

I291555

公 告 本

96. 7. 13

年 月 日修(更)正本

發明專利說明書

中文說明書替換本(96年7月)

(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：092120775

※ 申請日期：92. 7. 30

※IPC 分類：

G01N 33/53

C07K 14/47, 14/45

A61K 38/17, A61P 1/00

壹、發明名稱：(中文/英文)

用於治療缺血性心臟病及充血性心衰竭之人類 G 蛋白-偶聯受體及其調節劑

HUMAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR AND MODULATORS THEREOF
FOR THE TREATMENT OF ISCHEMIC HEART DISEASE AND CONGESTIVE
HEART FAILURE

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商艾尼納製藥公司

Arena Pharmaceuticals, Inc.

代表人：(中文/英文)

大衛 L 布萊福

David L. Bradfute

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加利福尼亞州聖地牙哥市南西脊道 6166 號

6166 Nancy Ridge Drive, San Diego, California 92121, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

參、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 約翰·W·亞當

John W. Adams

2. 丹尼爾·T·康諾里

Daniel T. Connolly

住居所地址：(中文/英文)

1. 美國加州 92109 聖地牙哥市
San Diego, California 92109, U.S.A.
2. 美國加州 92008 卡斯貝德市
Carlsbad, California 92008, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

- (1)~(2) 美國 U.S.A.

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 ☒ 主張國際優先權：

【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 8 月 1 日；60/400,774

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。

住居所地址：(中文/英文)

1. 美國加州 92109 聖地牙哥市
San Diego, California 92109, U.S.A.
2. 美國加州 92008 卡斯貝德市
Carlsbad, California 92008, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

- (1)~(2) 美國 U.S.A.

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 ☒ 主張國際優先權：

【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 8 月 1 日；60/400,774

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】

本發明關於辨識候選化合物是否為孤兒(orphan)G蛋白-偶聯受體(GPCR)之調節劑。較佳者該GPCR為人類GPCR。在一些具體實施例中，GPCR由心肌細胞內生性表現。在一些具體實施例中，GPCR與Gi-偶聯，且降低細胞內環單磷酸腺苷的濃度。在一些具體實施例中，GPCR的過度表現促使心肌細胞存活。在一些具體實施例中，GPCR的過度表現可挽救因缺氧/回氧所導致的心肌細胞凋亡。在一些具體實施例中，GPCR在患有充血性心衰竭的個體中被向下調節。本發明的促效劑預期可作為治療缺血性心臟病(包含心肌梗塞)、心肌梗塞後之重塑及充血性心衰竭之治療藥物。

【先前技術】

A. 缺血性心臟病及充血性心衰竭

充血性心衰竭(CHF)影響約5百萬美國人，且每年有50萬個新病例產生。就定義而言，CHF為一種心臟病，其臨床病徵為降低心輸出量，靜脈壓增加力，且伴隨著化學分子的不正常而造成心臟衰竭持續惡化及心臟細胞過早死亡(請參《心衰竭：疾病生理學，分子生物學，及臨床管理》，Katz, AM, Lippincott Williams and Wilkins, 2000)。在成人心臟，因為喪失的細胞無法取代替換，肌肉細胞(心肌細胞)死亡為心衰竭自然原因的重要元素。因為心衰竭一旦出現症狀，5年存活率少於50%，任何心衰竭的定

義若不能考慮促進心肌死亡的分子過程均忽略此症狀的主要臨床特徵。因此，如今許多團體的研究集中於規範心肌死亡及存活的分子機制及訊息傳遞路徑。細胞培養及小動物實驗清楚的證實心肌上的G蛋白-偶聯受體為心肌收縮功能的重要調節劑，同時也與心肌細胞死亡或存活的調節有關(請參Adams及Brown, *Oncogene*(2001)20:1626-1634)。然而，目前並沒有臨床上可得的藥物是設計用來抑制心肌細胞死亡或直接活化其存活路徑。近來公佈小鼠及大鼠證據顯示，心肌細胞存活路徑的活化或死亡路徑之抑制顯著改進心臟功能及動物存活(請參Lee等人，*Endocrinology* (1999) 140:4831-40；Laugwitz等人，*Hum Gene Ther* (2001) 12:2051-63)。因此類似的治療策略顯然對於人類心臟衰竭的治療相當值得期待。

B. G蛋白-偶聯受體

雖然人類體內存在許多類別的受體，目前所知數量最多且與治療相關的即為G蛋白-偶聯受體(GPCR)一類。據估計有3萬至4萬個基因存於人類基因組中，這當中約2%估計可編碼GPCR。包含GPCR在內，其內生性配體已被辨識出的受體，稱之為「已知配體」受體，而內生性配體尚未被辨識出的受則是「孤兒(orphan)」受體。

GPCR在藥劑製品的開發上占有重要地位：從100種已知配體GPCR當中大概20種，開發出全部處方藥劑之約60%的。例如，於1999年，前100大處方藥的品牌，就有下列藥物與GPCR作用(括號中指出與該藥物相關的主要治療疾

病及/或失調)：

Claritin®(過敏)、 Prozac®(憂鬱)、 Vasotec®(高血壓)、
 Paxil®(憂鬱)、 Zoloft®(憂鬱)、 Zyprexa®(精神疾病)、
 Cozaar®(高血壓)、 Imitrex®(偏頭痛)、 Zantac®(胃食道逆流)、
 Propulsid®(胃食道逆流)、 Risperdal®(精神分裂症)、 Serevent®(氣喘)、
 Pepcid®(憂鬱)、 Gaster®(潰瘍)、 Atrovent®(支氣管痙攣)、
 Effexor®(憂鬱)、 Depakote®(癲癇)、 Cardura®(前列腺炎)、
 Allegra®(過敏)、 Lupron®(前列腺癌)、 Zoladex®(前列腺癌)、
 Diprivan®(麻醉)、 BuSpar®(焦慮)、 Ventolin®(支氣管痙攣)、
 Hytrin®(高血壓)、 Wellbutrin®(憂鬱)、 Zyrtec®(鼻炎)、
 Plavix®(MI/中風)、 Toprol-XL®(高血壓)、 Tenormin®(心絞痛)、
 Xalatan®(青光眼)、 Singular®(氣喘)、 Diovan®(高血壓)及
 Harnal®(前列腺肥大)

(Med Ad News 1999資料)

GPCR都具有一種基本結構基元，其有22至24個疏水性氨基酸形成的7個序列片段形成7個 α 螺旋結構，其各自跨越細胞膜(各段以數字編號以供識別，如跨膜區-1(TM-1)，跨膜區-2(TM-2)等)。在位於細胞膜外部(或「細胞外」側)之跨膜 α 螺旋間，即跨膜區-2及跨膜區-3之間、跨膜區-4及跨膜區-5之間以及跨膜區-6及跨膜區-7之間(這些稱為「胞外」區1、2及3(EC-1、EC-2及EC-3))，皆以氨基酸鏈連結。在位於細胞膜內部(或「細胞內」側)之跨膜 α 螺旋間，即跨膜區-1及跨膜區-2之間、跨膜區-3及跨膜區-4之間以及跨膜區-5及跨膜區-6之間(這些分別稱之為「胞內」

區1、2及3(IC-1、IC-2及IC-3))，亦以胺基酸鏈相連。受體之「羧基」("C")端位於細胞內，而受體「胺基」("N")端位於細胞外。

一般而言，當配體與受體結合(一般稱為受體「活化」)時，受體之構形會產生變化而有助於其胞內區與細胞內之「G蛋白」偶聯。曾有報告指出GPCR對於G蛋白之結合為「雜亂的」，也就是說一個GPCR可與一種以上的G蛋白作用。請參Kenakin, T., 43 Life sciences 1095 (1988)。雖然，存在其他G蛋白，目前所辨認出的G蛋白為Gq、Gs、Gi、Gz及Go。被配體活化的GPCR與G蛋白偶聯而起始一連串訊號傳遞過程(稱之為「訊息傳遞」)。在一般的情況下，訊息傳遞最後造成細胞活化或細胞抑制。雖然不希望被理論所侷限，咸認為受體的IC-3環與羧基端均會與G蛋白交互反應。

在生理情況下，GPCR存在於細胞膜中並達到2種不同構形之平衡：「不活化」狀態及「活化」狀態。在不活化狀態下的受體不能夠連結細胞內訊息傳遞路徑以觸發訊息傳遞而引起生物反應。改變受體構形為活化狀態允許其與訊息傳遞路徑連鎖(經由G蛋白)而產生生物反應。

受體可因為配體或如藥品之類的化合物而在維持穩定的活化狀態。近來發現，包含，但不限於，修飾受體胺基酸序列，提供有別於配體或藥物的方法可幫助及穩定受體處於活化狀態的構形。這些方法模擬配體與受體結合所產生的結果而有效地將受體穩定維持於活化狀態。此不需配體

而穩定活化的方法稱之為「本質性(持續性)受體活化作用(constitutive receptor activation)」。

【發明內容】

本發明關於孤兒 GPCR，本文中稱為 RUP41。RUP41 與 GPR22(GenBank® Accession No. U66581)有關。

RUP41 由心肌細胞內生性表現。人類 RUP41 的基因表現圖譜由 Affmetrix 基因晶片測量，並以多組織點漬法及北方墨漬法確認。經由基因體 DNA 放大而得之大鼠異種同源(ortholog)之 RUP41 的部份編碼序列已被辨識出並公開。此大鼠 RUP41 聚核苷酸片段與已發表的小鼠 RUP41 聚核苷酸序列(XM_137998)具有 97% 序列同一性(identity)。揭示於本文的 RUP41 可與 Gi 偶聯，導致腺環化酶抑制作用且抑制 cAMP 產生。本文進一步揭示，在缺血性及充血性心臟病的實驗模式中，內生性 RUP41 表現量降低。本文亦進一步揭示 RUP41 的過度表現促進心肌細胞存活。由揭示的 RUP41 特性顯示 RUP41 的促效劑可能有助於治療心肌細胞凋亡相關的心臟病。

本發明之一部份係關於辨識候選化合物是否為 RUP41 調節劑的方法。在一些其他的具體實施例中，本發明係關於調節 RUP41 活性的方法，其包含將 RUP41 與 RUP41 調節劑接觸之步驟。在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內 cAMP 含量。在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該接觸發生於活體外(*in vitro*)。

在一些具體實施例中，在判定調節劑是否可有效抑制心肌細胞凋亡的方法中，RUP41調節劑被導入心肌細胞凋亡的細胞培養模式中。在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP含量。在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，接觸發生於活體內(*in vivo*)。在一些具體實施例中，在判定調節劑是否可有效降低缺血性心臟病及心衰竭之相關病理的方法中，RUP41調節劑係投予經歷缺血性心臟病及心衰竭手術模式之小鼠及大鼠。另一個具體實施例，在判定調節劑是否有益心臟重塑及其功能的方法中，RUP41調節劑係投予受實驗性的心肌梗塞處理之動物。在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP含量。在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

RUP41調節劑預期可作為治療缺血性心臟病(包含心肌梗塞)、心肌梗塞後之重塑及充血性心衰竭之治療藥劑。在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP含量。在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

人類RUP41之第一對對偶基因的聚核苷酸片段及其編碼之多肽片段分別如序列表中序列識別號:1及序列識別號:2所示(對應序列識別號:2多肽之編碼區為序列識別號:1的核苷酸237至1538)。人類RUP41多肽之第二對對偶基因的胺基酸序列(GenBank® Accession No. AAB63815)，包含將序列識別號:2胺基酸位置425上的離胺酸(lysine)單取代為半胱胺酸(cysteine)，即為序列識別號:3(相對之編碼序列

為 GenBank® Accession No. AC002381 的 79559 至 80860 核苷酸)。小鼠 RUP41 的聚核苷酸序列及其編碼之多肽序列，分別如序列表所示之序列識別號：4 及序列識別號：5。包含大鼠 RUP41 部份編碼序列之聚核苷酸序列如序列識別號：6 所示。

在第一個發明態樣中，本發明特徵為一種識別候選化合物是否為 RUP41 GPCR 的調節劑之方法，該受體包含選自下列群組的多肽：

- (a) 序列識別號：2 的多肽；
- (b) 序列識別號：3 的多肽；及
- (c) 序列識別號：5 的多肽；

或其片段或變異體，其中該受體與 G 蛋白偶聯，該方法包含下列步驟：

- (a') 將候選化合物與受體接觸；及
- (b') 測定受體功能是否可被調節，其中受體功能改變表示該候選化合物為該 GPCR 之調節劑。

本發明亦關於一種識別候選化合物是否為心臟保護作用之調節劑的方法，其包含下列步驟：

(a) 將候選化合物與 GPCR 接觸，該受體包含選自下列群組的多肽：

- (i) 序列識別號：2 的多肽；
- (ii) 序列識別號：3 的多肽；及
- (iii) 序列識別號：5 的多肽；

或其片段或變異體，其中受體與 G 蛋白偶聯；及

(b) 測定該受體功能是否被調控；

其中受體功能改變表示該候選化合物為心臟保護作用(cardioprotection)的調節劑。

在一些具體實施例中，該受體包含選自序列識別號：2胺基酸2至433或序列識別號：3胺基酸2至433的多肽片段。

在一些具體實施例中，RUP41 GPCR為內生性。

RUP41 GPCR對偶基因的變異體亦屬於本發明之範圍中。

序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41多肽的哺乳類異種同源基因亦屬於本發明之範圍中。在一些具體實施例中，該哺乳類異種同源基因包含小鼠RUP41、大鼠RUP41及非人類的靈長類動物之RUP41。

與序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之RUP41多肽具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性之多肽變異體亦屬於本發明之範圍中。在一些特定實施例中，多肽序列同源性係使用習知的「基本局部序列比對搜索工具」(「BLAST」)評估(請參例如Karlin及Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-8；Altschul等人, J Mol Biol (1990) 215:403-410；Altschul等人, Nature Genetics (1993) 3:266-272；及Altschul等人, Nucleic Acids Res (1997) 25:3389-3402；該等文獻之揭示皆以參考其整體併入本文)。該多肽變異體可包含一或多個胺基酸缺失、插入及

取代。序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之RUP41多肽的本質性活化型多肽變異體亦屬於本發明之範圍中。在一些具體實施例中，該本質性活化型之RUP41多肽的即為序列識別號：2或序列識別號：3的多肽，其中在序列識別號：2或序列識別號：3胺基酸位置312的苯丙胺酸(phenylalanine)以離胺酸取代。

在一些具體實施例中，該RUP41 GPCR為重組體。

在一些具體實施例中，該RUP41 GPCR包含一個或多個抗原決定基標記。在一些具體實施例中，該抗原決定基標記為血液凝集抗原(HA)抗原決定基標記。在一些具體實施例中，該抗原決定基標記為核酸序列FLAG抗原決定基標記。在一些具體實施例中，抗原決定基標記為V5抗原決定基標記。提供該等HA、FLAG或V5抗原決定基標記的程序為發明所屬技術領域中具有通常知識者所習知者(例如Clonthech, Palo Alto, CA及Invitrogen, Carlsbad, CA)。

在一些具體實施例中，該G蛋白調控細胞內cAMP濃度。在一些具體實施例中，該G蛋白為Gi。

在一些具體實施例中，該測定係經由使用黑色素細胞分析。在一些具體實施例中，色素聚集程度提高。在一些具體實施例中，色素分散降低。

在一些具體實施例中，該測定為測量選自環AMP(cAMP)、環GMP(cGMP)、三磷酸肌醇(IP₃)、二鹽甘油(DAG)及Ca²⁺之二級傳訊子的濃度。在一些具體實施例中，該二級傳訊子為cAMP。在一些具體實施例中，該

cAMP之濃度降低。在一些具體實施例中，該測定是以與CART-TSH共轉染(co-transfect)的COS-7細胞進行。

在一些具體實施例中，該測定是以包含該GPCR的細胞膜進行。在一些具體實施例中，該胞膜係將細胞使用Brinkman Polytron™均質機均質化製成。在一些具體實施例中，該細胞膜是使用該Polytron均質機強力攪拌3次每回10至20秒而製備成。

在一些具體實施例中，該測定係測量由細胞內部cAMP濃度降低所中介的活性。在一些具體實施例中，該活性為促進細胞生存。在一些具體實施例中，該細胞為初生大鼠心室心肌細胞細胞(NRVM)。在一些具體實施例中，該活性為挽救從缺氧/回氧反應誘導凋亡之細胞。在一些具體實施例中，該細胞為NRVM。

在一些具體實施例中，該G蛋白為嵌合之Gq(del)/G α 次單元且該測定為測量IP₃或Ca²⁺。

在一些具體實施例中，該測定為測量GTP γ S結合至包含該GPCR的細胞膜上。在進一步具體實施例中，GTP γ S以[³⁵S]標示。

在一些具體實施例中，該接觸是在GPCR之已知配體存在下進行。在一些具體實施例中，該已知配體為該GPCR的促效劑。

在一些具體實施例中，該方法進一步包含比較由候選化合物所導致之受體調節反應與將受體和已知的受體調節劑接觸所造成的第二種受體調節反應的步驟。

在第二個發明態樣中，本發明特徵為一種RUP41 GPCR調節劑或以如第一個發明態樣之方法所辨識出的心臟保護作用之調節劑。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選自1 μ M至100 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選自下列之濃度值：1 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M及100 μ M。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選自1 μ M至10 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選自下列之濃度值：1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M及10 μ M。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該調節劑有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為包含至少一個結合區

的抗體或其衍生物。

在第三個發明態樣中，本發明特徵為一種調節 RUP41 GPCR活性的方法，該受體包含選自下列群組的多肽：

- (a) 序列識別號：2的多肽；
- (b) 序列識別號：3的多肽；及
- (c) 序列識別號：5的多肽；

或其片段或變異體，其中該受體與G蛋白偶聯，該方法包含將受體與如第二個發明態樣之調節劑接觸的步驟。

在一些具體實施例中，該受體包含選自序列識別號：2胺基酸2至433及序列識別號：3胺基酸2至433的多肽片段。

RUP41 GPCR之對偶基因變異體亦屬於本發明之範圍中。

序列識別號：2或序列識別號：3的人類RUP41多肽之哺乳類異種同源體亦屬於本發明範圍中。在一些具體實施例中，該哺乳類異種同源體包含小鼠RUP41、大鼠RUP41及非人類之靈長類動物的RUP41。

具有與序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之RUP41多肽至少90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%序列同一性的變異體多肽亦屬於本發明之範圍中。在一些特定實施例中，多肽序列同源性(homology)係使用習知的「基本局部序列比對搜索工具」(「BLAST」)評估(請參例如Karlin及Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-8；Altschul等人, J Mol Biol

(1990) 215:403-410 ; Altschul等人, Nature Genetics (1993) 3:266-272 ; 及 Altschul等人, Nucleic Acids Res (1997) 25:3389-3402 ; 該等文獻之揭示皆以參考其整體併入本文)。該多肽變異體可包含一或多個胺基酸缺失、插入及取代。序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之RUP41多肽的本質性活化型變異體亦屬於本發明之範圍中。在一些具體實施例中，該RUP41多肽的本質性活化型為序列識別號：2或序列識別號：3的多肽，其中在序列識別號：2或序列識別號：3胺基酸位置312的苯丙胺酸以離胺酸取代。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至100 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M及100 μ M。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至10 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7

μM 、8 μM 、9 μM 及10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該接觸包含將該調節劑投予包含該受體的細胞膜。

在一些具體實施例中，該接觸包含將該調節劑投予包含該受體的細胞或組織。

在一些具體實施例中，該接觸包含將該調節劑投予包含該受體的個體。

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在一些具體實施例中，該方法係用來識別調節劑是否具有預防或治療選自下列組群之心血管失調症之療效：

(a) 心臟輸出量降低；及

(b) 靜脈壓增加；

該方法包含以下步驟：

(a') 將調節劑投予心肌細胞凋亡的細胞培養模式中；及

(b') 測定該凋亡是否被抑制，其中該測定是透過選自下列組群之測量法：

- (i) 測量細胞數目；
- (ii) 測量DNA斷裂；及
- (iii) 測量細胞核染色質濃縮；

其中測得細胞凋亡之抑制反應表示對該調節劑具有該治療效果。

在一些具體實施例中，細胞核染色質濃縮的測量係為使用DAPI(4',6'-二甲脒基-2-苯吡啶)染劑進行。

在一些具體實施例中，該方法係用於識別調節劑是否具有預防或治療選自下列組群之缺血性心臟疾病之療效：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞後之重塑；及
- (c) 充血性心衰竭；

該方法包含下列步驟：

- (a') 將調節劑投予心肌細胞凋亡的細胞模式中；及
- (b') 測定該凋亡是否被抑制，其中該測定是透過選自下列組群之測量法：

- (i) 測量細胞數目；
- (ii) 測量DNA斷裂；及
- (iii) 測量細胞核染色質濃縮；

其中測得細胞凋亡之抑制反應表示對該調節劑具有該治療效果。

在一些具體實施例中，細胞核染色質濃縮的測量係為使用DAPI(4',6'-二甲脒基-2-苯吡啶)染劑進行。

在一些具體實施例中，該方法係用於識別調節劑是否具有

有預防或治療選自下列組群之心血管失調症的療效：

(a) 心臟輸出量降低；及

(b) 靜脈壓增加；

該方法包含下列步驟：

(a') 將調節劑投予或不投予心血管失調症的小鼠或大鼠模式中；及

(b') 測定該調節劑的投予是否具有選自下列組群的效果：

(i) 心臟肥大降低；

(ii) 心臟射出分率增加；

(iii) 心室腔體積降低；及

(iv) 心肌細胞凋亡降低；

其中若能測定出上述效果即表示該調節劑具有所述的療效。

在一些具體實施例中，該方法係用於識別調節劑是否具有預防或治療選自下列組群中之缺血性心臟疾病之療效：

(a) 心肌梗塞；

(b) 心肌梗塞後之重塑；或

(c) 充血性心衰竭；

該方法包含下列步驟：

(a') 將調節劑投予或不投予缺血性心臟病的小鼠或大鼠模式中；及

(b') 測定該調節劑的投予是否具有選自下列組群的效果：

- (v) 心臟肥大降低；
- (vi) 心臟射出分率增加；
- (vii) 心室腔體積降低；及
- (viii) 心肌細胞凋亡降低；

其中若能測定出上述效果即表示該調節劑具有所述的療效。

在一些具體實施例中，該個體需要預防或治療選自下列組群之心血管失調症疾病：

- (a) 心臟輸出量減少；及
- (b) 靜脈壓增加；

在一些具體實施例中，該個體需要預防或治療選自下列組群之缺血性心臟病：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞後的重塑；及
- (c) 充血性心衰竭；

在一些具體實施例中，該個體需要改變選自下列組群之心血管功能：

- (a) 心臟肥大降低；
- (b) 心臟射出分率增加；
- (c) 心室腔體積降低；及
- (d) 心肌細胞凋亡降低。

在一些具體實施例中，該個體為遺傳學上易患有選自下列組群之心血管失調症的小鼠或大鼠：

- (a) 心臟輸出量減少；及

(b) 靜脈壓增加；

在一些具體實施例中，該方法係用於識別調節劑是否具有預防或治療選自下列組群之心血管失調症之療效：

(a) 心臟輸出量降低；及

(b) 靜脈壓增加；

該方法包含下列步驟：

(a') 將調節劑投予或不投予遺傳學上易患有心血管失調症的小鼠或大鼠；及

(b') 測定該調節劑的投予是否具有選自下列組群的效果：

(i) 心臟肥大降低；

(ii) 心臟射出分率增加；

(iii) 心室腔體積降低；及

(iv) 心肌細胞凋亡降低；

其中若能測定出上述效果即表示該調節劑具有所述的療效。

在第四個發明態樣中，本發明特徵為一種對有需要之個體改變其心血管功能的方法，該方法包含將治療有效量之如第二個發明態樣之調節劑與RUP41 GPCR接觸，該受體包含選自下列組群中的多肽：

(a) 序列識別號：2的多肽；

(b) 序列識別號：3的多肽；及

(c) 序列識別號：5的多肽；

或其對偶基因變異體。

在一些具體實施例中，該心血管功能的改變係選自下列組群：

- (a) 心臟肥大降低；
- (b) 心臟射出分率增加；
- (c) 心室腔體積降低；及
- (d) 心肌細胞凋亡降低。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至100 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M及100 μ M。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至10 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M及10 μ M。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該接觸係將該調節劑以口服投藥進行。

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第五個發明態樣中，本發明特徵為一種對有需要之個體預防或治療其心血管失調症的方法，該方法包含將治療有效量之如第二發明態樣之調節劑與RUP41 GPCR接觸，該受體包含選自下列組群的多肽：

- (a) EQ ID NO:2的多肽；
- (b) 序列識別號：3的多肽；及
- (c) 序列識別號：5的多肽；

或其對偶基因變異體。

在一些具體實施例中，該心血管失調症係選自下列組群：

- (a) 心臟輸出降低；及
- (b) 靜脈壓增加；

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選

自 1 μM 至 100 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2 或序列識別號：3 之人類 RUP41 GPCR 的 EC50 或 IC50 小於選自下列之濃度值：1 μM 、10 μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM 、60 μM 、70 μM 、80 μM 、90 μM 及 100 μM 。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2 或序列識別號：3 之人類 RUP41 GPCR 的 EC50 或 IC50 小於選自 1 μM 至 10 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2 或序列識別號：3 之人類 RUP41 GPCR 的 EC50 或 IC50 小於選自下列之濃度值：1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 及 10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內 cAMP 濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該接觸係將該調節劑以口服投藥進行。

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第六個發明態樣中，本發明特徵為一種對有需要之個體預防或治療缺血性心臟病的方法，該方法包含將治療有

效量之如第二發明態樣之調節劑與RUP41 GPCR接觸，該受體包含選自下列組群的多肽：

- (a) 序列識別號：2的多肽；
- (b) 序列識別號：3的多肽；及
- (c) 序列識別號：5的多肽；

或其對偶基因變異體。

在一些具體實施例中，該缺血性心臟病係選自下列組群：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞後之重塑；及
- (c) 充血性心衰竭；

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選自1 μ M至100 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選自下列之濃度值：1 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M及100 μ M。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選自1 μ M至10 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC₅₀或IC₅₀小於選自下列之

濃度值：1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 及10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該接觸係將該調節劑以口服投藥進行。

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第七個發明態樣中，本發明特徵為一種製備組合物的方法，其包含識別出RUP41 GPCR調節劑，接著混合載體及該調節劑，其中該調節劑係以如第一個發明態樣的方法識別。

在一些具體實施例中，該調節劑選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至100 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、10

μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM 、60 μM 、70 μM 、80 μM 、90 μM 及100 μM 。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至10 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 及10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該可由如第一個發明態樣之方法識別的調節劑是以第一個發明態樣的方法識別。

在一些具體實施例中，該調節劑為第二個發明態樣之調節劑。

在第八個發明態樣中，本發明特徵為一種藥學及生理學可接受的組合物，其包含第二個發明態樣之調節劑、或基本上由第二個發明態樣之調節劑組成、或是由第二個發明態樣之調節劑組成。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或

序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至100 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、10 μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM 、60 μM 、70 μM 、80 μM 、90 μM 及100 μM 。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至10 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 及10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在第九個發明態樣中，本發明特徵為一種改變心血管功能的方法，其包含對有需要該改變的個體提供或投予如第八個發明態樣之藥學或生理學可接受組合物，該心血管功能的改變係選自以下組群：

- (a) 心臟肥大降低；
- (b) 心臟射出分率增加；
- (c) 心室腔體積降低；及

(d) 心肌細胞凋亡降低。

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第十個發明態樣中，本發明特徵為一種治療心血管失調症的方法，其包含對有需要該治療之個體提供或投予如第八個發明態樣之藥學或生理學可接受的組合物，該心血管失調症係選自下列組群：

(a) 心臟輸出降低；及

(b) 靜脈壓增加；

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第十一個發明態樣中，本發明特徵為一種治療缺血性心臟病的方法，其包含對於需要該治療的個體提供或投予如第八個發明態樣之藥學或生理學可接受的組合物，該缺血性心臟係選自下列組群：

(a) 心肌梗塞；

(b) 心肌梗塞後之重塑；及

(c) 充血性心衰竭；

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔

子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第十二個發明態樣中，本發明特徵為一種使用由第二個發明態樣之調節劑以製備治療個體心血管失調症之藥劑的方法。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至100 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、10 μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM 、60 μM 、70 μM 、80 μM 、90 μM 及100 μM 。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至10 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 及10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該心血管失調症係選自下列組群：

(a) 心臟輸出降低；及

(b) 靜脈壓增加。

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第十三個發明態樣中，本發明特徵為一種使用由第二個發明態樣之調節劑以製備治療個體缺血性心臟病之藥劑的方法。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至100 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M及100 μ M。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至10 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別

號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 及10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該缺血性心臟病係選自下列組群：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞後之重塑；及
- (c) 充血性心衰竭。

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第十四個發明態樣中，本發明特徵為一種製備基因剔除小鼠的方法，其中該基因剔除小鼠易患有選自下列組群之心血管失調症：

- (a) 心臟輸出降低；及
- (b) 靜脈壓增加；

該方法包含剔除編碼序列識別號：5多肽之基因的步驟。

在一些具體實施例中，該剔除具心肌細胞選擇性。

在第十五個發明態樣中，本發明特徵為一種製造基因剔除小鼠的方法，其中該基因剔除小鼠易患有選自下列組群之缺血性心臟病：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞後之重塑；及
- (c) 充血性心衰竭；

該方法包含剔除編碼序列識別號：5多肽之基因的步驟。

在一些具體實施例中，該剔除具心肌細胞選擇性。

在第十六個發明態樣中，本發明特徵為一種如第十四個發明態樣或第十五個發明態樣所述之基因剔除小鼠。

在第十七個發明態樣中，本發明特徵為一種使用第十六個發明態樣之基因剔除小鼠以識別候選化合物是否具有預防或治療心血管失調症之療效的方法，該心血管失調症係選自下列組群：

- (a) 心臟輸出降低；及
- (b) 靜脈壓增加；

該方法包含以下步驟：

- (a') 將化合物投予或不投予小鼠；及
- (b') 測定該調節劑的投予是否具有選自下列組群之效果：

- (i) 心臟肥大降低；
- (ii) 心臟射出分率增加；

(iii) 心室腔體積降低；及

(iv) 心肌細胞凋亡降低；

其中若能測定出上述效果即表示該該調節劑具有所述的療效。

在第十八個發明態樣中，本發明特徵為一種使用第十六個發明態樣之基因剔除小鼠以識別候選化合物是否具有預防或治療缺血性心臟病療效的方法，該缺血性心臟病擇自以下組群：

(a) 心肌梗塞；

(b) 心肌梗塞後之重塑；及

(c) 充血性心衰竭；

該方法包含以下步驟：

(a') 將化合物投予或不投予小鼠；及

(b') 測定該調節劑的投予是否具有選自下列組群之效果：

(i) 心臟肥大降低；

(ii) 心臟射出分率增加；

(iii) 心室腔體積降低；及

(iv) 心肌細胞凋亡降低；

其中若能測定出上述效果即表示該該調節劑具有所述的療效。

在第十九個發明態樣中，本發明特徵為一種製造基因剔除大鼠的方法，其中該基因剔除大鼠易患有選自以下組群之心血管失調症：

(a) 心臟輸出降低；及

(b) 靜脈壓增加；

該方法包含剔除編碼序列識別號：6多肽之基因的步驟。

在一些具體實施例中，該剔除具心肌細胞選擇性。

在第二十個發明態樣中，本發明特徵為一種製造基因剔除大鼠的方法，其中該基因剔除大鼠易患有選自下列組群之缺血性心臟病：

(a) 心肌梗塞；

(b) 心肌梗塞後之重塑；及

(c) 充血性心衰竭；

該方法包含剔除編碼序列識別號：6多肽之基因的步驟。

在一些具體實施例中，該剔除具心肌細胞選擇性。

在第二十一個發明態樣中，本發明特徵為一種如第十九個發明態樣或第二十個發明態樣所述的基因剔除大鼠。

在第二十二個發明態樣中，本發明特徵為一種使用第二十一個發明態樣之基因剔除大鼠以識別候選化合物是否具有預防或治療心血管失調症療效的方法，該心血管失調症係選自下列組群：

(a) 心臟輸出降低；及

(b) 靜脈壓增加；

該方法包含下列步驟：

(a') 將化合物投予或不投予大鼠；且

(b') 測定該調節劑的投予是否具有選自下列組群之效果：

- (i) 心臟肥大降低；
- (ii) 心臟射出分率增加；
- (iii) 心室腔體積降低；及
- (iv) 心肌細胞凋亡降低；

其中若能測定出上述效果即表示該該調節劑具有所述的療效。

在第二十三個發明態樣中，本發明特徵為一種使用第二十一個發明態樣之基因剔除大鼠以識別候選化合物是否具有預防或治療缺血性心臟病療效的方法，該缺血性心臟病係選自下列組群：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞後之重塑；及
- (c) 充血性心衰竭；

該方法包含下列步驟：

- (a') 將化合物投予或不投予大鼠；且
- (b') 測定該調節劑的投予是否具有選自下列組群之效果：

- (i) 心臟肥大降低；
- (ii) 心臟射出分率增加；
- (iii) 心室腔體積降低；及
- (iv) 心肌細胞凋亡降低；

其中若能測定出上述效果即表示該該調節劑具有所述的療效。

在第二十四個發明態樣中，本發明特徵為一種經分離大

鼠RUP41多肽，其係選自下列組群：

(a) 包含序列識別號：6中至少連續75個核苷酸聚核苷酸；

(b) 包含序列識別號：6中至少連續150個核苷酸的聚核苷酸；

(c) 包含序列識別號：6中至少連續250個核苷酸的聚核苷酸；

(d) 包含序列識別號：6中至少連續350個核苷酸的聚核苷酸；或

(e) 包含序列識別號：6中至少連續500個核苷酸的聚核苷酸。

在一些具體實施例中，該連續序列不包含序列識別號：6之核苷酸514。

在一些具體實施例中，該經分離大鼠RUP41多肽包含編碼與序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR同源之內生大鼠RUP41 GPCR的核苷酸序列、或基本上由編碼與序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR同源之內生大鼠RUP41 GPCR的核苷酸序列組成，或由編碼與序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR同源之內生大鼠RUP41 GPCR的核苷酸序列組成。

與上述(a)至(e)中任何一個RUP41聚核苷酸具有至少60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性之多肽變異體亦屬於本發明之範圍中。在一些具體實施例中，多肽序列同

源性係使用習知的「基本局部序列比對搜索工具」(「BLAST」)評估(請參例如 Karlin及 Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-8; Altschul等人, J Mol Biol (1990) 215:403-410; Altschul等人, Nature Genetics (1993) 3:266-272; 及 Altschul等人, Nucleic Acids Res (1997) 25:3389-3402; 該等文獻之揭示皆以參考其整體併入本文)。該多肽變異體可包含一或多個胺基酸缺失、插入及取代。

在進一步的具體實施例中，本發明特徵為一種該經分離多肽之互補序列。

在第二十五個發明態樣中，本發明特徵為一種重組載體，該載體包含第二十四個發明態樣之經分離多肽。在一些具體實施例中，該重組載體為一種表現載體。又一些具體實施例中，該表現載體為真核表現載體。適合的表現載體對發明所屬技術領域中具有通常知識者為顯而易知者。

在一些具體實施例中，該重組載體係使用於暫時或穩定轉染。在一些具體實施例中，該重組載體係使用於感染方法。

在一些具體實施例中，該重組載體係使用於不活化 RUP41基因之方法的目標載體。

在一些具體實施例中，該重組載體係經分離。

在第二十六個發明態樣中，本發明特徵為一種包含第二十五個發明態樣之重組載體的原核及真核宿主細胞。在一些具體實施例中，該宿主細胞為原核細胞，且使用該重組

載體穩定轉形(transform)。在一些具體實施例中，該宿主細胞為真核細胞，且使用該重組載體暫時轉形。在其他進一步具體實施例中，宿主細胞為真核細胞，且使用該重組載體穩定轉形。

在一些具體實施例中，該宿主細胞為真核細胞，較佳者為哺乳動物細胞，更佳者係選自下列組群：293、293T、CHO及COS-7細胞。在一些具體實施例中，該宿主細胞為真核細胞，更佳者為黑色素細胞。其他適合的宿主細胞對發明所屬技術領域中具有通常知識者為顯而易知者。

在一些具體實施例中，該宿主細胞為哺乳動物真核幹細胞或真核的類幹細胞，且該重組載體係使用於不活化RUP41基因的方法。在一些具體實施例中，該宿主細胞為哺乳動物真核體細胞，且該重組載體係使用於不活化RUP41基因的方法。

一個進一步具體實施例包含一種為第二十四個發明態樣之多肽的原核或真核宿主細胞重組體。

在一些具體實施例中，該宿主細胞係經分離。

在第二十七個發明態樣中，本發明特徵為一種GPCR融合蛋白，其包含本質性活化之G蛋白-偶聯受體及G蛋白，該受體包含選自下列組群的RUP40多肽：

- (a) 序列識別號：2的多肽；
 - (b) 序列識別號：3的多肽；及
 - (c) 序列識別號：5的多肽；
- 或其片段或變異體。

在一些具體實施例中，該受體包含選自序列識別號：2胺基酸2至433或序列識別號：3胺基酸2至433的該多肽片段。

在RUP41 GPCR對偶基因的變異體應屬於本發明之範圍中。

序列識別號：2或序列識別號：3的人類RUP41多肽之哺乳類異種同源體亦屬於本發明之範圍中。在一些具體實施例中，該哺乳類異種同源體包含小鼠RUP41、大鼠RUP41及非人類之靈長類動物RUP41。

與序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之RUP41多肽具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性之多肽變異體亦屬於本發明之範圍中。在一些特定實施例中，多肽序列同源性係使用習知的「基本局部序列比對搜索工具」(「BLAST」)評估(請參例如Karlin及Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-8; Altschul等人, J Mol Biol (1990) 215:403-410; Altschul等人, Nature Genetics (1993) 3:266-272; 及Altschul等人, Nucleic Acids Res (1997) 25:3389-3402; 該等文獻之揭示皆以參考其整體併入本文)。該多肽變異體可包含一或多個胺基酸缺失、插入及取代。序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之RUP41多肽的本質性活化型之多肽變異體亦屬於本發明之範圍中。在一些具體實施例中，該RUP41多肽的本質性活化型為序列識別號：2或序列識別號：3的多肽，其中在

序列識別號：2或序列識別號：3胺基酸位置312的苯丙胺酸係以離胺酸取代。

在第二十八個發明態樣中，本發明特徵為一種識別候選化合物是否為RUP 41 GPCR配體的方法，該受體包含選自下列組群的多肽：

- (a) 序列識別號：2的多肽；
- (b) 序列識別號：3的多肽；及
- (c) 序列識別號：5的多肽；

或其片段或變異體，該方法包含下列步驟：

(a') 在候選化合物存在或不存的情況下將該受體與視需要標記的該受體之已知配體接觸；

(b') 檢測該已知配體與受體之複合物；及

(c') 測定該複合物的生成於候選化合物存在時是否較候選化合物不存在時少；

其中該測定即判定該識別候選化合物為該受體的配體。

在一些具體實施例中，該受體包含選自序列識別號：2胺基酸2至433及序列識別號：3胺基酸2至433的多肽片段。

RUP41 GPCR對偶基因變異體應屬於本發明之範圍中。

序列識別號：2或序列識別號：3的人類RUP41多肽之哺乳類異種同源體亦屬於本發明範圍中。在一些具體實施例中，該哺乳類異體同源體包含小鼠RUP41、大鼠RUP41及非人類靈長類動物RUP41。

與序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之

RUP41 多肽具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性之多肽變異體亦屬於本發明之範圍中。在一些特定實施例中，多肽序列同源性係使用習知的「基本局部序列比對搜索工具」(「BLAST」)評估(請參例如 Karlin及 Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-8; Altschul等人, J Mol Biol (1990) 215:403-410; Altschul等人, Nature Genetics (1993) 3:266-272; 及 Altschul等人, Nucleic Acids Res (1997) 25:3389-3402; 該等文獻之揭示皆以參考其整體併入本文)。該多肽變異體可包含一或多個胺基酸缺失、插入及取代。序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之RUP41多肽的本質性活化型之多肽變異體亦屬於本發明之範圍中。在一些具體實施例中，該RUP41多肽的本質性活化型為序列識別號：2或序列識別號：3的多肽，其中在序列識別號：2或序列識別號：3胺基酸位置312的苯丙胺酸係以離胺酸取代。

在一些具體實施例中，該受體之已知配體為第二個發明態樣之調節劑。

在一些具體實施例中，該受體之已知配體包含選自下列組群的標記：

- (a) 放射性同位素；
- (b) 酵素；及
- (c) 螢光團。

在一些較佳具體實施例中，該標記為放射性同位素。在

一些具體實施例中，該放射性同位素為³H。

在第二十九個發明態樣中，本發明特徵為一種放射線照影方法，其包含提供或投予需要該放射線照影之個體放射性標記的化合物，其中該化合物係選自第二個發明態樣之調節劑及第二十八個發明態樣的配體。

在一些具體實施例中，該個體為哺乳動物。在一些具體實施例中，該哺乳動物為馬、牛、羊、豬、貓、狗、兔子、小鼠、大鼠、非人類靈長動物或人。較佳者為小鼠、大鼠或人。最佳者為人。

在第三十個發明態樣中，本發明特徵為一種帶有人類RUP41 GPCR基因的非人類哺乳類基因轉殖動物。在一些具體實施例中，該非人類哺乳動物為小鼠、大鼠或豬。

在一些具體實施例中，該人類RUP41 GPCR包含選自下列組群的多肽：

- (a) 序列識別號：2的多肽；
- (b) 序列識別號：2的多肽，其中在序列識別號：2胺基酸位置312上的苯丙胺酸被離胺酸取代；
- (c) 序列識別號：3的多肽；或
- (d) 序列識別號：3的多肽，其中在序列識別號：3胺基酸位置312上的苯丙胺酸被離胺酸取代。

RUP41 GPCR的對偶基因變異體亦屬於本發明之範圍中。

在一些具體實施例中，該人類RUP41基因轉殖表現具有心肌細胞選擇性。

在第三十一個發明態樣中，本發明為使用第三十個發明態樣的非人類哺乳類基因轉殖動物以識別本發明的化合物是否具有心臟保護作用療效。

在一些具體實施例中，該非人類哺乳動物為小鼠、大鼠或豬。

該化合物之心臟保護作用療效可藉由將該化合物投予該非人類哺乳類基因轉殖動物，並測定將該化合物投予如實例18之大鼠活體內模式或其類似的小鼠或豬的活體內模式中，與單獨投予媒劑(vehicle)之該非人類哺乳類基因轉殖動物相較，是否會導致IS/AAR降低而評估。

在一些具體實施例中，該化合物之心臟保護作用療效可藉由將該化合物投予該非人類哺乳類基因轉殖動物，並測定該投予是否會導致選自以下組群之效果：

- (a) 心臟肥大降低；
- (b) 心臟射出分率增加；
- (c) 心室腔體積降低；及
- (d) 心肌細胞凋亡降低；

其中若能測定出上述效果即表示該化合物具有所述的療效。

在一些具體實施例中，該本發明化合物為第二個發明態樣之調節劑。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或

序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至100 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、10 μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM 、60 μM 、70 μM 、80 μM 、90 μM 及100 μM 。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至10 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 及10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在一些具體實施例中，該本發明化合物為第三十個發明態樣的配體。

在第三十二個發明態樣中，本發明特徵為一種製造RUP41 GPCR調節劑的方法，其包含下列步驟：

(a) 以請求項1或2的方法識別出該調節劑；及

(b) 合成由步驟(a)所識別出的調節劑。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促

效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至100 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M及100 μ M。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至10 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M及10 μ M。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在第三十三個發明態樣中，本發明特徵為一種如第二個發明態樣之調節劑，其係用於改變心血管功能。

在一些具體實施例中，該心血管功能之改變係選自：

- (a) 心臟肥大降低；
- (b) 心臟射出分率增加；

(c) 心室腔體積降低；及

(d) 心肌細胞凋亡降低。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至100 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、10 μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM 、60 μM 、70 μM 、80 μM 、90 μM 及100 μM 。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μM 至10 μM 之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 及10 μM 。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在第三十四個發明態樣，本發明特徵為一種如第二個發明態樣之調節劑，其係用於預防或治療心血管失調症。

在一些具體實施例中，該心血管失調症係選自：

- (a) 心臟輸出降低；及
- (b) 靜脈壓增加。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至100 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M及100 μ M。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至10 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M及10 μ M。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

在第三十五個發明態樣，本發明特徵為一種如第二個發

明態樣之調節劑，其係用於預防或治療缺血性心臟病。

在一些具體實施例中，該缺血性心臟病係選自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞後之重塑；及
- (c) 充血性心衰竭。

在一些具體實施例中，該調節劑係選自促效劑、部份促效劑、反向促效劑及拮抗劑。

在一些具體實施例中，該調節劑對於序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至100 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M及100 μ M。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自1 μ M至10 μ M之範圍中的值。在一些具體實施例中，該調節劑對序列識別號：2或序列識別號：3之人類RUP41 GPCR的EC50或IC50小於選自下列之濃度值：1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M及10 μ M。

在一些具體實施例中，該調節劑可降低細胞內cAMP濃度。

在一些具體實施例中，該調節劑具有選擇性。

在一些具體實施例中，該調節劑可為生物口服利用。

在一些具體實施例中，該調節劑為促效劑。

申請人保留排除本發明中任何具體實施例中的一種或多種候選化合物之權利。申請人亦保留排除本發明任何具體實施例中的任何聚核苷酸或多肽之權利。申請人另外保留排除本發明任何具體實施例中的任何缺血性心臟病或任何心血管失調症或任何心肌細胞凋亡之權利。

【實施方式】

科學文獻對於受體及對受體有不同影響的配體已發展許多詞彙。為求明卻與一致性，下列定義將使用於此整份專利文件中。這些定義若與這些名詞其他定義抵觸，將以下列定義為準：

促效劑 (AGONISTS) 意指當其與受體結合時可活化細胞內反應之物質(如配體、候選化合物)。在一些具體實施例中，促效劑為先前並不知其與受體結合時會活化細胞內反應(如增加CTP γ S與細胞膜結合或降低內生性cAMP量)的物質。在一些具體實施例中，促效劑為先前並不知其與受體結合時會抑制脂肪分解的物質。

異位調節劑 (ALLOSTERIC MODULATORS) 意指會影響受體功能活性但不會抑制內生性配體與受體結合之物質(如配體、候選化合物)。異位調節劑包含反向促效劑、部份促效劑及促效劑。

本文中所用之胺基酸縮寫 (AMINO ACID ABBREVIATIONS) 列於表A中：

表 A

丙 胺 酸 (ALANINE)	ALA	A
精 胺 酸 (ARGININE)	ARG	R
天 冬 醯 胺 酸 (ASPARAGINES)	ASN	N
天 冬 胺 酸 (ASPARTIC ACID)	ASP	D
半 胱 胺 酸 (CYCTEINE)	CYS	C
麩 胺 酸 (GLUTAMIC ACID)	GLU	E
麩 醯 胺 酸 (GLUTAMINE)	GLN	Q
甘 胺 酸 (GLYCINE)	GLY	G
組 胺 酸 (HISTIDINE)	HIS	H
異 白 胺 酸 (ISOLEUCINE)	ILE	I
白 胺 酸 (LEUCINE)	LEU	L
離 胺 酸 (LYSINE)	LYS	K
甲 酸 胺 酸 (METHIONINE)	MET	M
苯 丙 胺 酸 (PHENYLALANINE)	PHE	F
脯 胺 酸 (PRALINE)	PRO	P
絲 胺 酸 (SERINE)	SER	S
蘇 胺 酸 (THREONINE)	THR	T
色 胺 酸 (TRYPTOPHAN)	TRP	W
酪 胺 酸 (TYROSINE)	TYR	T
纈 胺 酸 (VALINE)	VAL	V

拮抗劑 (ANTAGONISTS) 意指與促效劑在受體之相同位置競爭結合，但不會活化細胞內反應，因此可抑制由促效

劑引起的細胞內反應之物質(如配體、候選化合物)。拮抗劑在促效劑不存在時不會降低細胞內反應基準值。在一些具體實施例中，拮抗劑為先前並不知當其與受體結合時會與促效劑競爭而能抑制細胞反應的物質，例如其中細胞反應為GTP γ S與胞膜結合或降低細胞內cAMP濃度。

抗體(ANTIBODIES)在本文中可包括單株抗體及多株抗體。抗體可進一步包括IgG、IgA、IgD、IgE及IgM。抗體包括整個抗體，其包括單鏈之整個抗體及抗原結合片段，其包括Fab、Fab'、F(ab)2及F(ab')2。抗體之來源可為任何動物。較佳之抗體來自人類、鼠、兔子、山羊、天竺鼠、倉鼠、駱駝、驢、羊、馬或雞。最佳之抗體具有解離常數或Kd值小於 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M及 10^{-15} M之偶聯親合力。本發明抗體可由任何適合的習知技術製備。

細胞凋亡(APOPTOSIS)(亦稱為計劃性細胞死亡)意指一種細胞死亡形式，其中細胞受在細胞中運作的訊息傳遞系統調控而計劃性的死亡。反之，壞死(necrosis)為細胞因外來因素而死亡。

候選化合物(CANDIDATE COMPOUND)意指可以通過篩檢之分子(例如，但不限於，化合物)。較佳者，「候選化合物」不包括選自受體之反向促效劑、拮抗劑或促效劑的已知化合物；更佳者，其不包括先前已被測定在至少一

種哺乳動物具有療效的化合物；且最佳者，其不包括先前已被測定對人類有療效的化合物。

心臟射出分率(CARDIAC EJECTION FRACTION)意指左心室單次收縮時的血液射出分率。例如，若左心室內有100毫升血液而在收縮時射出90毫升，其心臟射出分率為90%。

心臟肥大(CARDIAC HYPERTROPHY)意指心臟肌肉(心肌)增大。心臟肥大一般是，但並不一定是，對加於心肌上增加的血液動力學負載之調適反應。

密碼子(CODON)意指三個核苷酸(或核苷酸之等效物)所組成之單位，該核苷酸一般包含與磷酸基偶聯之核苷(腺嘌呤核苷(A)、鳥嘌呤核苷(G)、胞嘧啶核苷(C)、尿嘧啶核苷(U)及胸腺嘧啶核苷(T))，且當該密碼被轉譯時編碼一胺基酸。

組合物(COMPOSITION)意指包含至少一種組份的物質；「醫藥組合物(pharmaceutical composition)」為該組合物的一例。

化合物效力(COMPOUND EFFICACY)意指化合物抑制或刺激受體功能之能力的測量值，即活化/抑制訊息傳遞路徑的能力，而非指受體結合親和力。測定化合物效力的方法實例揭示在本專利文件的實施例中。

包含(COMPRISING)、基本上由...組成(CONSISTING ESSENTIALLY OF)及由...組成(CONSISTING OF)在本文中之定義係如其標準定義。M.P.E.P.所給的定義在發明所

屬技術領域中的定義之上，而由聯邦巡迴法院之判例所給的定義在M.P.E.P. 所給的定義之上。

充血性心衰竭 (CONGESTIVE HEART FAILURE (CHF))意指心臟喪失其有效送血能力的失調症。隨年齡增加充血性心衰竭變的更普及。缺血性心臟病為充血性心衰竭最常見之原因，約占有所有案例的60至70%。**靜脈壓**大於12 mmHg即為充血性心衰竭一種主要判別標準，**心臟輸出量的降低**，即相當於循環時間大於25秒，亦為一種判別標準。

本質性活化受體 (CONSTITUTIVELY ACTIVE RECEPTOR)意指受體以與配體或其化學等效物結合之外的方法使受體穩定處於活化狀態。本質性活化受體可為內生性或非內生性。

經本質性活化之受體 (CONSTITUTIVELY ACTIVATED RECEPTOR)意指經修飾而使其本質性活化之內生性受體。CART為「本質性活化受體技術 (Constitutively Activated Receptor Technology)」的首字縮寫，且當本文中使用的此做為GPCR的前綴詞時，應瞭解該帶有此前綴詞之GPCR為經本質性活化之受體。

本質性受體活化作用 (CONSTITUTIVE RECEPTOR ACTIVATION)意指在不經與配體或其化學等效物結合的受體活化作用。

接觸 (CONTACTC或CONTACTING)意指使至少兩部份碰在一起，不論是在活體內系統或活體外系統。

減少 (DECREASE)係指可測量的數量減低，其與「減低 (reduce)」、「減小 (diminish)」、「降低 (lower)」及「使減小 (lessen)」同義。

心臟超音波 (ECHOCARDIOGRAPHY)係指使用聲波測量活的動物心臟結構及功能的方法。

內生性 (ENDOGENOUS)意指哺乳動物自然產生之物質。舉例言之，內生性用於形容術語「受體」時，意指該受體可由哺乳動物(例如，但不限於，人類)自然產生。相對地，術語非內生性 (NON-ENDOGENOUS)在本文中意指非由哺乳動物(例如，但不限於，人類)所自然產生者。舉例言之，在本文中當受體之內生性形式並不為本質性活化者，但經處理後變成本質性活化之受體時，該受體最宜被稱為「非內生性被本質性活化之受體」。此二術語皆可被用於描述「活體內 (*in vivo*)」及「活體外 (*in vitro*)」系統。舉例言之，在一篩檢方法中，該內生性或非內生性受體皆可用於活體外系統之描述。在另一非限定性例子中，當哺乳動物的基因組 (genome) 經操作而包括非內生性被本質性活化之受體時，可藉由活體內系統的方法來篩檢候選化合物。

表現載體 (EXPRESSION VECTOR)在此定義為在轉錄選殖的DNA時以及在適當之宿主細胞重構物將轉錄的mRNA轉譯時，所需要之DNA片段。適當建構的表現載體應包含可在宿主細胞中自動複製的複製起始點、可用於挑選的記號、一定數量的限制酶切位、可大量複製的潛能及

具活性的啟動子(promoter)。該要被轉錄之選殖DNA在該的表現載體中係與本質性活化或條件性活化的啟動子以操作方式連結。在一非限定性例子中，pCMV即為一表現載體。

G 蛋白偶聯受體融合蛋白 (G PROTEIN COUPLED RECEPTOR FUSION PROTEIN)及**GPCR融合蛋白 (GPCR FUSION PROTEIN)**在本發明之揭示文件中係指包含內生性本質性活化GPCR或非內生性被本質性活化之GPCR與至少一個G蛋白融合之非內生性蛋白，最佳者為該G蛋白的 α 次單元(此為結合GTP之次單元)，且該G蛋白最佳者為與和內生性孤兒GPCR自然偶聯之G蛋白同屬一類者。舉例言之，但不限於此，在內生的狀態下，若G蛋白「 $G_s\alpha$ 」為與特定GPCR偶聯的主要G蛋白，那麼基於此特定GPCR的GPCR融合蛋白可能為包含與 $G_s\alpha$ 融合之GPCR的非內生蛋白；在一些情況下，如下文所詳述者，非主要G蛋白可與GPCR融合。G蛋白可與本質性活化GPCR的C端直接融合或在兩者之間有間隔基。

宿主細胞 (HOST CELL)為一種能夠納入載體的細胞。宿主細胞可為原核細胞或真核細胞。在一些具體實施例中，宿主細胞為真核細胞，較佳者為哺乳動物細胞，更佳者係選自293、293T、CHO及COS-7細胞。在一些具體實施例中，宿主細胞為真核細胞，更佳者為黑色素細胞。

需要治療 (IN NEED OF TREATMENT)在本文中意指由照顧者(若照顧的是人類那就是內科醫生、護士、護理人

員等；若是動物，包含非人類哺乳動物，則為獸醫)判斷認為個體或動物需要治療或可因治療得益。此判斷基於照顧者專業上的許多評量標準，但亦應考量個體或動物因可由本發明化合物治療之症狀而導致生病或將要生病。

靜脈壓增加 (INCREASED VENOUS PRESSURE)意指因循環系統衰弱所導致血液鬱積於靜脈系統(靜脈)而導致的血壓上升。

個體 (INDIVIDUAL)一詞在本文中意指任何動物，包含哺乳動物，較佳者為小鼠、大鼠、其他鼠類、兔子、狗、貓、豬、牛、羊、馬或靈長類動物，最佳者為人類。

抑制 (INHIBIT 或 INHIBITING)與「反應」一詞合用時意指該反應在化合物存在時相對於該化合物不存在時的反應被降低或被阻止。

反向促效劑 (INVERSE AGONISTS)意指會與受體之內生形式或本質性活化形式結合而降低在促效劑不存在時該受體之細胞內反應的基準值之物質(如配體、候選化合物)。

缺血性心臟病 (ISCHEMIC HEART DISEASE)意指心臟組織缺氧所導致之失調症，其中心肌被影響使得心臟不能適度的輸送血液。缺血性心臟病在美國為常見的心臟病。

經分離 (ISOLATED)意指物質係從來源環境(如其為自然產生，指的就是自然環境)中移出。舉例言之，在於活體動物中自然產生的聚核苷酸或多肽存即沒有經分離，但相同的聚核苷酸或DNA或多肽，從自然系統中與部分或全部

併存的物質分開，即稱為經分離。此聚核苷酸可為載體之一部分及/或此聚核苷酸或多肽可為組合物的一部分，但因為載體或組合物並非其自然環境之一部分移除，因此仍稱此聚核苷酸為經分離。

基因剔除小鼠/大鼠(KNOCKOUT MOUSE/RAT)在本文中
包含經由基因重組法改造的小鼠或大鼠，使得所選擇的
單個基因失活或「被剔除(knocked-out)」但不影響其他基
因表現。

已知配體受體(KNOWN RECEPTOR)意指內生性受體，
對此受體特有的配體已被辨識出。

配體(LIGAND)意指對自然產生之受體有特異性的分
子。

本文所使用之調節(MODULATE)或修飾(MODIFY)一詞
意指特定活性、功能或分子之數量、品質或效果增加或減
少。

心肌梗塞(MYOCARDIAL INFARCTION)意指因對心肌
之部分區域供氧不適當而使該區域之心肌受傷或死亡。心
肌梗塞通常由血塊阻斷一條冠狀動脈(攜帶血及氧氣至心
肌之血管)而造成。血塊阻止血液及氧氣到達該心臟區
域，使此區域心臟細胞死亡。

非孤兒受體(NON-ORPHAN RECEPTOR)意指對一被辨
認出之配體有特異性之內生性自然產生之分子，其中配體
結合至受體可活化細胞內訊息傳遞路徑。

孤兒受體(ORPHAN RECEPTOR)意指一種內生性受

體，其特有之配體未被識別出或為未知。

部份促效劑 (PARTIAL AGONISTS)意指當與受體結合時，會以低於促效劑之程度/範圍活化細胞內反應之物質(如配體、候選化合物)。

醫藥組合物 (PHARMACEUTICAL COMPOSITION)意指包含至少一種活性成份的組合物，藉此該組合物可用於在哺乳動物(例如，但不限於，人類)內進行對於特定功效之研究。發明所屬技術領域中具有通常知識者應瞭解了解並認同適用於測定一活性成分是否具有欲求之療效結果所使用之技術係依據技藝人士之需要所選擇。

聚核苷酸 (POLYNUCLEOTIDES)意指 RNA、DNA 或一個以上的單股或雙股核苷酸組成之 RNA/DNA 雜交片段。本發明之聚核苷酸可用任何已知的方法製備，包括合成、重組、胞外生成或上述方法的組合，也可以利用任何技術領域中已知的純化方法。

多肽 (POLYPEPTIDE)意指不限長度的胺基酸聚合物。因此，胜肽、寡肽及蛋白質皆包含於多肽之定義中。此名詞並未指明或排除多肽之表現後修飾。舉例言之，包含共價附接之糖基、乙基、磷酸基、脂基等的多肽亦包含於「多肽」一詞之範圍中。

心肌梗塞後之重塑 (POST-MYOCARDIAL INFARCTION REMODELING)。因為心肌梗塞之心肌組織喪失導致在心室的持續地過度血液流動重載。心室肥大即為心臟為補償所增加負載的主要機制之一。然而，在血

液動力過度負載下這種維持心臟表現的適應法有其能力限制，當長期維持在這種狀態下就會變成無法適應。一般而言，適應性的室肥大表現型因擴大的心室日漸鬆馳且收縮功能變弱而轉變成外顯的心衰竭。心臟對心肌梗塞的適應性或無法適應之反應的自然過程即稱作是「重塑現象」。

提及心肌梗塞後之重塑，若干參數有助於理解其病理進程：

- (a) 若心臟肥大增加，即為不利；
- (b) 若心臟心肌細胞凋亡，即為不利；
- (c) 若心臟射出分率降低，即為不利；
- (d) 若心室腔體積減少，即為不利。

射出分率、肥大、心室腔擴張均可在活體動物以心臟超音波測量，包括在大鼠及小鼠。這些參數基本上可作為一開始的評估。然而，為了準確查明涉及的發病機制，動物通常需要被犧牲以測量心臟心肌細胞凋亡。

引子(PRIMER)在本文中意指特殊的寡核苷酸片段，其可與目標核苷酸片段互補，而用來與目標核酸序列雜交。引子可做為以DNA聚合酶、RNA聚合酶或反轉錄酶所催化之核酸聚合反應的起點。

受體功能(RECEPTOR FUNCTIONALITY)意指受體在接收刺激後調節細胞內作用的正常活動，其包含，但不限於，調節基因轉錄、調節離子流入流出、影響催化反應及/或透過G蛋白調節活性。

心臟輸出量降低(REDUCED CARDIAC OUTPUT)意指由於衰弱的心臟送血能力降低而導致每一次心室收縮時較少的血液打入循環系統(動脈)。

二級傳訊子(SECOND MESSENGER)意指受體活化後所產生的細胞內反應。二級傳訊子包含如三磷酸肌醇(IP₃)、二醯甘油(DAG)、環單磷酸腺苷(cAMP)、環單磷酸鳥苷(cGMP)及Ca²⁺。可測量二級傳訊子反應來測定受體活化反應。此外，二級傳訊子反應之測量可直接用於辨識候選化合物，例如包含反向促效劑、部份促效劑、促效劑及拮抗劑。

訊號雜訊比(SIGNAL TO NOISE RATIO)意指在活化、放大或刺激反應中產生之訊號，其中該訊號高過背景雜訊或非活化、非放大或非刺激反應的基準值。

間隔基(SPACER)意指數個經轉譯的胺基酸，其位於基因(如有興趣之GPCR)最後端密碼子或最後胺基酸之後，但在起始密碼子或有興趣之G蛋白的起始區域前，其中該等經轉譯的胺基酸係與與有興趣之G蛋白的起始區域相連。該經轉譯之胺基酸的數目可為1、2、3、4至最多20。

刺激(STIMULATE 或 STIMULATING)與「反應(response)」一詞合用時表示當一化合物存在時，相對於此化合物不存在的情況下該反應增加。

受試者(SUBJECT)意指靈長類(其包含，但不限於，人及狒狒)、寵物(如狗及貓)、實驗動物(如大鼠及小鼠)及農場動物(如馬、羊及牛)。

有效劑量 (THERAPEUTICALLY EFFECTIVE AMOUNT)在本文中係指可在組織、系統、動物、個體或人類身上引發研究員、獸醫、醫師(medical doctor)或其他臨床醫師(clinician)所要得到的生物或藥學反應之活性化化合物或藥劑的用量，該生物或藥學反應包括下列一種或多種：

- (1) 預防疾病；例如對傾向患有疾病、症狀或失調症但尚未表現或呈現此疾病的病理或症狀之個體預防該疾病、症狀或失調症；
- (2) 抑制疾病；例如對表現或呈現疾病、症狀或失調症之病理或症狀的個體抑制其疾病、症狀或失調症(阻止病理及/或症狀進一步發展)；及
- (3) 改善疾病；例如對表現或呈現疾病、症狀或失調症病理或症狀的個體改善其疾病、症狀或失調症(反轉其病理及/或症狀)。

轉殖基因小鼠/大鼠 (TRANSGENIC MOUSE/RAT)在本文中係指以基因重組方法改造而帶有所選之外來基因或轉殖基因作為其本身基因物質的小鼠或大鼠。

心室腔體積 (VENTRICULAR CHAMBER VOLUME)意指測量心臟左及右心室腔的內部容積。在衰竭的心臟，其具有增大的心室腔。

A.前言

下列段落的順序是以呈現的效率做安排，並無意也不應被解釋為對本發明或隨後之申請專利範圍有所侷限。

B. 篩檢候選化合物

1. 通用的GPCR篩檢分析技術

當G蛋白受體被活化，其結合至G蛋白(如Gq、Gs、Gi、Gz、Go)且促進GTP結合至G蛋白。G蛋白接著如GTPase一般作用且緩慢水解GTP為GDP，因此在正常狀況下，受體失去活性。然而，活化的受體持續將GDP變成GTP。一種不可水解的GTP類似物(analog)， $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{ S}$ ，可被使用來監控G蛋白與表現出活化受體之細胞膜的結合增加。有報告指出不論配體是否存在， $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 均可被使用來監控G蛋白與胞膜的結合。除了其他技藝人士所習知及可獲得之實例，此監控之一例為由Traynor及Nahorski於1995所發表。本分析系統較佳之用途為候選化合物最初篩檢，因為不管在受體細胞內功能部位與其作用的特定G蛋白為何，此系統皆可適用全部的G蛋白-偶聯受體。

2. 特殊的GPCR篩檢分析技術

一旦候選化合物使用「通用的」G蛋白-偶聯受體分析(也就是選出是促效劑或反向促效劑之化合物的測定方法)識別，在一些具體實施例中，最好能做進一步篩檢以證實該化合物可與受體的連結位置交互作用。舉例言之，由通用篩檢測定法所辨認出的化合物可能無法結合至受體，而是僅能在細胞內功能部位將G蛋白「去偶聯(uncouple)」。

a. Gs、Gz及Gi

Gs刺激腺核苷環化酶。另一方面，Gi(及Gz與Go)抑制腺核苷環化酶。腺核苷環化酶催化由ATP轉變成cAMP；因

此，活化之與Gs蛋白偶聯的GPCR與細胞內cAMP量的增加有相關。另一方面，活化之與Gi(或Gz、Go)蛋白偶聯的GPCR與細胞內cAMP量的降低相關。總體來說可參見《突觸傳送間接機制》第八章，〈Neuron To Brain〉(第三版)Nichols, J.G.等編，Sinauer Associates, Inc. (1992)。因此偵測cAMP的測定法可用來判定例如候選化合物是否為此受體的反向促效劑(這種化合物可降低cAMP量)。習知技術已有多種方法用以測量cAMP；在一些具體實施例中，一種較佳的方式是在ELISA中使用anti-cAMP抗體。另一可被利用的測定法為全細胞二級傳訊子報導系統測定法。啟動子驅動一特定基因所編碼之蛋白質表現。cAMP藉著可與該cAMP反應之DNA結合蛋白或轉錄因子(CREB)結合進而結合至稱為cAMP反應元素(cAMP response elements)的特殊位置上，因此可驅動基因的表現。報導基因系統的構成可在報導基因(如 β 半乳糖酶或螢光酵素)前帶有包含多重cAMP反應元素的啟動子。因此，被活化的Gs連結受體造成cAMP累積，接著活化基因，且表現報導基因。報導蛋白如 β 半乳糖酶或螢光酵素可使用標準生化測定法(Chen等人，1995)測定。

b. Go及Gq.

Gq及Go與磷脂酶C的活化有關，後者再將磷脂PIP₂水解，釋放2個細胞內傳訊子：二醯甘油(DAG)及肌醇1,4,5-三磷酸(IP₃)。IP₃累積量的增加與Gq及Co結合受體之活化有關。總體來說可參見《突觸傳送間接機制》第八章，

〈Neuron To Brain〉(第三版)Nichols, J.G.等編, Sinauer Associates, Inc. (1992)。偵測IP₃累積的測定法可被利用來判斷例如候選化合物是否為Gq或Go-偶聯受體的反向促效劑(此種化合物降低IP₃濃度)。Gq相關受體亦可使用AP1報導測定法, 其中Gq相關磷脂酶C會引發含有AP1元件的基因活化; 因此, 活化的Gq相關受體即顯示上述基因表現增加, 因為反向促效劑即顯示此基因表現降低而促效劑即顯示此基因表現增加。一般這些測定分析法皆可購得。

3. GPCR融合蛋白

使用內生性本質性活化GPCR或非內生性本質性活化GPCR以直接辨識反向促效劑或促效劑的選候選化合物篩檢法, 提供十分有趣的挑戰, 因為按其定義此類受體即使在內生性配體並未與之結合的情況下亦被活化。因此為了區別非內生性受體處於存在或不存候選化合物的兩種情況時的差異, 如此區別的主要目的在於想要了解候選化合物是否可為反向促效劑或促效劑或對受體沒影響, 在一些具體實施例中, 最好能採用一種可以增加該差異的方法。在一些具體實施例中, 較佳之方法為使用GPCR融合蛋白。

一般來說, 只要使用前述分析技術(或其他技藝人士所熟知的技術)測定出非內生性本質性活化的GPCR, 就可能測定出與其內生性GPCR結合的主要G蛋白。G蛋白與GPCR偶聯可提供一個可被測得的訊息傳遞路徑。在一些具體實施例中, 其較佳者係使用哺乳動物表現系統篩檢, 在此系統中應該會有內生性G蛋白。因此, 以定義而言,

在此系統中非內生性本質性活化GPCR將不斷發訊號。在一些具體實施例中，較佳者此訊號在諸如受體反向促效劑存在時增加，因此特別在篩檢時，當其與反向促效劑接觸時，更容易顯現訊號的差異。

GPCR融合蛋白傾向於增加G蛋白與非內生性GPCR偶聯效率。在一些具體實施例中，針對內生性本質性活化GPCR或非內生性本質性活化GPCR的篩檢最好是用GPCR融合蛋白，因為此方法使此篩選技術所產生的訊號增加。重要的是能產生顯著的「訊號雜訊」比；此顯著比例對本文所揭示候選化合物的篩檢尤佳。

可用於表現GPCR融合蛋白構成物的製備法為熟習本技藝人士所知曉。市面上可得之表現載體及系統提供多樣方法，其可配合研究者特別的需求。在製作此GPCR融合蛋白構成物時的重要標準為，包含，但不限於，GPCR序列及G蛋白序列位於同一讀框中(較佳者內生性GPCR序列位於G蛋白序列下游位置)，且GPCR的「終止」密碼子被刪除或取代以致於在GPCR表現時G蛋白亦表現出來。GPCR可直接連結至G蛋白，或在兩者之間有間隔的殘基(最好不超過12個，雖然此數量可由熟習此技藝之人士確認)。為了使用方便，最好能使用間隔基。在一些具體實施例中，在製成GPCR融合蛋白構成物前最好先將與非內生性GPCR結合的G蛋白識別出。由於目前僅有少數G蛋白被辨識出，最好有一個包含G蛋白序列(意即通用的G蛋白構成物，見實例5(a))的構築體可用於嵌入內生性GPCR序列；

如此可對具有不同序列的不同內生性GPCR之大範圍篩檢法更增效率。

如上所述，因為與Gi，Gz及Go偶聯的經活化GPCR預期可抑制cAMP生成，使得以這些GPCR為基礎的測定法更具挑戰性(即，其活化時cAMP訊號降低，對諸如促效劑(其進一步降低此訊號)的直接識別更難)。如本文件所將揭示者，可確定的是，對此類的受體而言，要建立一能用的環化酶為主的測定法，可用並未以此GPCR之內生G蛋白為基礎所構成的GPCR融合蛋白。因此，舉例言之，一種內生性Gi-偶聯受體可與Gs蛋白融合—此一融合構築體的表現，將「驅動」或「強迫」內生性GPCR與諸如Gs而不是「原本的」Gi蛋白結合，如此可建立一環化酶測定法。因此，Gi，Gz，或Go-偶聯受體，在一些具體實施例中，當GPCR融合蛋白被使用且該測定法是以腺苷環化酶活性為基礎，融合構築體最好可用Gs製成(或可刺激腺苷環化酶生產的同等G蛋白)。

表 2

G蛋白	GPCR活化對cAMP生成的影響(例如，本質性活化或與促效劑結合)	GPCR活化對IP ₃ 累積的影響(例如，本質性活化或與促效劑結合)下效果	與反向促效劑接觸對cAMP生成的影響	與反向促效劑接觸對IP ₃ 累積的影響
Gs	增加	N/A	減少	N/A
Gi	減少	N/A	增加	N/A
Gz	減少	N/A	增加	N/A
Go	減少	增加	增加	減少
Gq	N/A	增加	N/A	減少

利用 Gq 蛋白與 Gs、Gi、Gz 或 Go 蛋白融合的 G 蛋白融合構築體也同樣有效。在一些具體實施例中，較佳的融合構築體可為與 Gq 蛋白融合而成，其中 G 蛋白 α 次單元體 (「G α q」) 的前六個胺基酸被刪除，且在 G α q 的 C 端後 5 個胺基酸以所用 G 蛋白的 G α 所對應之胺基酸取代。舉例言之，一融合構築體可能是 Gq(6 胺基酸被刪除) 與 Gi 蛋白融合，產生「Gq/Gi 融合構築體」。此融合構築體將強迫內生性 Gi-偶聯受體與偶聯於其非內生性的 G 蛋白 (Gq) 以致於其二級傳訊子，舉例言之，三磷酸肌醇或二醯甘油，可以用 cAMP 生成的測得量代替。

4. 目標 Gi-偶聯 GPCR 與一訊號增強劑 Gs-偶聯 GPCR 的共轉染 (以 cAMP 為基礎的測定法)

一 Gi-偶聯受體已知其可抑制腺苷環化酶，因而降低 cAMP 產量，對 cAMP 量的測定變得困難。在一些具體實施例中，測量 cAMP 產量減少以做為在活化狀態時主要與 Gi 結合之受體被活化指標的有效技術，可由共轉染訊號增強劑，如一個內生性本質性活化受體完成，此受體在活化狀態主要是與 Gs 連結的 GPCR (如 TSHR-A6231；見下文)。顯而易見，Gs-偶聯受體的活化可藉 cAMP 產量的增加而測定。Gi-偶聯受體的活化導致 cAMP 產量減少。因此，共轉染方法就是要利用這些「相」反應。舉例言之，非內生性、本質性活化 Gs-偶聯受體 (「訊號增強劑」) 與表現載體共轉染提供 cAMP 基礎訊號 (換言之，雖然 Gi-偶聯受體將減

少 cAMP 量，「減少」將是相對於由本質性性活化 Gs-偶聯訊號增強劑所建立的 cAMP 量增加而論)。接著將訊號增強劑與「目標受體」共轉染，Gi-偶聯目標受體的反向促效劑將增加測出的 cAMP 訊號，而 Gi-偶聯目標受體促效劑將減少訊號。

使用此方法直接識別的候選化合物必須另經獨立測定以確認其並非針對目標訊號增強受體(此獨立測定可在共轉染受體篩檢期間或之後進行)。

C. 藥物化學

候選化合物

任何本技藝已知的分子均可測試其調節(增加或減少)本發明 GPCR 活性的能力。若要識別出一個可調節活性的化合物，候選化合物可直接提供至表現該受體的細胞。

本發明具體實施例可適用於篩檢化學資料庫中何者能調節受體的表現量或其活性，即，拮抗劑或促效劑。化學資料庫可為胜肽資料庫、胜肽模擬物資料庫、化學合成資料庫、重組體(如噬菌體表現資料庫)、活體外轉譯的資料庫及其他非胜肽合成有機資料庫等。本發明具體實施例將適合篩檢含有生物材料的內生性候選化合物，包含，但不限，於血漿及組織萃取液，及篩檢含已知具生化活性的內生性化合物資料庫。

在一些具體實施例中候選化合物的直接識別法是用於以組合的化學技術產生之化合物，因此可為此類分析隨機製備數以千計的化合物。候選化合物可能屬於某一化學資料

庫。此資料庫可包含任何合宜數目的個別化合物，例如10至100至1000至百萬適合的化合物，舉例言之，胜肽、胜肽及其他寡聚物(環狀或直線狀)及以模板為基底的較小分子，例如像是苯二氮平類、乙內醯脲類、雙芳香基類、碳環及聚環化合物(如奈甲醛類、硫二苯胺類、吡啶類、類固醇等)、碳水化合物及胺基酸衍生物、二氫吡啶類、二苯甲基類及雜環類(如三氮六環、吡啶、硫氮二烯五環等)。所述數目及列出的化合物種類僅為說明用，其並非用於限至本發明之範疇。較佳的化學資料庫包含低分子量化合物及可能的藥劑。

化學資料庫的範例購自數個來源(ArQule, Tripos/PanLabs, ChemDesign, Pharmacopoeia)。在一些實例中，這些化學資料庫使用組合策略產生，其可在基質上編碼資料庫中每個成員之身份，而化合物附接於該基質上，因此允許直接且快速識別分子是否為一有效調節劑。因此，在許多結合方法中，化合物在玻片上顯現的位置具體指明其成份。同時，在某個實例中，每個玻片位置可帶有1至20個化學物質，可直接加入盛有所要篩檢之化合物的培養盤小孔中。因此，若分子被測出具有調節作用，可縮小測定的範圍。由此方法，許多候選化合物可被篩檢。

許多種適合使用的資料庫為已知技藝且可被使用來提供化合物由本發明之方法測定。或者，資料庫可使用標準方法自行建造。進一步，更一般來說，亦可使用結構有限的別種有機資料庫(如非胜肽)。由範例的方法，可用一種苯

二氮平資料庫(見, Bunin等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712)。

本發明另一個具體實施例, 組合化學可用來辨識本發明GPCR調節劑。組合化學能夠建立包含數以千計化合物的資料庫, 可以為結構相似。同時高產能篩檢程序能夠針對已知目標篩檢這些大規模資料庫, 已有新的方法可製造出總數量較少但化學多樣性更高的資料庫。(見Matter, 1997, Journal of Medicinal Chemistry 40:1219-1229)。

一種組合化學方法, 即親和度指紋圖譜, 之前是用來測試小分子零散資料庫對一群特定蛋白質的親和度。由上述篩檢法所得之指紋圖譜可被使用來預測資料庫上個別分子對其他蛋白質或受體的親和力(在本發明中, 即為本發明的受體)。所得指紋圖譜可與其他已知會和蛋白質起反應之化合物的指紋圖譜比較, 預測資料庫中的化合物是否會有同樣反應。舉例言之, 先不要針對一化合物或蛋白質成分逐一測試大資料庫中的每一個配體, 僅測試與其他已知具有活性之化合物指紋圖譜類似的配體。(請參Kauvar等人, 1995, Chemistry and Biology 2:107-118; Kauvar, 1995, Affinity fingerprinting, Pharmaceutical Manufacturing International. 8:25-28; 及Kauvar, Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, D. Kurtz. L. Stanker及J.H. Skerritt. Editors, 1995, AOAC: Washington, D.C., 305-312)。

候選化合物被識別為調節劑

一般，此篩檢結果將為有一致核心結構，因此這些化合物可沿一個最好的核心結構提供額外的化學修飾至進一步增加藥物特性。此技術為已知技藝，且將不會詳細說明於專利文件中。

在一些具體實施例，識別的分子為生物可利用。多數計算方法可利用這些技藝有建立預測藥物口服生理利用性(請參Ooms等人，Biochem Biophys Acta (2002) 1587:118-25；Claek & Grootenhuis, Curr OpinDrug Discov Devel (2002) 5:382-90；Cheng等人，J Comput Chem (2002) 23:172-83；Norinder & Haeberein, Adv Drug Deliv Rev (2002) 54:291-313；Matter等人，Comb Chem High Throughput Screen (2001) 4:453-75；Podlogar & Muegge, Curr Top Med Chem (2001) 1:257-75；揭示於此均以其整體作為參考)。進一步，正子放射斷層攝影(PET)有很多種運用方式可直接測量藥物分布，包含口服給藥後隨即對哺乳動物估計其口服生物利用率，包含非人類靈長類及人體(請參Noda等人，J. Nucl Med (2003) 44:105-8；Gulyas等人，Eur J Nucl Med Mol Imaging (2002) 29:1031-8；Kanerva等人，Psychopharmacology (1999) 145:76-81；揭示於此均以其整體作為參考)。亦可見於後揭之實例，包含實例19。

D. 醫藥組合物

本發明提供一種治療(或預防)方法可將本發明之調節劑

以其有效劑量施用於需要此治療(或預防)的個體(請參PCT申請編號PCT/IB02/01461，公告WO02/066505，2002年8月29日；揭示於此均以其整體作為參考)。在一個最佳發明態樣中，該調節劑已被純化。此個體最好為動物，包含，但不限於，如牛、豬、馬、雞、貓、狗、兔子、大鼠、小鼠等，且較佳者為哺乳動物，最佳者為人。

本發明調節劑可用至非人類動物(見之後實例)及/或人，其可單獨使用或在藥學或生理可接受之組合物中，可使用習知技藝的技術將其與適合的載體或賦型劑混和。習知技藝中可獲得之藥學可接受載體皆適用；舉例言之，參見Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980, Marking Publishing Co., (Oslo等人編)。

藥學或生理可接受組合物接著便可以其有效劑量施用於個體。有效劑量指的是調節劑的量足夠產生預防或改善缺血性心臟病之症狀或生理狀態，包含心肌梗塞、心肌梗塞後的重塑現象及充血性心衰竭；可以如本文所揭示之方法決定其量，但不限於該等方法揭露者。在一些具體實施例中，有效劑量指的是調節劑的用量能充分產生預防或改善心血管失調症的症狀或生理狀態，包含心臟輸出降低及靜脈壓增加，可以如本文所揭示之方法決定其量，但不限於該等方法揭露者。在一些具體實施例中，有效劑量指的是調節劑的用量足以產生所需要之心臟功能改變，包含降低心臟肥大、增加心臟輸出量、降低心室通到體積及降低心肌細胞凋亡；可以如本文所揭示之方法決定其量，但不限

於該等方法揭露者。

在此需明白指出本發明調節劑可單獨或與其他藥學或生理可接受組合物合併施用。其他用以治療本發明失調症的化合物為已知技藝。本發明一個發明態樣包含使用揭示於此具體實施例，其進一步包含一個或多個選自卡特普(captopril)、依那普利順丁烯二酸鹽(enalapril maleate)、林諾普利(lininopril)、雷米普利(ramipril)、培哚普利(perindopril)、弗西邁(furosemide)、托拉西邁(torasemide)、氯苯塞啶(chlorothiazide)、水合氯苯塞啶(hydrochlorothiazide)、阿米羅鹽酸鹽(amiloride hydrochloride)啶、螺內酯(spironolactone)、天諾敏(atenolol)、比索洛爾(bisoprolol)、卡維地洛(carvedilol)、美托洛爾酒石酸鹽(metoprolol tartrate)及地谷新(digoxin)的試劑。

在一些具體實施例中，缺血性心臟病係選自下列組群：包括心肌梗塞、心肌梗塞後的重塑現象及充血性心衰竭。在一些具體實施例中，心血管失調症係選自下列組群：包括心臟輸出降低及靜脈壓增加。在一些具體實施例中，需要改變的心血管功能係選自下列組群：心臟肥大、心臟射出量增加、心室腔體積減少及心肌細胞凋亡降低。

給藥途徑

適合的給藥途徑包含口服、鼻腔、直腸、黏膜、或腸吸收、非腸道擴散，包含肌肉、皮下、脊椎注射及技術領域中已知的腦脊椎膜注射、直接腦室內注射、靜脈注射、腹

腔注射、鼻內栓劑及肺內(吸入)或眼內注射。其他特殊的給藥途徑為噴霧式及總儲製劑(depot formulation)。持續釋放製劑(特別是總儲製劑)特別適用於本發明的藥劑。在一些具體實施例中給藥途徑為口服。

組合/配方

適用於本發明藥學或生理可接受組成或藥劑可以由常見的方法配置，使用一種或多種生理可接受載體包含賦型劑及輔助劑。適合的配方取決於給藥途徑的選擇。

某些描述於此的藥劑將包含藥學或生理可接受載體及至少一種本發明的調節劑。用於注射時，本發明試劑可製成水性溶液，較佳者為加上生理相容之緩衝液如Hanks's溶液、Ringer's溶液、生理食鹽水如磷酸或重碳酸鹽溶液。若經黏膜給藥，藥劑之中需用到可滲透該屏障的適當滲透劑。此滲透劑為習知技藝。

可供口服的藥學或生理可接受調劑包含由凝膠製成的插承膠囊，以及凝膠及塑化劑如甘油及三梨醇製成的柔軟密封膠囊。插承膠囊可包含與填充劑如乳糖、結合劑如澱粉及/或潤滑劑如滑石或硬脂酸鎂及穩定劑混合的活性成份。在軟膠囊中，活性成份可溶解或懸浮於適合的液體如油、液化石蠟或液化聚乙烯甘油。另外，可添加穩定劑。全部口服給藥配方都應以適合此給藥途徑的劑量製成。

口服給藥，其配方型式可為由常見方法製成的劑或錠劑。

吸入給藥，本發明所用的配方型式以從噴嘴尖端提供噴

霧噴灑方便投遞，使用適合的氣體推進，如二氧化碳。若為加壓噴霧藥劑其投藥量可由一控制閥計量。使用於吸入器或吹藥器的膠囊及卡匣，如凝膠製成，可由包含該化合物以及一種像是乳糖或澱粉的適合粉狀基底的混合粉末製成。

本發明化合物若要採用不經口服的給藥途徑可做成注射劑，如大劑量注射或連續注射。注射劑的組成可以單位劑量存在，如安瓿或多次劑量容器，且添加保存劑。注射劑的組成可為以水為載體的懸浮液、溶液或乳液，並可包含功能劑如懸浮劑，穩定劑及/或分散劑。

靜脈方式的藥學或生理可接受製劑包含水溶形式活化成份的水狀溶液。水狀懸浮液可包含增加懸浮黏性的物質，如鈉羧甲機纖維素、硬脂醇或澱粉。此外，懸浮液可包含適合的穩定劑或可增加成份溶解的試劑，以允許製備高濃度溶液。

另一方面，活性成份在使用前可為粉狀或凍乾形式，使用時再配合適合的載體，如無菌無熱源水。

除上述組成以外，本發明化合物也可製成一總儲製劑。此長效配方可由植入方式(例如皮下或黏膜植入)或肌肉注射。因此，舉例言之，本發明化合物可以適合的聚合物或疏水性材料配製(例如像是乳化於可接受的油中)或離子交換樹脂，或如少量可溶解衍生物，例如少量可溶解鹽類。

在一個特別的具體實施例中，化合物可經由釋放控制系統投遞。在一個具體實施例中，可使用一幫浦(請參

Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biom. Eng. 14:201-240; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507-516; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574-579)。在另一個具體實施例中，可使用聚合材料（請參 Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, S,molen and Ball, eds., Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Levy et al., 1985, J. Neurosurg. 71:858-863)。其他釋放控制系統揭示於 Langer(1990, Science 249:1527-1533)。

另外，本發明化合物可使用持續性釋放系統傳送，如包含治療劑的固狀疏水聚合物半滲透基質。有多種持續性釋放物質以為技藝人士所發展出且知曉。依其化學性質，持續釋放膠囊可釋放本發明之化合物達數週到100天以上。

依治療劑的化學性質及生物穩定性，可使用額外的調節劑穩定劑。

藥學及生理可接受化合物亦包含合適的固體或膠體相的載體或賦形劑。此載體或賦形劑範例包含，但不限於，碳酸鈣、磷酸鈣、多種糖類、澱粉、纖維素衍生物、凝膠及聚合物，如聚乙烯乙二醇。

有效劑量

適合本發明使用的藥學及生理可接受組合物包含成份其中活性成份達到其預期目標。特定言之，一種治療有效量

指有效預防形成或減輕要治療目標目前的症狀。有效量的測量已為技藝人士所熟知，尤其是本文中所詳細揭示者。

對於任何使用於本發明的化合物，其有效劑量可由細胞培養分析估算。舉例言之，動物模式的配方劑量達到循環濃度範圍，其包含或含有一濃度點或範圍顯示在活體外系統中細胞死亡保護。(見後揭實例之活體外及動物體內模式。)此資訊被用於更精準測量人體劑量。

治療有效量係指化合物之用量可改善病人的症狀。此化合物毒性及治療效果可由細胞或實驗動物標準藥學程序測定法，如LD₅₀(測試族群50%致死率量)及ED₅₀(測試族群50%有效劑量)測得。毒性跟治療有效量間的比為治療指數，且其可以LD₅₀與ED₅₀之比表示。表現高治療指數的化合物較佳。

從細胞分析及動物試驗獲得的數據可被使用配製用在人類身上的劑量範圍。化合物劑量最好落在循環濃度範圍內，包含具有少量毒性或無毒性之ED₅₀。在範圍內的劑量可多樣化，取決於使用的劑量及利用的方法。精確的配方、使用方法及劑量可隨個別醫師針對病人狀況選擇。(參見，Fingl等人，1975，治療的藥學基礎第一章)。

劑量的量及間隔以適應提供活化物質的血漿濃度，其充分預防或治療本發明失調，取決於特殊的情境。需要達到有效的劑量江取決於個體特性及服用方法。

劑量間隔一使用最小劑量濃度體積測定法。化合物必須使用攝食給予以維持血漿濃度在最低有效濃度10至90%

倍，較佳為30至99%，更佳為50至90%間。區域給予或選擇性攝入的例子中，藥物的有效區域濃度與血漿濃度無關。

組合物之投予量取決於受治療之對象、受治療者體重、嚴重程度、給予方法及藥劑師之判斷。

本發明調節劑較佳劑量範圍為0.1至100毫克/公斤體重，其可為每天投藥或以規律的方式以達到需要的結果，其包含，但不限於，預防或治療本發明缺血性心臟病、預防或治療本發明充血性心臟病或產生本發明心肌細胞功能需要的改變。其他最佳劑量範圍為0.1至30毫克/公斤體重。當然，每日劑量可在一天當中少量週期性地給予或投藥。必須注意的是這些劑量範圍僅為最佳範圍，並非用於限制本發明。

E. 治療方法

本發明係關於預防或治療缺血性心臟病，包含心肌梗塞後之重塑及充血性心衰竭之方法，其包含提供有需要之個體本發明之調節劑。本發明亦關於預防或治療心血管失調症，包含心臟輸出降低及靜脈壓增加，其包含提供有需要之個體本發明之調節劑。本發明亦關於產生所需之心肌細胞功能改變的方法，心肌細胞功能改變包含降低心臟肥大、增加心輸出體積、降低心肌細胞凋亡，該方法包含提供有需要之個體本發明之調節劑。在一些具體實施例中，調節劑可為生物口服利用性。在些具體實施例中，調節劑係以口服醫藥組合物提供給個體。較佳者個體為哺乳動

物，且更加者為人類。

F.其他用途

可調節(即增加、降低或阻斷)心肌細胞保護作用的RUP41受體功能的試劑可以將候選化合物與RUP41受體接觸並測定在RUP41受體上候選化合物效用之方法而識別出。可調節RUP41受體功能的化合物之選擇性可以其對RUP41受體及對其他受體之功效比較而評估。為確認或定量該等或合物之活性，在辨識出可調節RUP41受體功能的化合物後，該化合物可以其他分析法測試，其包括，但不限於，活體內模式。RUP41受體功能的調節劑可用於治療正常或異常RUP41受體功能有關之疾病及生理狀。

調節(即增加、降低或阻斷)心臟保護作用的試劑可由將候選化合物與RUP41受體接觸並測定在RUP41受體上候選化合物的效用而識別出。在一些具體實施例中，該心臟保護作用包含預防或降低心肌死亡。在一些具體實施例中，該心肌死亡包含心肌細胞凋亡。在一些具體實施例中，該心臟保護作用包含降低梗塞大小。在一些具體實施例中，該心臟保護作用包含改善的缺血後收縮回復，在一些具體實施例中，該心臟保護作用包含抑制惡性局部缺血導致之心律不整。可調節RUP41受體功能的化合物之選擇性可以其對RUP41受體及對其他受體之功效比較而評估。為確認或定量該等或合物之活性，在辨識出可調節RUP41受體功能的化合物後，該化合物可以其他分析法測試，其包括，但不限於，活體內模式。RUP41受體功能的調節劑可用於

治療正常或異常RUP41受體功能有關之疾病及生理狀。

本發明亦關於本發明化合物的放射性同位素標記型，其係經辨識為RUP41調節劑或載體，其不僅用於放射線造影(請參Lemstra等人，Gerontology (2003) 49:55-60; Myers等人，J Psychopharmacol (1999) 13:352-7; 揭示於此均以其整體作為參考)，亦可用於在活體內或活體外之分析，以進行包含人類之組織樣品中RUP41之定位及定量，及藉由抑制放射線同位素標記之化合物之結合來識別RUP41配體。本發明進一步之目的係發展新穎的RUP41分析法，其包含此放射性同位素標記化合物。就說明之目的而非限制本發明而言，可預期經由放射線造影之RUP41影像顯像可辨識可能有罹患缺血性心臟，包含心肌梗塞、心肌梗塞後的重塑及充血性心衰竭，危險性之個體。

本發明亦包含識別為RUP41調節劑或配體之本發明放射線同位素標記型的化合物。

在一些具體實施例中，放射線同位素標記型的化合物與化合物本身相同，但被一個或多個原子量或原子數不同於一般發現於自然界(即自然產生)之原子的原子量或原子數的原子置換或取代。可結合本發明化合物的適合放射性核種包含 ^2H (重氫)、 ^3H (氚)、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{82}Br 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 及 ^{131}I 。併入放射性標記之化合物之放射性核種將取決於該放射性標記之化合物的特殊用途。舉例言之，在用於活體外RUP41標示及競爭分析時，通常使用含

有³H、¹⁴C、⁸²Br、¹²⁵I、¹³¹I或³⁵S之化合物。在放射線造影時，通常使用¹¹C、¹⁸F、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、⁷⁵Br、⁷⁶Br或⁷⁷Br。在許多具體實施例中，放射性核種係選自由³H、¹¹C、¹⁸F、¹⁴C、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S及⁸²Br組成之群。

將放射同位素併入有機化合物的合成方法適合本發明化合物且為習知技藝。此合成方法，舉例言之，將氙活化程度併入目標分子，如下：

- A. 以氙氣催化降解——此過程一般產生高比活性產物及需要鹵化或未飽和先趨物。
- B. 以硼氙化鈉降解——此過程較不貴且需要包含可還原的官能基如醛基、酮基、內酯、酯類及相似的前驅物。
- C. 以鋰鋁氙降解——此過程在理論比活性下提供產物。其亦需要包含可還原的官能基如醛基、酮基、內酯、酯類及相似的前驅物。
- D. 重氫氣體暴露標記法——此過程包含暴露包含在合適催化存在下可改變質子至氫氣的前驅物。
- E. 使用甲基吡啶 [³H] 的 N-甲醇化物——此過程一般被使用來製備 O-甲基或 N-甲基(³H)產物以以高比活性甲基吡啶(³H)治療適當的前驅物。此方法一般允許高比活性，例如 70 至 90 Ci/毫莫耳。

將¹²⁵I活化物併入目標分子的合成方法包含：

- A. 桑德美爾及相似反應——此過程將芳基或雜芳基胺轉變為重氮鹽化合物，如四氟硼酸鹽，且使用 Na¹²⁵I

混合的 ^{125}I 標記。一種具代表性的程序發表於 Zhu, D, -G. 及共同合作者於 J. Org. Chem. 2002, 67, 943-948。

B. 正 ^{125}I 酚 - 此過程允許 ^{125}I 併入酚的正向位置如揭示於 Collier, T. L. 及共同合作者，於 J. Labeled Compd Radiopharm. 1999, 42, S264-S266。

C. 以 ^{125}I 取代的芳香族羥基或異芳香族羥基溴——此方法一般為 2 個步驟。第一步驟使用例如 Pd 催化反應 [即 $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$] 或在三-烷基錫鹵 (tri-alkylstannohalide) 或六烷基二錫 (hexaalkylditin) [如 $(\text{CH}_3)_3\text{SnSn}(\text{CH}_3)_3$] 存在下或通過芳基或雜芳基鋰將芳基或雜芳基溴化物轉換為相對應之與三-烷基錫 (tri-alkyltin) 中間體。代表性程序揭示於 Bas, M. -D. 及共同合作者，於 J. Labeled Compd Radiopharm. 2001, 44, S280-S282。

在一些具體實施例中，放射線同位素標記型的化合物與該化合物相同，但另加上包含放射性核種的取代基。在一些進一步的具體實施例中，該化合物為多肽。在一些更進一步的具體實施例中，該化合物為抗體或其抗體結合片段。在一些更進一步的具體實施例中，抗體為單株抗體。可結合本發明化合物的適合放射性核種包含 ^2H (重氫)、 ^3H (氚)、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{82}Br 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 及 ^{131}I 。併入放射性標記之化合物之放射性核種將取決於該

放射性標記之化合物的特殊用途。舉例言之，在用於活體外 RUP41 標示及競爭分析時，通常使用含有 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{82}Br 、 ^{125}I 、 ^{131}I 或 ^{35}S 之化合物。在放射線造影時，通常使用 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 或 ^{77}Br 。在許多具體實施例中，放射性核種係選自由 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{14}C 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 及 ^{82}Br 組成之群。

添加一種或多種包含放射性核種取代基的方法為技藝人士所應知曉，包含但不限於以酵素法添加放射性碘(請參 Marchalonis JJ, Biochemical Journal (1969)113:299-305; Thorell JJ and Jahansson BG, Biochimica et Biophysica Acta (1969) 251:363-9；揭示於此均以其整體作為參考)，或以 Chloramine-T/Iodogen/Iodobead 法(請參 Hunter WM and Greenwood FC, Nature (1962) 194:495-6; Greenwood FC et al., Biochemical Journal (1963) 89:114-23；揭示於此均以其整體作為參考)。

技藝人士讀過此專利申請文件後，應能明白理解本文所揭示之受體的其他應用。

實例

下列實例為說明目的，其並非用於不限制本發明。雖揭示某些特定的核酸及胺基酸序列，熟習本技藝的人士應有能力對這些序列進行小幅修飾而同時可達到與下述實例相同或基本上相同的結果。揭示於此的突變法並不是依靠其方法本身而是依照一演算法計算位在人類 GPCR 之 TM6 區域內的脯胺酸殘基的距離決定。只要其方法可以信任，熟

習本技藝的人士應有能力對這些序列進行小幅修飾而達到與下述實例相同或基本上相同的結果(例如本質性活化)。這些修飾的方法均應視為屬於本文件揭示的範圍內。

隨後實例之提出是為說明目的而不是限制目的。熟習此技藝者應能夠設計出與本發明揭示於此之全部或部份相等的測定法與方法。

雖然技藝有許多種表現載體可用，為了內生性及非內生性GPCR利用的目的，在一些具體實施例中，其載體最好使用pCMV。此載體依「專利申請程序所需微生物提存之國際認證布達佩斯協定」於1998年10月13日寄存於美國菌種保存中心(ATCC)(10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)。其DNA由ATCC測試且證實其可用。ATCC給予之寄存編號為pCMV：ATCC #203351。在一些具體實施例中，其較佳之載體為腺病毒表現載體。

與本發明內容有關的DNA重組技術為熟習本技藝人士所通曉並可查書得知，如Maniatis等人., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory；美國專利編號6399373；及PCT申請號PCT/IB02/01464，公告如2002年8月29日WO/02/066506；揭示於此均以其整體作為參考。

實例1

內生性人類RUP41全長片段選殖

此處所揭示之人類RUP41為使用基因銀行的資料庫識別確認。在資料庫中搜尋，取用編號U66581選殖而成的

cDNA被辨認出來應為出自於第7號染色體的人體基因片段。RUP41全長選殖以PCR使用引子：

5'-TCCCCCGGGAAAAAAACCAACTGCTCCAAA-3'(序列識別號：7；義股)

5'-TAGGATCCATTTGAATGTGGATTTGGTGAAA-3'(序列識別號：8；反義股，包含BamHI位置)

並以人類基因體DNA作用模板。放大程序使用rTth聚合酶(Perkin Elmer)及製造商提供的緩衝液系統，每一個引子為0.25 mM，且每4個核苷酸為0.2mM。循環條件為94℃ 1分鐘，50℃ 1分鐘及72℃ 1.5分鐘30循環。5' PCR引子經活化而所得1.38 kb PCR片段以BamHI酶解，且選殖進pCMV表現載體的EcoRV-BamHI位置。核酸序列請見序列識別號：1而其推導出的胺基酸序列則為序列識別號：2。

實例2

製備非內生性本質性活化的人類RUP41

熟習本技藝的人士應具備能力選擇核酸序列突變所需技術。下面所揭的方法是拿來製成人類GPCR非內生性轉型。以下所揭示在RUP41上的突變以運算方法為基礎，因此第16個胺基酸(位在GPCR IC3位置)從原先的脯胺酸(或其內生性的保留性取代)殘基(位在GPCR的TM6位置，接近TM6/IC3交界處)發生突變，成為丙胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸殘基，較佳者為離胺酸殘基。

非內生性本質性活化的人類RUP41全長片段之製備是由苯丙胺酸殘基在序列識別號：2或序列識別號：3的312位

置變異成離胺酸(F312K)。

1. Site-DirectedTM轉換子突變法

製備非內生性人類GPCRs，特別可以運用 Site-DirectedTM轉換子突變基法套件(Clontech)依製造手冊的指示在人類CPGR上實施。所用兩種突變引子，最好為離胺酸突變的離胺酸突變基因寡聚核苷酸，以及一種選擇標記寡聚核苷酸。為了操作便利，與人類GPCR連結的密碼子突變亦以其標準形式記錄下來。

2. QuikChangeTM Site-DirectedTM突變法

製備非內生性人類GPCR亦可使用 QuikChangeTM Site-DirectedTM突變法套件(Stratagene，依製造手冊的指示)。模板最好使用一內生性GPCR而兩個突變引子，和上述方法一樣，最好是離胺酸突變基因寡聚核苷酸，及一種選擇標記寡聚核苷酸(包含於套件中)。為了操作便利，密碼子突變連結至此新穎的人類GPCR而且各寡聚核苷酸分別以標準形式註記。

實例3

受體表現

雖然技藝中有許多種細胞可利用來表現蛋白質，其最佳者係利用哺乳動物細胞或黑色素細胞。最主要的理由為可預期之實用性，即當可能使用諸如酵母菌細胞表現GPCR時，在非哺乳動物細胞中可能沒有包含哺乳動物系統所演化出的受體偶聯基因機制及訊息傳遞路徑(在酵母菌的例子中，確實沒有)；因此，以非哺乳動物細胞所得結果，

就算是有可能使用，也不如用哺乳動物細胞或黑色素細胞所的結果那麼好。雖然依技藝人士所需可選用特別的哺乳動物細胞，在哺乳動物細胞當中，較佳者是用CHO、COS-7、293及293T細胞。關於黑色素細胞請參見下文，包含實例8。

a. 暫時轉染

第一天， 6×10^6 個293細胞置於10公分培養盤中。第二天，準備兩個反應試管(下述每個試管的藥劑量以每個培養盤為單位)：試管A由混合4 μ g DNA混合製備(pCMV載體；受體cDNA的pCMV載體，等)於0.5毫升無血清DMEM(Gibco BRL)；試管B由混合24 μ g脂質體(Gibco BRL)於0.5毫升無血清DMEM。試管A及B倒轉混合(數次)，隨後在室溫下培養30至45分鐘。混合稱之為"轉染混合液"。製成的293細胞以1XPBS清洗，隨後添加5毫升無血清DMEM。取1毫升的轉染混合液物添加至細胞，在37°C /5% CO₂下培養4小時。轉染混合液物以移液管吸出，隨後添加10毫升DMEM/10%胎牛血清。細胞在37°C /5% CO₂下培養。經48小時培養後，採收細胞且用以分析。

b. 穩定的細胞株

12×10^6 的293細胞置於15公分組織培養盤。在DME高葡萄糖培養基包含10%胎牛血清及1%丙胺酸鈉，L-麩醯胺酸及抗生物素。293細胞分盤24小時後(或約達成80%融合)，細胞使用12 μ g DNA轉染。12 μ g DNA以60毫升脂質體及2毫升無血清DME高葡萄糖培養基結合。將培養基從盤中吸

出，且細胞以無血清之培養基清洗一次。DNA，脂質體，及培養基混合物添加至僅有10毫升無血清培養基盤中。隨後在37°C培養4至5小時，將培養基吸出且添加25毫升包含血清之培養基。轉染24小時後，再次吸出培養基被，且添加有血清之新鮮培養基。轉染48小時後，吸出培養基且添加抗菌素(G418藥物)在最終濃度500 μm /毫升中培養。轉染細胞選擇出有效轉染包含G418抗菌基因的細胞。選擇過程中，培養基每4至5天更換一次。在選擇期間，細胞成長形成穩定族群，或再經區分以供穩定選殖篩選。

實例4

GPCR活化測定法

多種方法可利用來測定人類GPCRs活性。下文所述僅為示實例；熟習本技藝人士應具能力可判斷依其需要最適用的測定法。

1. 細胞膜結合測定法： $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 測定法

當G蛋白-偶聯受體在其活化狀態，如配體偶聯或本質性活化結果，受體與G蛋白偶聯並促進GDP釋放，且隨後將GTP結合至G蛋白。G蛋白受體化合物的 α 單元體如GTP水解酶般作用，且緩慢將GTP水解成GDP，受體正常來說為不活化。活化的受體持續將GTP換成GDP。不可水解的GTP類似物($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$)可被利用來表示 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 與表現出活化受體之胞膜的結合增加。使用 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合來測量活性的優點為：(a)可通用至全部的G蛋白-偶聯受體；(b)其靠近胞膜表面使其較不容易再獲得會影響細胞內訊息

傳遞的化學分子。

此分析利用 G 蛋白-偶聯受體刺激 [^{35}S]GTP γ S 結合至胞膜上表現出相關受體的能力。因此，此分析可使用於直接辨識方法針對內生性 GPCRs 及非內生性本質性活化 GPCRs 來篩選候選化合物。此測定法為通用方法，可應用至針對所有 G 蛋白-偶聯受體的藥物開發。

[^{35}S]GTP γ S 測定法為培養於 20 mM HEPES 及 1 至 20 mM 氯化鎂間(此量可再調整以取得最佳的結果，雖然 20 mM 較佳)pH 7.4，緩衝液與 0.3 至 1.2 nM [^{35}S]GTP γ S(此量可再調整以取得最佳的結果，雖然 1.2 較佳)結合，及 12.5 至 75 μg 膜蛋白(此量可再調整以取得最佳的結果)及 10 μM GDP(此量可再調整以取得結果)1 小時。接著添加小麥胚芽凝集素 (25 μl ; Amersham)且在室溫混合培養 30 分鐘。試管接著以 $1500 \times g$ ，室溫下離心 5 分鐘，且以閃爍計數器計數。

2. 腺苷酸環化酶

設計用於以細胞為基礎之測定法所用的 Flash PlateTM 腺苷酸環化酶套件(新英格蘭中心; Cat. NO. SMP004A)可經修飾供使用在未經加工的質體胞膜。Flash Plate 的培養盤各孔可包含一閃爍覆蓋層並可包含特別的抗體辨別 cAMP。孔中生成之 cAMP 可由放射性 cAMP 追蹤劑與 cAMP 抗體結合的直接競逐測得其量。以下提出一簡短程序可用來測量表現出受體之完整細胞內 cAMP 濃度的改變。

轉染細胞在暫時轉染後 24 小時採收。將培養基小心吸出且丟棄。10 毫升 PBS 緩慢添加至每一盤細胞中再小心吸

出。1毫升Sigma細胞裂解緩衝液及3毫升PBS添加入每一個培養盤中。將細胞以微量滴管移出培養盤而細胞懸浮液收集於50毫升圓錐形離心管。細胞接著在室溫下以1100 rpm離心5分鐘。細胞沉澱塊小心再懸浮於足夠量的PBS中(約3毫升/盤)。細胞接著使用血球計數並再加入PBS以取得足夠數量的細胞(最終體積為50 μ l/盤)。

cAMP標準及檢測緩衝液[包含1 μ Ci的 125 IcAMP追蹤劑(50 μ l)至11毫升檢測緩衝液中]依製造商的說明書配製並保持備用。測定緩衝液為即席配置以供篩選使用且包含50 μ l刺激緩衝液, 3 μ l測試化合物(12 μ M最終分析濃度)及50 μ l細胞, 測定緩衝液儲存在冰上備用。此測定法是先添加50 μ l cAMP標準液至適當的孔中, 隨後添加50 μ l PBSA至H-11及H-12孔。50 μ l刺激緩衝液添加至所有孔中。取DMSO(或選擇的候選化合物)使用能夠分配3 μ l化合物溶液的針狀工具添加至適當的孔中, 測試化合物最終測定濃度為12 μ M而最終測定液總體積為100 μ l。接著將細胞加入孔中在室溫下培養60分鐘。100 μ l包含cAMP追蹤劑的偵測混合液添加入孔中。培養盤接著再培養2小時後以Wallac MicroBeta 閃爍計數器計數。每一孔的cAMP含量可由各培養盤的標準cAMP曲線推導算出。

3. 以細胞為基礎的Gi-偶聯目標GPCRs之cAMP測定法

TSHR為Gs-偶聯GPCR, 其在活化時造成cAMP累積。TSHR若在胺基酸殘基623位置突變將成為本質性活化(將丙胺酸殘基改成異白胺酸殘基)。一種Gi-偶聯受體應抑制

腺苷環化酶，且，因此，降低cAMP產生量，這就使得cAMP濃度的測量較困難。一種能測量cAMP生成量降低而顯示Gi-偶聯受體之本質性活化的技術可藉由共轉染達成，其中最好是用一非內生性本質性活化TSHR(TSHR-A6231)(或一種內生性本質性活化Gs-偶聯受體)當做Gi-偶聯目標GPCR的"訊號增強劑"而得出cAMP濃度基準值。一旦造出一種非內生性Gi-偶聯受體的轉型，接著將此目標GPCR的非內生轉型與訊號增強劑共轉染，這就是可以用來篩檢候選化合物的材料。在一cAMP測定法中我們將利用上述方法有效地產生訊號；此方法最好是使用於針對Gi-偶聯受體直接識別候選化合物。請注意，就一Gi-偶聯GPCR而論，當使用此方法時，目標GPCR的反向促效劑將增加cAMP訊號，且其促效劑將降低cAMP訊號。

第一天，每一孔 2×10^4 個293細胞置於培養盤中。第二天，準備兩個反應試管(下文中每個試管的藥劑用量以培養盤為單位)：試管A的製備是將每個受體2 μ g DNA轉染到哺乳動物細胞中，總共為4 μ g DNA (例如pCMV載體、帶有突變之TSHR(TSHR-A6231)的pCMV載體、TSHR-A6231及GPCR等)於1.2毫升無血清DMEM (Irvine Scientific, Irvine, CA)；試管B的製備則是混合120 μ l 脂質體(Gibco BRL)於1.2毫升無血清DMEM。試管A及B由倒轉混合(數次)，隨後在室溫下培養30至45分鐘。混合液稱之為「轉染混合液」。已分盤的293細胞以1 $\times$ PBS清洗，隨後添加10毫升無血清DMEM。2.4毫升的轉染混合液添加至細胞，再

置於37°C / 5% CO₂下培養4小時。轉染混合液物由吸除，隨後添加25毫升DMEM/10%胎牛血清。細胞在37°C / 5% CO₂下培養。在24小時培養後，採收細胞且用以分析。

Flash PlateTM腺苷酸環化酶套件(新英格蘭中心；Cat. NO. SMP004A)設計以細胞為主的分析，然而，可依熟知此技藝人士的需要修飾以使用於未經加工的原生質胞膜。Flash Plate的培養盤可包含一閃爍體覆蓋層其中也包含可辨別cAMP的特定抗體。產生於孔中的cAMP可由放射性cAMP追蹤劑直接競逐要與cAMP抗體結合而測得其量。以下提出一簡短程序可用來測量表現出受體之完整細胞的cAMP濃度改變。

轉染細胞在暫時轉染後24小時採收。培養基小心吸出且丟棄。每一培養盤的細胞緩慢添加10毫升PBS再小心吸除。將1毫升Sigma細胞裂解緩衝液及3毫升PBS添加入每一個培養盤中。將細胞以微量滴管移出培養盤且將細胞懸浮液收集於50毫升圓錐形離心管。細胞接著在室溫下以1100 rpm離心5分鐘。細胞沉澱塊小心再懸浮於足夠體積的PBS中(約每盤3毫升)。細胞接著使用血球計數且另外添加PBS以得到足夠數量的細胞(最終體積約為每孔50 µl)。

cAMP標準及檢測緩衝液(包含1 µCi的追蹤劑 [¹²⁵IcAMP(50 µl)]至11毫升檢測緩衝液中)依製造商的說明書配製並保持備用。用來篩選的測定緩衝液必須即用即配且包含50 µl刺激緩衝液，3 µl測試化合物(12 µM最終測定濃度)及50 µl細胞，測定緩衝液置於冰上備用。此測定法

首先添加 50 μ l 的 cAMP 標準液至適當的孔，隨後添加 50 μ l 的 PBSA 至 H-11 及 H-12 孔。50 μ l 刺激緩衝液添加至所有孔中。將所選擇的化合物(例如 TSH)使用能夠分配 3 μ l 化合物溶液的針狀工具添加至適當的孔中，達 12 μ M 最終測定濃度的受測化合物及 100 μ l 總測定體積。接著加入細胞於孔中在室溫下培養 60 分鐘。100 μ l 包含 cAMP 追蹤劑的偵測混合液添加入孔中。培養盤接著培養 2 小時後在 Wallac MicroBeta scintillation 閃爍計數器中計數。每孔的 cAMP 數值可由各個培養盤的標準 cAMP 曲線推算得知。

4. 以報導基因為基礎的測定法

a. CRE-LUC 報導基因測定法(Gs 相關受體)

293 及 293T 細胞在以每孔 2×10^4 細胞的密度分於 96 培養盤，隔天根據廠商說明書使用脂質體試劑(Lipofectamine Reagent, BRL)轉染。每 6 孔轉染製備一種 DNA/脂質混合液，其法如下：：100 μ l DMEM 中 260 ng 質體 DNA 和緩與 100 μ l DMEM 中的 2 μ l 脂質混合(該 260 ng 質體 DNA 包含 200 ng 的 8 $\times$ CRE-Luc 報導基因質體，50 ng 包含內生性受體或非內生性受體的 pCMV 或僅為 pCMV，及 10 ng GPRS 表現質體(pcDNA3(Clontech)之中的 GPRS)。8 $\times$ CRE-Luc 報導基因質體製備如下：載體 SRIF- β -gal 是由在 p β gal 載體(Clontech)的 BglV-HindIII 位置上選殖大鼠體抑素受體(-71/+51)獲得。腺病毒模板 AdpCF126CCRE8 以 PCR 獲得 8 份的 cAMP 反應元素(見，*Human Gene Therapy*, 7:1883 (1996))且在 Kpn-BgalV 位置選殖插入 SRIF- β -gal 載體，取

得 8×CRE-β-gal 報導基因載體。8×CRE-Luc 報導基因質體是將 8×CRE-β-gal 報導基因載體中的 β-半乳糖苷酶基因，代之以 pGL3 基本載體 (Promega) 在 HindIII-BamHI 位置上的螢光素酶。在室溫下培養 30 分鐘後，將 DNA-脂質混合液與 400 μl 的 DMEM 稀釋且在每一個孔中添加 100 μl 的稀釋混合液。在細胞培養箱培養 4 小時後，將 100 μl 的 DMEM 與 10% FSC 添加入每一個孔中。隔天轉染細胞換上每孔 200 μl 的 DMEM 與 10% FSC。8 小時後，以 PBS 清洗一次後，又換成每一孔 100 μl 不含酚紅的 DMEM，隔天使用 LucLite™ 報導基因測定套件 (Packard) 依廠商的說明書測量螢光素酶活性，且以 1450 MicroBeta™ 閃爍與螢光計數器 (Wallac) 讀取。

b. AP1 報導基因測定法 (Gq-相關受體)

有一種偵測 Gq 刺激量的方法是依靠 Gq 蛋白相關之磷脂酶 C 的已知特性，後者會導致啟動子當中包含 AP1 元素的基因被活化。有一 Pathdetect™ AP-1 順式報導基因系統 (Stratagene, Catalogue # 219073) 可依上文中有關 CREB 報導基因測定法所提出的標準程序運用，不過其中的磷酸鈣沉澱成份為 410 ng pAP1-Luc，80 ng pCMV 受體表現質體及 20 ng CMV-SEAP。

c. SRF-Luc 受體分析 (Gq-相關受體)

有一種偵測 Gq 刺激量的方法是依靠 Gq-相關之磷脂酶 C 的已知特性，後者會導致在其啟動子中包含血清反應因子的基因被活化。Pathdetect™ SRF-Luc 報導基因系統

(Stratagene)可用於測定，例如像是COS7細胞中，的Gq-偶聯活性。細胞是用該系統的質體成份進行轉染，此表現質體是運用Mammalian TransfectionTM套件(Stratagene, Catalogue #200285)依廠商指示而編碼有內生性或非內生性GPCR。簡言之，410 ng SRF-Luc，80 ng pCMV受體表現質體及20 ng CMV-SEAP(分泌鹼性磷酸酶表現質體；測量轉染細胞培養基當中的鹼性磷酸酶活性以控制各樣品的轉染效率)如操作說明書所示在混合後以磷酸鈣沉澱物析出。將一半的沉澱物平均分配在96孔培養盤上的三3孔中，保持細胞於無血清培養基24小時。在最後5小時，依指示在某些孔中加入1 μ M血管收縮素培養。接著將細胞酶解並使用LuciteTM套件(Packard, Cat.#6016911)及"Trilux 1450 Microbeta"液體閃爍與螢光計數器(Wallac)如廠商之操作說明測定其螢光素酶活性。所得數據可由GraphPad PrismTM 2.0a(Graphpad Software Inc.)分析。

細胞內IP₃累積分析(Gq相關受體)

第一天，包含受體(內生性及/非內生性)的細胞分盤於24孔培養盤，一般為每孔 1×10^5 個細胞(此數目尚可最佳化整調)。第二天，細胞首先以每孔50 μ l無血清DMEM之中的0.25 μ g DNA及每孔50 μ l無血清DMEM之中的2 μ l脂質體混合以進行轉染。混合液溫和攪拌且在室溫培養15至30分鐘。細胞以0.5毫升PBS及400 μ l無血清培養基清洗再與轉染培養基混合且添加入細胞中。細胞接著在37°C /5% CO₂下培養3至4小時，然後把轉染培養基移除且代之以每孔1

毫升的一般成長培養基。第三天，細胞以 ^3H -myo-肌醇標記。簡言之，先將培養基移除且以0.5毫升PBS清洗細胞。接著添加每孔0.5毫升無肌醇無血清培養基(GIBCO BRL)以及每孔0.25 μCi 的 ^3H -myo-肌醇，且細胞在 37°C /5% CO_2 下培養16至18小時。第四天，細胞以0.5毫升PBS清洗且添加0.45毫升包含無肌醇無血清培養基10 μM 巴吉林(pargyline)，10 mM氯化鋰或0.4毫升測定培養基以及及50 μl 10 $\times$ 酮色林(ket)至最終濃度為10 μM 。細胞接著在 37°C 培養30分鐘。細胞接著添加每孔0.5毫升PBS及200 μl 新鮮/冰過的冷停止溶液(1 M氫氧化鉀；18 mM硼酸鈉；3.8 mM EDTA)。溶液置於冰上5至10分鐘或直到細胞被酶解，接著以200 μl 新鮮/冰過的冷中和溶液中(7.5%鹽酸)。然後把溶胞產物移入1.5毫升微量離心管並在每根試管中添加1毫升氯仿/甲醇(1：2)。溶液離心15秒取上清液用Bioead AG1-X8TM離子交換樹脂(100至200孔徑)。首先，樹脂以1：1.25 W/V的水清洗，再將0.9毫升上清液裝入管柱中。管柱以5 mM myo-肌醇10毫升及5 mM硼酸鈉/60 mM甲酸鈉10毫升清洗。以三磷酸肌醇洗提放進裝有10毫升包含2毫升0.1 M甲酸/1 M甲酸銨之閃爍劑混合液的閃爍計數瓶。管柱之再生可用10毫升0.1 M甲酸/3 M甲酸銨清洗且以去離子蒸餾水浸潤2次並儲存於 4°C 水中。

實例5

融合蛋白製備

a. GPCR：Gs融合構築體

本質性活化GPCR與G蛋白融合構築體設計以下述方法達成：大鼠G蛋白Gs α 的5'及3'末端(長結構；Itoh, H等人, 83 *PNAS* 3776 (1986))經加工均包含一HindIII序列(5'-AAGCTT-3')。確認其為正確序列後(包含兩側嵌入的HindIII序列)，全部序列運用pcDNA3.1(-)(Invitrogen, cat. No. V795-20)的HindIII限制位點次選殖進入該載體中。Gs α 序列正確的方向在次選殖進入pcDNA3.1(-)後測量。接著再確認經過修飾之pcDNA3.1(-)在HindIII序列包含大鼠Gs α 基因；此載體可當做是「通用」Gs α 蛋白載體。PcDNA3.1(-)載體在HindIII位置上游包含多種已知的限制位點，因此更有能力在Gs蛋白上游處提供嵌入內生性本質性活化GPCR編碼序列。相同的方法可利用來製成其他"通用"G蛋白載體，當然，其他技藝人士所曉得的市面可得載體或專屬載體均利用於此——重要的標準為GPCR序列位於G蛋白上游處且在同一讀框中。

b. Gq(6胺基酸刪除)/Gi融合構築體

Gq(del)/Gi融合構築體的設計可依下述步驟完成：N端6胺基酸(胺基酸2至7)，具TLESIM G α q-次單元體的序列將被刪除；且C端5胺基酸，具EYNLV的序列將以對應為G α i蛋白具DCGLF序列胺基酸取代。融合構築體可使用下列引子以PCR獲得：

5'-gatcAAGCTTCCATGGCGTGCTGCCTGAGCGAGGAG-
3'(序列識別號：9)及

5'-gatcGGATCCTTAGAACAGGCCGCAGTCCTTCAGGTTC

AGCTGCAGGATGGTG-3'(序列識別號：10)

並以包含帶有紅血球凝集素標記的小鼠野生型 $G_{\alpha q}$ 之質體 63313 做為模板。低位末端蓋的核苷酸也被包含進來當做間隔。

TaqPlus Precision DNA 聚合酶 (Stratagene) 將用於以下的放大程序，其循環條件為：步驟 2 至 4 重複 35 次：95°C 2 分鐘；95°C 20 秒；56°C 20 秒；72°C 2 分鐘；及 72°C 7 分鐘。PCR 產物將選殖於 pCRII-TOPO 載體 (Invitrogen)，並使用 ABI Big Dye Terminator 套件 (P.E. Biosystems) 定出序列。從包含融合構築體片段的 TOPO 選殖嵌入物將用 2 個步驟的選殖程序送入表現載體 pcDNA3.1(+) 的 HindII/BamHI 位置。同時請參考，PCT 申請編號 PCT/US02/05625，公告為 WO02068600，2002 年 9 月 6 日，揭示於此均以其整體作為參考。

實例 6

標準程序：反向促效劑與促效劑的直接識別

A. [35 S]GTP γ S 測定法

在一些具體實施例中，內生性 GPCR 將被用來直接識別候選化合物是否為促效劑或拮抗劑。在一些具體實施例中，內生性本質性活化 GPCR 或非內生性本質性活化 GPCR 被利用來直接識別候選化合物是否為反向促效劑或促效劑。在一些具體實施例中，包含內生性本質性活化 GPCR 或非內生性本質性活化 GPCR 的 GPCR 融合蛋白將被利用來直接識別候選化合物是否為反向促效劑。在上述之具體實

施例中，該直接識別是用以下所提出的標準程序。

細胞膜製備

在一些具體實施例中，細胞膜包含所要用的GPCR/融合蛋白且用以直接識別候選化合物是否為反向促效劑、促效劑或拮抗劑，其較佳製備法如下：

a. 材料

「細胞膜刮除緩衝液」包含20 mM HEPES及10 mM EDTA，pH7.4；「胞膜清洗緩衝液」包含20 mM HEPES及0.1 mM EDTA，pH 7.4；「結合緩衝液」包含20 mM HEPES及100mM氯化鈉及10 mM氯化鎂，pH 7.4。

b. 過程

全部的材料在整個過程中皆置於冰上。首先，將聚合之單層細胞的培養基吸出，隨後以10毫升冰冷的PBS浸潤，再吸出。此後，添加5毫升胞膜刮除緩衝液將以刮除細胞；再將細胞萃取物移至50毫升離心管中(在4°C，20000 rpm離心17分鐘)。然後，將上清液吸出，沉澱塊再次懸浮於30毫升膜清洗緩衝液中並在4°C，20000 rpm離心17分鐘。將上清液吸出，沉澱塊再次懸浮於緩衝液中。接著使用Brinkman Polytron™均質機均質(15至20秒攪拌多次直到全部材料均懸浮於液中)。此液在此稱之為"膜蛋白"。

Bradford蛋白質測定法

在均質後，胞膜的蛋白質濃度將由Bradford蛋白質測定法測出(蛋白質稀釋至1.5毫克/毫升，能整除且冷凍(-80°C)待稍後使用；當冷凍，使用如下標準程序：在分析當天，

冷凍的膜蛋白在室溫下融化，隨後以Polytron以 12×1000 rpm轉動且均質5至10分鐘；其值得注意的是若要多次製備均質機必需在不同的製備程序間先完全清理乾淨。

a. 材料

依廠商提供之操作說明書(Biorad, cat. No. 500-0006)，尚會用到結合緩衝液(如上述)；Bradford染劑；Bradford蛋白質標準液。

b. 過程

準備相同的試管，一個包含胞膜，另一個"空白"做為對照組。每一試管包含800 μ l結合緩衝液。然後，將10 μ l Bradford蛋白質標準液(1毫克/毫升)添加至每一個試管，再來是將10 μ l膜蛋白添加至某一管(可不是空白管)。此後，將200 μ l Bradford染劑添加至每一管中，均經渦流攪拌。5分鐘後，將試管再經渦流攪拌且將物質轉移至比色管中。將比色管用CECIL3041分光光度計，在波長595下讀取。

直接識別分析

a. 材料

包含37.5毫升結合緩衝液及2毫克GDP(Sigma, cat. No. G-7127)的GDP緩衝液，經結合緩衝液連續稀釋成為0.2 μ M GDP(每孔的最終GDP濃度為0.1 μ M的GDP)；每一個孔包含一種候選化合物，最終體積為200 μ l，包含100 μ l GDP緩衝液(最終濃度，0.1 μ M GDP)，50 μ l溶於結合緩衝液中的膜蛋白及50 μ l溶於結合緩衝液中之 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (0.6 nM)(每10毫升結合緩衝液有2.5 μ l $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$)。

b. 過程

候選化合物最好使用96孔的培養盤進行篩檢(其可以冷凍至 -80°C)。膜蛋白(或不含GPCR融合蛋白表現載體的胞膜，做為對照組)，經快速均質直到懸浮於溶液中。蛋白質濃度將使用上文所述之Bradford蛋白質測定法。接著將膜蛋白(及對照組)稀釋於結合緩衝液直到0.25毫克/毫升(最終分析濃度為每一孔12.5 μg)。接下來以一種5 μl 針狀工具用來轉移5 μl 候選化合物至每一孔(即5 μl 於200 μl 總分析體積，比例為1:40，因此最終候選化合物的篩檢濃度為10 μM)。同樣的，為避免污染，在每一個轉移步驟後，針狀工具將以裝有水(1X)，乙醇(1X)及水(2X)的三個儲液清洗——清洗後將多餘液體從工具上甩掉並以紙或紙巾擦乾。此後，將50 μl 膜蛋白添加至每一孔(同時也有用到一包含胞膜而沒有GPCR融合蛋白的對照組孔)，且在室溫下預先培養5至10分鐘。此後，將溶於結合緩衝液中的 $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 50 μl (0.6 nM)添加至每一孔，隨後在室溫下置於震盪器培養60分鐘(同樣地，在此實例中，將培養盤以鋁箔覆蓋)。測定程序的終止是將培養盤在 22°C ，4000 rpm轉動15分鐘。將培養盤以與8通道多管移液器吸除且以培養盤的蓋子密封。將培養盤使用Wallac 1450的"Prot.#37"設定(如廠商說明書所示)讀取。

B. 環單磷酸腺苷測定

另一個直接辨識候選化合物是否為反向促效劑，促效劑，或拮抗劑的方法，是利用以環化酶為基礎的測定法。

除了可用來直接識別，此測定法可當做是上述 [^{35}S]GTP γ S 測定法所得結果的獨立確認方式。

本測定法最好利用一種經修改的 Flash PlateTM腺苷環化酶套件(New England Nuclear; Cat. No. SMP004A)以直接識別候選化合物是否為內生性或本質性活化GPCR的反向促效劑或促效劑，其方法如下列標準程序所述。

轉染細胞在轉染後3天採收。胞膜的製備是將細胞均質懸浮在包含20 mM HEPES, pH 7.4, 及10 mM氯化鎂溶液中。均質最好在冰上使用Brinkman PolytronTM約10秒。產生的均質物再經4°C, 49000X克下離心15分鐘。所得沉澱塊接著再次懸浮於含有20 mM HEPE, pH 7.4及0.1 mM EDTA溶液中，均質10秒，隨後在4°C, 49000X克下離心15分鐘。所得沉澱塊接著儲存於-80°C備用。直接辨識篩檢當天，將胞膜沉澱塊在室溫下緩慢融化，再次懸浮於含20 mM HEPES, pH 7.4, 及10 mM 氯化鎂溶液中以達成最終蛋白質濃度為每毫升0.60毫克(懸浮胞膜溶液置於冰上備用)。

cAMP標準緩衝液及測定緩衝液[包含2 μCi 追蹤劑 ^{125}I cAMP(100 μl)於11毫升測定緩衝液]依廠商之操作說明製備及儲存。測定緩衝液為進行篩檢時才配製且包含20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM 氯化鎂, 20 mM磷酸肌酸(Sigma), 0.1單位/毫升肌胺酸磷酸轉移酶(Sigma), 50 μM GTP(Sigma), 及0.2 mM ATP(Sigma)。測定緩衝液接著儲存於冰中備用。

取一最好為96孔的培養盤，將候選化合物(若冷凍，在室溫下融化)添加(3 μ l/孔；12 μ M最終測定濃度)，與40 μ l膜蛋白(30 μ g/孔)及50 μ l測定緩衝液。混合溶液在室溫下伴隨輕微振盪培養30分鐘。

培養後，100 μ l測定偵測緩衝液添加至每一個孔中，隨後培養2至24小時。培養盤使用一Wallac MicroBeta™培養盤讀取儀的程序"Prot. #31"(如操作說明)讀取其數值。

舉例來說但不僅限於此，一示範性的篩檢測定培養盤(96孔)所得結果可見於圖1中。每一線段代表各孔中不同化合物所測得結果，「目標受體」為一內生性本質性活化Gs-偶聯蛋白GPCR的Gs α 融合蛋白構築體。在圖1中示範的結果亦提供每一培養盤("m")結果的平均值以及兩偏好的判斷標準，此初步篩檢要選出反向促效劑時的"領先者"，所選出候選化合物其反應百分率的降低至少達平均值再減去2個標準差。反之，此初步篩檢要選出促效劑時的"領先者"所選出的候選化合物其反應百分率的增加至少達到平均值加再上2個標準差。基於上述選擇程序，下述孔中的候選化合物直接識別為針對該內生性GPCR推定的反向促效劑(化合物A)及促效劑(化合物B)，分別對應於孔A2及孔G9。見圖1。明白來說，需知：這些化合物的直接辨識並不需對此GPCR的內生性配體有任何了解。將測定技術以受體的功能為基礎，而非化合物的-偶聯親合度，我們能夠同時弄清那些化合物能降低此受體功能活性(化合物A)又有那些會增加受體功能活性(化合物B)。

實例 7

測量細胞內鈣濃度的螢光影像培養盤讀取機(FLIPR)

目標受體(實驗組)及pCMV(反向控制組)的穩定轉染細胞分別由其轉殖細胞株中取出以每孔 5.5×10^4 細胞的數量植於預鍍有聚-D-離胺酸的96孔培養盤(Becton-Dickinson, #356640)再加入培養基(含有10% FBS的DMEM, 2 mM L-麩胺酸, 1mM丙酮酸鈉)以作為隔天測定用。製備Fluo4-AM(Molecular Probe, #F14202)培養緩衝液的儲液, 將1毫克Fluo4-AM溶解於467 μ l DMSO及467 μ l Pluoronic acid(Molecular Probe, #P3000)以得到1 mM儲液, 其可以儲存於-20°C一個月。Fluo4-AM為螢光鈣指示染劑。

候選化合物製備於清洗緩衝液中(1X HBSS/2.5 mM Probenicid/20 mM HEPES, pH 7.4)。

在分析時, 將培養基從孔中移除且在細胞中加入100 μ l之4 μ M Fluo4-AM、2.5 mM羧苯磺胺(Sigma, #P8761)、20 mM HEPES, 成為pH 7.4的培養基。培養於37°C /5% CO₂ 60分鐘。

在培養1小時後, 將Fluo4-AM培養液移除並把細胞以100 μ l清洗緩衝液清洗兩次。每一孔中留下100 μ l清洗緩衝液。培養盤再次培養於37°C /5% CO₂ 60分鐘。

FLIPR(螢光影像培養盤讀取機; Molecular Device)的設定是要在第30秒添加50 μ l候選化合物, 且記錄由候選化合物所引起細胞內鈣濃度([Ca²⁺])的即時改變共達150秒。總螢光改變的計數是用FLIPR軟體判定促效劑活性。儀器的

軟體會將螢光讀數常規化使得其起始讀數都是從0開始。

在一些具體實施例中，包含目標受體的細胞進一步包含不具專一性的 $G\alpha_{15/16}$ 或變異的 $Gq/Gi\alpha$ 次單位。

雖然前文提供一種使用穩定轉染細胞的促效劑活性 FLIPR 分析，熟習此技藝者應能針對拮抗劑活化的特性修改此測定法。熟悉此項技術者也應能體會，或可換用暫時轉染的細胞。

實例 8

黑色素細胞技術

黑色素細胞為低等脊椎動物的皮膚細胞。其包含具有色素的胞器稱之為黑色素體。黑色素細胞能夠靠 G 蛋白-偶聯受體 (GPCR) 活化微管網狀物上再分散這些黑色素。這些色素移動的結果為細胞外觀變亮或變暗。在黑色素細胞中，因 Gi -偶聯受體活化所導致降低細胞內 cAMP 濃度下降會造成黑色素體移動至細胞中央，造成其顏色急劇變亮。若接下來隨著 Gs -偶聯受體的活化 cAMP 量上升，黑色素體會再分散且細胞看起又變暗。 Gq -偶聯受體活化產生的二醯甘油濃度增加亦可引起黑色素體再分散。另外，此技術液適合研究某些受體酪胺酸激酶。黑色素細胞的反應在受體活化後幾分鐘就生成，且產生簡單、持久之顏色改變。此反應可使用常見吸光度微量讀取器或適當的錄影成像系統輕鬆測得。不像其他皮膚細胞，黑色素細胞是由神經胚分化而得且似乎表現為訊號蛋白質的完全補體。尤其是細胞表現出相當多種的 G 蛋白，也就能夠在功能上表現所有的

GPCR。

黑色素細胞可用來針對GPCR辨識化合物，包含其天然配體。此方法可藉由引進黑色素細胞株的測試細胞達成，其能夠因應一特定刺激分散或聚集它們的色素同時可表現出該GPCR的外生之選殖編碼序列。刺激劑(例如褪黑激素)可以設定色素配置的最初狀態，其中若該GPCR會引發色素聚集，色素會聚集在該測試細胞內。相反地，假設該GPCR的活性引發色素聚集，為了引起色素分散，可以利用黑促素來設定一色素配置的最初狀態，其色素分散開來。之後將該測試細胞與化合物接觸，以及測定是否在該細胞中色素的配置與該色素配置的最初狀態有任何變化。候選化合物，包括，但不限於，配體，若能連結該GPCR並導致色素的分散，將在該培養皿上呈現深色，而色素的聚集將使培養皿呈現淡色。

隨後所敘述的材料與方法是依據美國專利編號5462856及美國專利編號6051387所揭示。這些專利揭示於此以其整體列為參考。

將細胞置於96孔培養盤(每盤一種受體)。轉染48小時後，在每一培養盤上一半的細胞以10 nM褪黑激素處理。褪黑激素活化一種黑色素細胞之內生性Gi-偶聯受體，且造成其色素聚集。其餘另一半的細胞則換用無血清培養基0.7X L-15(Gibco)。一小時後，在無血清培養基中的細胞保持在色素分散狀態，同時黑色素治療細胞是在色素聚集狀態。此時，細胞以一反應劑量的候選化合物處理。若盤

中的 GPCRs 與候選化合物結合，黑色素細胞表現應會對化合物做出反應而改變顏色。若受體為 Gs 或 Gq-偶聯受體，且若候選化合物為促效劑，那麼黑色素聚集之黑色素細胞將經歷色素分散。相反的，若受體為 Gi-偶聯受體，且若候選化合物為促效劑，那麼色素分散細胞應會經歷一種與劑量相關的色素聚集。

實例 9

人類 RUP41 組織分布

A. AFFYMETRIX GENECHIP® 技術

胺基酸序列送交 Affymetrix 公司使用 GeneChip® 技術設計並製造包含寡聚核苷酸微陣列以監測 G 蛋白-偶聯受體 (GPCRs) 的表現。在微陣列上還含有從 Harvard Brain Bank 或其他市場上可得的特殊人類腦組織探針。RNA 樣品經放大，標記並雜合至微陣列，且依廠商的操作說明分析數據。

使用 GeneChip，要測的是人類 RUP41 表現圖譜。見圖 2A。圖 2A 為在多種組織中人類 RUP41 表現量的圖示。檢視此圖顯示出 RUP41 表現於腦及心臟中。除腦部的組織以外，RUP41 選擇性表現於心臟。RUP41 選擇表現使得對 RUP41 的調節所導致不良副作用的機會減少。

墨點測定法(圖 2B)及北方墨漬測定法(圖 2C)所得結果與 GeneChip 的結果一致。

B. RT-PCR

RT-PCR 是用來測人類 RUP41 表現。所用寡聚核苷酸為

RUP41特有，並且用 cDNA 為模板。依廠商的指示，運用 Taq DNA 聚合酶(Stratagene)放大一 40 μ l 的反應。PCR 循環條件為 96 $^{\circ}$ C 2 分鐘，隨後是 30 循環的 96 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒及 72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，再經 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。將 20 μ l 反應物裝載於 1.5% 洋菜膠以分析 RT-PCR 產物。

5'PCR 引子序列：

5'-GTAATAATTGCCCTCCGGCGAGC-3'(序列識別號：11)。

3'PCR 引子序列：

5'-CTAGTCTGTGACAACCTGAGG-3'(序列識別號：12)。

放大的 DNA 片段長度為 390 鹼基對。

舉例來說，人類 RUP41 的 RT-PCR 顯示於圖 7，充血性心衰竭病人心臟組織的 RUP41 表現與心臟功能正常之病人的心臟組織 RUP41 表現作比較。

熟悉本技藝者應有能力對小鼠 RUP41 及大鼠 RUP41 如上所述施行 RT-PCR。

C. 北方墨漬測定法

人類 RUP41 表現的北方墨漬測定法可由熟悉本技藝者所通曉的程序達成。相當於序列識別號：1 核苷酸 1104-1538 的人類 RUP41 編碼區域片段被當探針使用。

實例 10

原位雜交：成年大鼠心臟 RUP41 表現

原位雜交顯示成年大鼠心臟的大區域心肌表現(見第三圖)。反意的 RUP41 放射性標籤探針偵測出所有心臟腔室內都表現出 RUP41。還有些額外的切片用反意的對照

(GAPDH)及心房特異(心房例鈉因子, ANF)探針以顯示出這些心臟切片對此探針具專一性。

原位雜交

固定的心臟組織浸於50:50的OCT混合液:Aqua Mount(VWR, #41799-008, West Chester, PA)且冷凍於乾冰/乙醇中。塊狀物保持在-80°C直到進行冷凝切片,此時將製備10微米的連續切片。待冷凝切片後,組織切片儲存在細胞培養玻片中置於-20°C。

大鼠RUP41序列識別號:6的聚核苷酸次選殖進入PCR II-TOPO載體(Invitrogen, Carlsbad, CA)前後分別為SP6及T7啟動子。與序列識別號:6聚核苷酸互補的 $[^{35}\text{S}]$ -放射性標記反義大鼠RUP41 mRNA探針使用Promega RiboProbe轉錄套件(#P1460; Madison, WI)之SP6 RNA聚合酶製備,依廠商之說明書操作。對照的放射性標記有意股探針使用T7 RNA聚合酶依前法製備。

固定的組織切片解凍且立即在室溫下進行一系列的固定後之細胞培養:PBS 3分鐘;10%福馬林10分鐘;PBS 10分鐘;及PBS 10分鐘。

組織切片接著提供至穿透作用及乙醯作用。為此,將組織切片培養於K蛋白酶(0.001% K蛋白酶於0.5 M Tris, 0.25 M EDTA, pH 8.0)在37°C下10分鐘,隨後在室溫下以水清洗5分鐘。組織切片接著在室溫下以三乙醇胺緩衝液(0.1 M TEA, pH 8.0)作用5分鐘,隨後在室溫下以溶於0.1 M TEA pH 8.0的2.5%醋酸酐培養5分鐘。組織切片接著在

室溫下以2X SSC；50%乙醇；95%乙醇；及100%乙醇各作用2分鐘。接著將組織切片風乾且保持乾燥直到後隔天進行雜交。

組織切片的雜交是在每一切片80至100 μ l之0.47 M氯化鈉，54%甲醯胺於60°C下進行20小時。放射性標記探針用量為 1×10^7 cpm/毫升。組織切片接著以4X SSC在室溫下清洗4次，每次10分鐘。未雜交探針在以RNase A(20 μ g/毫升於0.5 M氯化鈉，10 mM Tris，1 mM EDTA，pH8)在37°C酶解30分鐘。組織切片接著以2X SSC在室溫下清洗2次，每次5分鐘，隨後以1X SSC在室溫下清洗10分鐘，隨後以0.5X SSC在室溫下清洗10分鐘。接著組織切片再以0.1X SSC在65°C下清洗30分鐘，隨後以0.1X SSC在室溫下清洗5分鐘，隨後以酒精脫水。

經歷雜交的組織切片接著對X光底片感光且RUP41雜交訊號可由自動放射照相術呈現。為此，將組織切片以Biomax MR底片感光1天，4天，及皆著1星期。在自動放射照相後，將組織切片使用NTB-2液體感光乳膠(VWR, #IB1654433, West Chester, PA)浸泡。乳膠浸泡過的組織切片在該乳膠感光1星期後將之顯影。在顯影後，組織切片以螢光染劑(bisbanzimidazole, 0.001%於PBS)對比染色並加蓋。組織切片使用暗視野聚光鏡(銀顆粒顯現白色)及DAPI螢光濾鏡(觀察螢光染劑的對比染色)照相。

對由部份大鼠GAPDH序列及心房利鈉因子(ANF)所得之雜交探針也用相同的方法。

實例 11

在肥大的新生大鼠心室心肌細胞中RUP41之向下調控

新生大鼠心室心肌細胞(NRVMS)如前文所描述方法製備(請參Adams, JW等人, J Biol Chem (1996) 271: 1179-86; 揭示於此均以其整體作為參考)。簡言之, 心臟由1至2天齡的Sprague-Dawley系新生大鼠獲得且以膠原酶酶解, 心肌細胞以通過Percoll梯度純化。將細胞分置於預先覆有0.1%明膠的組織培養盤, 在4: 1DMEM/medium-199中保持過夜並另加10%馬血清, 5%新生牛血清, 及抗體(100單位/毫升盤尼西林及100 μ g/毫升鏈黴素)。在培養基中18小時後, 心肌細胞以維持培養基清洗(DMEM/medium-199加抗菌素)以移除死細胞及雜物且在實驗期間時常換新維持培養基。

圖4A。RT-PCR顯示新生鼠心室心肌細胞(NRVMS)保持在無血清情況下24小時的RUP41轉錄表現。RUP41轉錄量在添加脫羥腎上腺素(PE)或新生牛血清(NCS)至培養基後24小時急劇下降, 且與肥大的表現型有關。脫羥腎上腺素用量為100 μ M(再加2 μ M以阻斷 β 腎上腺素受體, 且因此允許選擇性活化 α 腎上腺素受體)。新生牛血清用量為10%。G3PDH PCR產物顯示PCR反應中使用相同量之模板及電泳上樣量的一致性。

RT-PCR

如上所述從NRVMS分離的全部RNA當做模板用來製造反向轉錄DNA(RT-DNA), 用PCR套件的RT(Becton Dickenson)

依廠商的說明操作。在PCR所產出的RT-DNA樣品可偵測得RUP41表現。PCR循環條件為96℃ 2分鐘，隨後96℃ 30秒，55℃ 30秒及72℃ 2分鐘30循環，隨後72℃ 10分鐘。20 µl反應物加在1.5%洋菜膠以分析RT-PCR產物。

5'PCR引子具以下序列：

5'-GTAATAATTGCCCTCCGGCGAGC-3'(序列識別號：11)。

3'PCR引子具以下序列：

5'-CTAGTCTGTGACAACCTGAGG-3'(序列識別號：12)。

放大的DNA片段有390鹼基對。

圖4B。北方墨漬測定法顯示，經過24小時以增肥劑治療，其包含脫羥腎上腺素(PE)，巴豆酯-12肉豆蔻酸-13醋酸(PMA)，前列腺素F2α(PGF2α)，及新生小牛血清(NCS)，表現於NRVMs的RUP41程度降低。脫羥腎上腺素使用100 µM(加2 µM以阻斷β腎上腺受體，且因此允許選擇性活化α腎上腺受體)。巴豆酯-12肉豆蔻酸-13醋酸使用100nM。前列腺素F2α使用1 µM。新生牛血清使用10%。心房利鈉因子(ANF)，一種會對所有肥大刺激均有反應心肌細胞肥大之基因標記為向上調節。28S rRNA的甲烯藍染色顯示RNA完整性及電泳上樣量的一致性。

北方墨漬分析

1-2天齡的大鼠(SD)心房心肌細胞(NRVMs)分離且如上述分於培養盤上。經過多樣處理，總RNA依廠商說明用Trizol試劑(Invitrogen)分離。15毫克的總RNA在含甲醛的洋菜膠上用電泳方式分離且轉移至PVDF胞膜(Amersham)。

相當於序列識別號：6之核苷酸53-488的大鼠RUP41編碼區片段被使用做為北方墨漬分析的探針。³²P標記探針使用標準方法製成且在55°C雜交至細胞膜上。將細胞膜在高嚴格度條件下清洗且在-80°C以X光底片感光2-4天。

實例12

受到血壓過度負荷心肌肥大之小鼠心臟中RUP41之向下調節

圖5，上圖。在血壓過度負荷所引發的心肌肥大之小鼠活體模式中，其RUP41 mRNA向下調節。北方墨漬分析是對橫向大動脈緊縮(TAC)或經模擬手術小鼠(Sham)取得之左心室中分離的全部RNA連續測7天。ANF表現的增加顯示在TAC心臟中確實有肥大的反應。28S rRNA甲烯藍染色顯示此RNA之完整性及電泳上樣量的一致性。相當於序列識別號：4核苷酸775-1269的小鼠RUP41編碼區片段被當作北方墨漬分析的探針。³²P標記探針使用標準方法製成且在55°C雜交至細胞膜上。細胞膜在高嚴格度條件下清洗且在-80°C以X光底片感光2-4天。

圖5，下圖。RUP41訊號以濃度儀測量並以rRNA訊號正規化所得數據。*以Anova統計分析6隻模擬手術小鼠(Sham)及6隻TAC樣品顯示出RUP41 mRNA顯著降低， $P < 0.00005$ 。

橫向大動脈緊縮(TAC)

小鼠的橫向大動脈緊縮手術之實行如前人述(Rockman等人，Proc Natl Acad Sci. 1991 9月15日；88(18)：8277-

81)。簡言之，8週齡小鼠(C57/BL6)以Ketamine及xylazine混合物麻醉。在解剖顯微鏡下，以顯微手術進行頸中線切開使氣管及頸動脈露出。順利在氣管內插管後，插管連接至嚙齒類循環換氣機(volume cycled rodent ventilator, Harvard Apparatus)，氧氣以0.2毫升潮氣量供應且呼吸率為每分鐘110次。以一個小切口在左上胸骨邊緣穿過進入第二肋間的胸腔，大動脈緊縮手術以下述方法達成：以7-0尼龍縫合線在27號針上打結產生一個0.4公釐直徑的緊縮環，將針移除後得到一65%到70%的大動脈緊縮。大動脈綁上之後隨後排空氣胸，將動物拔管並令其復原。

實例13

受到缺氧之NRVM中RUP41之向下調節

北方墨漬分析結果顯示，在患有組織缺氧NRVMs之後6小時所分離的總RNA中RUP41的mRNA濃度減少(圖6)。在缺氧後回氧24小時(H6/R24)後RUP41的mRNA恢復至對照(正常)值。c-fos表現(Hypox-6)增加顯示心肌細胞對缺氧狀況出現壓力反應。28S rRNA甲烯藍染色顯示此RNA之完整性及電泳上樣量之一致性。對應於序列識別號：6核苷酸53-488的大鼠RUP41編碼區片段被當作北方墨漬分析的探針。³²P標籤探針使用標準方法產生且在55°C雜交至胞膜上。胞膜在高嚴格度條件下清洗且在-80°C以X光底片感光2-4天。

NRVM之組織缺氧作法描述於Van Heugten等人，J Mol Cell Cardiol (1994) 26：1513-24，揭示於此均以其整體作

為參考。簡言之，組織缺氧是使用密閉培養箱灌入92%N₂及5%CO₂達成。在缺氧處置達所要求的時間後，將細胞從培養箱中取出至環境空氣中且將無血清DMEM/F12培養基更新。見實例17。

實例14

在有充血性心衰竭之人類中RUP41之向下調節

圖7A。RT-PCR是以人類心臟分離之總RNA進行。充血性心衰竭(CHF)病人RNA中的RUP41轉錄量較正常心臟功能(正常)病人為低。人類GAPDH引子添加至每一個PCR反應做為模板濃度及電泳結果一致性的內部控制。

圖7B。*Anova統計分析顯示在CHF病人的RUP41轉錄較正常病人顯著降低， $p < 0.05$ 。心肌梗塞(MI)病人的RUP41轉錄量與正常心臟並無不同。

人類心臟疾病樣本

RT-PCR(其方法如上述)針對市面可得(Clinomics)經診斷為以下數種心臟之屍體解剖而取得的總RNA進行：正常心臟功能，充血性心衰竭(CHF)，及心肌梗塞(MI)。每一組內RUP41表現的相對量在對GAPDH內部對照組進行正規化後判定。

實例15

在COS-7細胞中Gi的RUP41偶聯

圖8，上圖。COS-7細胞與pCMV-HARUP41(HA-RUP41)或pCMV-HA骨幹(CMV)，以及本質性活化的Gs偶聯甲狀腺刺激荷爾蒙受體(pCMV-TSHR-A6231)共轉染。

(HARUP41即紅血球凝集素(HA)-標記RUP41)。另外，CRE-螢光酵素酶報導基因構築體共轉染以測定百日咳毒素(PTX)存在或不存在時的cAMP活化路徑。同時表現CART-TSHR及HARUP41的細胞其螢光酵素酶報導基因活性較同時表現CART-TSHR及pCMV-HA的細胞之對照組低，可推測RUP41與Gi偶聯。經RUP41與PTX處理而抑制cAMP降低則證實Gi與此受體偶聯。

圖8，下圖。在百日咳毒素(PTX)存在或不存在的情況下，以pCMV-HA(CMV)或pCMV-HARUP41(HA-RUP41)構築體共轉染的COS-7細胞。Forskolin(1 μ M)刺激cAMP量的增加會被RUP41表現抑制。經PTX處理之RUP41的cAMP降低被抑制，證實Gi與此受體結合。

RUP41載體的構成

將序列識別號：3之胺基酸2-433編碼有人類RUP41的聚核苷酸送入pCMV-HA中以進行暫時轉染表現研究。

暫時轉染

DNA轉染使用帶有5'-HA標記的RUP41表現構築體(HA-pCMVRUP41)。簡言之，依廠商的操作說明用Fugene-6轉染劑(Roche)將HA-pCMVRUP41轉染入分於細胞培養玻片的COS-7或HEK細胞。帶有5'-HA標記GPR(孤兒GPCR；GenBank® Accession No. NM_007223)及HA-pCMV載體轉染至COS-7及HEK細胞做為對照組。

cAMP測量

COS-7細胞以RUP41表現質體轉染24小時後，以PBS清

洗，且在FlashPlate分析(PerkinElmer)所得細胞前，於無血清有或無100ng/毫升PTX培養基在37°C下培養18小時。依廠商說明測量cAMP濃度。

CRE-螢光素酶報告基因測定法

COS-7細胞以pCMVRUP41及TSHR-A6231表現質體共同轉染24小時(TSHR-A6231：RUP41(或CNV)的DNA比值=1：7(w/w))。以PBS清洗細胞，且在依廠商說明使用LucLite螢光素酶報告基因套件(Parkard)前，培養於無血清以及有或無100ng/毫升PTX的培養基於37°C下18小時。cAMP量由操作說明偵測。

實例16

腺病毒中介之RUP41過度表現促進NRVM存活

圖9A。NRVM以編碼有RUP41(AdRUP41)的重組腺病毒處理，其不同程度的感染是由病毒滴定量的每細胞之成斑單位(PFU)區分。腺病毒轉染24小時後，總RNA被分離出來且以北方墨漬分析法判定病毒所表現的RUP41濃度。50 PFU/細胞的RUP41表現即可被偵測出，但100 PFU/細胞才顯示出。

圖9B。以每細胞100 PFU的量與AdRUP41感染的NRVM顯示細胞在無血清培養基當中的存活率增加。NRVM與結合葷毒素(phalloidin)之德州紅及Hoechst 33342共同染色。

RUP41載體的構成

為腺病毒實驗，在製造腺病毒RUP41(AdRUP41)結合體之前先將序列識別號：3編碼有人類RUP41多肽的聚核苷

酸次選殖進入pShuttleCMV(Qbiogene)。

腺病毒感染

NRVM被腺病毒載體感染的實作方法如先前描述(請參Adams JW等人, Circ Res (2000) 87: 1180-7; 揭示於此均以其整體作為參考)。簡言之, NRVM於覆有層粘連蛋白(3.5毫克/平方公分)的細胞培養玻片(Nunc)加入血清培養隔夜, 在腺病毒感染前清洗並於無血清培養基中再培養8小時。複感染(MOI)的理想值是每細胞50至100成斑單位(PFU)而劑量範圍則是每細胞0.1至500 PFU。50 PFU/細胞的MOI可得大於95%的感染結果(此值可以此對照病毒感染之NRVMs中的GFP表現判定)而在感染後的48小時內沒有任何細胞毒素, 不論是用AdRUP41或對照組編碼有GFP(AdGFP)的腺病毒感染。

實例17

RUP41過度表現挽救NRVMs免於組織缺氧/回氧引起的凋亡

寡聚核苷酸DNA斷裂(又稱裂解)的分析顯示在缺氧(8小時)後回氧(24小時)會刺激以對照組(AdGFP)腺病毒用每細胞100 PFU之量感染的NRVMs其凋亡增加(H8/N24)。然而, 以腺病毒中介之序列識別號: 3所示之人類RUP41多肽過度表現(100 PFU/細胞)降低因缺血(normox)及缺氧後回氧(H8/N24)引起的DNA斷裂程度(圖10)。

組織缺氧/回氧

分離的NRVMs加入血清(10% FBS, 5%HS)培養隔夜,

接著在缺氧處置前24小時將培養基替換成無血清培養基DMEM-F12(Sigma)。組織缺氧使用密閉培養箱灌入92%N₂及5%CO₂達成。(請參Van Heugten等人, J Mol Cell Cardiol (1994) 26: 1513-24, 揭示於此均以其整體作為參考)。缺氧處置達所要求的時間後, 細胞從密閉箱中移至周遭空氣中且將無血清DMEM/F12培養基換新。

DNA片段化

依廠商之操作說明運用PUREGENE DNA分離套件(Gentra)從NRVMs中分離出DNA。等量DNA分置於2%洋菜膠中且以溴化乙錠(Ethidium Bromide)染色在紫外光下偵測其片段化。

實例18

心臟保護作用

本發明之一種調節劑使用於Fryer等人提出的大鼠體內模式顯示其具心臟保護作用(請參Circ Res (1999) 84: 846-51; 揭示於此均以其整體作為參考)。該調節劑由腹腔內注射給藥。最佳劑量為0.1至100毫克/公斤。其他最佳劑量係選自以下組群: 0.1毫克/公斤、0.3毫克/公斤、1.0毫克/公斤、3.0毫克/公斤、30毫克/公斤及100毫克/公斤。安慰劑對照組僅施用藥物賦型劑。在一些具體實施例中, 該調節劑為促效劑。

350至450克之雄性Wistar大鼠使用於此實驗所有階段。大鼠在進行手術程序前1、12、24、48或72小時先以腹腔內注射給予調節劑或生理食鹽水。隨後, 大鼠以腹腔給藥

用硫丁巴比妥鈉鹽(thiobutabarbital sodium) (Inaction, Research Biochemical International; 100毫克/公斤)麻醉。施行氣管切開術，其插管連接一齧齒類呼吸器(型號CIV-101, Columbus Instruments, 或型號683, Harvard Apparatus)。大鼠用室內空氣輔氧氣以每分鐘60至65次推送。維持5至10毫米水柱的吐氣終了正壓以預防肺膨脹不全。動脈pH, P_{CO_2} , 及 P_{O_2} 以血液氣體分析儀(AVL995pH/血液氣體分析儀, AVL Medical Instruments)監測控制, 15分鐘阻塞, 接著60及120分鐘回血, 並調校呼吸速率及/或體積來維持在正常生理範圍(pH 7.35至7.45; P_{CO_2} 為25至44毫米汞柱; 及 P_{O_2} 為80至110毫米汞柱)。體溫有加熱墊維持在38°C, 且視需要以靜脈注射重碳酸鹽以維持動脈血液pH在正常生理範圍內。

右頸動脈血管插入一管經由Gould PE 50 或GOULD PE 23壓力轉換器連結至Grass(模式7)多種波動描寫器以測量血壓及心臟速率。右頸靜脈插入一管以灌注生理食鹽水, 重碳酸鹽及藥劑。在第五肋間位置施行左胸廓切開術, 然後施行心包膜穿刺放液術並拉開左心耳以顯露左冠狀動脈位置。取一縛線(6-0 丙烯)從左心耳底下區域通過冠狀動脈至左心室右部。縫合線兩末端穿過一丙烯管以形成一線圈刀。將縫合口兩端拉緊使得該線圈夾住心外膜表面形成一止血鉗而阻塞冠狀動脈。冠狀動脈阻塞可由心外膜發紺以及其造成之血壓降低證實。心臟再回血可將上述線圈解開而鬆開止血鉗, 且可由肉眼所見之心外膜充血反應證

實。在進行實驗程序前應先讓心跳速率及血壓維持穩定。

大鼠隨機分配於設計的實驗組中。對照組大鼠在局部缺血30分鐘及回血2小時(I/R)前先施以生理食鹽水24小時。為顯示調節劑急性心臟保護作用，在延長缺血前施用該調節劑1小時。為顯示對急性缺血的延遲心臟保護作用，在I/R前12或24小時以所需的劑量施用該調節劑。也在I/R前48或72小時以所需的劑量施用該調節劑。

一但完成上述程序，即將冠狀動脈阻塞，且危險區(AAR)由專利的藍色染劑經由頸靜脈提供負染色判定。大鼠以15%氯化鉀安樂死。心臟取出，左心室與其餘組織分離，然後切成6塊縱剖薄片。這樣就可以看出染成藍色的正常區，以及大致保持粉紅色危險區之輪廓。危險區從非缺血區切出，組織置於數個小藥瓶且以1.0%的2,3,5-三苯基四唑氯(TTC)染色於37℃，100毫莫耳/公升磷酸溶液(pH7.4)培養15分鐘。TTC為組織是死是活的指示劑。TTC由存在於可培養心肌細胞的脫氫酶酵素還原，且產生甲鑽(formazan)沉澱，其顯示一種深紅色，反之梗塞區維持灰色(請參Klein等人，Virchows Arch [Pathol Anat] (1981) 393：287-97)。組織儲存於10%甲醛瓶中過夜，且梗塞之心肌在顯微鏡下由AAR切下(Cambridge Instruments)。梗塞大小(IS)，AAR，及左心室重(LV)由重量分析測定法。AAR是以LV的百分率表示(AAR/LV)，且IS以AAR的百分率表示(IS/AAR)。

若大鼠表現極度低血壓(收縮壓小於30毫米汞柱)或因為

新陳代謝的酸中毒或鹼中毒而在正常生理範圍內不能維持適當的血氧值，將會從數據分析中剔除。

全部數值以平均值±標準差表示。運用一個維度的ANOVA與Bonferroni's檢驗以測定組群之間的血液動力學，IS及AAR是否有任何顯著差異存在。顯著差異的判定為 $P<0.05$ 。IS/AAR減少表示心臟保護作用。

實例19

口服生物可用率

直接測定口服生物可用率的生化技術為熟悉本技藝者所通曉並可運用於此(參見，但不限於，Wang PC等人，Cardiovasc Drug Rev(2002)20：137-52；及Buchan P等人，Headache(2002)Suppl2：S54-62；揭示於此均以其整體作為參考)。為求進一步說明而非設限，所謂的別種分析方法可包含液相色層分析儀-串連質譜儀(請參Chavez-Eng CM等人，J ChromatogrB Analyt Technol Biomed Life Sci (2002) 767：117-29；Jetter A等人，Clin Pharmacol Ther (2002) 71：21-9；Zimmerman JJ等人，J Clin Pharmacol (1999) 39：1155-61；及Barrish A等人，Rapid Commun Mass Spectrom (1996) 10：1033-7；揭示於此均以其整體作為參考)。

正子放射斷層攝影(PET)已可成功使用來直接測量藥物分布，包含在口服給藥物後哺乳動物體內之口服生物可用率(請參Gulyas等人，Eur J Nucl Med Mol Imaging (2002) 29：1031-8；揭示於此均以其整體作為參考)。

此外，本發明調節劑的口服生物可用率可用體內模式的數據為基礎判定，例如但不僅限於實例18的老鼠模式。調節劑以0.1毫克/公斤至100毫克/公斤範圍經口餵食給藥。調節劑口服給藥顯示可提供心臟保護作用。調節劑效果顯示出劑量依存且可與經腹腔給藥的效果比擬。調節劑口服給藥以達成IS/AAR最大減低量一半所需的劑量，也可與經腹腔給藥以達成IS/AAR最大減底量之半數所需之劑量作一比較。舉例來說，若口服劑量為腹腔劑量的2倍，那麼此調節劑的口服生物可用率為50%。更一般來說，若口服劑量為 θ 毫克/公斤而腹腔劑量為 ρ 毫克/公斤，則調節劑的口服生物可用率為 $[(\rho / \theta) \times 100]$ 。

熟悉本技藝的人士即應明白本發明調節劑的口服生物可用率可使用本文為舉例而非限制所提出之活體動物模式以外的方法判定。熟悉本技藝的人士也應明白，該口服生物可用率的生物利用性讀取值可為IS/AAR以外的別種參數。應可推想所參照的給藥途徑可為腹腔給藥以外的別種方法。在一些具體實施例中，該參照給藥途徑可為靜脈注射。

在一些具體實施例中，本發明調節劑的口服生物可用率至少為腹腔內注射的1%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%。

實例20

包含人類RUP41 GPCR表現的基因轉殖小鼠/大鼠/豬

本發明亦提出以人類RUP41 GPCR基因轉殖於非人類哺乳動物的方法及其相關組合物，該受體包含選自下列組群中的多肽：

- (a) 序列識別號：2的多肽；
- (b) 序列識別號：2的多肽；其中在序列識別號：2之胺基酸位置312上的苯丙胺酸以離胺酸取代；
- (c) 序列識別號：3的多肽；或
- (d) 序列識別號：3的多肽；其中在序列識別號：2之胺基酸312位置上的苯丙胺酸以離胺酸取代。

在一些具體實施例中，非人類哺乳動物為小鼠，大鼠或豬。

製造包含小鼠，大鼠及豬的基因轉殖方法為熟悉本技藝者所通曉，且任何此種方法皆可被使用於本發明。簡言之，基因轉殖動物的產生，譬如可將編碼有人類RUP41 GPCR的聚核苷酸轉染一多可能幹細胞ES(「基因轉殖」)。成功轉化的ES細胞接著引入早期胚胎中，其接著移植入相同物種的哺乳動物子宮。在某些實例中轉形(「基因轉殖」)細胞將包含所產生動物的部份生殖系，所以在此生殖系中含有基因轉殖細胞的成年動物可與其他動物配對，因此最終產生一群基因轉殖動物在其每一個細胞皆有轉殖基因且可以穩定傳送轉染細胞至其後代。其他引入聚核苷酸的方法亦可採用，例如像是經由微注射引入編碼有人類RUP41 GPCR的聚核苷酸進入受精卵或早期胚胎。此外，基因轉殖可由受精卵與包含轉殖基因的腺病毒

感染進入動物體內(請參Jaenisch, R, Proc Natl Acad Sci USA (1976) 73: 1260-4)。製造轉殖基因哺乳動物的方法描述於Wall等人, J Cell Biochem (1992) 49: 113-20; Hogan等人, Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. (1986) 13: 1762-73; WO 91/08216; 美國專利編號4736866及美國專利編號6504080; 揭示於此均以其整體作為參考]。

在一些具體實施例中, 該人類RUP41 GPCR表現具心肌細胞選擇性。在一些具體實施例中, 該具心肌選擇性的人類RUP41 GPCR表現是由 α 肌凝蛋白重鏈探針給予[Subramaniam A等人, J Biol Chem (1991) 266: 24613-20; 揭示於此均以其整體作為參考。

實例21

心臟保護作用的基因轉殖活體動物模式

使用描述於實例20的基因轉殖活體動物模式, 本發明化合物可顯示出具有心臟保護作用功效。在一些具體實施例中, 該動物為小鼠、大鼠或豬。

該化合物可施用於基因轉殖動物來測定其心臟保護作用功效, 並判斷是否該施用, 相較於只對基因轉殖動物施用賦型劑, 可導致如實例18之大鼠活體模式、小鼠活體模式或豬的類同模式, 其IS/AAR降低。

在一些較佳具體實施例, 該化合物為本發明調節劑。在一些具體實施例中, 該調節劑降低細胞內cAMP的量。在一些具體實施例中, 該調節劑為促效劑。在一些具體實施

例中，該化合物由腹腔內注射給藥。較佳劑量為0.1至100毫克/公斤。其他較佳劑量選自下列組群，包括：0.1毫克/公斤、0.3毫克/公斤、1.0毫克/公斤、3.0毫克/公斤、30毫克/公斤及100毫克/公斤。安慰劑僅為賦型劑。在一些具體實施例中，該劑量每天投藥。在一些具體實施例中，該劑量的給藥間隔選自下列組群：一星期、二星期、三星期及四星期。須知，此給藥途徑，劑量範圍，給藥頻率，及給藥所本質性本質性時間均為舉例而不應侷限本發明。

實例22

含有剔除RUP41基因的小鼠/大鼠/豬

小鼠

一較佳DNA構築體將包含，從5'末端至3'末端：(a)第一核苷酸序列包含於小鼠RUP41基因體序列中；(b)一核苷酸序列包含正選擇標記，如抗心黴素(neo)標記；且(c)第二核苷酸序列包含於小鼠RUP41基因序列中且位在第一小鼠RUP41核苷酸序列(a)下游位置的基因組中。小鼠RUP41基因體序列可使用熟悉本技藝者所通曉的技術分離(Maniatis T等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory；揭示於此均以其整體作為參考)。小鼠RUP41基因體序列分離的探針將從編碼有一小鼠RUP41多肽的cDNA衍生而得，其中該cDNA可使用mRNA模板從小鼠心臟，肺臟，或脂肪組織獲得。

在一些較佳具體實施例，此DNA構築體亦包含一個位在核酸序列(a)上行位置或核酸序列(c)下行位置的負選擇標

記。最好此負選擇標記包含胸腺嘧啶激酶(tk)基因(請參Thomas等人, Cell (1986) 44: 419-28), 潮黴素 β 基因[Te Riel等人, Nature (1990) 248: 649-51], hprt基因(請參Van der Lugt等人, Gene (1991) 105: 263-7; Reid等人, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 4299-4303]或白喉毒素A片段(Dt-A)基因; Nada等人, Cell (1993) 73: 1125-35; Yagi等人, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 9918-9922), 揭示於此均以其整體作為參考。最好正選擇標記位在小鼠RUP41外顯子序列內而打斷編碼有小鼠RUP41的多肽。這些取代載體已有前人提出, 舉例言之, 由Thomas等人, Cell (1986) 44: 419-28; Thomas等人, Cell (1987) 51: 503-12; Mansour等人, Nature (1988) 336: 348-52; Koller等人, Annu Rev Immunol (1992) 10: 705-30; 及美國專利編號5631153; 揭示於此均以其整體作為參考。

第一及第二核酸序列(a)及(c)可以無區別地位於一小鼠RUP41調節劑序列, 內含子序列, 外顯子序列或包含調節劑及/或內含子及/或多顯子序列之內。核酸序列(a)及(c)大小範圍在1至50 kb, 最好從1至10 kb, 更好從2至6 kb, 且更好從2至 4kb。

製造將一種選定基因剔除之小鼠的方法已為熟悉此技藝者所通曉, 且被使用來成功地使多種基因失去活性。

大鼠

大鼠目標基因技術較小鼠不健全且一直受人們關注。有一種方法可將大鼠似胚胎幹細胞(ESC)上的大鼠RUP41不

活性化，且接著以不活化大鼠RUP41基因注入由2細胞之胚胎融合後製成的大鼠胚囊(請參Krivokharchenko等人，Mol Reprod Dev (2002) 61：460-5)。

大鼠基因的識別是使用序列識別號：6的大鼠RUP41聚核苷酸在嚴格雜交條件下篩檢大鼠基因資料庫。全長或基本上全長的大鼠RUP41 cDNA將以相同條件篩檢大鼠心臟或腦部DNA識別。嚴格的核苷酸雜交條件已為熟悉本技藝者所通曉(請參Manuatis T等人(1982)Molecular Cloning：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York)。

另有一法將在大鼠似ESC細胞中不活性化大鼠RUP41基因，接著將有不活性化大鼠RUP41基因的大鼠似ESC細胞移植進入摘除細胞核的卵母細胞(請參Sato K等人，Hum Cell (2001) 14：301-4；Wakayama及Yanagimachi，Semin Cell Dev Biol (1999) 10：235-8；Hochedlinger及Jaenish，Nature (2002) 415：1035-8；Yanagimachi，Mol Cell Endocrinol (2002) 187：241-8；揭示於此均以其整體作為參考)。

上述方法的類同或替代(請參Zan等人，Nature Biotechnology (2003) 21：645-51；揭示於此均以其整體作為參考)可能被使用來製成包含剔除RUP41基因的大鼠。

豬

類似或替代的方法可被使用來製成包含剔除RUP41基因的豬(請參Lai等人，Science (2002) 295：1089-1092；揭示於此均以其整體作為參考)。

Cre-LoxP系統：

含有心肌細胞選擇性剔除RUP41基因的小鼠/大鼠/豬
小鼠

這種新的DNA構築體使用P1噬菌體系統的特殊重組位置製成。P1噬菌體具有一種稱Cre的重組酶，其與34鹼基對的loxP位置反應。loxP位置是由8bp保留序列所分開的兩個13bp迴紋序列所組成(請參Hoess RH等人，Nucleic Acid Res (1986) 14：2287-300；揭示於此均以其整體作為參考)。兩個具相同方向之loxP位置間因Cre酵素的重組將導致此DNA片段遭刪除。

將Cre-loxP系統與同源重組技術合用是由Gu等人首先提出(請參Gu等人，Cell (1993) 73：1155-64；Gu等人，Science (1994) 265：103-6；揭示於此均以其整體作為參考)。簡言之，將嵌入基因體目標位置的某一核苷酸序列帶有至少兩個相同方向loxP位置，且分別位在要由重組基因體中刪除之核苷酸序列的兩末端。刪除的發生需要在重組之細胞宿主的細胞核中存有重組酶(Cre)。重組酶可在需要時由以下方法引入，(a)在含有此酵素的培養基中培養重組細胞宿主，直接注射Cre酶進入所要的細胞，譬如由酵素脂質體進入細胞，如Baubonis等人描述(請參Baubonis W及Sauer B，Nucleic Acid Res (1993) 21：2025-9；揭示於此均以其整體作為參考)；(b)與包含Cre之編碼序列之載體轉染細胞宿主使該序列和重組之細胞宿主的啟動子功能實質相連，其啟動子可依需要誘發，再將該載體引入再結合

細胞宿主，如Gu等人(請參Gu H等人，Cell (1993) 73：1155-64；揭示於此均以其整體作為參考)及Sauer等人(請參Sauer B及Henderson N，Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85：5166-70；揭示於此均以其整體作為參考)描述；(c)細胞宿主基因體引入一聚核苷酸，其包含Cre之編碼序列與重組之細胞宿主的啟動子功能實質相連，其啟動子可依需要誘發，而該聚核苷酸嵌入細胞宿主基因體的情況是隨意嵌入或同源重組，如Gu等人描述(請參Gu H等人，Science (1994) 265：103-6；揭示於此均以其整體作為參考)。

使用Cre-loxP系統的載體及方法在下列文件中被提出：Zou等人(1994)；Minamisawa S等人，J Biol Chem (1999) 274：10066-70；Chen等人，J Biol Chem (1998) 273：1252-6；Chen等人，Development (1998) 125：1943-9；揭示於此均以其整體作為參考。

本發明一些較佳的具體實施例，Cre由上述策略(c)引入細胞宿主基因體，其中該啟動子具心肌細胞選擇性且導致具心肌細胞選擇性之小鼠RUP41基因體序列瓦解(loxP-內嵌；"內解floxed")。在一些具體實施例中，該具心肌細胞選擇性的啟動子即為肌凝蛋白輕鏈2號(mlc-2v)之心室特化異構體(請參Minamisawa S等人，J Biol Chem (1999)274：10066-70；Chen等人，J Biol Chem (1998) 2731252-6；揭示於此均以其整體作為參考)。將Cre重組酶之編碼序列插入內生性mlc-2v位置的基因轉殖小鼠("mlc-2v植入小鼠")之前曾被提出(請參Chen等人，Development (1998) 125：

1943-9；揭示於此均以其整體作為參考)。內解(floxing)某一所選基因的方法應屬熟悉本技藝者的已知領域(請參Chen等人，Development (1998) 125：1943-9)。

在一些具體實施例中，本發明特徵為一種製造包含具心肌細胞選擇性之RUP41基因剔除小鼠的方法，包含將mlc-2 cer對偶基因與一被「內解」之RUP41基因一起刪除，如前文所述。

其他製造具心肌選擇性之RUP41基因剔除小鼠的方法為熟悉本技藝者所通曉；可見於Kuhn R及Torres RM，Methods Mol Biol (2002) 180：175-204；Sauer B，Methods (1998) 14：381-92；Gutstein DE等人，Circulation Research (2001) 88：333；Minamino T等人，Circulation Research (2001) 88：587；及Bex A等人，J Urol (2002) 168：2641-2644；揭示於此均以其整體作為參考。

大鼠

類似或替代方法(請參Zan等人，Nature Biotechnology (2003) 21：645-51；揭示於此均以其整體作為參考)可使用來製造具心肌選擇性之RUP41基因剔除大鼠。

豬

類似或替代方法可使用來製造具心肌選擇性之RUP41基因剔除豬。(請參Lai等人，Science (2002) 295：1089-1092；揭示於此均以其整體作為參考)。

本申請案通篇引用許多刊物、專利及專利申請公開資

料。本申請案揭示之該等刊物、專利及專利申請公開資料均以其整體併入本文作為參考。依熟悉本技藝者所能理解本發明之修飾及延伸均包含在上文之揭示及以下將提出的申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

圖 1：描述候選化合物對「目標受體」的初步篩檢，其為內生本質性活化的Gs-偶聯GPCR之Gs α 融合蛋白。A2孔表示「化合物A」的結果。G9孔表示「化合物B」的結果，僅為說明但並不限制本發明。

圖 2A至 C：A. 以訂製之高密度寡聚核苷酸微陣列用於人類組織樣品所得的微陣列分析結果，微陣列包含可顯現RUP41基因表現量的探針。圖譜中每一個組織的長條顯示的是針對RUP41多次測量的相對表現量(平均差)及標準誤。各組織以垂直的文字在其長條圖上標明。

檢閱長條圖譜顯示人類腦部及心臟有RUP41表現。

B. 人類多重組織點漬測定結果顯示在成人及胎兒心臟組織有高度RUP41 mRNA表現。RUP41 mRNA表現也可在許多不同區域的腦組織偵測出。

C. 人類多重組織北方墨漬測定結果顯示在心臟及腦部有高度RUP41 mRNA表現。

圖 3：原位雜交顯示成年大鼠心臟內有廣泛的心肌細胞RUP41表現。反義之RUP41放射性標籤探針測出RUP41表現於所有的心臟腔室。將反義對照組(GAPDH)及心房特異性探針(心房鈉尿因子(atrial natriuretic factor)，ANF)使用

於另外的切片以顯示探針標記對心臟切片具特異性。

圖 4A 至 B：A. RT-PCR 顯示在無血清條件下 24 小時的初生大鼠心室心肌細胞(NRVMS)之 RUP41 轉錄表現。添加脫羥腎上腺素(PE)或初生牛血清(NCS)於培養基後 24 小時，RUP41 轉錄表現量急劇下降且與心肌肥大的表現型有關。G3PDH PCR 產物顯示 PCR 反應中使用相同量之模板及電泳上樣量的一致性。

B. 北方墨漬測定顯示 NRVMS 在經過促肥厚藥劑處理 24 小時後其 RUP41 mRNA 表現降低，該促肥厚藥劑包括脫羥腎上腺素(PE)、巴豆酯-12 肉豆蔻酸-13 醋酸(PMA)、前列腺素 F2 α (PGF2 α)及初生牛血清(NCS)。心房利鈉因素(ANF)(其為心肌肥大的基因標記)對所有上述的肥厚刺激都有向上調升之反應。28S rRNA 之甲烯藍染色顯示 RNA 完整性及電泳上樣量的一致性。

圖 5：上圖，在高血壓所引發之心室肥大的活體小鼠模式中 RUP41 mRNA 為往下調節。北方墨漬分析是針對於從橫向大動脈緊縮(TAC)小鼠左心室或小鼠經模擬手術 7 天後所分離出的總 RNA。增加的 ANF 顯示 TAC 心臟已形成確實的肥大反應。28S rRNA 甲烯藍染色顯示 RNA 完整性及電泳上樣量的一致性。

下圖，RUP41 訊號以濃度儀分析且對 28S rRNA 訊號正規化。*6 隻模擬手術小鼠(Sham)及 6 隻 TAC 小鼠樣本的 Anova 統計分析顯示 RUP41 mRNA 顯著降低， $P < 0.00005$ 。

圖 6：北方墨漬分析顯示由缺氧 6 小時的 NRVMS 分離的總

RNA中RUP41 mRNA表現量降低。RUP41 mRNA表現量在缺氧又回氧後24小時(H6/R24)回到正常量。增加的c-fos表現(Hypox-6)顯示於缺氧情況下的心肌細胞壓力反應。28S rRNA甲烯藍染色顯示RNA完整性及電泳上樣量的一致性。

圖 7A 至 B：A. RT-PCR 實施於人類心臟分離出的總 RNA。充血性心衰竭(CHF)病人較正常心臟功能(正常)病人的 RNA 當中 RUP41 轉錄程度降低。每次 PCR 反應均加入人類 GAPDH 引子做為模板濃度及電泳上樣量一致性之內部控制。

B. *Anova 統計分析顯示 CHF 病患相較於正常病患其 RUP41 轉錄有顯著降低， $p < 0.05$ 。心肌梗塞(MI)病人的 RUP41 轉錄程度與正常心臟無差異。

圖 8：，上圖，COS-7 細胞以 pCMV-HARUP41(HA-RUP41) 或 pCMV-HA 骨幹(CMV)及本質性活化的Gs結合甲狀腺刺激荷爾蒙受體(pCMV-TSHR-A6231)共轉染。(HARUP41即紅血球凝集素(HA)-標記RUP41)。另外，將CRE-螢光酵素酶報導基因構築體共轉染以測定百日咳毒素(PTX)存在或不存在的cAMP活化路徑。螢光酵素酶報導基因活性在同時表現CART-TSHR及HARUP41的細胞中較同時表現CART-TSHR及pCMV-HA的細胞之對照組中低，表示RUP41與Gi結合。經PTX處理時，因RUP41而抑制cAMP降低則證實Gi與此受體結合。

下圖：在百日咳毒素(PTX)存在或不存在的情況下，以

pCMV-HA(CMV) 或 pCMV-HARUP41(HA-RUP41) 構築體共轉染的 COS-7 細胞。Forskolin ($1\mu\text{M}$) 刺激所導致的 cAMP 量增加會被 RUP41 表現抑制。經 PTX 處理時，因 RUP41 而抑制 cAMP 降低則證實 Gi 與此受體結合。

圖 9A 至 B：A. NRVMs 以編碼 RUP41 的重組腺病毒 (AdRUP41) 處理，以每細胞之成斑單位 (PFU) 之病毒滴定量定義感染程度。腺病毒轉染 24 小時後，總 RNA 被分離出來且以北方墨漬分析法測定病毒所表現的 RUP41 濃度。在 50 PFU/細胞時，RUP41 表現即可被偵測出，但 100 PFU/細胞時才顯示出高度表現。

B. 以 100 PFU/細胞的量之 AdRUP41 感染 48 小時的 NRVMs 顯示細胞在無血清培養基中的存活率增加。NRVMs 以結合蕁毒素 (phalloidin) 之德州紅及 Hoechst 33342 共同染色。

圖 10：寡核苷酸 DNA 片段化 (又稱斷裂 (laddering)) 的分析顯示在缺氧 (8 小時) 後回氧 (24 小時) (H8/N24) 之刺激會使以 100 PFU/細胞對照組 (AdGFP) 腺病毒感染的 NRVMs 之細胞凋亡增加。然而，以腺病毒中介之 RUP41 多肽過度表現 (100 PFU/細胞) 會降低因缺血 (normox) 及缺氧後回氧 (H8/N24) 引起的 DNA 片段化程度。

序 列 表

<110> 美商艾尼納製藥公司

<120> 用於治療缺血性心臟病及充血性心衰竭之人類 G 蛋白-偶聯受體及其調節劑

<140> TW 092120775

<141> 2003-07-30

<150> US 60/400,774

<151> 2002-08-01

<160> 12

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1881

<212> DNA

<213> 人類

<400> 1

gttatttctt caaaaggaaa acacaatttt cttttatatac aaaacaatgc aaacttgatg	60
gttcttaatt ctacattttc tattaatagt ttacaaactt aaaaattaaa ctaagtacac	120
aattgaaaga tttttttttc ttacaaagaa cacgttatac gtcatttaaa ttgccaaata	180
tcaaatagtt tattctatit cactttctag ggaaaaaac caactgctcc aaaagaatgt	240
gtttttctcc cattctggaa atcaacatgc agtctgaatc taacattaca gtgcgagatg	300
acattgatga catcaacacc aatatgtacc aaccactatc atatccgtta agctttcaag	360
tgtctctcac cggattttct atgtagaaaa ttgtgttggg acttggcagc aacctcactg	420
tattgggtact ttactgcatg aaatccaact taatcaactc tgtcagtaac attattacaa	480
tgaatcttca tgtacttgat gtaataatit gtgtgggatg tattcctcta actatagtta	540
tccttctgct ttactggag agtaacactg ctctcatttg ctgtttccat gaggcttgtg	600
tatcttttgc aagtgtctca acagcaatca acgtttttgc tatcactttg gacagatatg	660
acatctctgt aaaacctgca aaccgaattc tgacaatggg cagagctgta atgttaatga	720
tatccatttg gattttttct tttttctctt tcctgattcc ttttattgag gtaaattttt	780
tcagtcttca aagtggaaat acctgggaaa acaagacact tttatgtgtc agtacaaatg	840
aatactacac tgaactggga atgtattatc acctgttagt acagatccca atattctttt	900
tcactgttgt agtaatgtta atcacatata ccaaaatact tcaggctctt aatattcgaa	960

```

taggcacaag attttcaaca gggcagaaga agaaagcaag aaagaaaaag acaatttctc 1020
taaccacaca acatgaggct acagacatgt cacaagcag tgggtgggaga aatgtagtct 1080
ttggtgtaag aacttcagtt tctgtaataa ttgccctccg gcgagctgtg aaacgacacc 1140
gtgaacgacg agaaagacaa aagagagtct tcaggatgtc tttattgatt atttctacat 1200
ttctttctctg ctggacacca atttctgttt taaataccac ctttttatgt ttaggcccaa 1260
gtgacctttt agtaaaatta agattgtgtt ttttagtcat ggcttatgga acaactatat 1320
ttcacctctt atttatgca ttactagac aaaaatttca aaaggcttg aaaagtaaaa 1380
tgaaaaagcg agttgtttct atagtagaag ctgatcccct gcctaataat gctgtaatac 1440
acaactcttg gatagatccc aaaagaaaca aaaaaattac ctttgaagat agtgaaataa 1500
gagaaaaacg ttttagtcct caggttgtca cagactagag aaaagtcctca gtttcaccaa 1560
atccacattc aaatgagttt taaatttaaa ttgtaaaaac tgatattact gccaaatata 1620
agaaaaatat ttttaagtatt ggttatgttg taaattttca atgtgaaatg ctaattagat 1680
aggcatata tattcaattt cttcattact taatgtattt gttgcatggc agtttgtaa 1740
agtactatca tgtgtatatt ttgtcaatat tatgtccaac agaaaatatt catgtaagtc 1800
atatttttta aggaataaat acatagcctt aaaacagtgt ataactttaa aatgtaaaaa 1860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1881

```

<210> 2
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 2

```

Met Cys Phe Ser Pro Ile Leu Glu Ile Asn Met Gln Ser Glu Ser Asn
1           5           10           15

```

```

Ile Thr Val Arg Asp Asp Ile Asp Asp Ile Asn Thr Asn Met Tyr Gln
          20           25           30

```

```

Pro Leu Ser Tyr Pro Leu Ser Phe Gln Val Ser Leu Thr Gly Phe Leu
          35           40           45

```

```

Met Leu Glu Ile Val Leu Gly Leu Gly Ser Asn Leu Thr Val Leu Val
          50           55           60

```

I291555

Leu Tyr Cys Met Lys Ser Asn Leu Ile Asn Ser Val Ser Asn Ile Ile
65 70 75 80

Thr Met Asn Leu His Val Leu Asp Val Ile Ile Cys Val Gly Cys Ile
85 90 95

Pro Leu Thr Ile Val Ile Leu Leu Leu Ser Leu Glu Ser Asn Thr Ala
100 105 110

Leu Ile Cys Cys Phe His Glu Ala Cys Val Ser Phe Ala Ser Val Ser
115 120 125

Thr Ala Ile Asn Val Phe Ala Ile Thr Leu Asp Arg Tyr Asp Ile Ser
130 135 140

Val Lys Pro Ala Asn Arg Ile Leu Thr Met Gly Arg Ala Val Met Leu
145 150 155 160

Met Ile Ser Ile Trp Ile Phe Ser Phe Phe Ser Phe Leu Ile Pro Phe
165 170 175

Ile Glu Val Asn Phe Phe Ser Leu Gln Ser Gly Asn Thr Trp Glu Asn
180 185 190

Lys Thr Leu Leu Cys Val Ser Thr Asn Glu Tyr Tyr Thr Glu Leu Gly
195 200 205

Met Tyr Tyr His Leu Leu Val Gln Ile Pro Ile Phe Phe Phe Thr Val
210 215 220

Val Val Met Leu Ile Thr Tyr Thr Lys Ile Leu Gln Ala Leu Asn Ile
225 230 235 240

Arg Ile Gly Thr Arg Phe Ser Thr Gly Gln Lys Lys Lys Ala Arg Lys
245 250 255

Lys Lys Thr Ile Ser Leu Thr Thr Gln His Glu Ala Thr Asp Met Ser
260 265 270

Gln Ser Ser Gly Gly Arg Asn Val Val Phe Gly Val Arg Thr Ser Val
275 280 285

Ser Val Ile Ile Ala Leu Arg Arg Ala Val Lys Arg His Arg Glu Arg
290 295 300

Arg Glu Arg Gln Lys Arg Val Phe Arg Met Ser Leu Leu Ile Ile Ser
305 310 315 320

Thr Phe Leu Leu Cys Trp Thr Pro Ile Ser Val Leu Asn Thr Thr Ile
325 330 335

Leu Cys Leu Gly Pro Ser Asp Leu Leu Val Lys Leu Arg Leu Cys Phe
340 345 350

I291555

Leu Val Met Ala Tyr Gly Thr Thr Ile Phe His Pro Leu Leu Tyr Ala
355 360 365

Phe Thr Arg Gln Lys Phe Gln Lys Val Leu Lys Ser Lys Met Lys Lys
370 375 380

Arg Val Val Ser Ile Val Glu Ala Asp Pro Leu Pro Asn Asn Ala Val
385 390 395 400

Ile His Asn Ser Trp Ile Asp Pro Lys Arg Asn Lys Lys Ile Thr Phe
405 410 415

Glu Asp Ser Glu Ile Arg Glu Lys Arg Leu Val Pro Gln Val Val Thr
420 425 430

Asp

<210> 3
<211> 433
<212> PRT
<213> 人類

<400> 3

Met Cys Phe Ser Pro Ile Leu Glu Ile Asn Met Gln Ser Glu Ser Asn
1 5 10 15

Ile Thr Val Arg Asp Asp Ile Asp Asp Ile Asn Thr Asn Met Tyr Gln
20 25 30

Pro Leu Ser Tyr Pro Leu Ser Phe Gln Val Ser Leu Thr Gly Phe Leu
35 40 45

Met Leu Glu Ile Val Leu Gly Leu Gly Ser Asn Leu Thr Val Leu Val
50 55 60

Leu Tyr Cys Met Lys Ser Asn Leu Ile Asn Ser Val Ser Asn Ile Ile
65 70 75 80

Thr Met Asn Leu His Val Leu Asp Val Ile Ile Cys Val Gly Cys Ile
85 90 95

Pro Leu Thr Ile Val Ile Leu Leu Leu Ser Leu Glu Ser Asn Thr Ala
100 105 110

Leu Ile Cys Cys Phe His Glu Ala Cys Val Ser Phe Ala Ser Val Ser
115 120 125

Thr Ala Ile Asn Val Phe Ala Ile Thr Leu Asp Arg Tyr Asp Ile Ser
130 135 140

I291555

Val	Lys	Pro	Ala	Asn	Arg	Ile	Leu	Thr	Met	Gly	Arg	Ala	Val	Met	Leu	145	150	155	160
Met	Ile	Ser	Ile	Trp	Ile	Phe	Ser	Phe	Phe	Ser	Phe	Leu	Ile	Pro	Phe	165	170	175	
Ile	Glu	Val	Asn	Phe	Phe	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Thr	Trp	Glu	Asn	180	185	190	
Lys	Thr	Leu	Leu	Cys	Val	Ser	Thr	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Leu	Gly	195	200	205	
Met	Tyr	Tyr	His	Leu	Leu	Val	Gln	Ile	Pro	Ile	Phe	Phe	Phe	Thr	Val	210	215	220	
Val	Val	Met	Leu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Lys	Ile	Leu	Gln	Ala	Leu	Asn	Ile	225	230	235	240
Arg	Ile	Gly	Thr	Arg	Phe	Ser	Thr	Gly	Gln	Lys	Lys	Lys	Ala	Arg	Lys	245	250	255	
Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Leu	Thr	Thr	Gln	His	Glu	Ala	Thr	Asp	Met	Ser	260	265	270	
Gln	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Val	Phe	Gly	Val	Arg	Thr	Ser	Val	275	280	285	
Ser	Val	Ile	Ile	Ala	Leu	Arg	Arg	Ala	Val	Lys	Arg	His	Arg	Glu	Arg	290	295	300	
Arg	Glu	Arg	Gln	Lys	Arg	Val	Phe	Arg	Met	Ser	Leu	Leu	Ile	Ile	Ser	305	310	315	320
Thr	Phe	Leu	Leu	Cys	Trp	Thr	Pro	Ile	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Thr	Ile	325	330	335	
Leu	Cys	Leu	Gly	Pro	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	Lys	Leu	Arg	Leu	Cys	Phe	340	345	350	
Leu	Val	Met	Ala	Tyr	Gly	Thr	Thr	Ile	Phe	His	Pro	Leu	Leu	Tyr	Ala	355	360	365	
Phe	Thr	Arg	Gln	Lys	Phe	Gln	Lys	Val	Leu	Lys	Ser	Lys	Met	Lys	Lys	370	375	380	
Arg	Val	Val	Ser	Ile	Val	Glu	Ala	Asp	Pro	Leu	Pro	Asn	Asn	Ala	Val	385	390	395	400
Ile	His	Asn	Ser	Trp	Ile	Asp	Pro	Lys	Arg	Asn	Lys	Lys	Ile	Thr	Phe	405	410	415	
Glu	Asp	Ser	Glu	Ile	Arg	Glu	Lys	Cys	Leu	Val	Pro	Gln	Val	Val	Thr	420	425	430	

I291555

Asp

<210> 4
<211> 1269
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 4
atgcagtctg aatcaaacgt cacgggtcga gatgacattg atgacatcga caccaatatg 60
taccaaccac tgtcataccc actaagcttt caagtgtctc tcaactggatt tctcatgtta 120
gagatcgtgc tggggcttgg cagcaacctt accgtcctgg tactttactg catgaaatcc 180
aacttaatca actctgtcag taacattatt acaatgaacc tccatgtact tgatgtcata 240
atttgtgtgg gatgcattcc tctaactata gtgatccttc tgctctcact ggagagtaac 300
actgctctca tctgtctgtt ccacgaagct tgtgtttcct ttgcaagtgt ttcgacagca 360
atcaacgttt ttgctattac tctggacaga tatgacatct ctgtaaaacc tgcaaacaga 420
attctgacaa tgggcagagc tgtaatgcta atgacatcca tttggatttt ttctttcttc 480
tcattcctga ttcccttcat tgaagtaaatt tttttcagtc ttcaaagtgg aaatacatgg 540
gcaaacaaga cactgctgtg tgtcagtaca agtgaatact atactgagct cgggatgtac 600
tatcaccttt tgggtcagat ccccatcttc ttcttcacag ttatagtcac gttgatcaca 660
tacactaaga tactccaggc tcttaacatc cgcataggca ctagattctc aacaggacag 720
aagaagaaag cccgaaagaa aaagacaatc tctctagcta cacatgagac cacagacatg 780
tcacaaagca gtgggtgggag gaatgtcgtg tttgggtgtga gaacttcagt ttctgtaata 840
attgccctcc ggcgagccgt gaaacgccac cgggaacgac gagaacggca gaaaagagtc 900
ttcaaaatgt cgttattgat tatttctaca tttcttctct gttagacacc aatttctgtt 960
ttaaatacca ccattctatg tttaggccca agtgaccttt tagtaaaatt aagatttgtt 1020
tttctagtca tggcttatgg aacaacgata ttccaccctc tcttgatgc attcaccaga 1080
caaaagtctc aaaaggtctt aaagagtaag atgaaaaagc gagttgtttc catagttgaa 1140
gctgatccca tgcctaataa cgctgtaata cacaactcat ggatagatcc taaaagaaac 1200
aaaaaggtta cctatgaaga cagtgaataa agagagaaat gtttagtacc tcaggttgtc 1260
acagactag 1269

I291555

<210> 5
<211> 422
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Met Gln Ser Glu Ser Asn Val Thr Val Arg Asp Asp Ile Asp Asp Ile
1 5 10 15

Asp Thr Asn Met Tyr Gln Pro Leu Ser Tyr Pro Leu Ser Phe Gln Val
20 25 30

Ser Leu Thr Gly Phe Leu Met Leu Glu Ile Val Leu Gly Leu Gly Ser
35 40 45

Asn Leu Thr Val Leu Val Leu Tyr Cys Met Lys Ser Asn Leu Ile Asn
50 55 60

Ser Val Ser Asn Ile Ile Thr Met Asn Leu His Val Leu Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Cys Val Gly Cys Ile Pro Leu Thr Ile Val Ile Leu Leu Leu Ser
85 90 95

Leu Glu Ser Asn Thr Ala Leu Ile Cys Cys Phe His Glu Ala Cys Val
100 105 110

Ser Phe Ala Ser Val Ser Thr Ala Ile Asn Val Phe Ala Ile Thr Leu
115 120 125

Asp Arg Tyr Asp Ile Ser Val Lys Pro Ala Asn Arg Ile Leu Thr Met
130 135 140

Gly Arg Ala Val Met Leu Met Thr Ser Ile Trp Ile Phe Ser Phe Phe
145 150 155 160

Ser Phe Leu Ile Pro Phe Ile Glu Val Asn Phe Phe Ser Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Thr Trp Ala Asn Lys Thr Leu Leu Cys Val Ser Thr Ser Glu
180 185 190

Tyr Tyr Thr Glu Leu Gly Met Tyr Tyr His Leu Leu Val Gln Ile Pro
195 200 205

Ile Phe Phe Phe Thr Val Ile Val Met Leu Ile Thr Tyr Thr Lys Ile
210 215 220

Leu Gln Ala Leu Asn Ile Arg Ile Gly Thr Arg Phe Ser Thr Gly Gln
225 230 235 240

I291555

Lys Lys Lys Ala Arg Lys Lys Lys Thr Ile Ser Leu Ala Thr His Glu
245 250 255

Thr Thr Asp Met Ser Gln Ser Ser Gly Gly Arg Asn Val Val Phe Gly
260 265 270

Val Arg Thr Ser Val Ser Val Ile Ile Ala Leu Arg Arg Ala Val Lys
275 280 285

Arg His Arg Glu Arg Arg Glu Arg Gln Lys Arg Val Phe Lys Met Ser
290 295 300

Leu Leu Ile Ile Ser Thr Phe Leu Leu Cys Trp Thr Pro Ile Ser Val
305 310 315 320

Leu Asn Thr Thr Ile Leu Cys Leu Gly Pro Ser Asp Leu Leu Val Lys
325 330 335

Leu Arg Leu Cys Phe Leu Val Met Ala Tyr Gly Thr Thr Ile Phe His
340 345 350

Pro Leu Leu Tyr Ala Phe Thr Arg Gln Lys Phe Gln Lys Val Leu Lys
355 360 365

Ser Lys Met Lys Lys Arg Val Val Ser Ile Val Glu Ala Asp Pro Met
370 375 380

Pro Asn Asn Ala Val Ile His Asn Ser Trp Ile Asp Pro Lys Arg Asn
385 390 395 400

Lys Lys Val Thr Tyr Glu Asp Ser Glu Ile Arg Glu Lys Cys Leu Val
405 410 415

Pro Gln Val Val Thr Asp
420

<210> 6
<211> 542
<212> DNA
<213> 大鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (514)..(514)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 6
atgcatgctc gagcgccgc cagtgtgatg gatatctgca gaattcgccc ttgtaataat 60
tgccctccgg cgagccgtga aacgacaccg ggaacgacga gagaggcaga aaagagtctt 120
caaaaatgtc gttatggata atttctacat ttcttctctg ttggacacca atttctgttt 180

I291555

taaataccac cattttatgt ttaggcccaa gtgacctttt agtaaaatta agattgtgtt 240
ttctagtcac ggcttatgga acaactatat tccatcctct cctgtatgca ttcaccagac 300
aaaaatttca aaaggtctta aaaagtaaga tgaaaaagcg agttgtttcc atagttgaag 360
ctgatcccat gcctaataac gctgtaatac acaactcatg gatagatcct aaaagaaaca 420
aaaaggttac ctacgaagac agtgaaataa gagagaaatg tttagtacct caggttgica 480
cagactagaa gggcgaattc cagcacactg gcgnccgtta ctagtggatc cgagctcggc 540
ac 542

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 新穎序列

<400> 7
tcccccgga aaaaaaccaa ctgctccaaa 30

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 新穎序列

<400> 8
taggatccat ttgaatgtgg atttggtgaa a 31

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 新穎序列

<400> 9
gatcaagctt ccatggcgtg ctgcctgagc gaggag 36

<210> 10
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

I291555

<223> 新穎序列

<400> 10

gatcggatcc ttagaacagg ccgcagtcct tcaggttcag ctgcaggatg gtg 53

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 新穎序列

<400> 11

gtaataattg ccctccggcg agc 23

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 新穎序列

<400> 12

ctagtctgtg acaacctgag g 21

伍、中文發明摘要：

本發明關於辨識候選化合物是否為孤兒(orphan)G蛋白-偶聯受體(GPCR)之調節劑。較佳者該GPCR為人類GPCR。在一些具體實施例中，GPCR由心肌細胞內生性表現。在一些具體實施例中，GPCR與Gi-偶聯，且降低細胞內單磷酸腺苷(cAMP)濃度。在一些具體實施例中，GPCR的過度表現促進心肌細胞存活。在一些具體實施例中，GPCR的過度表現可挽救因缺氧/回氧所導致的心肌細胞凋亡。在一些具體實施例中，GPCR在患有充血性心衰竭的個體身中被向下調節。本發明的促效劑預期可作為治療缺血性心臟病，包含心肌梗塞、心肌梗塞後之重塑，及充血性心衰竭之治療藥物。

陸、英文發明摘要：

The present invention relates to methods of identifying whether a candidate compound is a modulator of an orphan G protein-coupled receptor (GPCR). Preferably the GPCR is human. In some embodiment, the GPCR is expressed endogenously by cardiomyocytes. In some embodiments, the GPCR is coupled to Gi and lowers the level of intracellular camp. In some embodiment, overexpression of the GPCR promotes survival of cardiomyocytes. In some embodiment, overexpression of the GPCR rescues cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation induced apoptosis. In some embodiment, the GPCR is down-regulated in individuals with congestive heart failure. Agonists of the invention are envisioned to be useful as therapeutic agents for treatment of ischemic heart disease, including myocardial infarction, post-myocardial infarction remodeling, and congestive heart failure.

拾、申請專利範圍：

1. 一種活體外篩選可作為心臟保護作用調節劑之候選化合物的方法，其包含：

- (a) 將候選化合物與G蛋白-偶聯受體接觸，該G蛋白-偶聯受體包含具有與序列識別號：3至少80%序列同一性之胺基酸序列，其中該受體與G蛋白偶聯；及
- (b) 測定該化合物抑制或刺激該G蛋白-偶聯受體之能力；

其中該化合物抑制或刺激該G蛋白-偶聯受體之能力即表示該化合物為心臟保護作用調節劑。

2. 如請求項1之方法，其中該G蛋白-偶聯受體位於宿主細胞或其細胞膜中。
3. 如請求項2之方法，其中該宿主細胞為哺乳動物宿主細胞、酵母菌宿主細胞或黑色素宿主細胞。
4. 如請求項1之方法，其中該G蛋白-偶聯受體係本質性活化者。
5. 如請求項1之方法，其中該G蛋白-偶聯受體包含內源性受體之胺基酸序列，該內源性受體包含序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之胺基酸序列。
6. 如請求項1之方法，其中該G蛋白-偶聯受體與G蛋白構成融合蛋白之一部份。
7. 如請求項1之方法，其中該方法包含偵測二級傳訊子。
8. 如請求項7之方法，其中該二級傳訊子為環單磷酸腺苷(cAMP)或三磷酸肌醇(IP₃)。

9. 如請求項1之方法，其中該方法包含測量黑色素細胞分析中之色素分散。
10. 如請求項1之方法，其中該方法包含測量結合至細胞膜之GTP γ S。
11. 如請求項1之方法，其係用於篩選G蛋白-偶聯受體之促效劑。
12. 如請求項1之方法，其係用於篩選G蛋白-偶聯受體之部份促效劑。
13. 如請求項1之方法，其係用於篩選G蛋白-偶聯受體之反向促效劑。
14. 如請求項1之方法，其係用於篩選G蛋白-偶聯受體之拮抗劑。
15. 如請求項1之方法，其係用於篩選心臟保護作用之藥劑。
16. 如請求項1之方法，其係用於篩選促進心肌細胞存活之藥劑。
17. 如請求項1之方法，其係用於篩選用於心血管失調症之藥劑，該心血管失調症係選自由下列組成之群：
 - (a)心臟輸出量減少；及
 - (b)靜脈壓增加。
18. 如請求項1之方法，其係用於篩選用於缺血性心臟病之藥劑。
19. 如請求項18之方法，其中該缺血性心臟病係選自由下列組成之群：

- (a)心肌梗塞；
 - (b)心肌梗塞後之重塑；及
 - (c)充血性心衰竭。
20. 如請求項1之方法，其係用於篩選改變心血管功能的藥劑，其中該心血管功能之改變係選自由下列組成之群：
- (a)心臟肥大減少；
 - (b)心臟射出分率增加；
 - (c)心室腔體積減少；及
 - (d)心肌細胞凋亡減少。
21. 如請求項15至20中任一項之方法，其中該方法包含識別G蛋白-偶聯受體之促效劑或部份促效劑。
22. 如請求項1之方法，其中該G蛋白-偶聯受體為重組體。
23. 一種活體外測定化合物是否具有心臟保護活性的方法，其包含：
- (a) 將候選化合物與G蛋白-偶聯受體接觸，該G蛋白-偶聯受體包含具有與序列識別號：3至少80%序列同一性之胺基酸序列，其中該受體與G蛋白偶聯；
 - (b) 測定該化合物抑制或刺激該G蛋白-偶聯受體之能力；及
 - (c) 測定該化合物是否具有心臟保護活性。
24. 如請求項23之方法，其中該G蛋白-偶聯受體位於宿主細胞或其細胞膜中。
25. 如請求項24之方法，其中該宿主細胞為哺乳動物宿主細胞、酵母菌宿主細胞或黑色素宿主細胞。

26. 如請求項23之方法，其中該G蛋白-偶聯受體係本質性活化者。
27. 如請求項23之方法，其中該G蛋白-偶聯受體包含內源性受體之胺基酸序列，該內源性受體包含序列識別號：2、序列識別號：3或序列識別號：5之胺基酸序列。
28. 如請求項23之方法，其中該G蛋白-偶聯受體與G蛋白構成融合蛋白之一部份。
29. 如請求項23之方法，其中該方法包含偵測二級傳訊子。
30. 如請求項29之方法，其中該二級傳訊子為環單磷酸腺苷(cAMP)或三磷酸肌醇(IP₃)。
31. 如請求項23之方法，其中該方法包含測量黑色素細胞分析中之色素分散。
32. 如請求項23之方法，其中該方法包含測量結合至細胞膜之GTP γ S。
33. 如請求項23之方法，其係用於篩選G蛋白-偶聯受體之促效劑。
34. 如請求項23之方法，其係用於篩選G蛋白-偶聯受體之部份促效劑。
35. 如請求項23之方法，其係用於篩選G蛋白-偶聯受體之反向促效劑。
36. 如請求項23之方法，其係用於篩選G蛋白-偶聯受體之拮抗劑。
37. 如請求項23之方法，其中部分(c)包含：
 - (i) 將在部分(b)中可抑制或刺激G蛋白-偶聯受體之化合

物在活體外(*in vitro*)與心肌細胞接觸；及

(ii) 測定該化合物是否可調節該心肌細胞之存活。

38. 如請求項37之方法，其中該方法包含測量心肌細胞之細胞凋亡。

39. 如請求項23之方法，其中該方法係用於篩選作為心臟保護作用藥劑之候選化合物。

40. 如請求項23之方法，其中該方法係用於篩選作為促進心肌細胞存活藥劑之候選化合物。

41. 如請求項23之方法，其中該方法係用於篩選作為心血管失調症藥劑之候選化合物，該心血管失調症係選自由下列組成之群：

(a)心臟輸出量減少；及

(b)靜脈壓增加。

42. 如請求項23之方法，其中該方法係用於篩選作為缺血性心臟病藥劑之候選化合物。

43. 如請求項42之方法，其中該缺血性心臟病係選自由下列組成之群：

(a)心肌梗塞；

(b)心肌梗塞後之重塑；及

(c)充血性心衰竭。

44. 如請求項23之方法，其中該方法係用於篩選作為改變心血管功能藥劑之候選化合物，其中該心血管功能之改變係選自由下列組成之群：

(a)心臟肥大減少；

(b)心臟射出分率增加；

(c)心室腔體積減少；及

(d)心肌細胞凋亡減少。

45. 如請求項39至44中任一項之方法，其中該方法包含識別

G蛋白-偶聯受體之促效劑或部份促效劑。

46. 如請求項23之方法，其中該G蛋白-偶聯受體為重組體。

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無元件符號說明)

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)