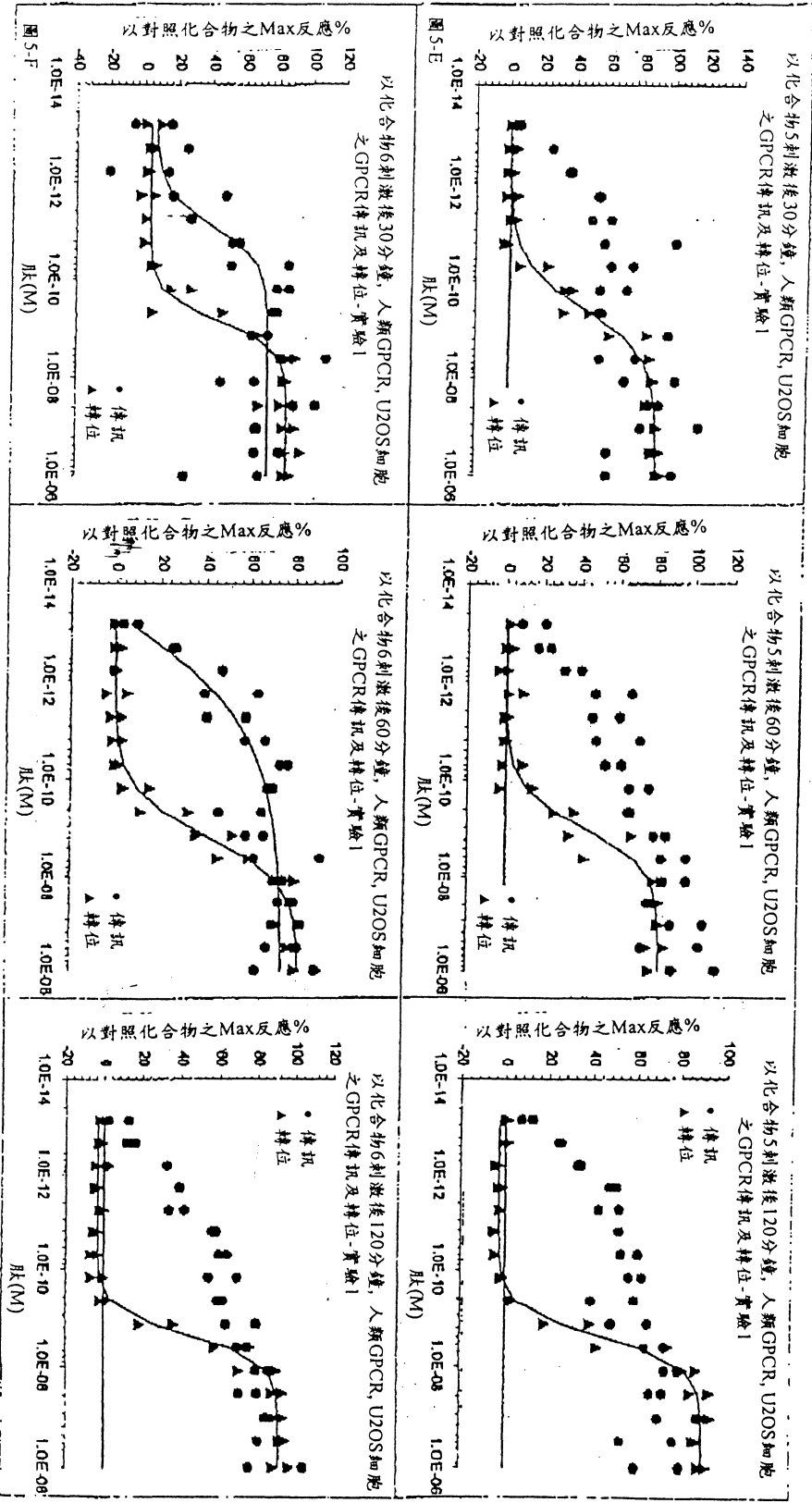


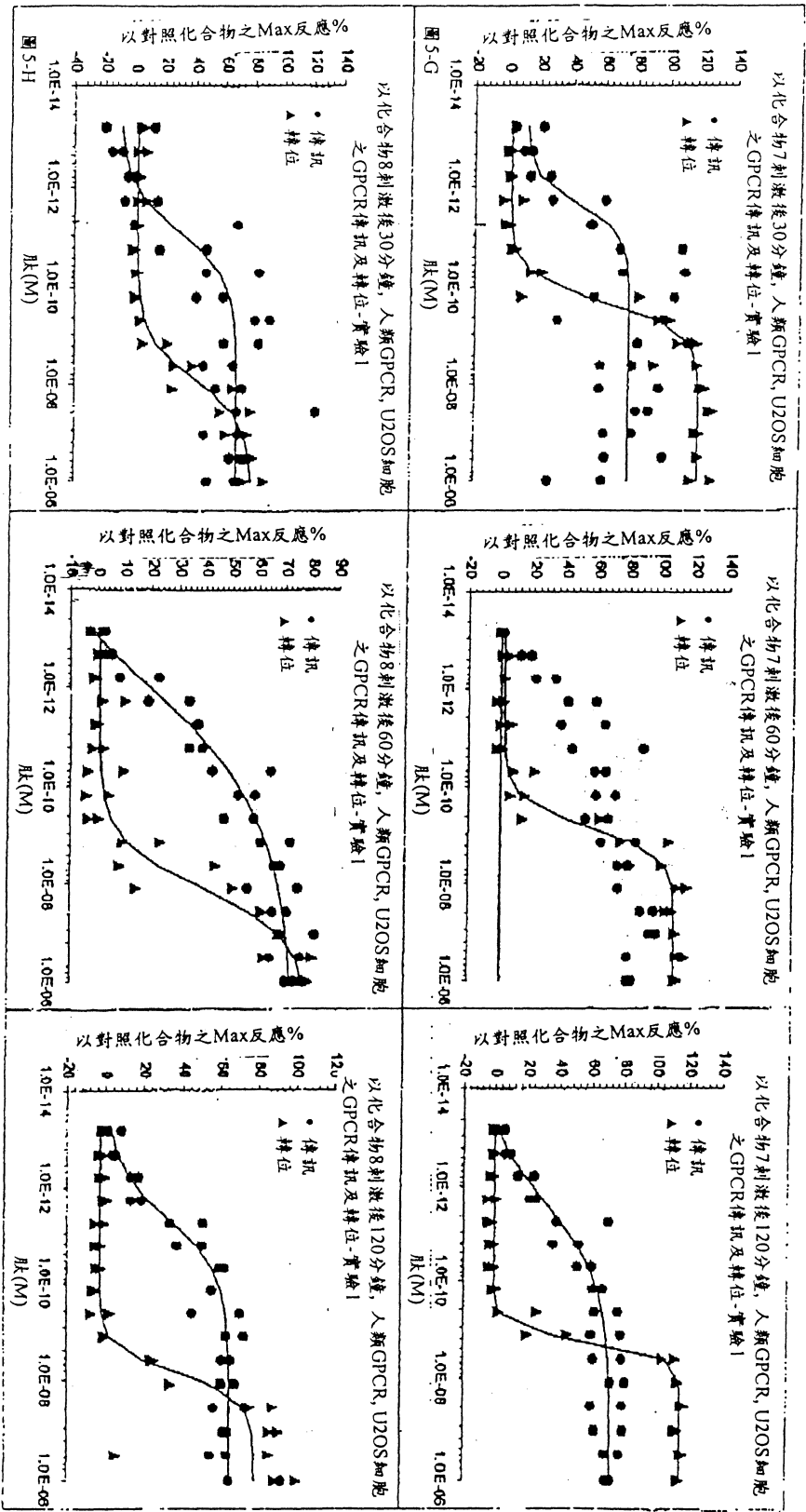


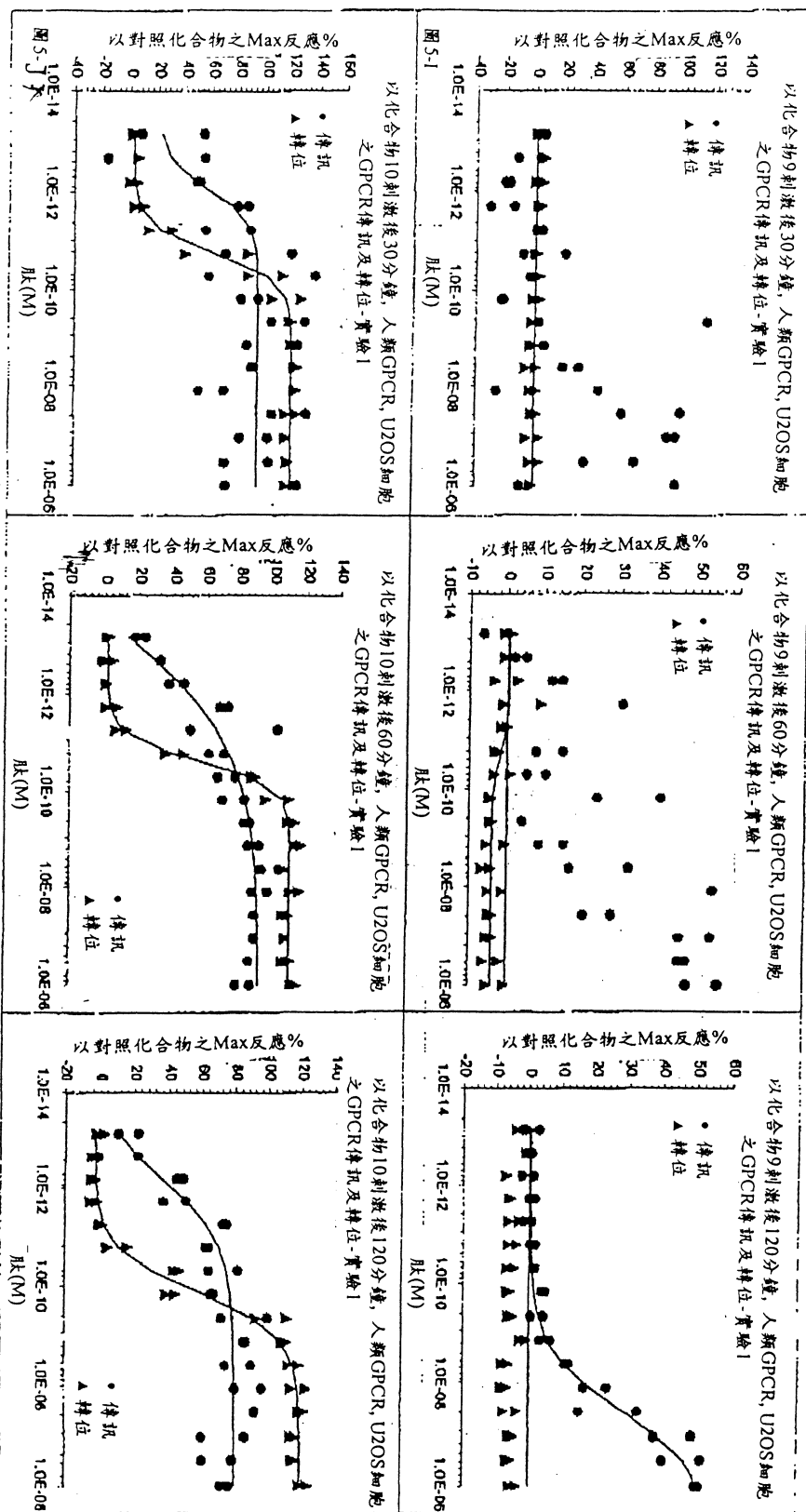


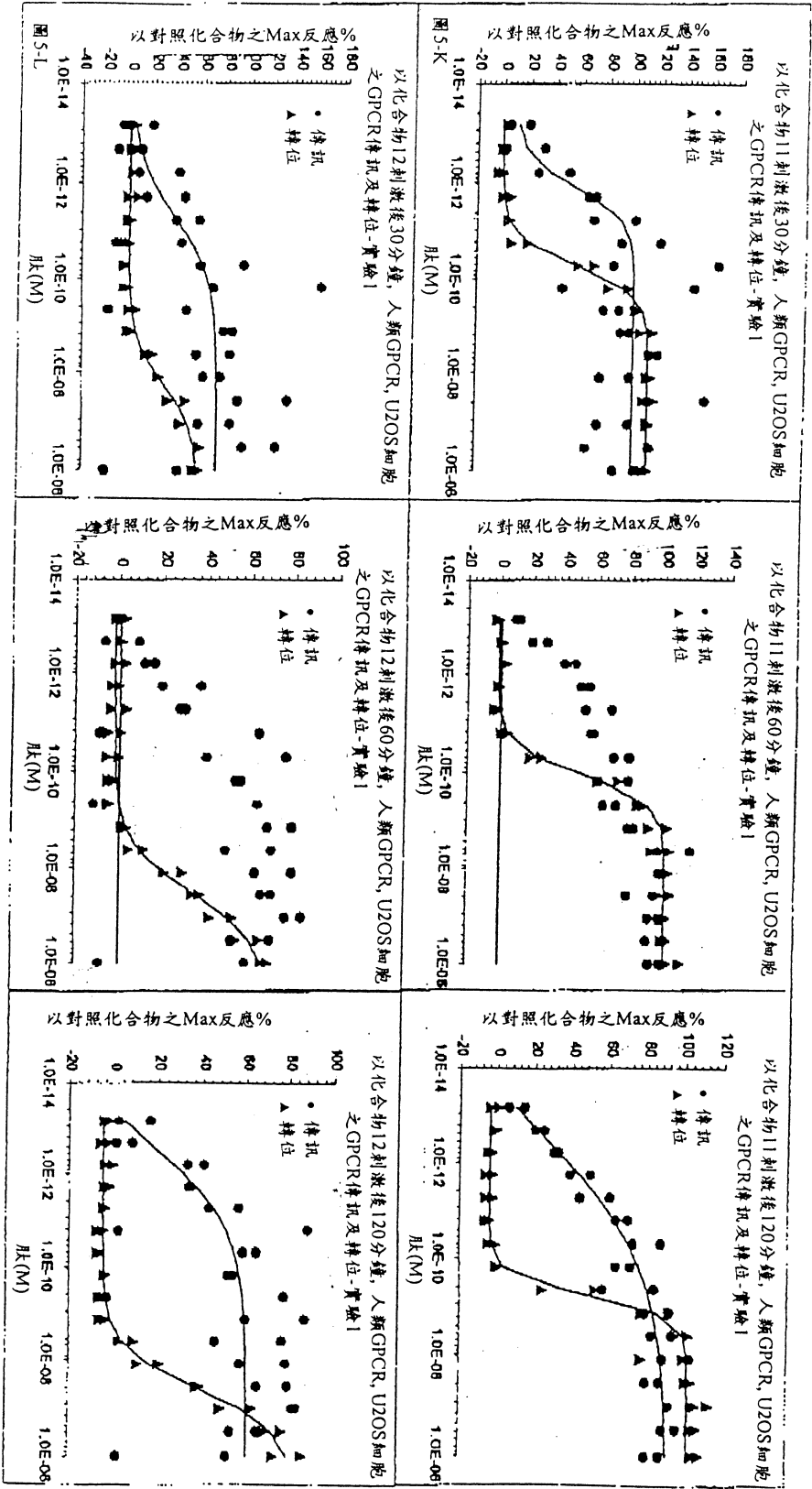


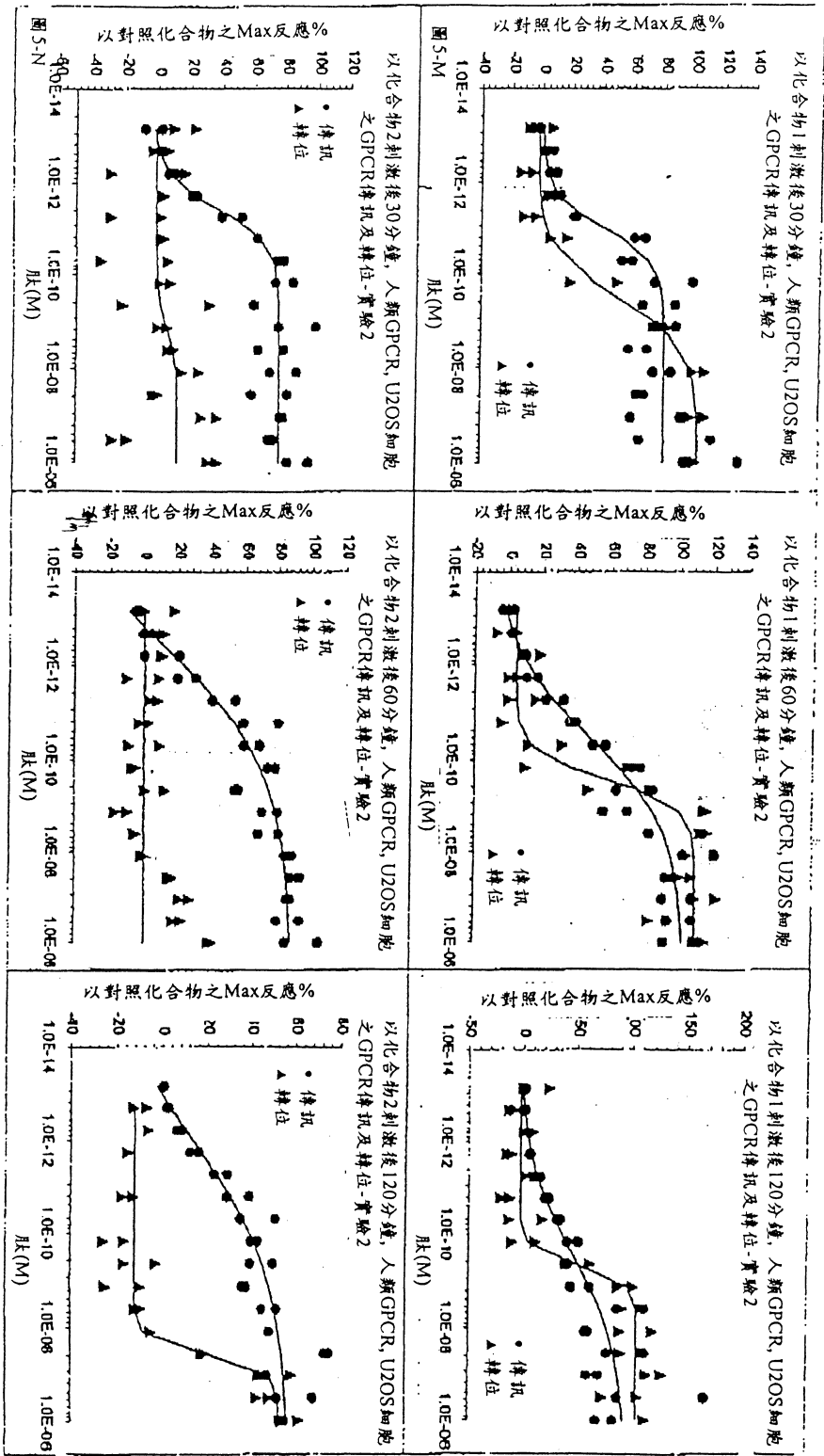


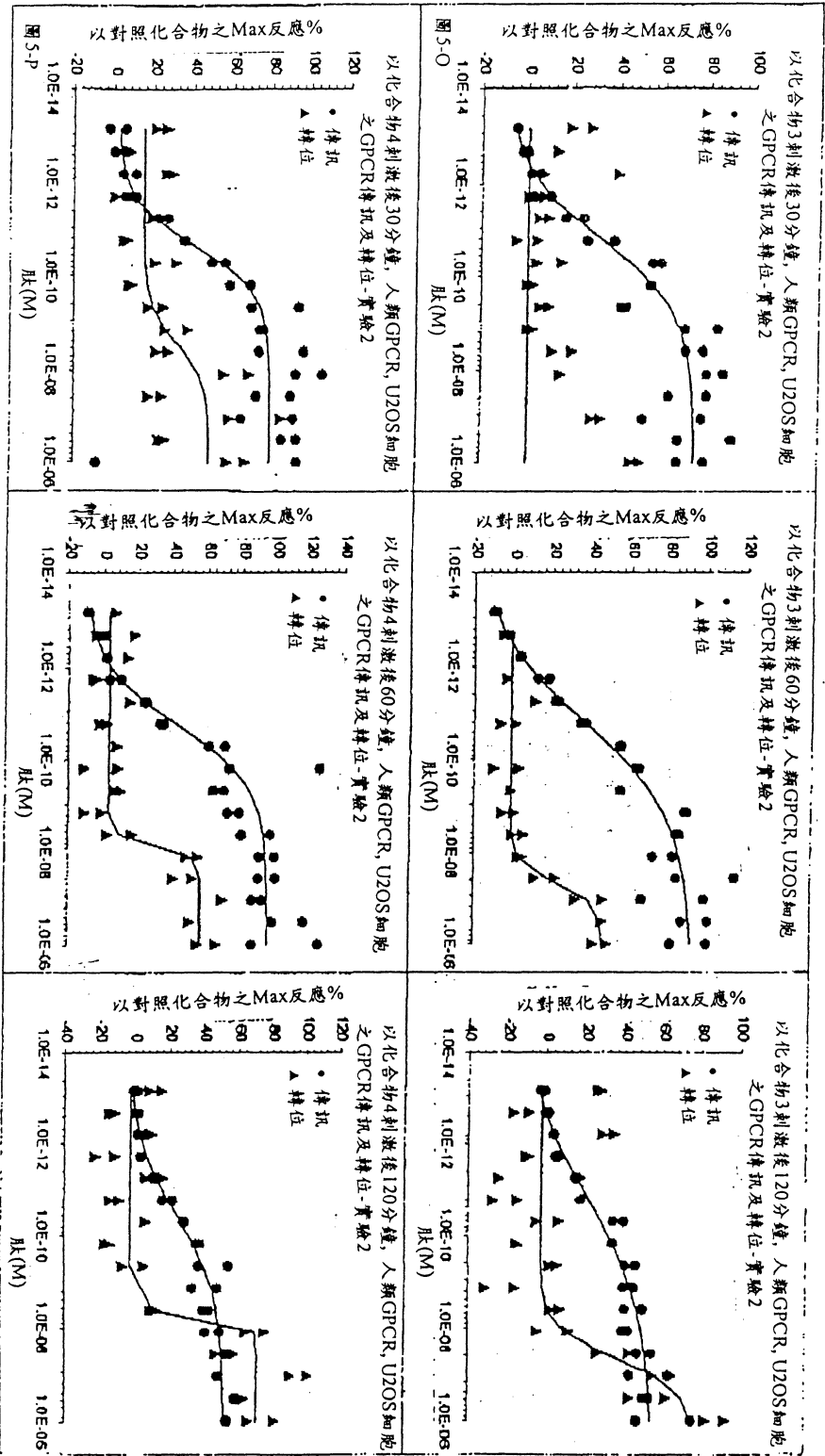


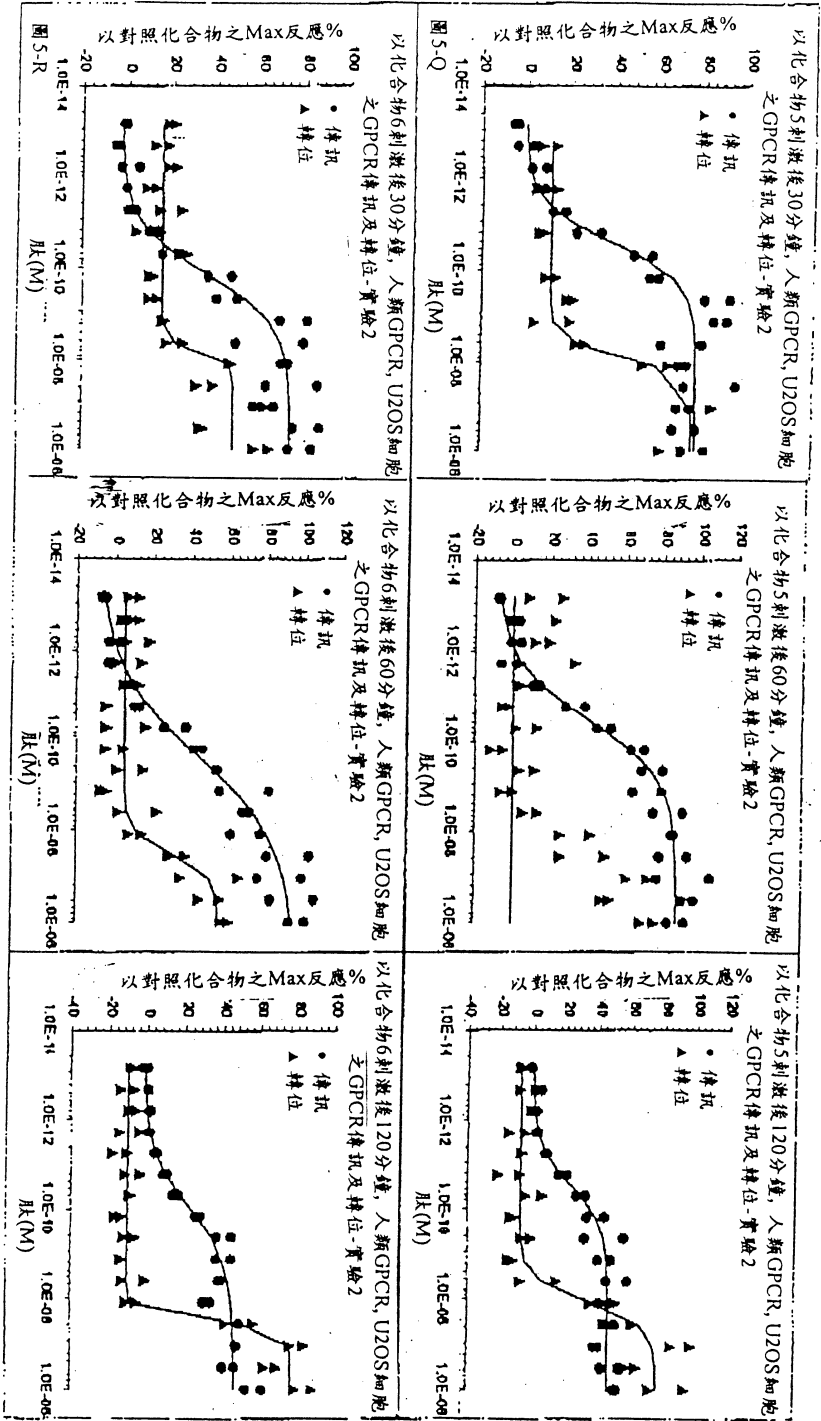


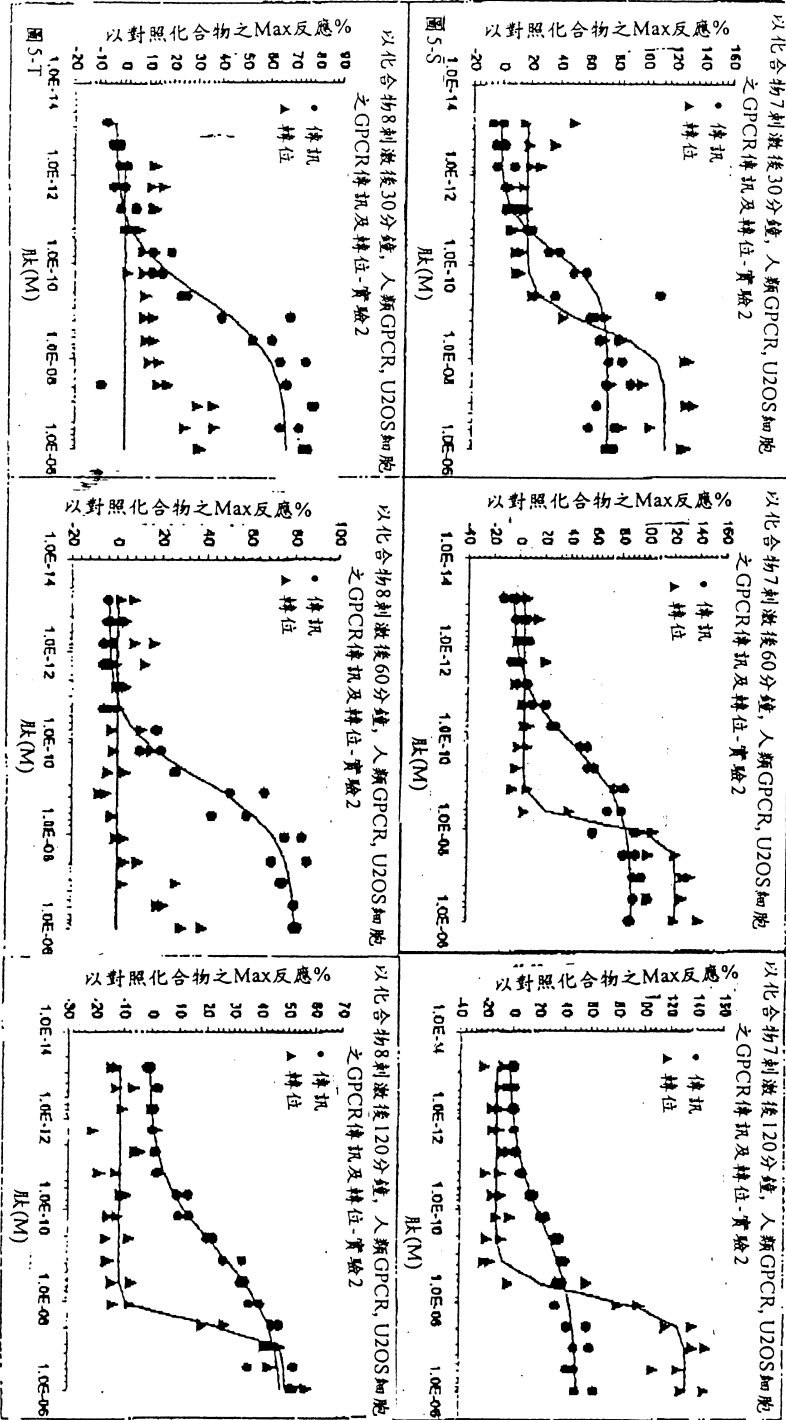


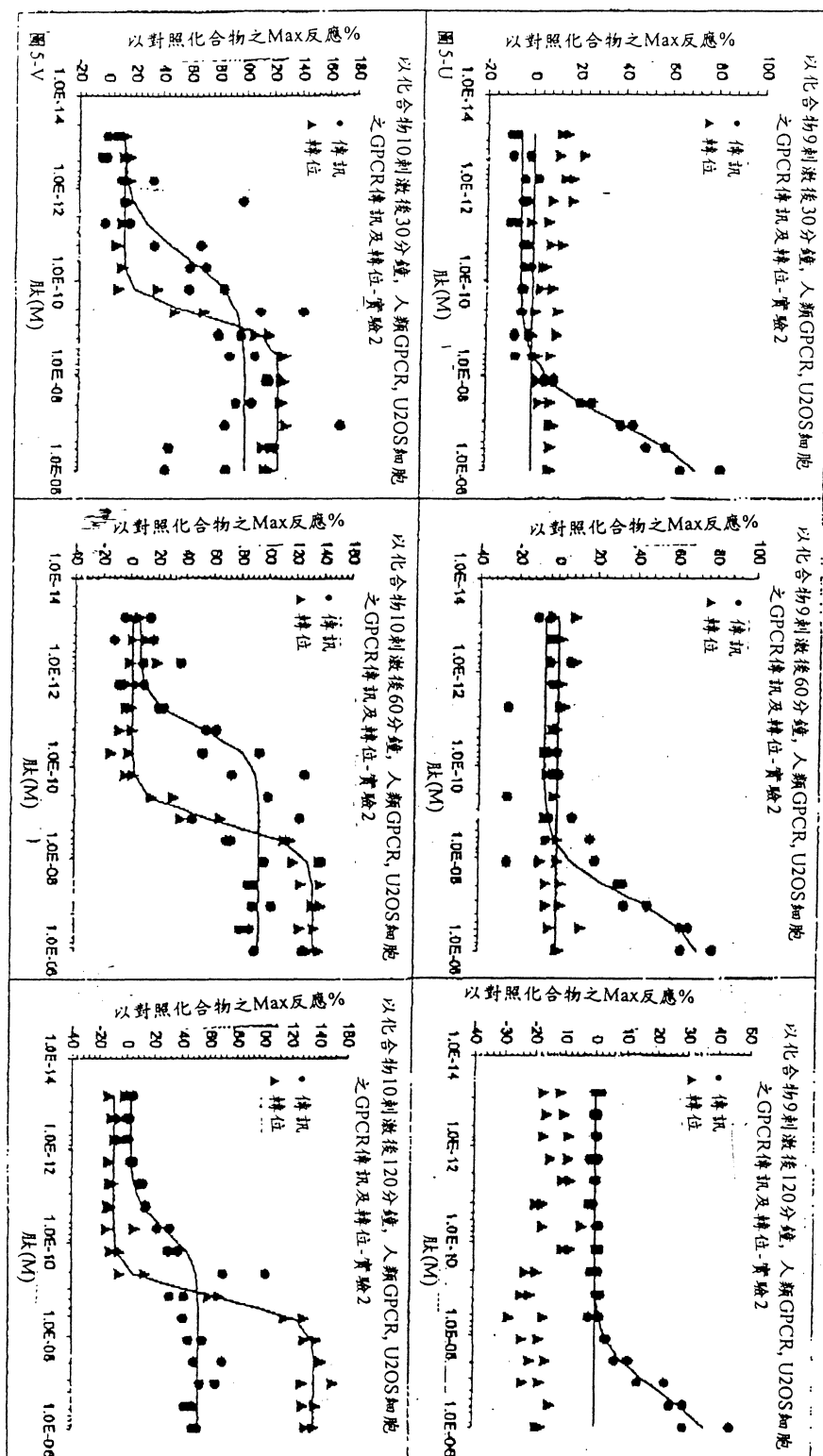


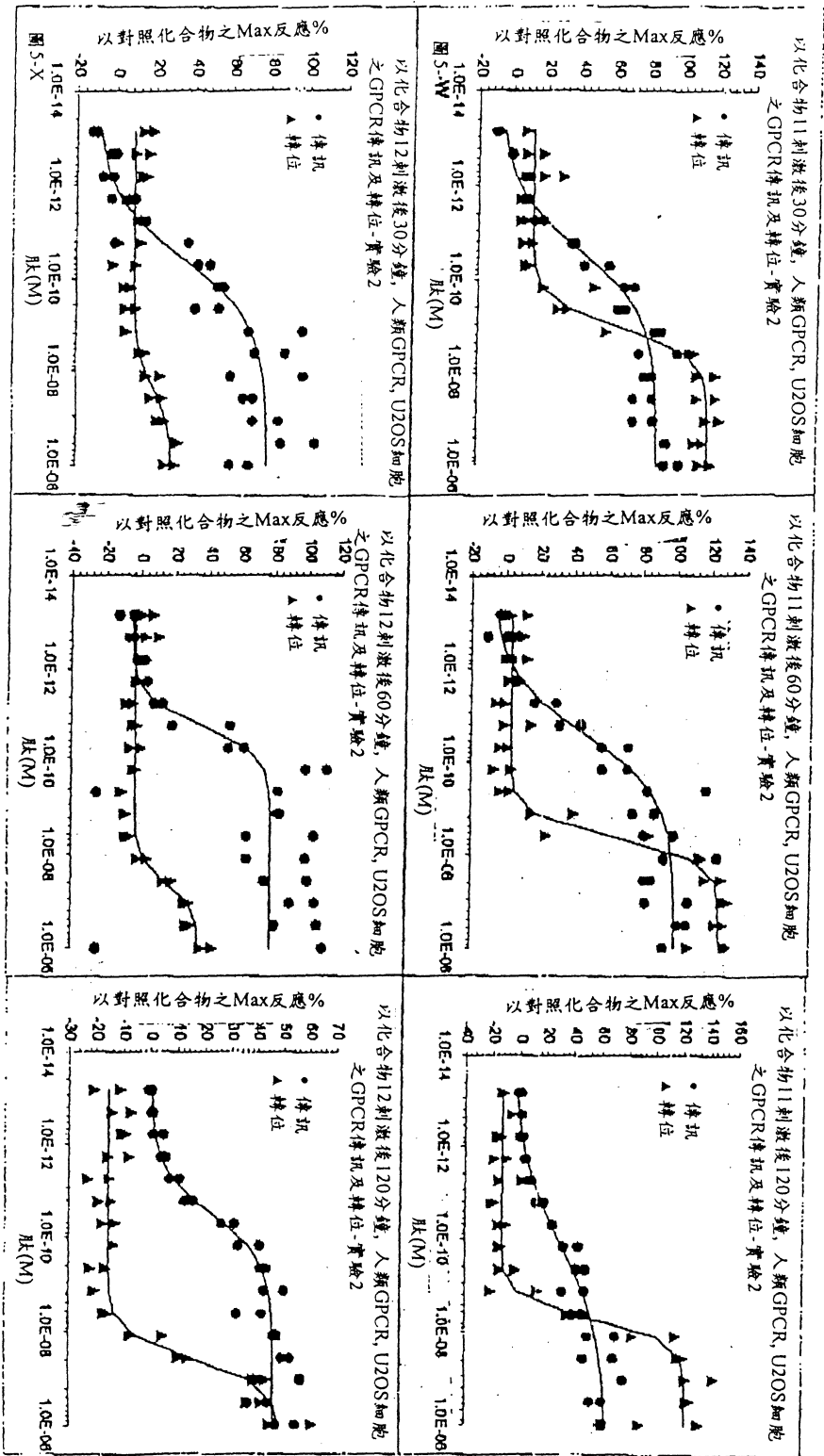


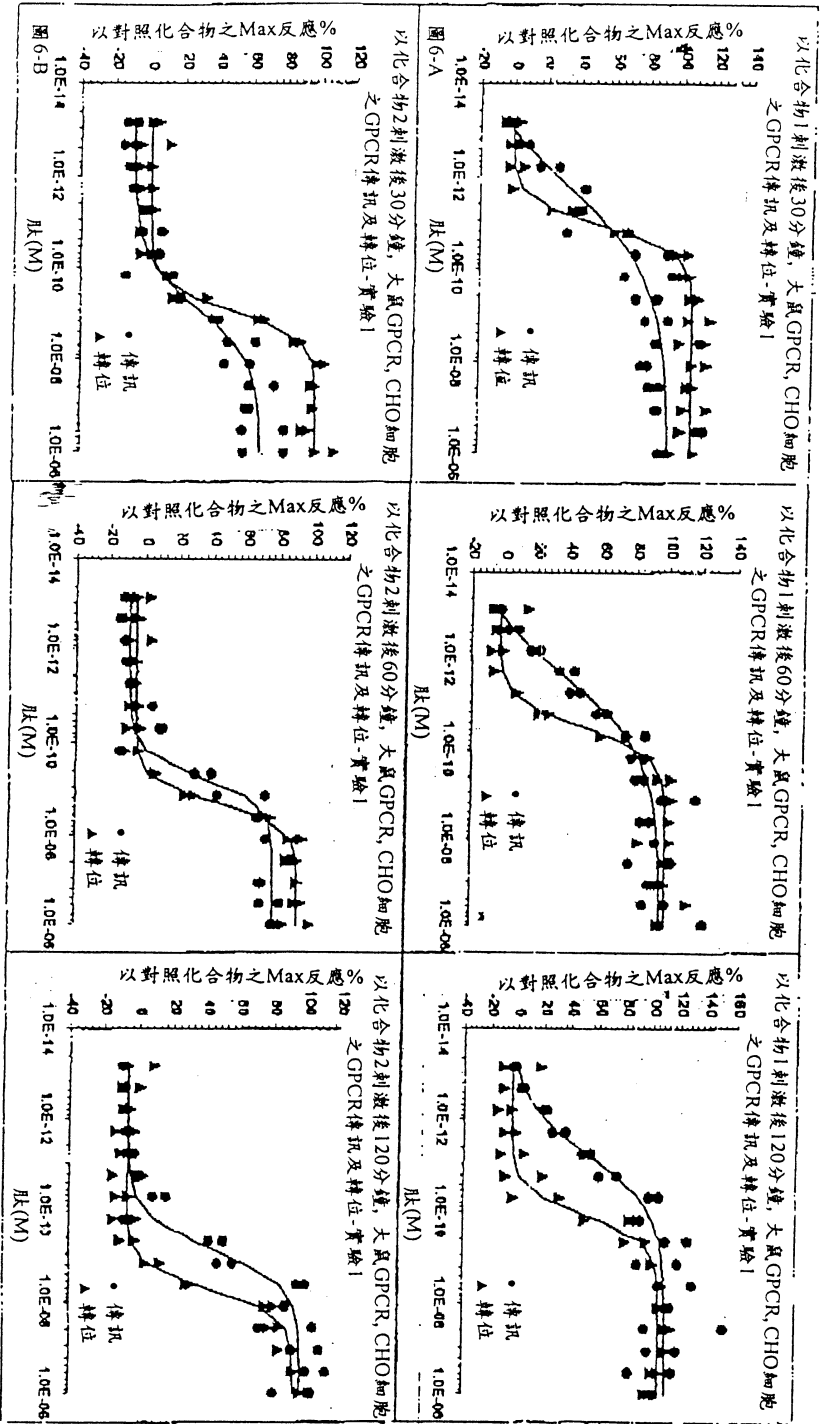


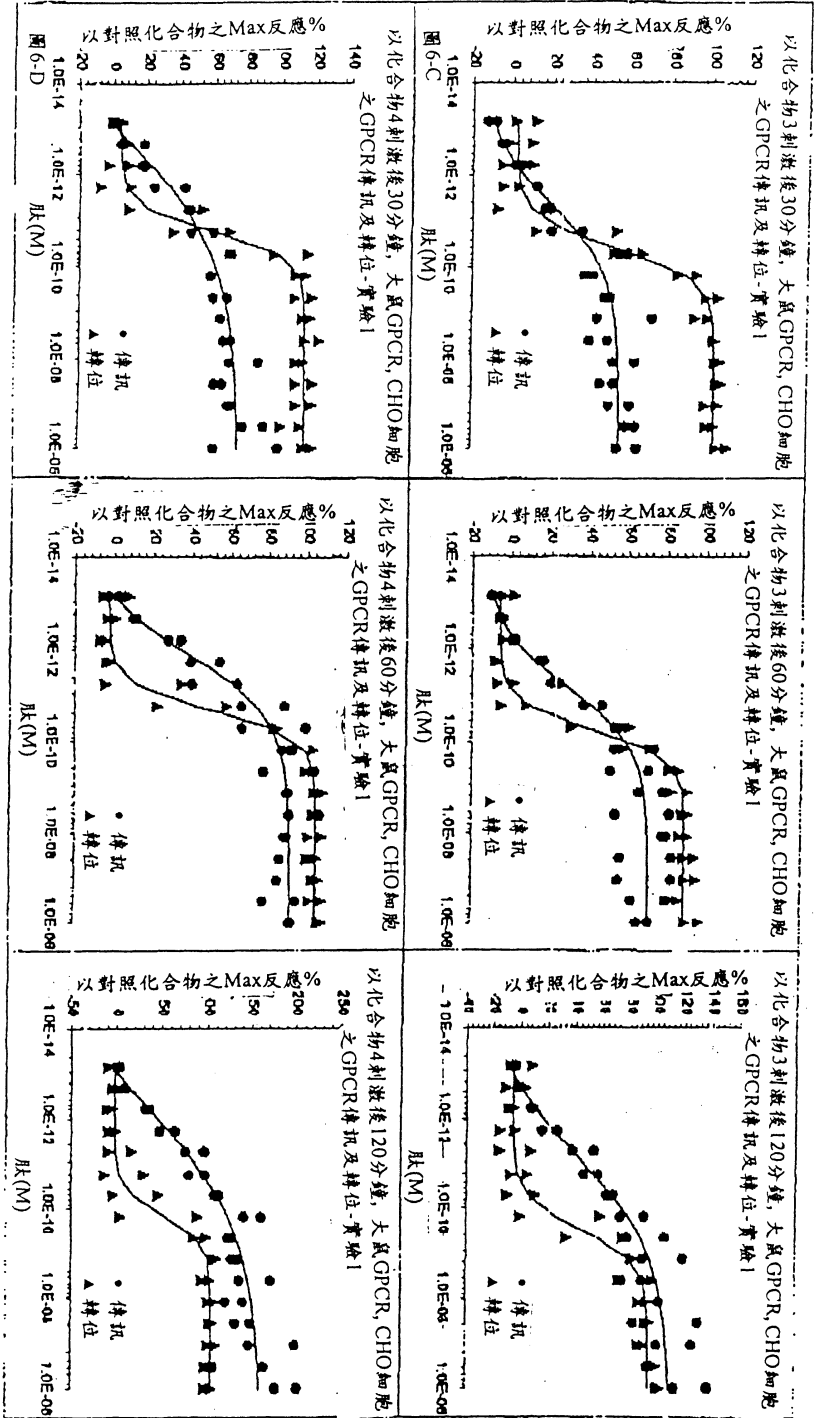


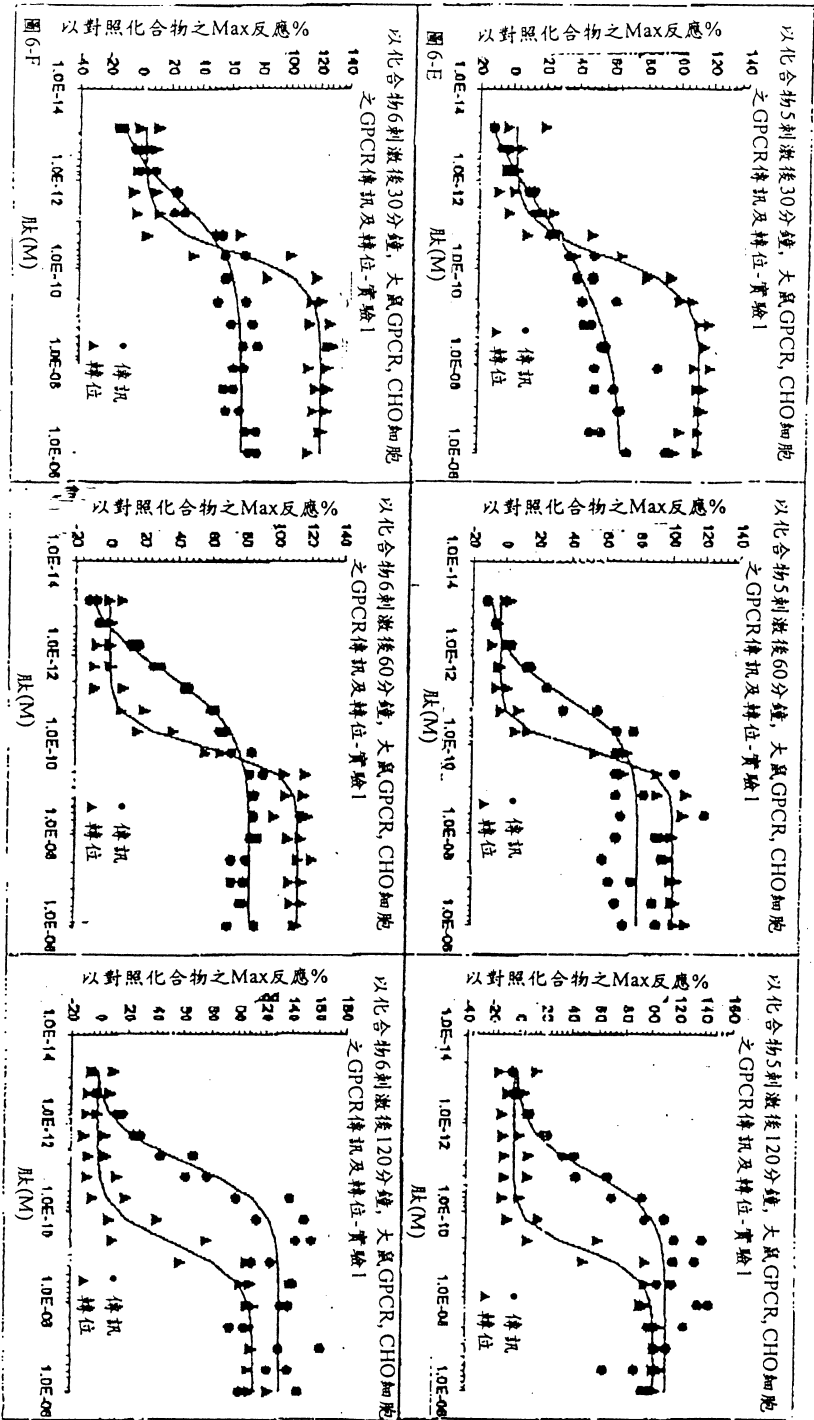


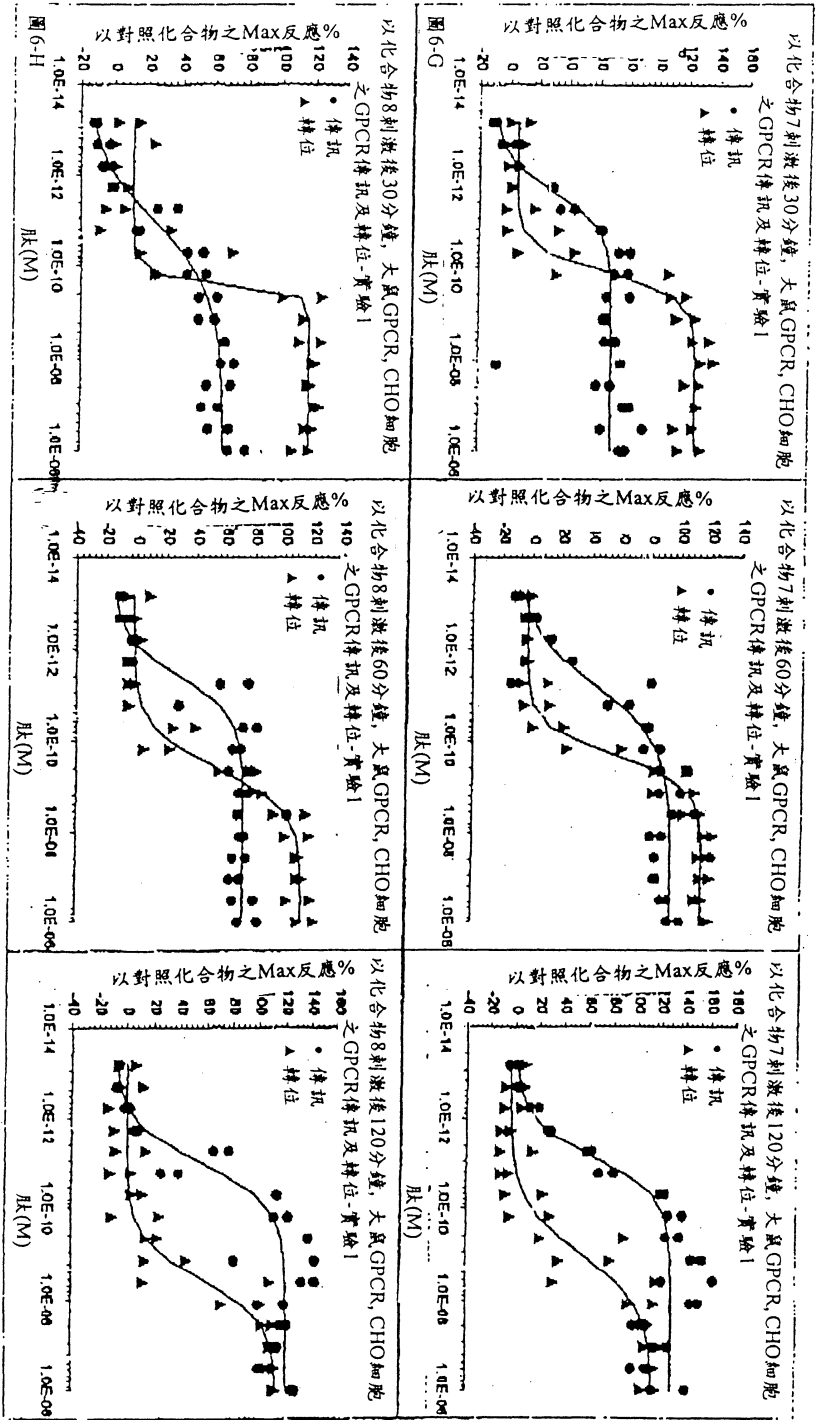


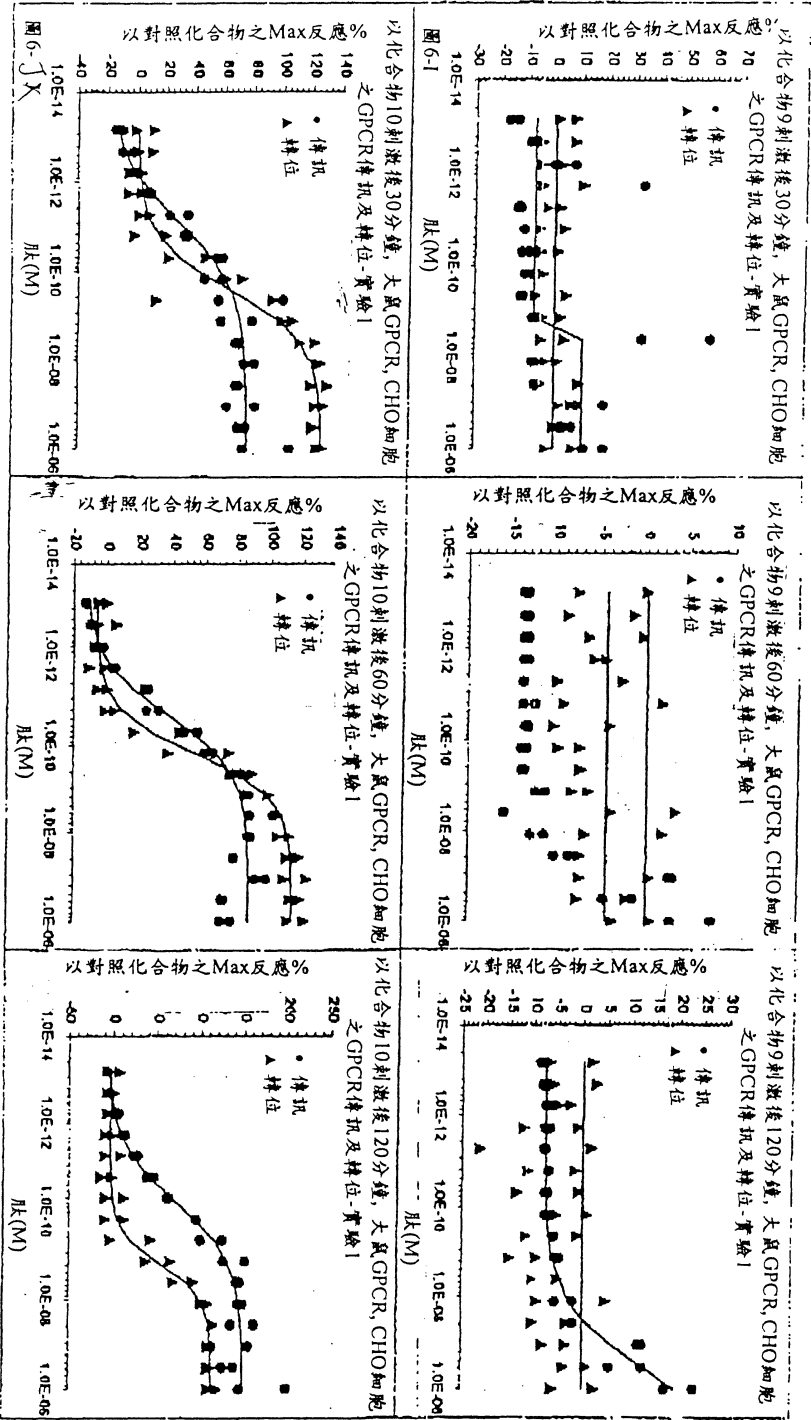


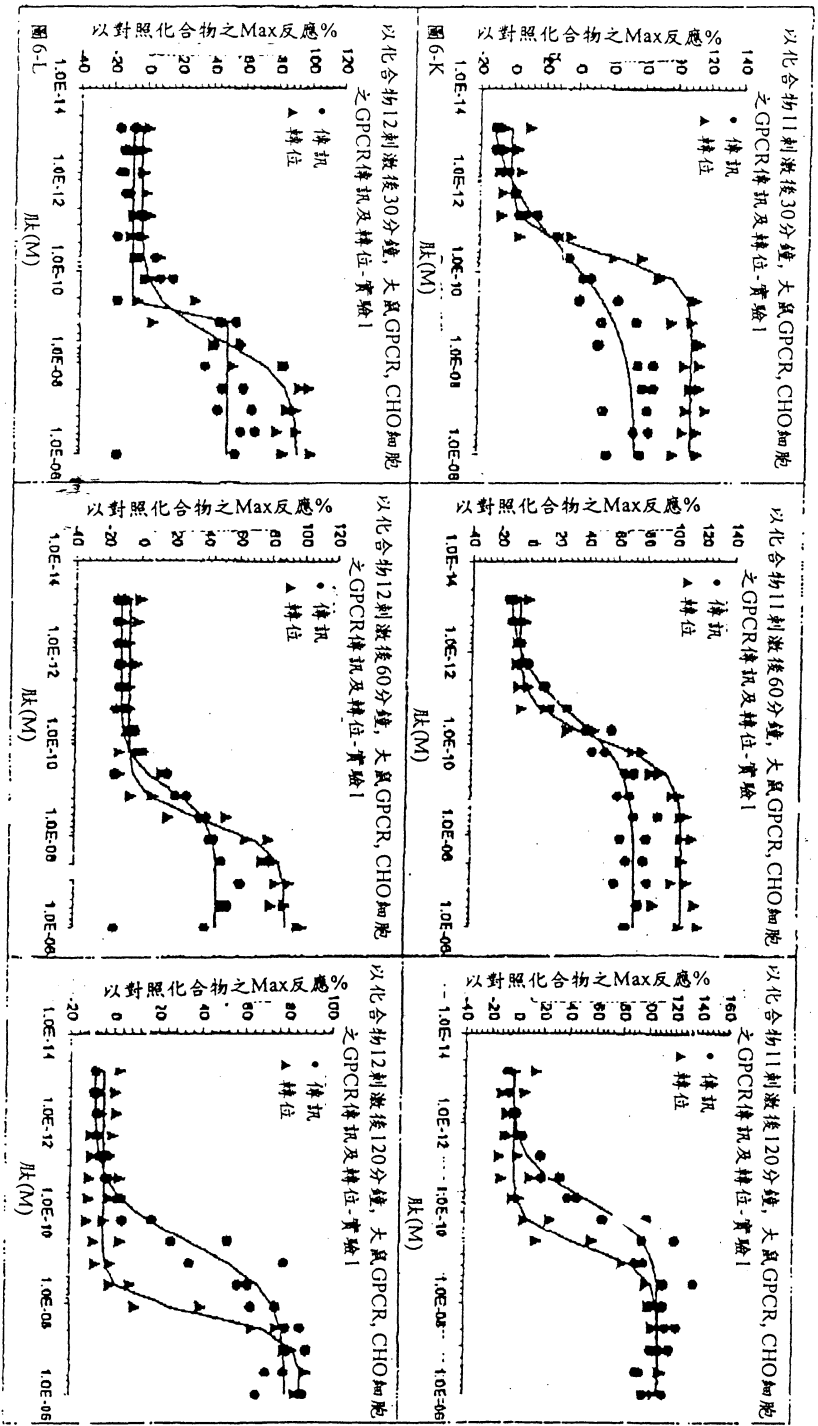


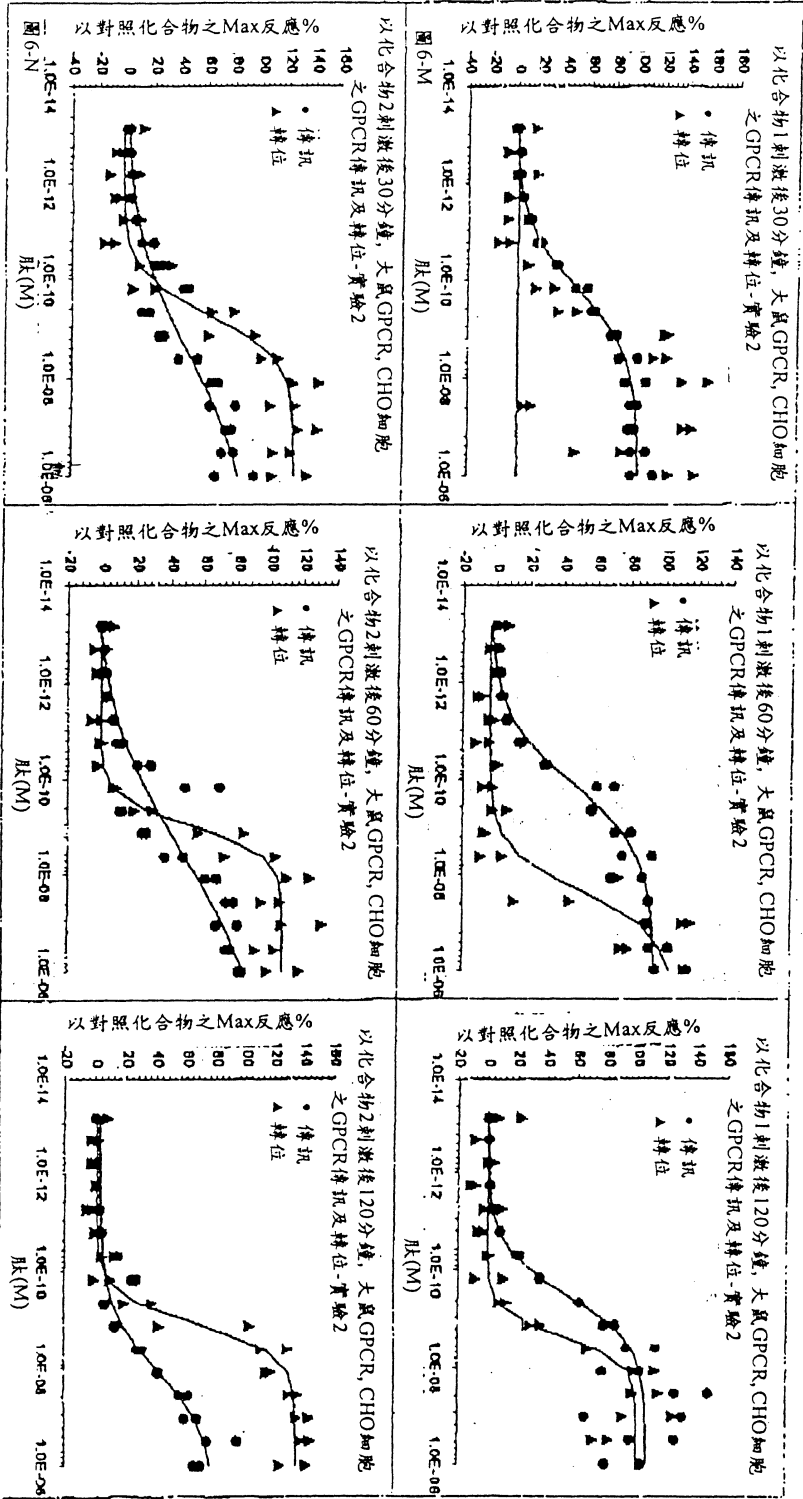


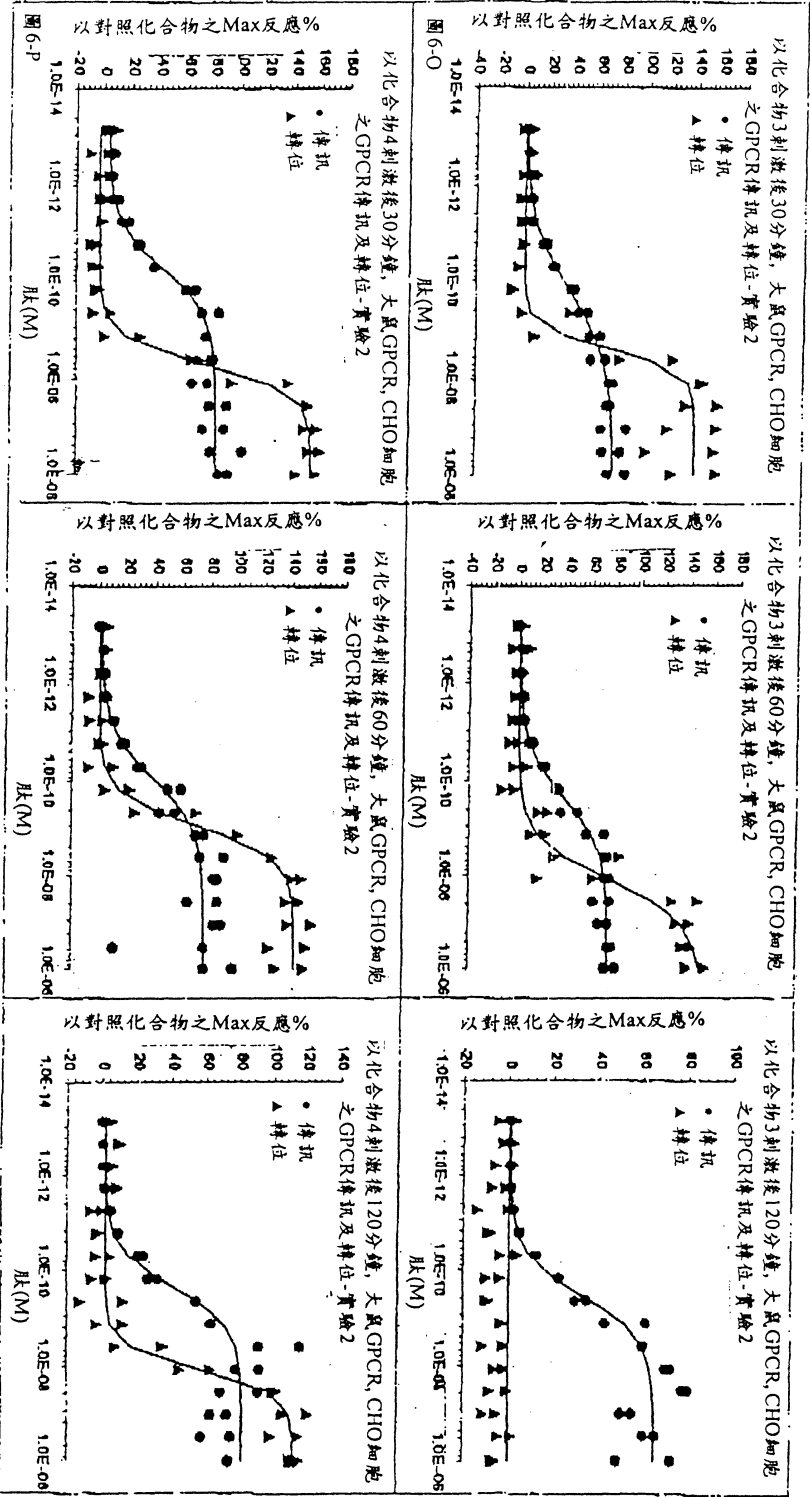


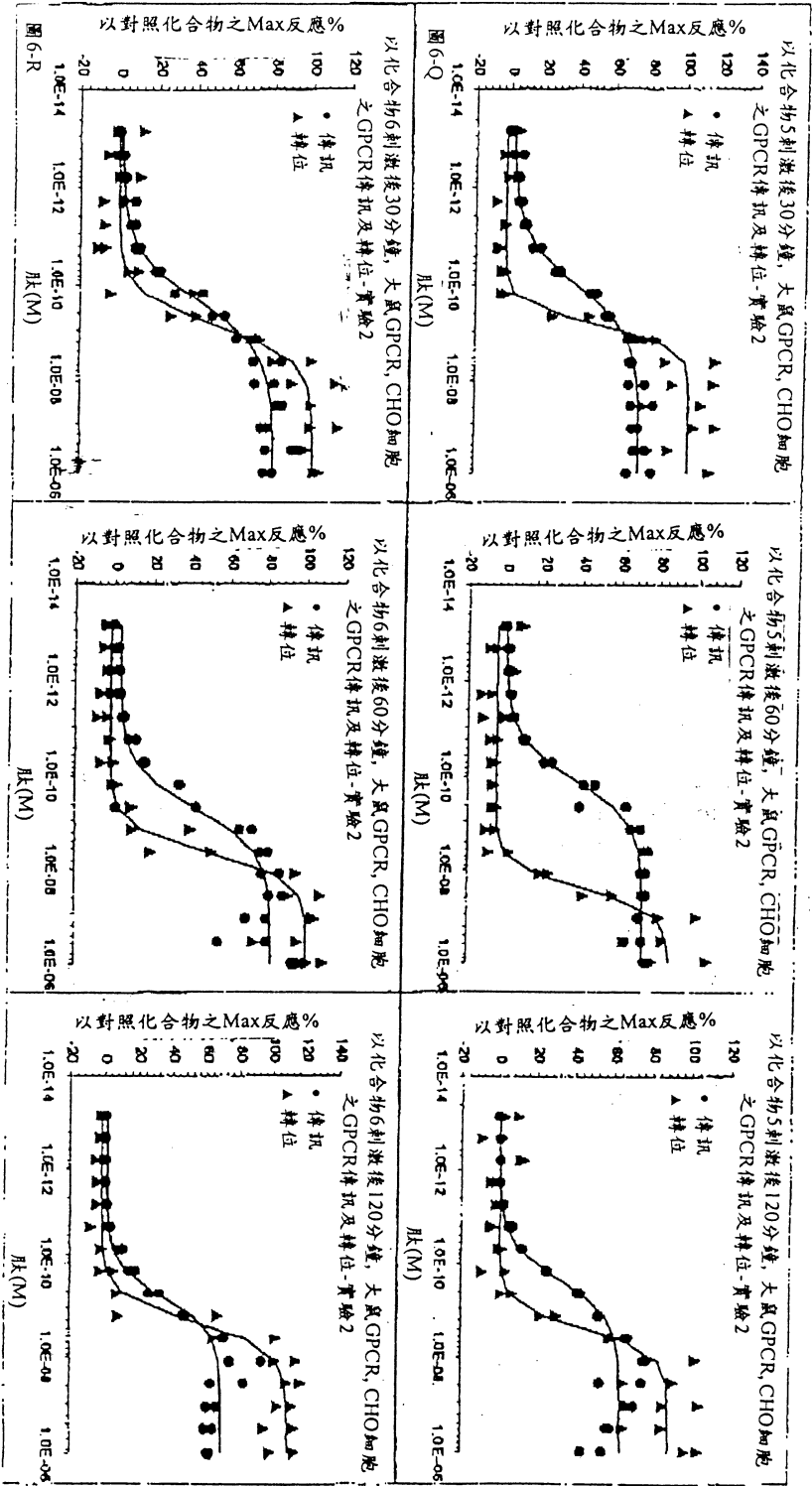


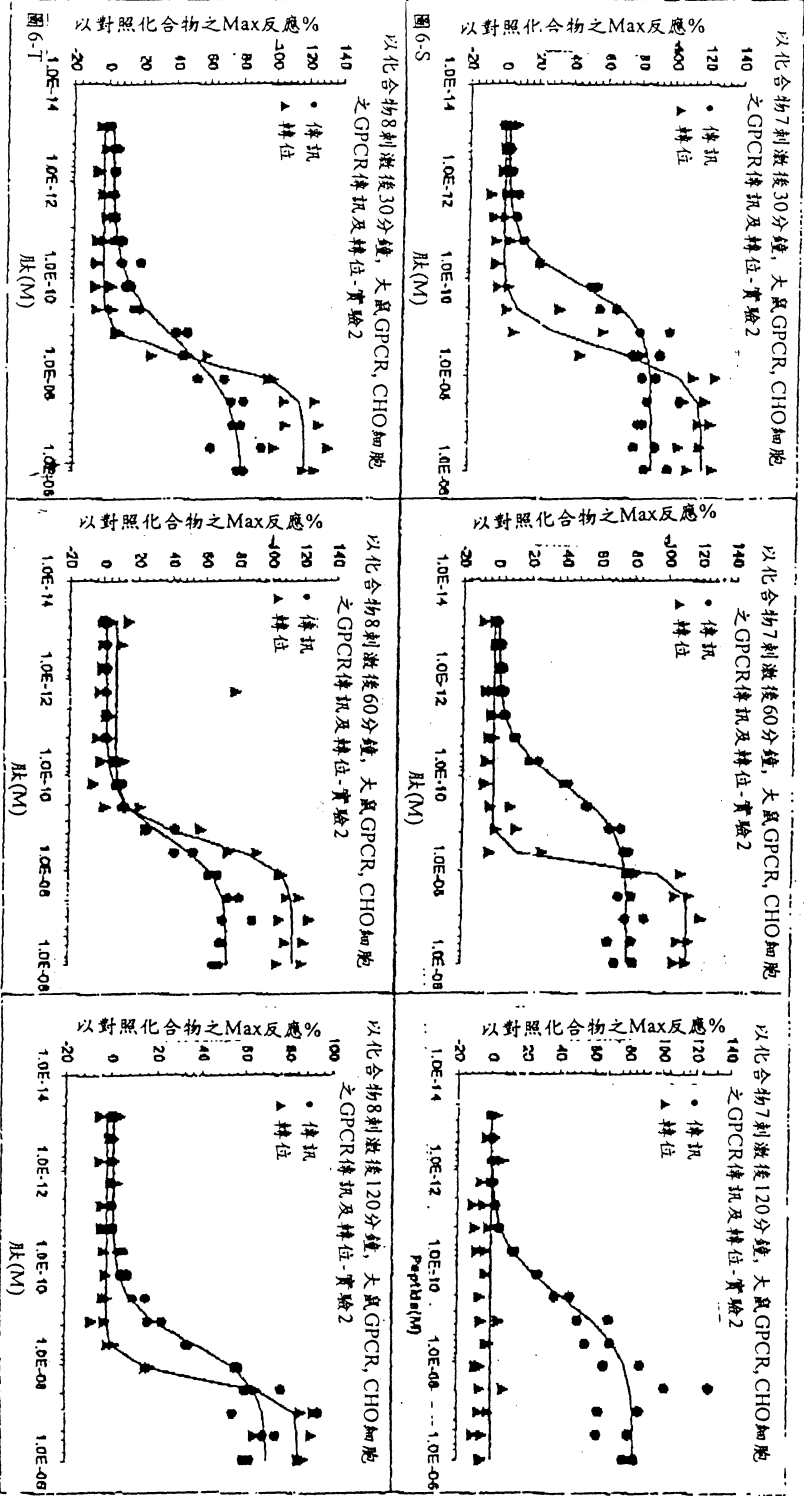


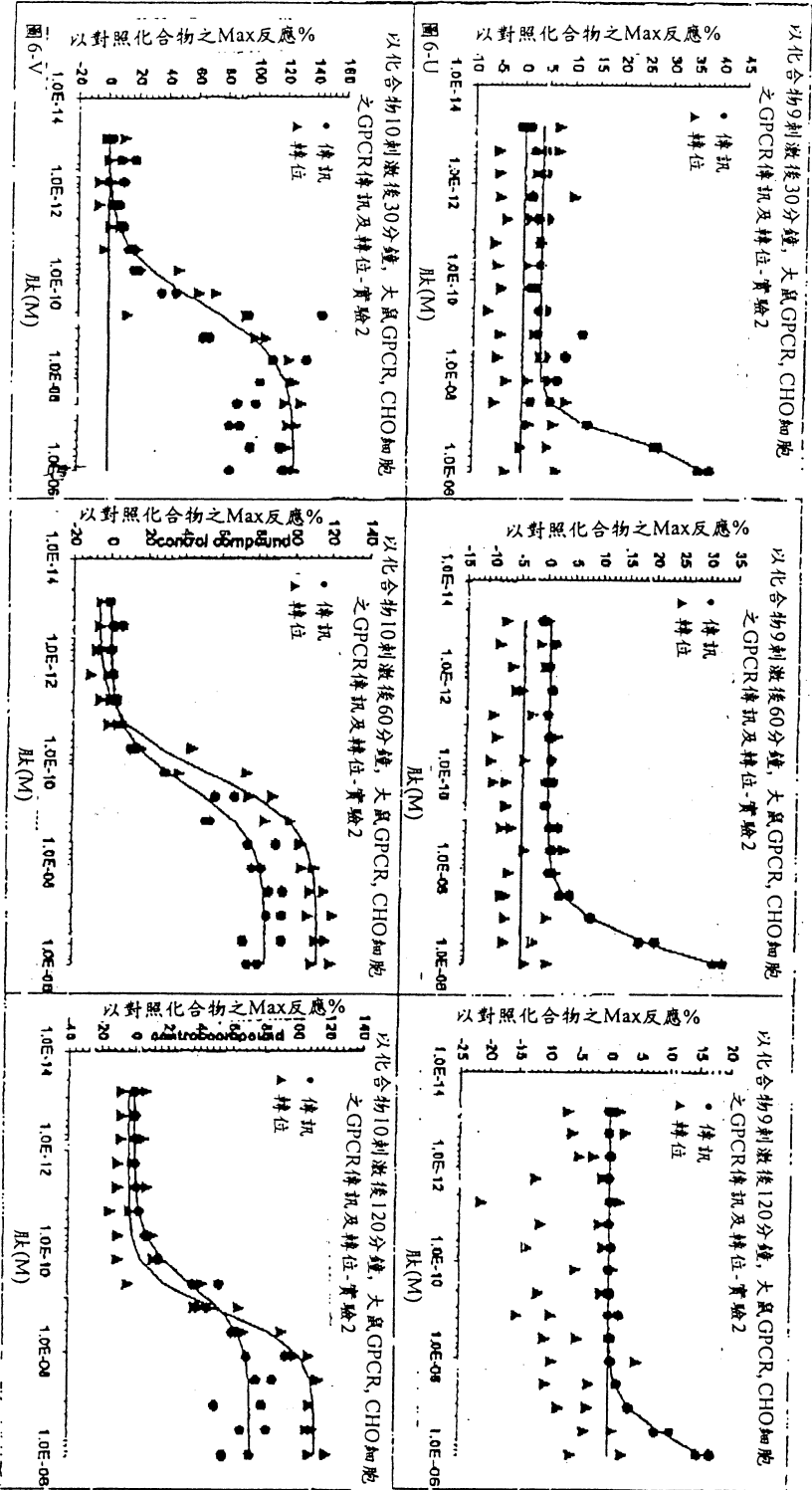


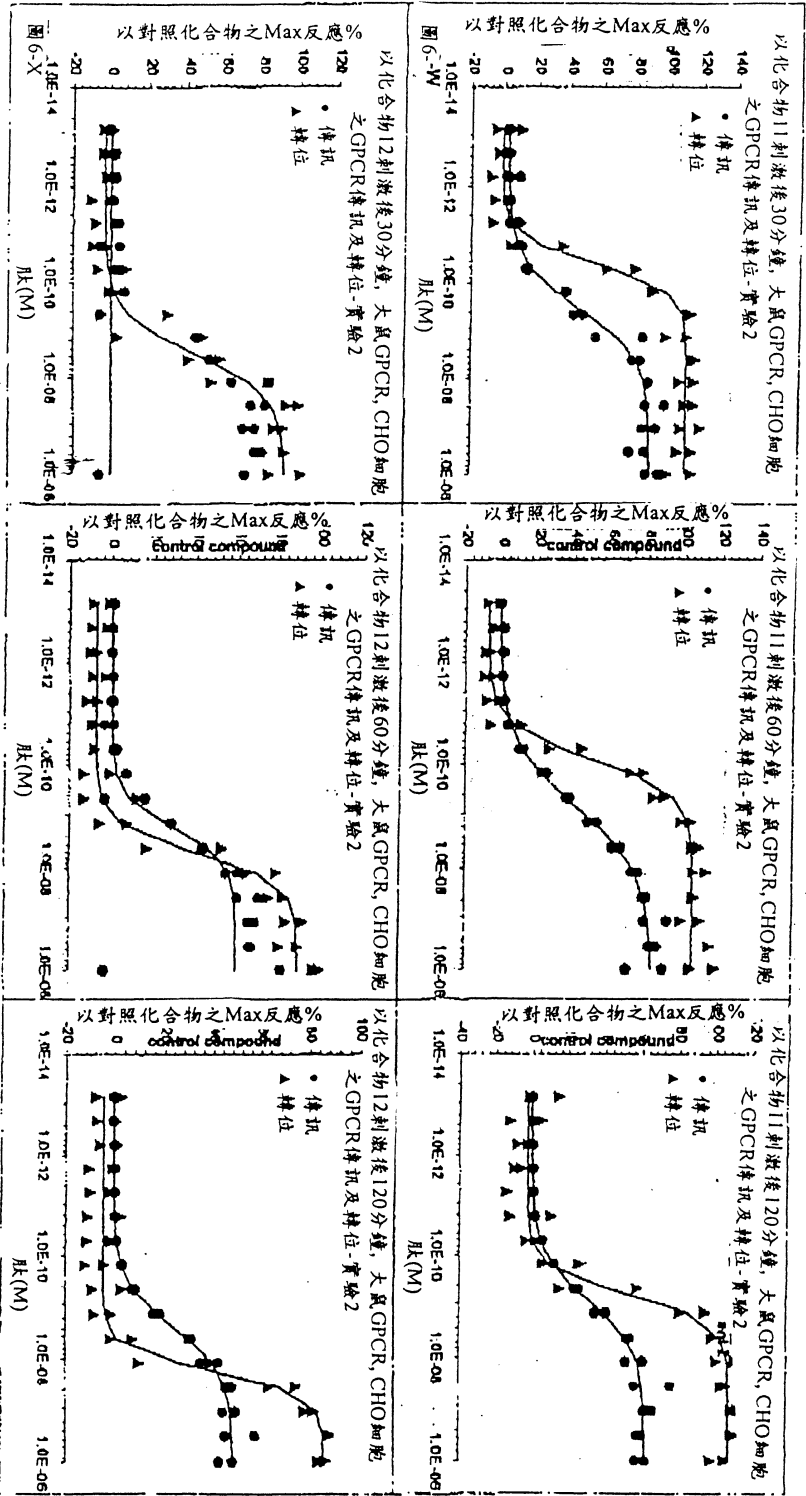


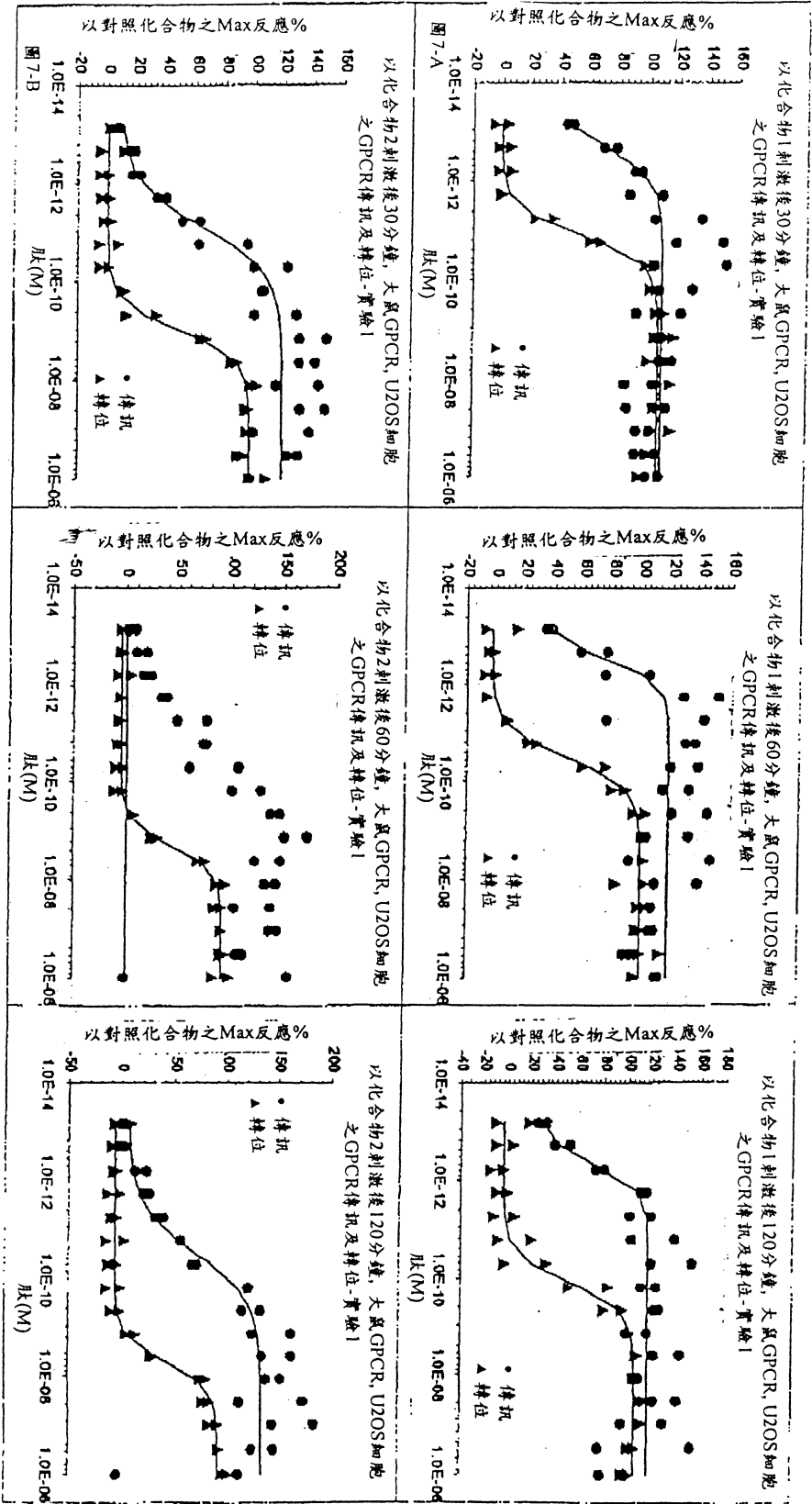


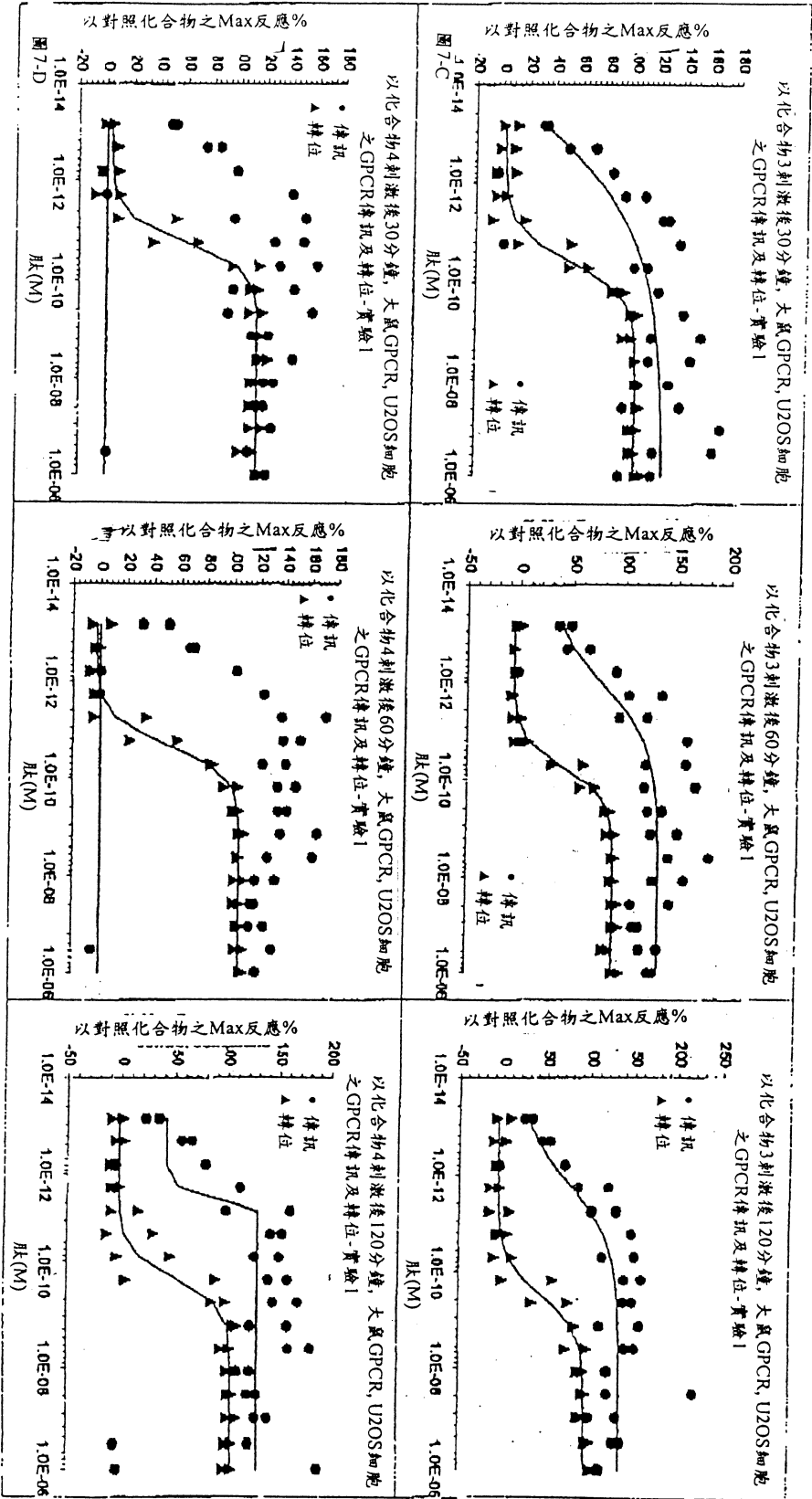


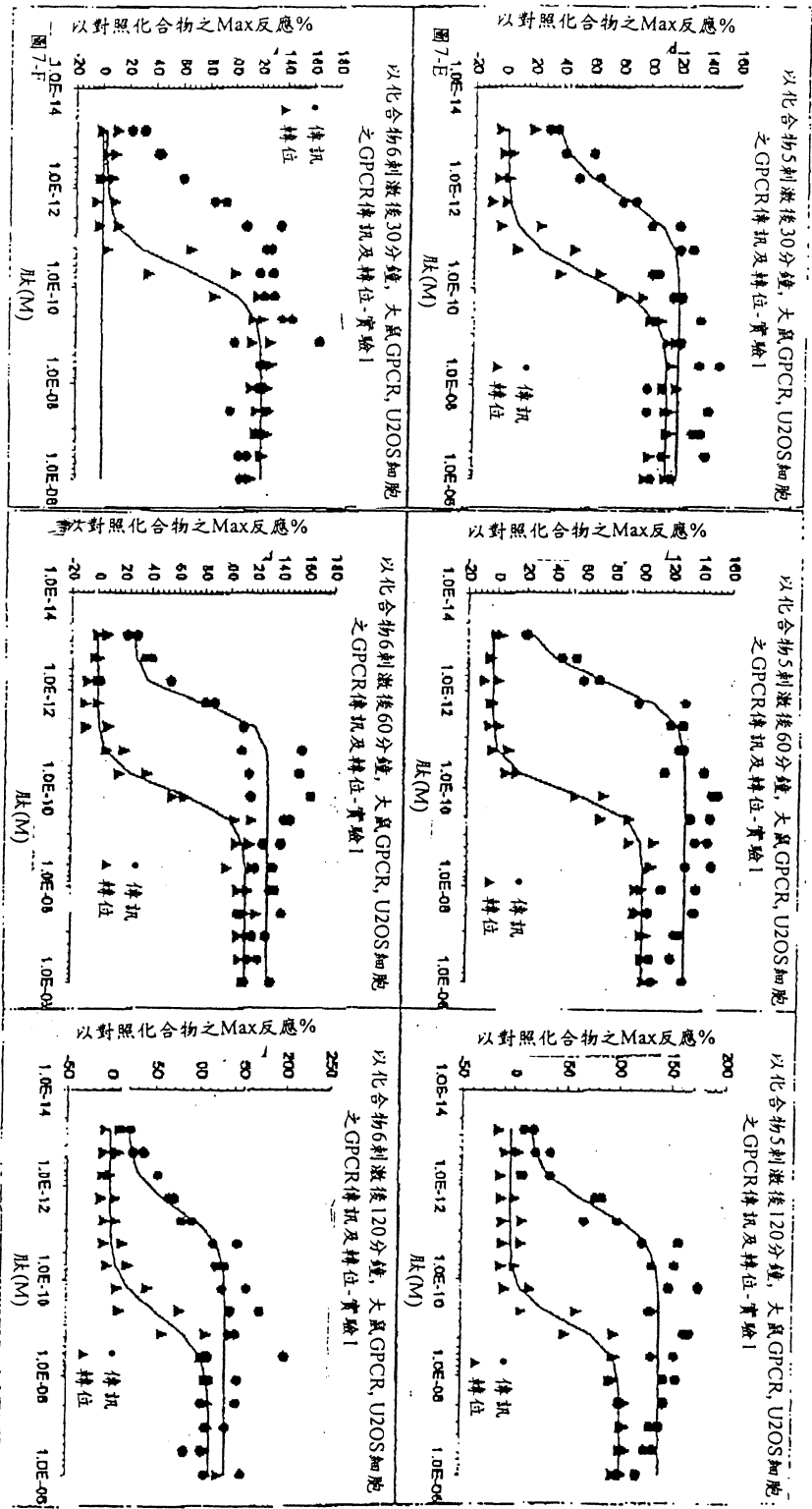


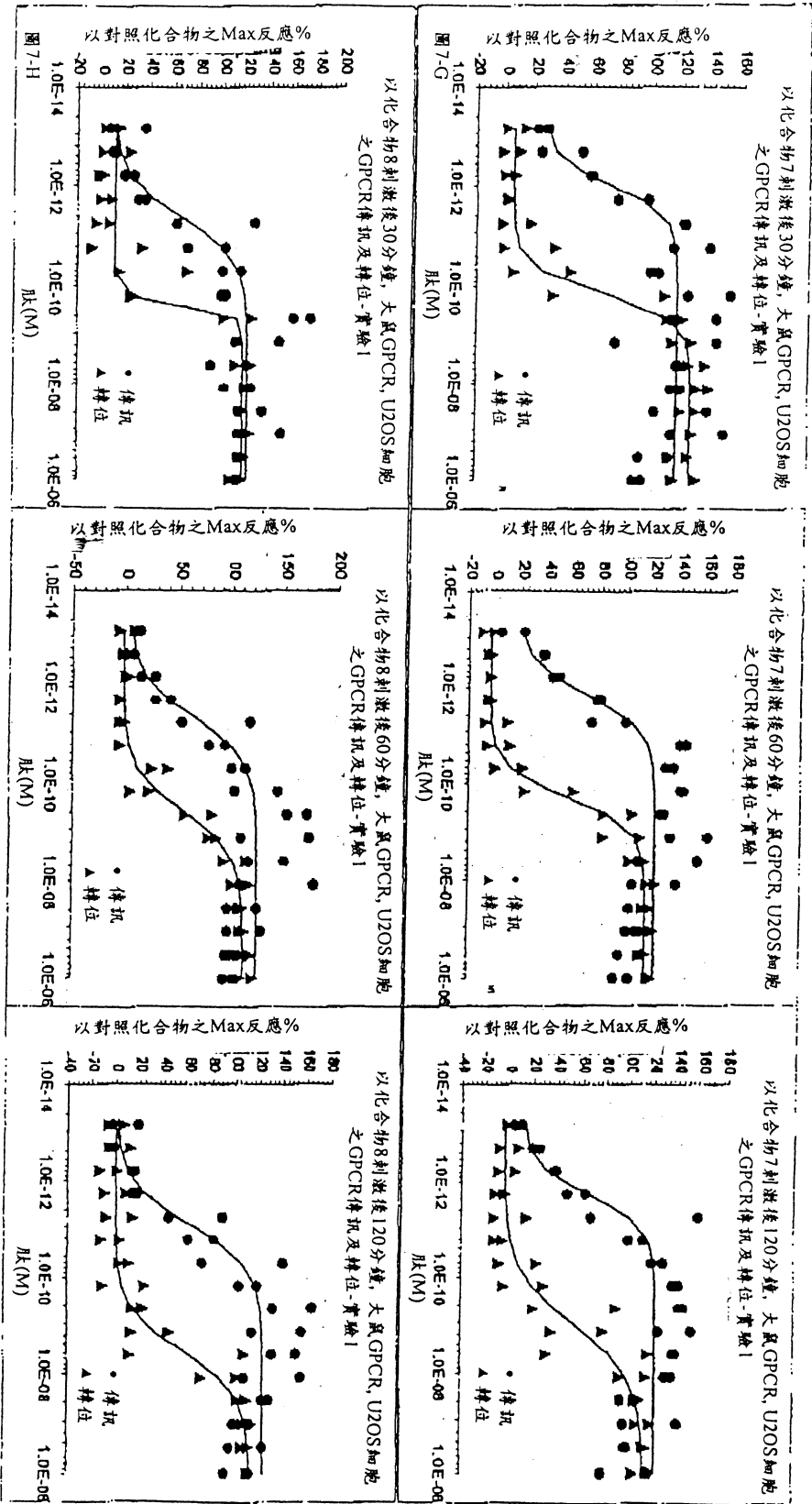


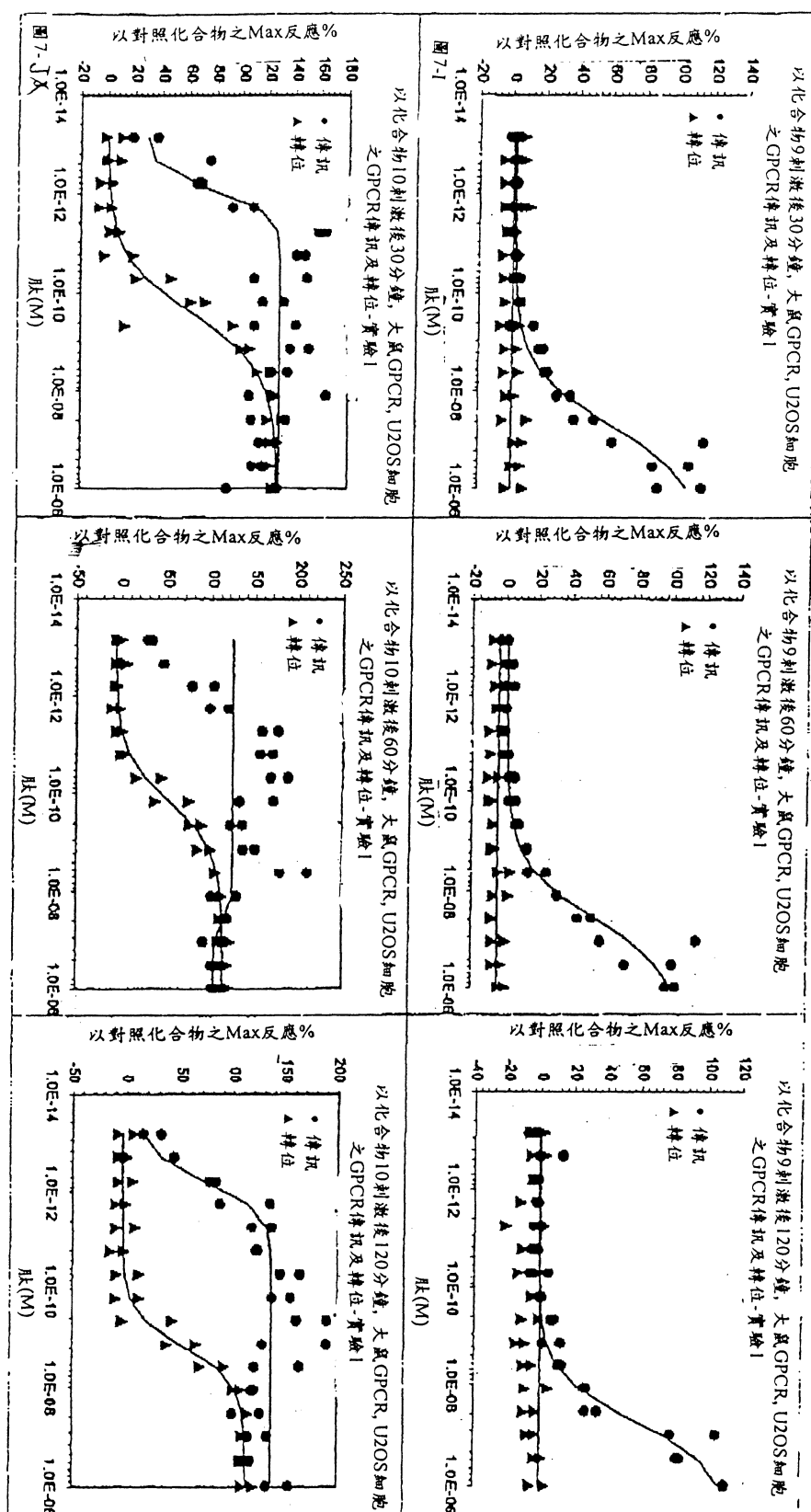


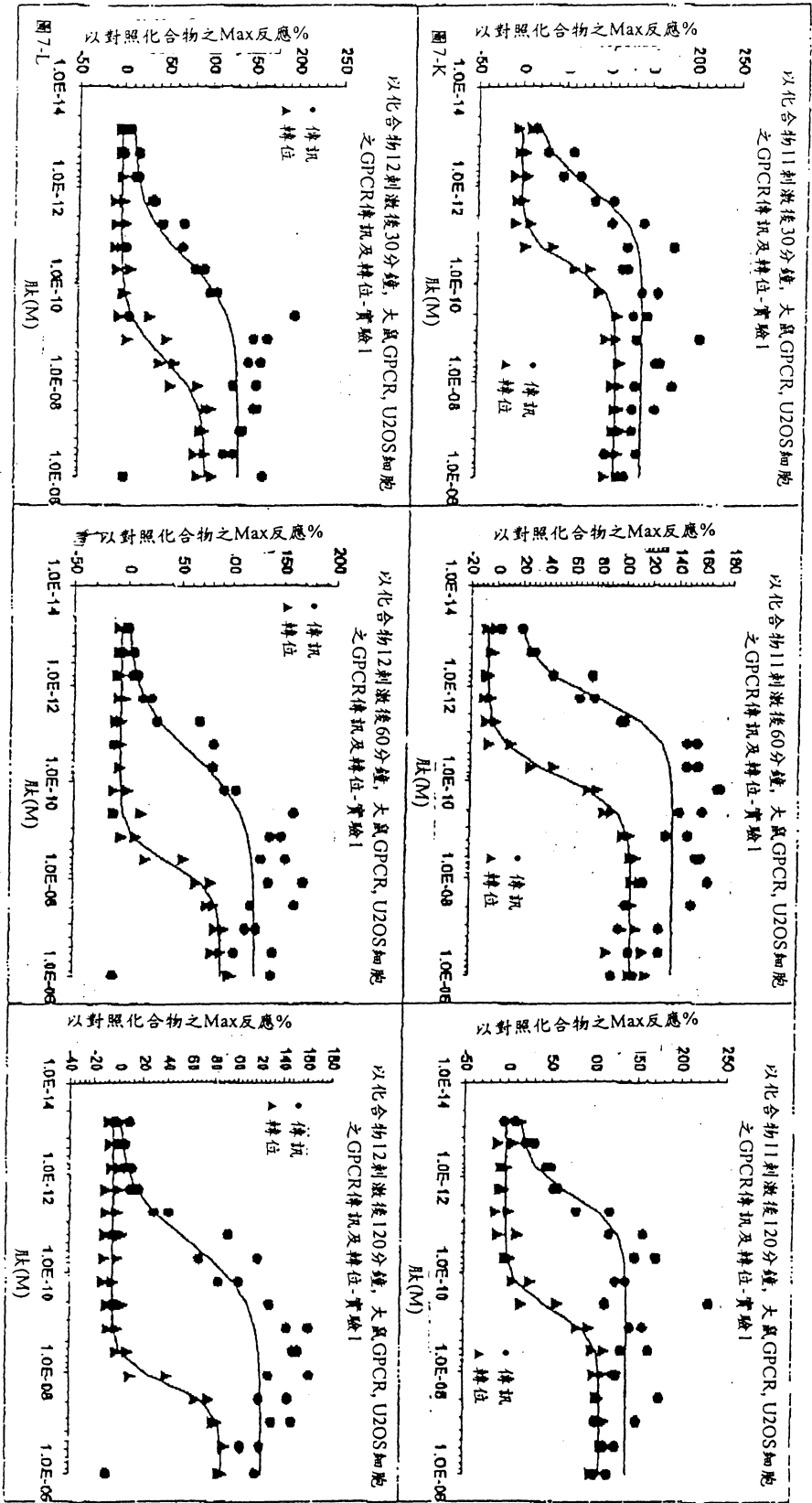


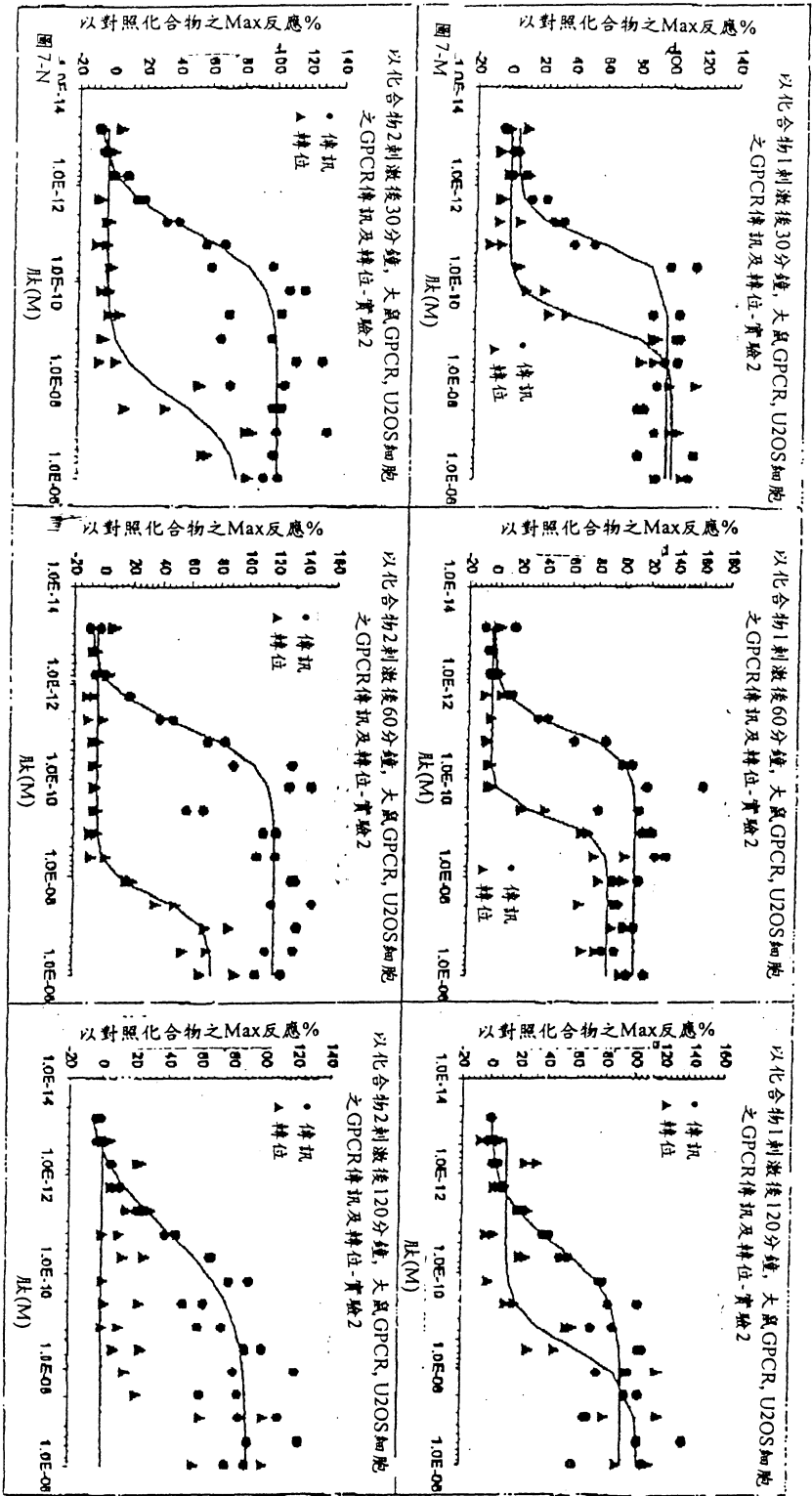


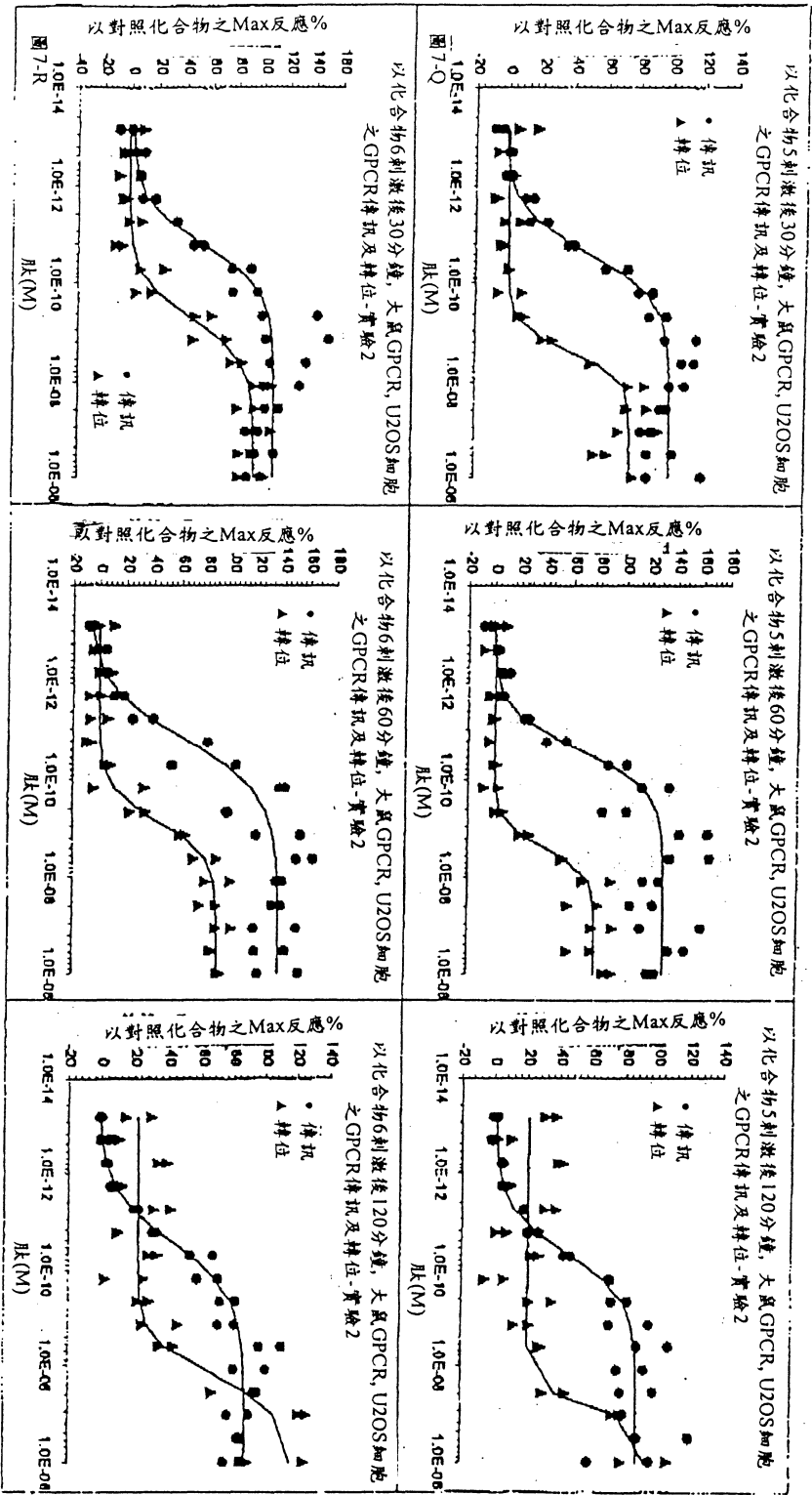


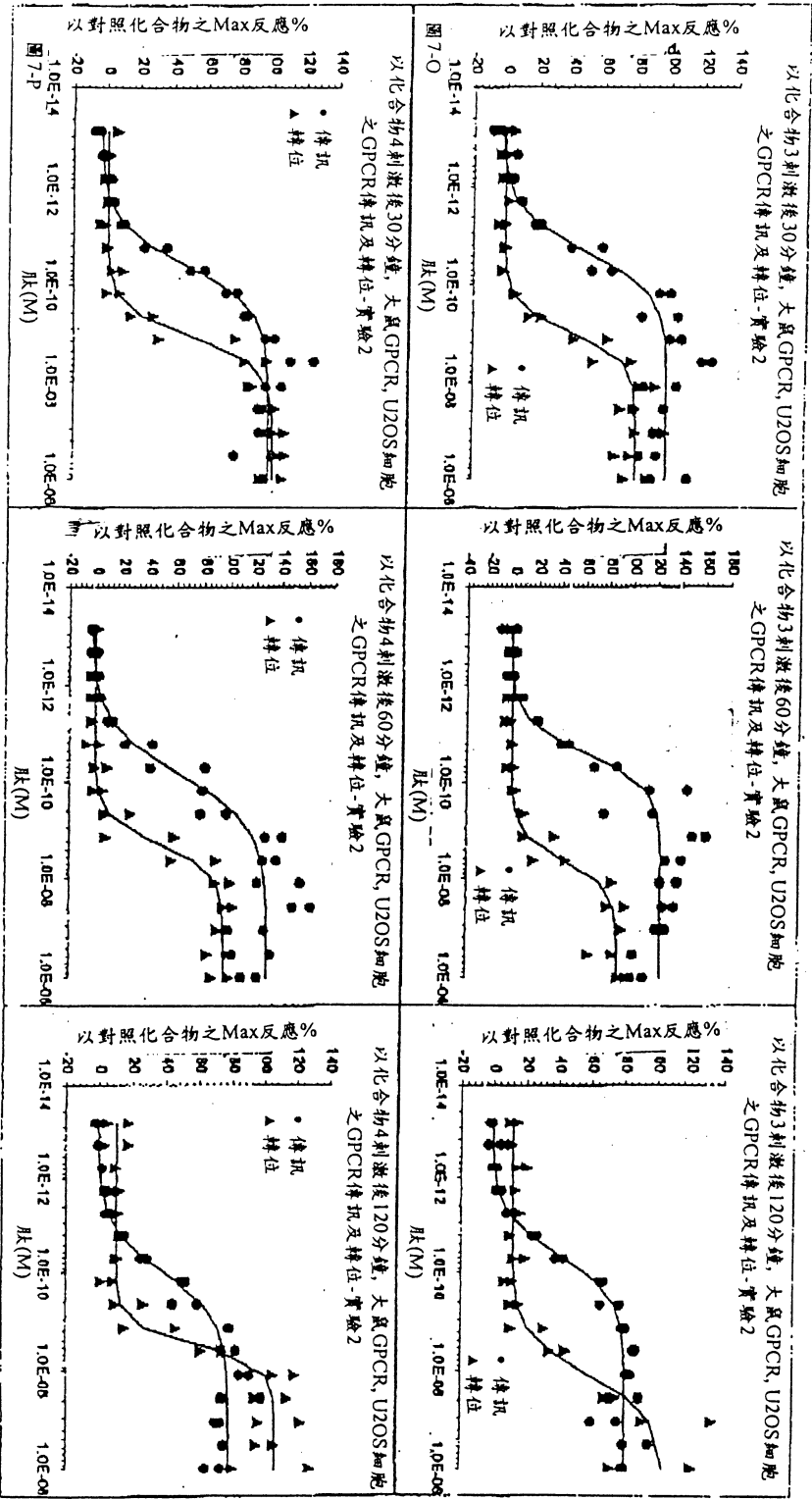


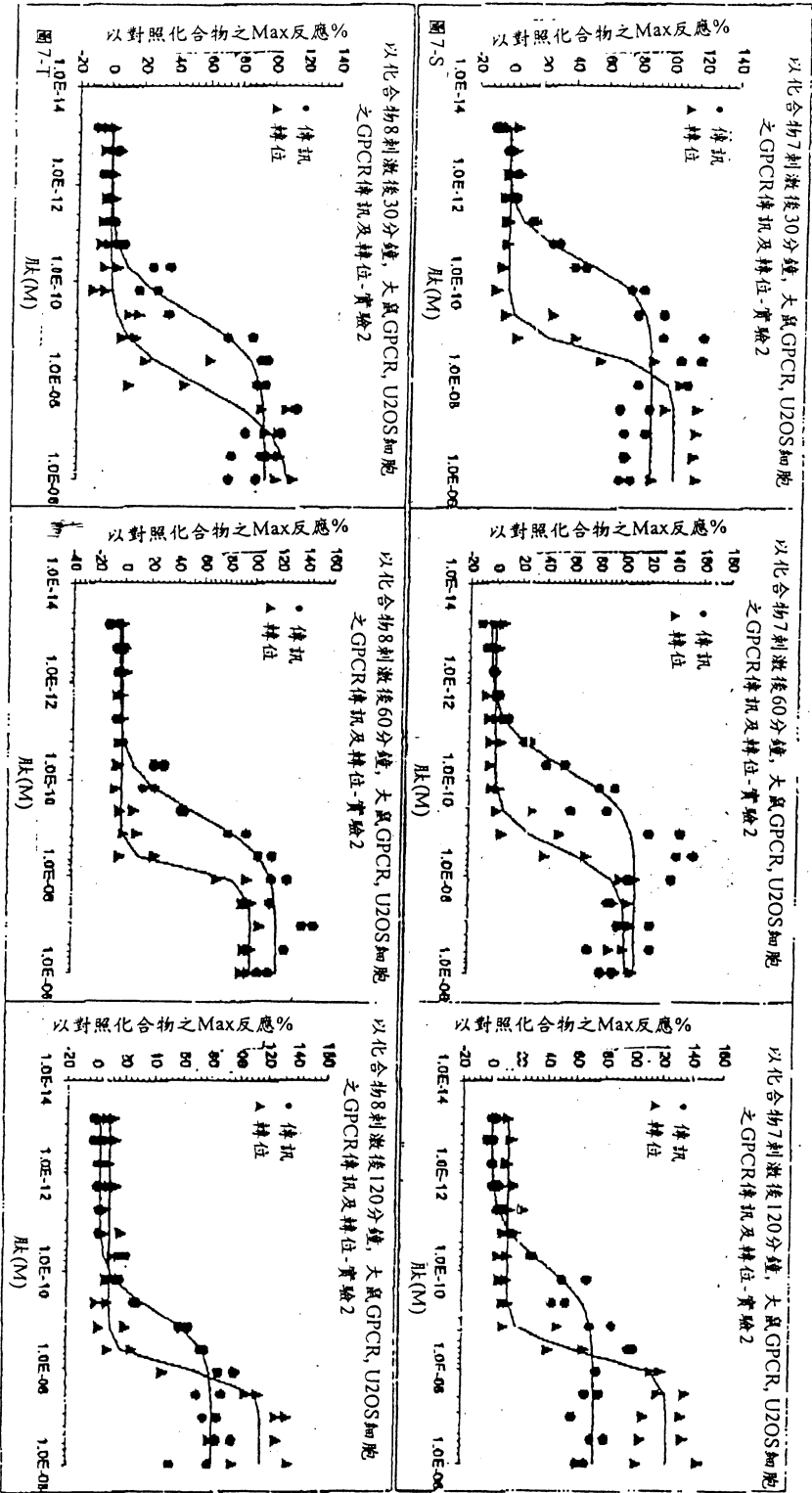


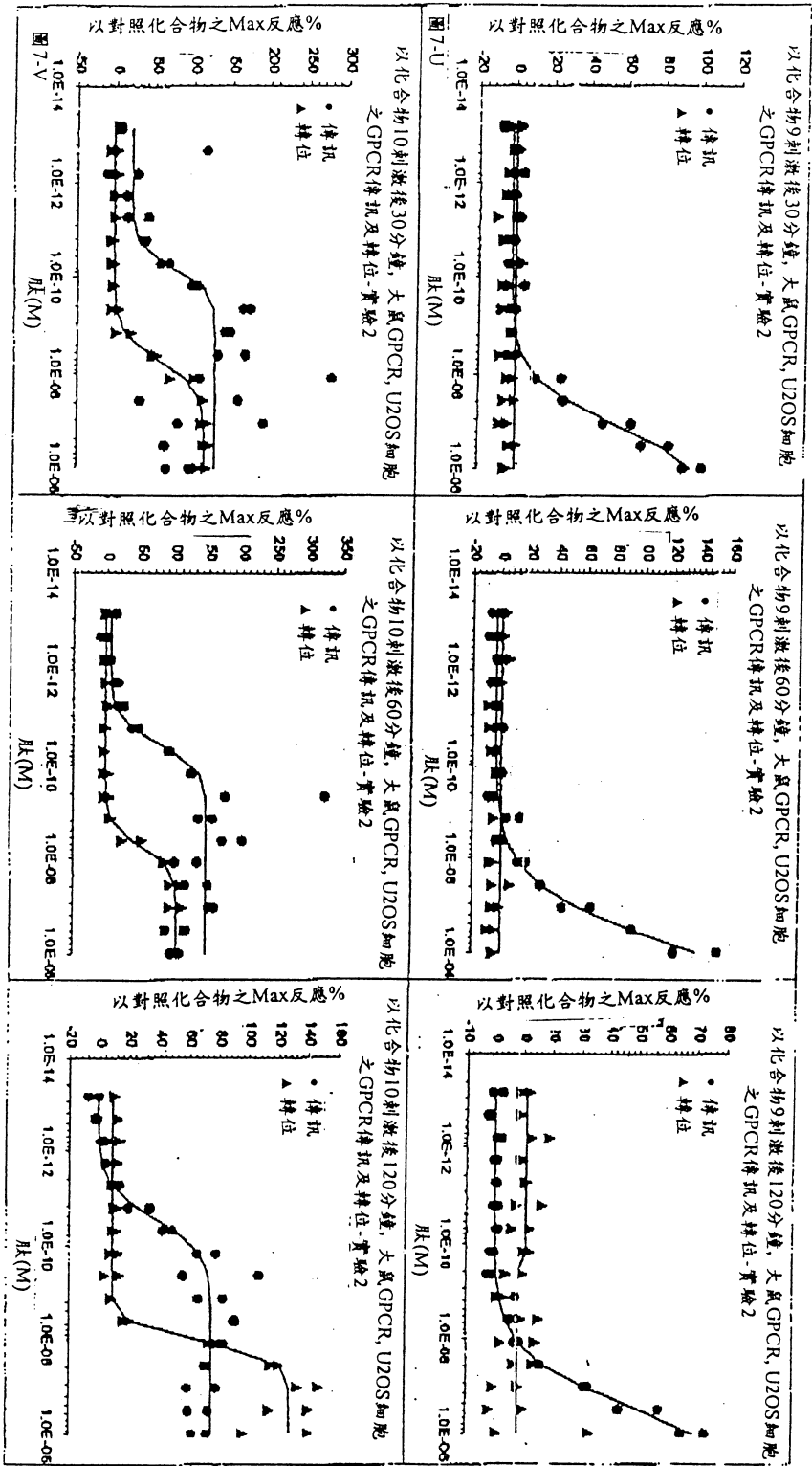


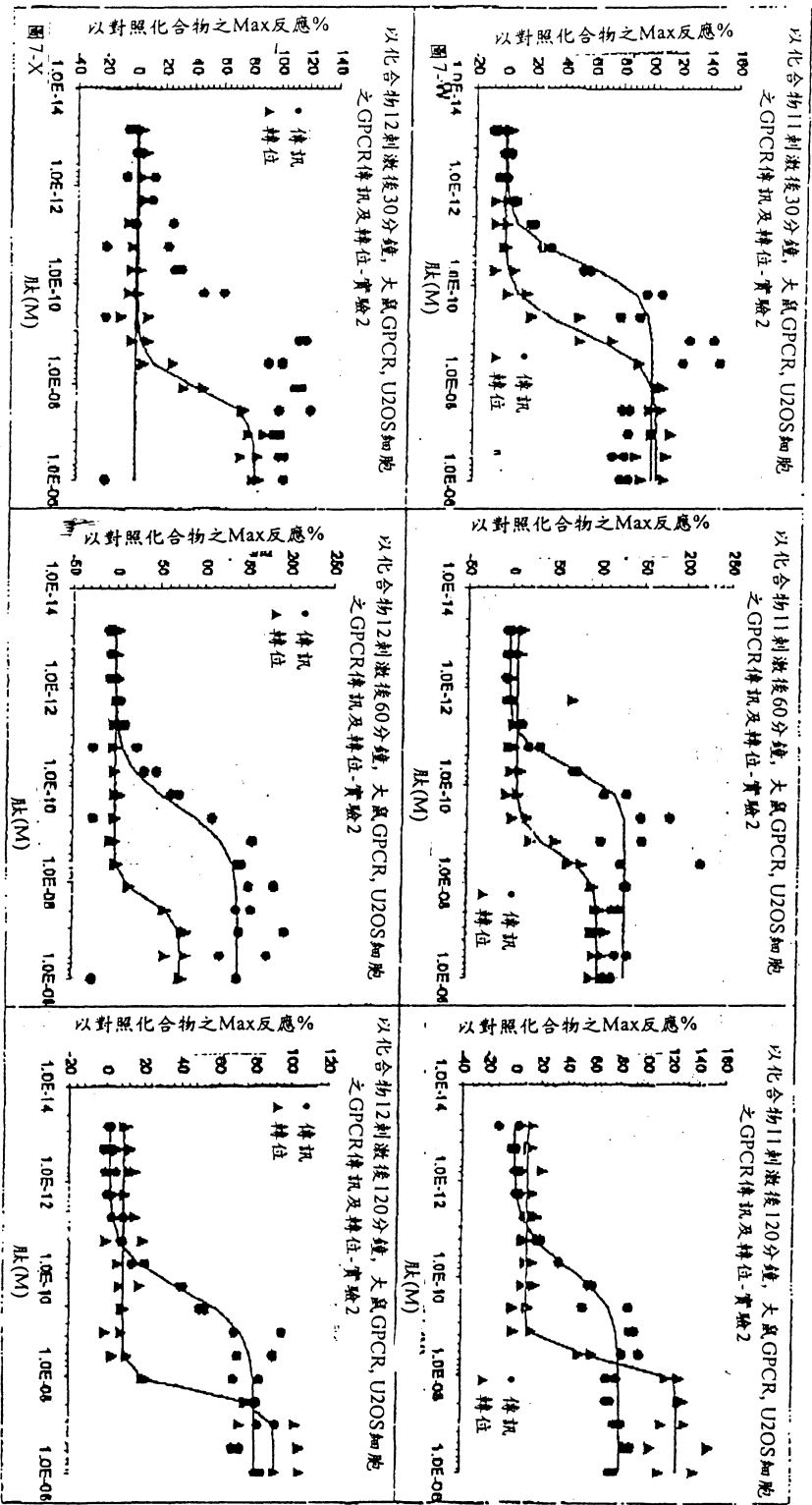












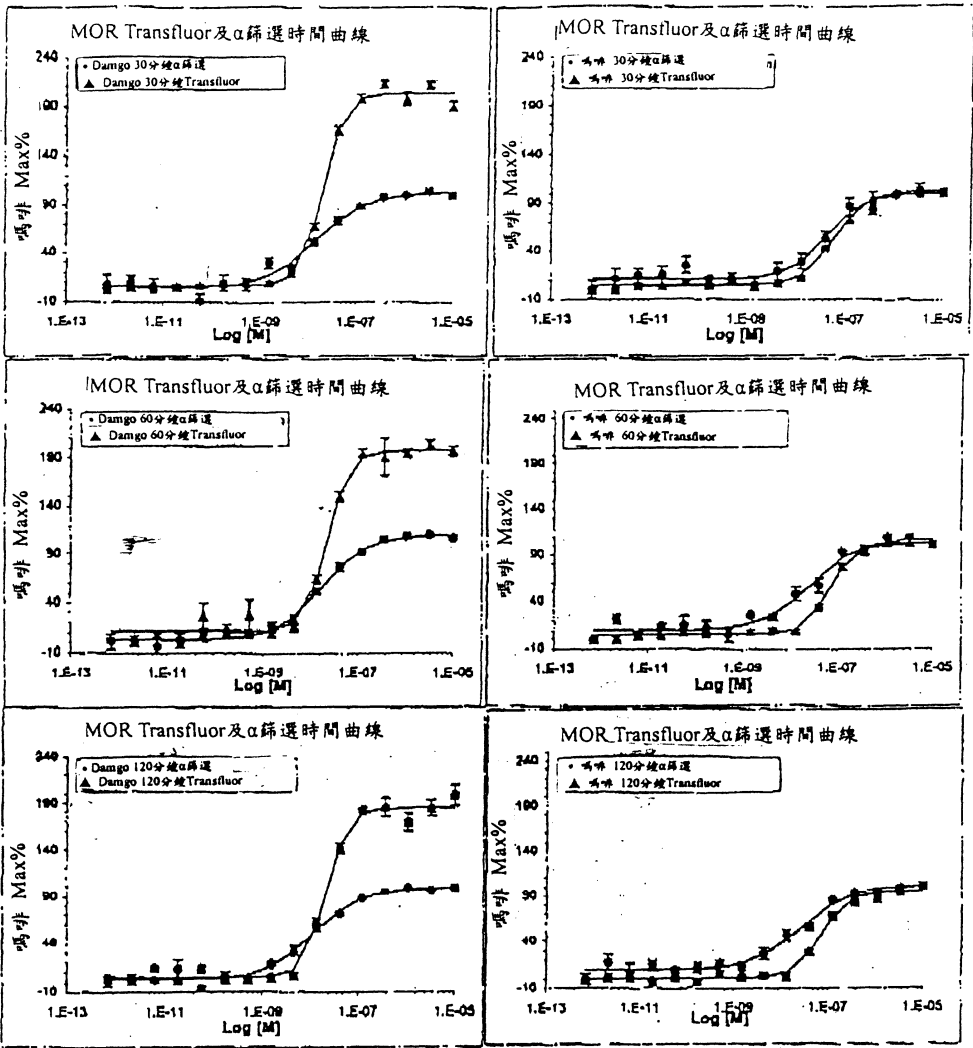


圖 8-A

圖 8-B

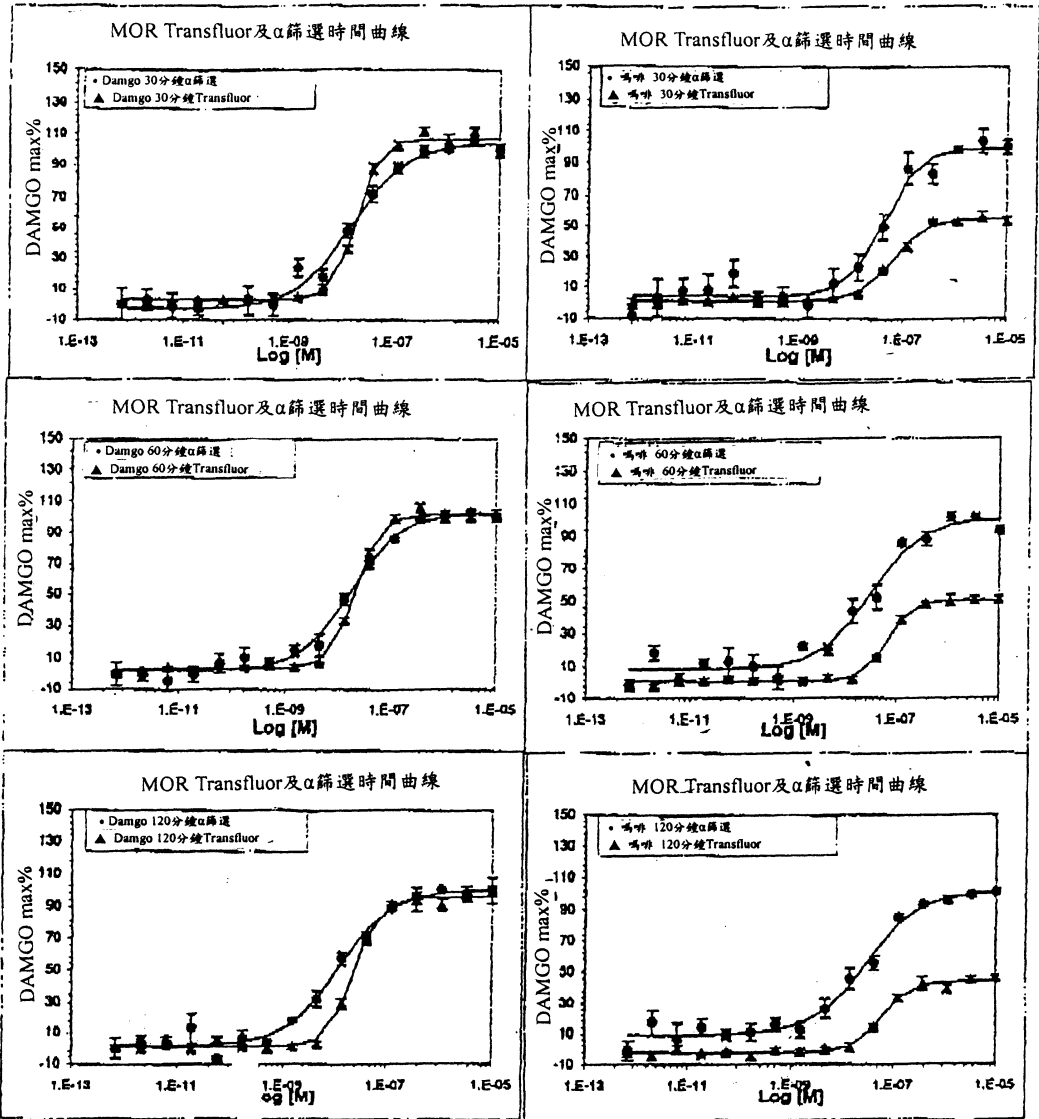


圖 8-C

圖 8-D

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (4C) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)