



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201005294 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：098108689

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 03 月 18 日

(51)Int. Cl.:

G01N33/58 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2008/03/20 歐洲專利局 08290265.1

(71)申請人：賽諾菲阿凡提斯公司 (法國) SANOFI-AVENTIS (FR)

法國

(72)發明人：利裘 湯姆士 LICHER, THOMAS (DE)；吉貝爾 史文 GEIBEL, SVEN (DE)；弗雷 曼芙德 FREY, MANFRED (DE)

(74)代理人：林秋琴；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：20 共 54 頁

(54)名稱

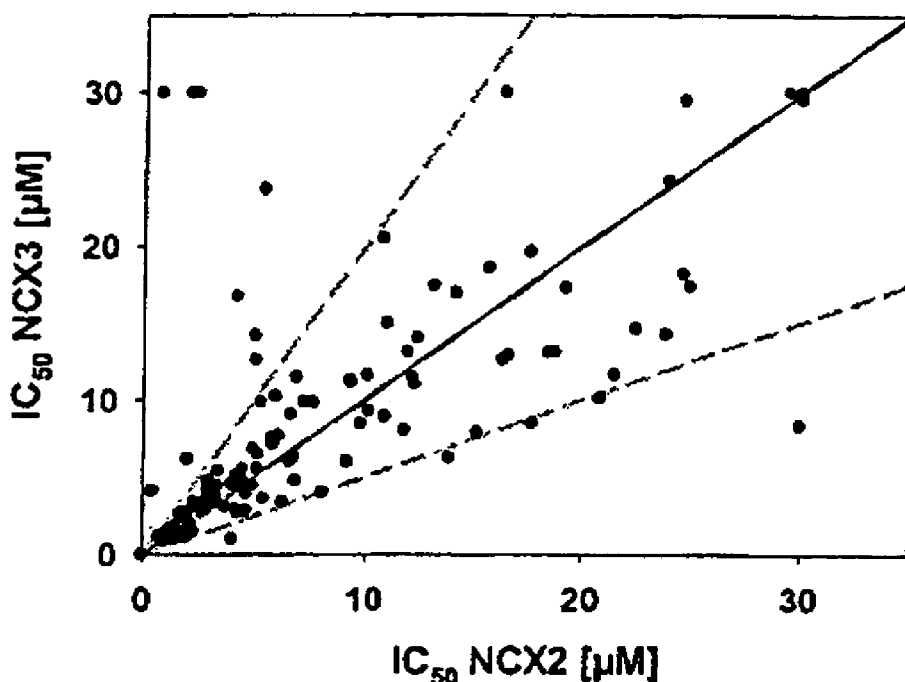
檢測鈉 / 鈣交換劑 (NCX) “反向模式”調節的化合物之螢光為主的分析法

FLUORESCENCE BASED ASSAY TO DETECT SODIUM/CALCIUM EXCHANGER (NCX)

“REVERSE MODE” MODULATING COMPOUNDS

(57)摘要

轉運蛋白是深具潛力的新興標的家族，提供科學和經濟上的機會。鈉/鈣交換劑是一種用以從各種各樣的細胞中移出 Ca^{2+} 的重要機轉。在心臟中，它使得已經由 Ca^{2+} 通道進入的 Ca^{2+} 流出以啟動收縮作用，同時 Na^{+} 進入心臟細胞。鑑定出不僅可調節鈉/鈣交換劑之鈣輸出活性(正向模式)亦可調節鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性(反向模式)的化合物具有顯著的利益。本發明係關於一種用以檢測 NCX 的“反向模式”調節化合物之螢光為主的分析法。本發明又關於一種包含有表現出 NCX 之細胞的部件套組，以及該部件套組在測試一化合物作為 NCX 之促效劑或拮抗劑的活性上之用途。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201005294 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：098108689

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 03 月 18 日

(51)Int. Cl. : *G01N33/58 (2006.01)* *G01N33/68 (2006.01)*

(30)優先權：2008/03/20 歐洲專利局 08290265.1

(71)申請人：賽諾菲阿凡提斯公司 (法國) SANOFI-AVENTIS (FR)

法國

(72)發明人：利裘 湯姆士 LICHER, THOMAS (DE) ; 吉貝爾 史文 GEIBEL, SVEN (DE) ; 弗雷 曼芙德 FREY, MANFRED (DE)

(74)代理人：林秋琴；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：20 共 54 頁

(54)名稱

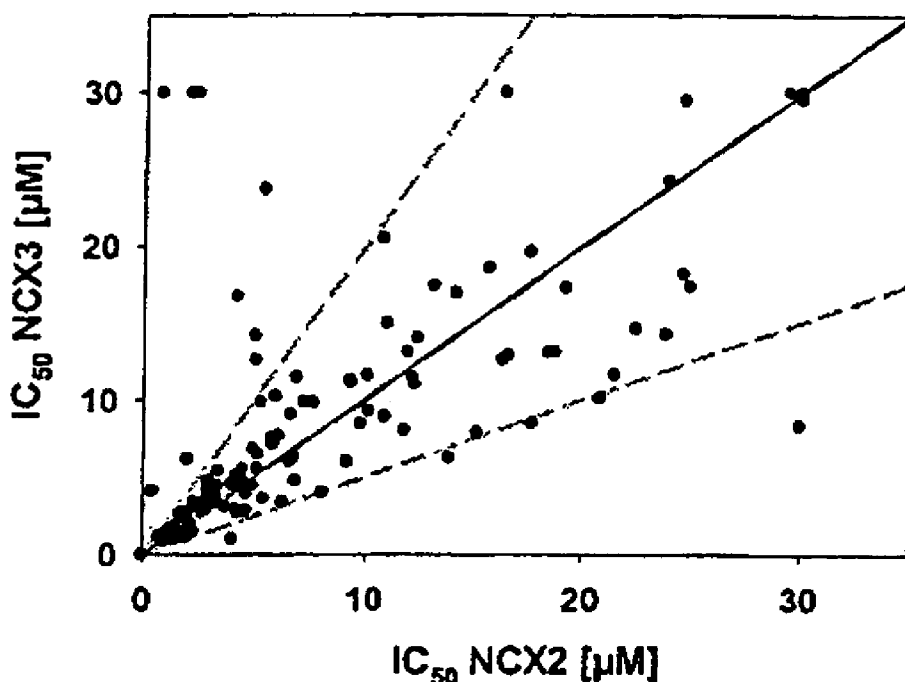
檢測鈉 / 鈣交換劑 (NCX) “反向模式”調節的化合物之螢光為主的分析法

FLUORESCENCE BASED ASSAY TO DETECT SODIUM/CALCIUM EXCHANGER (NCX)

“REVERSE MODE” MODULATING COMPOUNDS

(57)摘要

轉運蛋白是深具潛力的新興標的家族，提供科學和經濟上的機會。鈉/鈣交換劑是一種用以從各種各樣的細胞中移出 Ca^{2+} 的重要機轉。在心臟中，它使得已經由 Ca^{2+} 通道進入的 Ca^{2+} 流出以啟動收縮作用，同時 Na^{+} 進入心臟細胞。鑑定出不僅可調節鈉/鈣交換劑之鈣輸出活性(正向模式)亦可調節鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性(反向模式)的化合物具有顯著的利益。本發明係關於一種用以檢測 NCX 的“反向模式”調節化合物之螢光為主的分析法。本發明又關於一種包含有表現出 NCX 之細胞的部件套組，以及該部件套組在測試一化合物作為 NCX 之促效劑或拮抗劑的活性上之用途。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

5 本發明係關於鈉/鈣交換劑(NCX)以及用以測定彼等之活性的方法。特定言之，本發明係關於一種用以檢測 NCX 的「反向模式」調節化合物之螢光為主的分析法。本發明更關於一種包含有表現出 NCX 之細胞的部件套組，以及該部件套組的用途。

【先前技術】

發明背景

10 生命的基本要件在於區隔化—而生物膜則是踐行此一原則的天然工具。但是，脂質雙層—細胞膜的基礎結構—無法通透大多數必須運輸經過胞膜以維持細胞和生物體中之重大生活機能的離子和化合物。此一難題的解答在於胞膜的半通透特性—必須要通過膜的溶質係被特定膜蛋白所輸送。這些轉運蛋白負責產生並維持離子梯度、攝入養份、運送代謝物、回收訊息分子以及丟棄毒性和無用化合物。因此，從此點觀之，轉運蛋白是容許針對與疾病相關之功能違常進行直接影響的潛在藥物標的。

20 轉運蛋白是深具潛力的新興標的家族，提供科學和經濟上的機會。另一方面，從藥物發現技術的角度觀之，轉運蛋白是一個不易處理之標的種類。

鈉/鈣交換劑的人類基因家族(亦被稱為 NCX 或 SLC8)涵蓋三種不同蛋白，即 NCX1、NCX2 和 NCX3。SLC8 以

及 SLC24 共同構成一個 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 抗衡轉運蛋白的超家族。SLC24 的家族成員亦輸送 K^+ ，它們亦被稱為 NCKXs。

NCX1 是人類鈉/鈣交換劑基因家族中最被高度鑑定的成員，在衰竭的人類心臟中，NCX1 的表現被向上調控，且其涉及心肌梗塞之後的缺血再灌注損傷 (ischemia-reperfusion damage)。抑制 NCX1 會使得衰竭中之心臟的心肌收縮正常化，並在缺血再灌注後的期間內展現出心臟保護性 (Flesch et al., Circulation 1996; Komuro and Ohtsuka, Journal of Pharmacological Sciences, 2004)。NCX2 主要被表現在腦部，而 NCX3 則表現於腦部和骨骼肌中，它們的生理作用仍有待發掘。

鈉/鈣交換劑可依據膜電位和離子梯度而雙向輸送 Ca^{2+} 和 Na^+ 。在被稱作為「正向模式」或「鈣輸出模式」的第一方向上， Ca^{2+} 從細胞運送出來，而 Na^+ 進入細胞內。在被稱作為「反向模式」或「鈣輸入模式」的另一方向上，輸送方向則相反。

鈉/鈣交換劑是一種用以從各種各樣的細胞中移出 Ca^{2+} 的重要機轉。在心臟中，它使得已經由 Ca^{2+} 通道進入的 Ca^{2+} 流出以啟動收縮作用，同時 Na^+ 進入心臟細胞。它與心血管疾病的相關性敘述在諸如 Hobai, JA & O'Rourke, B (2004) Expert Opin. Investig. Drugs, 13, 653-664 中。因此，製藥業界已發展出抑制 NCX 的化合物，諸如於 Iwamoto, T. et al. (2004) J. Biol. Chem., 279, 7544-7553 所述者。

心臟鈉/鈣交換劑的抑制對於保護心臟非常重要(例如

Pogwizd, 2003)。在醫學上有需要將抑制 NCXs 之「正向模式」的化合物與抑制「反向模式」的化合物相區別。因而需要一種分析鈣輸入模式的分析法。此外，抑制 NCX1 的化合物必須具有選擇性，因為 NCX2 和 NCX3 屬於同一轉運蛋白家族。因此，需要一種能夠測定選擇特性的分析法。

鑑定出可諸如藉由阻斷鈣之流動及/或抑制 NCX 之活化來調節鈉/鈣交換劑之活性的化合物具有顯著的利益。用以執行此類鑑定的一種標準方法是經由運用膜片鉗制實驗(patch clamp experiments)。在這些實驗中，細胞必須個別地且依序地接受具高度技術之操作人員藉由測量對於膜電位變化及/或施加測試化合物所反應出的通過胞膜鈣流而進行評估。NCX 的新穎專一性抑制劑 Sea0400 對於犬類心室乳頭肌中之作用電位的影響係經研究，並被揭露於 K. Acsai 在慕尼黑「2004 年度 ESC 會議」(“ESC Congress 2004”)所發表的第 2886 號看板(標題：專一性鈉-鈣交換劑阻斷劑 Sea0400 對於心室作用電位的影響以及在犬類乳頭肌和普金氏纖維中所引發的活性)中，以及在 C. Lee et al. (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; Vol. 311: 748-757, 2004；標題：SEA0400 [2-[4-[(2,5-二氟苯基)甲氧基]苯氧基]-5-乙氧苯胺]對於心臟 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 NCX1.1 的抑制特性)。

利用離子選擇性電極技術將大片膜片中之離子流予以定量，顯示出心臟 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑具有多重運輸模式(Tong Mook Kang & Donald W. Hilgemann; Nature; Vol. 427, 2004

年 2 月 5 日標題：心臟 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑的多重運輸模式)。

這些實驗固然有效且富含有用資訊，但卻極為耗時且不適合作為能調節鈣離子通道活性之化合物的高通量分析法。

5 許多技術已被發展出來做為標準電生理法的替代性方法。例如，可使用放射性流動分析法(radioactive flux assays)，其中令細胞暴露於一放射性追蹤劑(諸如 ^{45}Ca)並監測經放射性標記之 Ca 的流動情形。令載有追蹤劑之細胞暴露於化合物中，並將能增進或降低該追蹤劑之流出量的化合物鑑定出來而成為胞膜離子通道的可能活化劑或抑制劑。一個特定實例揭露於 T. Kuramochi et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12 (2004) 5039-5056 中；標題為：作為鈉-鈣交換劑之新穎抑制劑的苯氧吡啶衍生物的合成及結構-活性關係。EP1031556 揭露一種方法，其中 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑之活性係利用肌漿膜囊泡測量而得，肌漿膜囊泡中之 Ca^{2+} 攝入濃度則藉由測量 ^{45}Ca 的放射活性而測定。

20 許多放射性離子-轉運蛋白分析法僅具有有限的敏感度，因而僅能得到品質不佳的數據資料。此外，放射性篩選技術所伴隨而來的成本 and 安全性課題也是其無法進行廣泛應用的障礙。

在前述藥物-發現技術當中，運用放射性流動分析法來鑑定能調節離子通道和離子轉運蛋白之活性的化合物乃是與本發明最為相近的先前技術，因為它是一種藉由監測從細胞所流出的 Ca^{2+} 而鑑定出可能的活化劑或抑制劑。這些

放射性分析法所面對的主要課題在於不易測得每秒約 1 至 1000 個分子的離子轉運蛋白有限轉換率—相較於大多數離子通道低約 10^4 倍。

因此，先前技術所面對的問題在於建構出一種具有極佳敏感度的強效分析法，以供用於鈉/鈣交換劑調節劑之高通量篩選和特性鑑定，該分析法能夠將化合物的「正向模式」和「反向模式」調節活性相區別，且能夠分別針對被鑑定出之調節劑對於 NCX1、NCX2 和 NCX3 的選擇性進行特性鑑定。本發明針對這個問題提供了解決方案。

【發明內容】

發明概要

本發明的一個標的在於一種用以測定一鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性的分析法，其中：

- a)提供表現出一鈉/鈣交換劑的細胞；
- b)提供一用以測定胞內鈣的呈色物質；
- c)令細胞與一鈉/鈣交換劑之活化劑相接觸；以及
- d)將該呈色物質受鈣調控所產生之發光訊號變化與一對照組實驗所產生的一發光訊號進行比較。

本發明的另一個標的在於一種用以測定一鈉/鈣交換劑對於一化合物之添加所反應的鈣輸入活性之分析法，其中：

- a)提供表現出一鈉/鈣交換劑的細胞；
- b)提供一用以測定胞內鈣的呈色物質；
- c)令細胞與一化合物相接觸，其中該等細胞在接受該化合物處理之前，已經先被一鈉/鈣交換劑之活化劑所處理；

以及

d)將該呈色物質受鈣調控所產生之發光訊號變化與一對照組實驗所產生的一發光訊號進行比較。

一般而言，所使用之鈉/鈣交換劑具有哺乳動物來源，特別是具有人類來源。該鈉/鈣交換劑係選自於下列鈉/鈣交換劑蛋白中之一者：NCX1、NCX2、NCX3、NCX4、NCX5、NCX6 及/或 NCX7，特別是 NCX1、NCX2 及/或 NCX3；及/或下列鈉/鈣/鉀交換劑蛋白中之一者：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4 及/或 NCKX5。

一般而言，本發明之方析法中所使用的細胞可來自於任何真核生物體。在一較佳具體例中，這些細胞為哺乳動物細胞。在一更佳具體例中，這些細胞為 CHO (CCL-61)、HEK (CCL-1573)、COS7 (CRL-1651) 及 / 或 JURKAT (CRL-1990)細胞。

在一較佳具體例中，該呈色物質係呈一可進入細胞且被水解成一染料的染料前驅物而被添加於細胞中，藉此，染料與鈣在細胞內相複合並提供一發光訊號。再者，該染料前驅物可較佳為一種乙醯氧甲酯衍生物，且該染料可較佳為鈣敏性螢光染料 fluo-4。在一更佳具體例中，該發光訊號為螢光，且該監測步驟 c)運用一個 FLIPR 裝置。

本發明亦關於前述分析法在測試一化合物作為一鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性的促效劑(agonist)或拮抗劑(antagonist)活性上之用途。在另一較佳具體例中，本發明關於前述分析法在診斷一伴隨鈉/鈣交換劑的變化表現而發生的疾病上

之用途。

本發明又關於一種部件套組，其包含：

a)表現出一鈉/鈣交換劑的冷凍乾燥細胞；

b)一呈色物質；

5 c)一化合物緩衝液；以及

d)一呈色物質緩衝液。

在本發明之部件套組的一較佳具體例中，該呈色物質為鈣敏性螢光染料 fluo-4。在另一較佳具體例中，所使用之鈉/鈣交換劑具有哺乳動物來源，特別是具有人類來源。該鈉/鈣交換劑係選自於下列鈉/鈣交換劑蛋白中之一者：NCX1、NCX2、NCX3、NCX4、NCX5、NCX6 及/或 NCX7，特別是 NCX1、NCX2 及/或 NCX3；及/或下列鈉/鈣/鉀交換劑蛋白中之一者：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4 及/或 NCKX5。

15 本發明更關於前述部件套組在測試一化合物作為一鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性的促效劑或拮抗劑活性上之用途。在另一較佳具體例中，本發明關於前述部件套組在診斷一伴隨鈉/鈣交換劑的變化表現而發生的疾病上之用途。

本發明的詳細敘述

20 「分析法」此用語係指一系統或個體之性質被測量的過程。分析法是生物分析法的常用縮寫，且為一種活體外實驗。分析法係通常用以測量一物質對於一存活生物體的影響。分析法可為定性或定量，它們為新藥發展所必須。

本發明之分析法提供一廣泛動態範圍，以使得一種

NCX 蛋白之活性得以測定。特別是，本發明獲致一種快速有效的分析法，供用於篩選並鑑定出能夠與一鈉/鈣交換劑進行交互反應並調節其活性的藥學上有效性化合物。

「鈉/鈣交換劑」或「NCX」等用語在本發明的意義上係意指下列 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑蛋白之名單中之任一者：NCX1、NCX2、NCX3、NCX4、NCX5、NCX6、NCX7；或是下列 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ 交換劑蛋白之名單中之任一者：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5，該用語意指上述蛋白的單獨存在形式或彼此組合形式。

特佳者為 SLC8 家族成員 NCX1、NCX2 及/或 NCX3，它們的胺基酸序列分別對應於序列辨識編號第 1 號、序列辨識編號第 2 號序列和辨識編號第 3 號。

此一鈉/鈣交換劑可來自於任何脊椎動物，特別是哺乳動物物種(例如狗、馬、牛、小鼠、大鼠、犬、兔、雞、猿、人或其他)。鈉/鈣交換劑可從這些脊椎動物生物體的組織探針單離出來，或是可藉由能夠表現該鈉/鈣交換劑的重組型生物材料製得。

「鈉/鈣交換劑蛋白」係指具有一胺基酸序列的多肽、多形性變異體、突變株和物種間類似物，該胺基酸序列相對於序列辨識編號第 1 號、序列辨識編號第 2 號序列和辨識編號第 3 號所含有的一胺基酸序列，具有超過約 80% 的胺基酸序列相同性，85%、90% 且較佳為 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 或是更高的胺基酸序列相同性，較佳為涵蓋一為至少約 25、50、100、200 或 500

或是更多個胺基酸的範圍。

「生物材料」此用語意指含有遺傳訊息並且能夠自我複製或在一生物系統內被複製的任何材料。重組型生物材料為藉由熟習本項技術人士所知悉的重組技術所製成、被變化或被修飾的任何生物材料。

下列參考文獻為特定 NCX 蛋白的選殖範例：犬類 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 NCX1 係被 Nicoll, DA. 等人所選殖 (Science. 250(4980): 562-5, 1990；標題：犬類心肌肌漿膜 $\text{Na}(+)/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑的分子選殖及功能表現)。人類 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 NCX1 係被 Komuro, I. 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89(10), 4769-4773, 1992；標題：人類心臟 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 cDNA 的分子選殖及鑑定) 以及 Kofuji, P. 等人 (Am. J. Physiol. 263 (Cell Physiol. 32): C1241-C1249, 1992；標題：Na-Ca 交換劑在各種細胞內的表現：運用經選殖的人類心臟 Na-Ca 交換劑所進行的研究) 所選殖。人類 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 NCX2 係被 Li, Z. 等人所選殖 (J. Biol. Chem. 269(26): 17434-9, 1994；標題：胞膜 $\text{Na}(+)/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑的 NCX2 異構型的選殖)。大鼠 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 NCX3 係被 Nicoll, DA. 等人所選殖 (J. Biol. Chem. 271(40): 24914-21, 1996；標題：第三個哺乳動物 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 NCX3 的選殖)。人類 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 NCX3 係被 Gabellini, N. 等人所選殖 (Gene. 298: 1-7, 2002；標題：人類 SCL8A3 基因及組織專一性 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換劑 3 異構型)。

「多肽」、「胜肽」及「蛋白」等用語在本說明書中可

交換運用來以指稱由數個胺基酸殘基所構成的聚合物。這些用語適用於其中有一或多個胺基酸殘基為對應天然生成胺基酸之人造化學仿擬體的胺基酸聚合物，亦適用於天然生成胺基酸聚合物以及非天然生成胺基酸聚合物。

5 「一鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性」此用語係指該鈉/鈣交換劑之「反向模式」，亦即，將 Ca^{2+} 輸送進入細胞且令 Na^+ 流出細胞的機轉。此種「反向模式」運輸作用係在某些胞膜去極化狀態和高胞質 Na^+ 濃度下發生。鈉/鈣交換劑之活性係藉由測量由一適當呈色物質與鈣相複合所增強的發光度來測定。

10 「表現出一鈉/鈣交換劑的細胞」此用語係指內源地表現出相關交換劑的細胞，抑或是重組型細胞。

當用於指稱一細胞、核酸、蛋白或載體時，「重組型」此用語係指該細胞、核酸、蛋白或載體已藉由導入一異質性核酸或蛋白或是改變一原生核酸或蛋白而被改質，抑或是該細胞係源自於一經過上述改質的細胞。因此，舉例來說，重組型細胞表現出未見於原生型(非重組型)細胞內的基因，抑或是以不正常表現方式、低度表現方式或完全不表現方式來表現原生基因。在本發明中，此用語通常係指已

15 被編碼有一鈉/鈣交換劑的核酸序列所轉染的細胞。

20 分析法係單純地藉由令細胞生長在一載有適當培養基的適當容器內來進行。只要該細胞在分析期間能被維持且能夠在一培養基內適當地生長，則該細胞可為天然生成細胞(naturally occurring cell)、原生細胞(native cell)、確立細

胞株(established cell line)、商業上可購得之細胞、經遺傳改質之細胞等。

適用於本發明分析法的細胞包括原核細胞、酵母菌或高等真核細胞，特別是哺乳動物細胞。原核細胞包括格蘭氏陰性和格蘭氏陽性生物體。細胞通常是哺乳動物細胞，諸如人類細胞、小鼠細胞、大鼠細胞、中國倉鼠細胞等。合適的細胞包括 CHO、COS7、JURKAT、HeLa、HEKs、MDCK 和 HEK293 細胞。細胞可利用習知方法來製備 (Current protocols in cell biology, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0471241059) 或可購得 (Invitrogen Corp., Sigma-Aldrich Corp., Stratagene)。

「呈色物質」此用語特指鈣敏性螢光染料。染料前驅物的特點在於在分析條件下不會發光，為一能夠進入細胞且在胞內被水解成為發光性氧基化合物的酯類，以及藉由與鈣相複合而增強發光度。這些酯類被選定為容易遭受胞內水解酶所水解者。

「能夠進入細胞」此用語意指前驅物能夠通過胞膜且在細胞內被水解，染料前驅物在特定的 pH、溫度等條件下進入細胞，以不同速率進入細胞或是在特定條件下不會進入細胞。

呈色物質係運用習知實驗程序(Current protocols in cell biology, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0471241059)而被加入於細胞中。呈色物質的運用方式係屬習知，商業上可購得的試劑(Invitrogen Corp.)以及實驗室中所合成的試劑均

可使用。已知有數種商業上可購得的染料符合於上述需求。用以監測 Ca^{2+} 的螢光染料係屬習知，且詳述於 Molecular Probes catalog 第 9 版第 20.1-20.4 節中。它們通常具有兩個接合至一諸如螢光素(fluoresceins)、若丹明(rhodamines)、香豆素(coumarins)、胺基苯基吡啶等螢光核的雙-羧甲基胺基基團。這些化合物大部分為經 3,6-二氧取代之氧雜蒽(xanthenes)，其中在前驅物中氧基被取代，而在發光染料中氧基未被取代。乙醯氧甲基基團經常存在於分子中以保護酚及酸。請參見諸如 Fluo3/4、Fura2/3、鈣黃綠素(Calcein green)等。乙醯基團的水解會獲致發光產物。這些前驅物能夠通過胞膜且在細胞內被水解。

「發光」此用語係指「冷光」，即來自於其他能量來源的光線，其可在常溫或低溫下產生。就發光作用而言，一些能量來源將原子中之一電子從「基態」(最低能階)撞擊至「激態」(較高能階)；隨後該電子以光的形式放出能量從而能夠返回「基態」。發光作用有數種形式，分別依據能量來源和發光誘發體來命名。

「螢光」此用語係指在冷物體中作為最常見到之光學現象的發光作用，其中光子的分子吸收會引發另一光子以較長之波長放射。被吸收和被放射的光子之間的能量差最後會產生分子振動或熱量。被吸收的光子通常位於紫外光範圍，而被放射的光子位於可見光範圍，但此係依據特定螢光團的吸收曲線和斯托克斯位移(Stokes shift)而定。螢光從螢石而得名，而螢石係由氟化鈣所構成，其經常顯現出

此種螢光現象。

源自於指示劑染料的螢光可運用一具發光量測儀或是一具螢光成像儀來測量。一種較佳的檢測儀器為螢光成像皿盤讀數器 (FLIPR) (Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.)。FLIPR 非常適合於運用本發明方法所進行的高通量篩選法，因為其合併了能夠同時將物質吸移至一微滴定皿中之 96 至 384 個培養井的整合式液體操作法以及運用一與電荷耦合式成像攝影機相耦合之氬電射的快速動態檢測法。

一種應用鈣指示劑染料的替代性方法是運用水母光蛋白 (aequorin) 系統。水母光蛋白系統係應用原水母光蛋白 (apoequorin) 此種蛋白質，其與親脂性發色團腔腸素 (coelenterazine) 相結合，而形成一由原水母光蛋白與腔腸素所構成的組合，稱之為水母光蛋白。原水母光蛋白具有三個鈣結合址，水母光蛋白的原水母光蛋白部分會藉由與鈣結合而變化其構形。此種在構形上的變化致使腔腸素被氧化成腔腸素醯胺 (coelenteramide)、 CO_2 和一個藍光光子 (466 nm)。此一光子可運用適當儀器來檢測。有關水母光蛋白之應用的回顧性論文，請參見 Créton et al., 1999, *Microscopy Research and Technique* 46: 390-397；Brini et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 9896-9903；Knight & Knight, 1995, *Meth. Cell. Biol.* 49:201-216。美國專利第 5,714,666 號亦屬相關，其敘及藉由將腔腸素輔助因子加入表現出原水母光蛋白的哺乳動物細胞以於哺乳動物細胞中測量胞內鈣的方法。

「抑制劑」為諸如與鈉/鈣交換劑蛋白相結合，或是部分地或完全地阻斷其活性，或降低、防止、遲緩活化、失活化、去敏化或向下調控鈉/鈣交換劑蛋白之活性或表現的化合物，例如拮抗劑。

5 「活化劑」為增加、開啟、活化、促進、增進活化、敏化、促效化或向上調控鈉/鈣交換劑之活性的化合物。本發明的一較佳活化劑為短桿菌肽(gramicidine)，其致使胞內鈉濃度升高，從而增加鈉/鈣交換劑在「反向」運輸模式上的活性。

10 抑制劑、活化劑或調節劑亦包括鈉/鈣交換劑蛋白的遺傳改質變體，例如活性改變的變體，以及天然生成和合成的配位體、拮抗劑、促效劑、胜肽、環肽、核酸、抗體、反訊息分子、核糖酶、小有機分子等。

15 「化合物」或「測試化合物」或「測試候選物」等用語或其文義上的等效用語係描述諸如蛋白質、寡肽、小有機分子、多醣、脂肪、脂肪酸、聚核苷酸、寡核苷酸等供測試對於鈉/鈣交換劑活性之調節能力的任何天然生成或合成分子(Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0471250961)。測試化合物可呈測試化合物之資料庫的形式，諸如一提供充分多樣性範圍的組合式或隨機化資料庫(Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0471250937)。任擇地，測試化合物被連接至一諸如致標化合物、救援化合物、二聚體化合物、安定化合物、可定址化合物和其他功能性部分等融

20

合伴隨體。習慣上係藉由鑑定出具有有一些所欲性質或活性(例如增進活性)的化合物(稱之為「先導化合物」)，產生先導化合物的變異體，並評價這些變異體化合物的性質和活性，從而產生具有有用性質的新穎化學實體。較佳地，高通量篩選法(HTS)係供用於此一分析。

該抑制劑、活化劑和測試化合物可藉由在細胞生長後注入培養基內而加入於細胞中，抑或是它們可在細胞生長之前即存在於培養基內(Current protocols in cell biology, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0471241059)。

細胞可於抑制劑、活化劑及/或測試化合物上生長至適當數目，抑或是將它們放置於抑制劑、活化劑及/或測試化合物上並在不繼續生長下加以運用。可令細胞與抑制劑、活化劑及/或測試化合物相結合，抑或在將細胞放置於或生長於培養井內的具體例中，細胞可為被懸浮於井內流體中的細胞懸浮液。

「對照組實驗」此用語係指應該伴同進行的不同種類實驗。習於本項技術人士可認知到，對照組與本說明書所述方法伴同進行通常是有好處的。

例如，相對於測定鈉/鈣交換劑活性之分析法具有一對照組經常是有幫助的，在該對照組中，細胞較佳為本質上相同於分析法中所使用者，但這些細胞不會表現出相關鈉/鈣交換劑。

再者，相對於測定一鈉/鈣交換劑對於一化合物之添加所反應的活性的分析法，具有一對照組經常是有幫助的，

其中這些化合物係在本發明分析法針對細胞進行測試，而在該對照組中，這些細胞較佳為本質上相同於分析法中所使用者，但這些細胞不會表現出相關鈉/鈣交換劑。藉著此一方式，可測知藉由分析法所鑑定出的化合物確實會經由相關鈉/鈣交換劑而發揮其效用，而不是經由一些未預期到的非專一性機轉。這些對照組細胞的一個可能來源是應用非重組型母本細胞，而實際實驗組細胞會表現出相關鈉/鈣交換劑。

相對於測定一鈉/鈣交換劑對於一化合物之添加所反應之活性的分析法，其他的對照組可為在不添加測試化合物下進行分析法(低對照組)以及在高濃度測試化合物下進行分析法(高對照組)。

其他種類的對照組涉及將本發明分析法所鑑定出之化合物引用作為相關鈉/鈣交換劑的促效劑或拮抗劑，並在習用方法中將這些化合物予以測試，以確認這些化合物在以習用方法進行測試時亦為促效劑或拮抗劑。再者，熟習本項技術人士將會知悉藉由將分析數值與標準數值作比較而進行統計分析亦為所欲。

「促效劑」和「拮抗劑」等用語係指經由一受體來調節訊息傳導作用的受體效應物分子。受體效應物分子能夠與受體相結合，縱然不一定結合至天然配位體的結合位址。受體效應物於單獨使用時可調節訊息傳導作用，亦即可作為替代性配位體，抑或是可在天然配位體存在下透過增進或抑制該天然配位體的傳訊而改變訊息傳導作用。舉

例而言，「拮抗劑」為能夠阻斷或降低受體的訊息傳導活性的分子，例如，它們可競爭性地、非競爭性地及/或異位性地抑制源自於受體的訊息傳導作用，而「促效劑」加強、引發或是增進一受體的訊息傳導活性。

5 「伴隨鈉/鈣交換劑的變化表現而發生的疾病」此用語係指擴張型心肌病變(dilated cardiomyopathy)、冠心病、心律不整(arrhythmia)、心臟衰竭等。

10 為求方便，分析法中之呈色物質和其他組份可設置成為套組，其中呈色物質可呈一種可復水之粉末或呈一種配於緩衝液內之冰鎮溶液。套組亦可包括緩衝液、活化劑、抑制劑、測試化合物、表現出一鈉/鈣交換劑蛋白的細胞等。這些細胞可呈經冷凍乾燥之細胞。

該部件套組可供用作為一種用以診斷擴張型心肌病變、冠心病、心律不整、心臟衰竭等的診斷套組。

15 下列圖式和實例係在不限制保護範圍之下詳細闡述本發明，並敘述以螢光為主之細胞鈉/鈣交換劑分析法的典型結果。

【實施方式】

實例

1. 材料與方法

1.1. 化學品及設備

設備	製造商	功用
Biomek FX	Beckman Coulter	液體操作
Biomek 2000	Beckman Coulter	液體操作
16°C -CO ₂ -Cytomat 培養箱	Heraeus	細胞操作
CO ₂ - Hera 細胞培養箱	Heraeus	細胞操作
FLIPR ₃₈₄	Molecular Devices	螢光成像皿盤讀數器

材料	供應商	型錄號碼	功用
CHO-hNCX1 CHO-hNCX2 CHO-hNCX3	Steinbeis Transfer Zentrum	-	轉染有人類 Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換劑 (NCX1、NCX2、 NCX3)之細胞株
A000135933	ACR	-	NCX1 阻斷劑
Fluo4-AM	Molecular Probes	F14201	監測胞內 Ca ²⁺
普洛林 F-127	Sigma	P2443	清潔劑
遺傳黴素 (geneticin)	Gibco	10131-027	細胞篩選
F-12 (Ham) + L-麩醯胺酸	Gibco	21765-029	細胞培養
PBS，不含鈣 和鎂	Gibco	14200-067	緩衝液

FCS	PAA	A15-649	細胞培養
短桿菌肽	Sigma	G-5002	Na/K 離子載體
96-井 PP-微型 培養皿，U-型	Greiner	650201	化合物培育皿
96-井黑色透 明平底培養皿 (以 TC 處理)	Costar	3904	分析皿
胰蛋白酶	Biochrom	L2143	細胞培養

1.2. 細胞株

由位於曼罕市的 *Steinbeis-Transferzentrum für Angewandte Biologische Chemie* 提供分別穩定地表現出人類 NCX1、NCX2 和 NCX3 的重組型 CHO-K1 細胞株。

令細胞在標準條件下(37°C，補充有 5% CO₂ 的空氣)進行連續培養。將 CHO-K1 NCX1、CHO-K1 NCX2 和 CHO-K1 NCX3 細胞置入補充有 10% 胎牛血清 (FCS)和 450 µg/ml G418 的含麩醯胺酸 HAM'S-F12 培養基中。每隔 3-4 日利用一胰蛋白酶溶液令細胞脫離後進行繼代，並以一為 150,000 個細胞/ml 的濃度再接種之。

1.3. 電生理細胞株鑑定

電生理鑑定係在位於法蘭克福市的離子閘生技公司 (Iongate Biosciences GmbH)完成。

藉由在電生理實驗至少 18 小時之前施加冰冷 PBS (磷酸緩衝化生理食鹽水)或胰蛋白酶令培養細胞脫離，再將細

胞展佈於蓋玻片上。利用下列組成製備兩種浸浴溶液和移液管溶液，以供膜片鉗制實驗之用：

「低鈣」浸浴(外部)溶液：135 mM NMG, 5 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 4 mM EGTA, 30 mM HEPES, pH 7.4

5 (HCl→pH 7.0，接著 CsOH→pH 7.4)

「高鈣」浸浴(外部)溶液：139 mM NMG, 5 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 30 mM HEPES, pH 7.4

(HCl→pH 7.0，接著 CsOH→pH 7.4)

●

10

移液管(內部)溶液：100 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 2.1 mM EGTA, 35 mM TEA-Cl, 4 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 5.63 mM 磷肌酸, 30 mM HEPES, 3.5 U/ml 肌酸磷酸激酶(70 ml 移液管溶液 + 3500 U 經過濾之肌酸磷酸激酶，補足成為 100 ml 移液管溶液), pH 7.4 (NaOH)

15

●

20

將 5 mM 氯化鎳溶解於「高鈣」浸浴溶液內，以抑制 NCX 電流。NCX 活性係運用膜片鉗制實驗而在全細胞組態下測得。細胞係以一為 0 mV 的固持電位在室溫下(20-25°C)被鉗制。藉由施加 2 mM 外部鈣(「高鈣」浸浴溶液)歷時 4 秒鐘以產生 NCX 電流(=對照組)。每隔 20 秒重覆施加鈣一次。經過 5 次刺激之後，利用相同實驗程序但在 5 mM 鎳的存在下以鈣進行活化，以測試鎳的抑制性(重覆 5 次)。最後，再次施加 5 次鈣脈衝以進行洗除研究。依據報告檢驗並分析峰值電流、輸送電荷量以及訊號衰減之時間常數，以鑑定 NCX 電流。所有的數據均以平均值±SEM 來表示。

1.4. 分析試劑

試劑	化學品	註記
分析緩衝液	133.8 mM NaCl 4.7 mM KCl 1.25 mM MgCl ₂ 3.5 mM CaCl ₂ 5 mM 葡萄糖 10 mM Hepes/NaOH, pH 7.5 0.01% 普洛林 F-127 2.5 mM 丙磺舒 (probenecid)	丙磺舒必須每天重新製備
染料載入緩衝液	Fluo4-AM, 0.02% 普洛林 F-127, 0.1% BSA	將 12 µl 之普洛林 F-127 (20%) 加入 12 µl 之 Fluo4-AM (2 mM)，接著溶解於分析緩衝液中
短桿菌肽原料溶液	1 mM 短桿菌肽配於乙醇內(4°C)	每天重新製備，並儲存於 4°C 直到測量進行為止
短桿菌肽分析溶液	60 µM 短桿菌肽配於分析緩衝液內	展佈於 PP-培養皿上並儲存於 16°C (安定達 3 小時)； 3×濃縮，最終濃度為 20 µM； 細胞上之乙醇濃度為 2%；

1.5. 最終分析過程

1.5.1. 細胞培養皿的製備

在實驗前一天，利用胰蛋白酶令細胞脫離，並以一為 35,000 個細胞/100 μl 培養基/井之密度展佈於 96-井微培養皿中，並在 37°C、5% CO_2 和 90%溼度的環境下予以培育~22 小時。

1.5.2. 化合物培育皿的製備

化合物係以一為 $1.5 \times$ 最終濃度之濃度製備於分析緩衝液中。將化合物溶液予以預培育並儲存於 16°C。為測定 IC_{50} ，運用 Biomek 2000 製成初始濃度為 45 μM 的稀釋系列 (最終：30 μM)。

1.5.3. 短桿菌肽培育皿的製備

利用冰乙醇(4°C)作為溶劑每日製備 1 mM 之短桿菌肽原料溶液。利用分析緩衝液從該原料溶液製得 60 μM 之短桿菌肽分析溶液。在一個 96 井聚丙烯皿中填入每井為 150 μl 之短桿菌肽分析溶液，並儲存於 4°C。因為短桿菌肽溶液在室溫下會非常快速地喪失活性，所以裝填有短桿菌肽溶液的培養皿僅可使用二次即需要再填加。

1.5.4. 分析過程

1. 將培養基從細胞培養皿中移除
2. 添加 100 μl /井的染料載入緩衝液
3. 在室溫下將細胞予以培育 90 分鐘
4. 每個井均以 100 μl 之分析緩衝液洗滌三次，其後將緩衝液完全移除

5

- 5. 運用 Biomek FX 添加不同濃度(1.5×濃縮)之 80 µl 測試化合物
- 6. 在一個 CO2 培育箱內，於 16°C 和 5% CO₂ 的環境下，將細胞予以培育 45 分鐘
- 7. 將細胞培養皿移入 FLIPR，並藉由在測量期間添加 40 µl 的短桿菌肽分析溶液(最終濃度：20 µM 短桿菌肽)而進行記錄

使用 10 µM 之 NCX 抑制劑 A000135933 作為高對照組，並使用緩衝液作為低對照組。

10

1.5.5 FLIPR 設定參數

FLIPR 實驗設定參數	
暴露時間	1.2 秒 (在 0.6 W)
孔徑	2.8
濾鏡	515-575 (「鈣」)
預設值(圖形設定)	
負偏移	由樣品 1
空間均勻度校正	關閉
負對照組校正	關閉
第一序列	
初始週期	2 秒
初始計數	240 (480 秒)
畫面後增補	5
增補高度	70 µl
增補速率	40 µl / 秒

增補體積	40 μl
混合	2×40 μl

1.6. 數據分析

下列計算係以利用 FLIPR 軟體的統計輸出功能所得數據作為基礎：統計方法 1 = max-min (樣品 1-240)。若有需要，計算可針對邊際效應進行校正。

抑制 NCX 的主要結果是添加短桿菌肽後之螢光增強受到抑制，且由統計方法 1 演算而得。高對照組係指利用 10 μM 之 A000135933 來抑制 NCX 活性，而低對照組係指僅添加緩衝液之後未對於 NCX 進行抑制。因此，%抑制率係參照對照組(0%抑制率=低對照組，100%抑制率=高對照組)而計算出。依據下式從校正後之原始數據以及培養皿內對照組計算出結果：

$$\text{抑制率(\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{(\text{樣品} - \text{低對照組})}{(\text{高對照組} - \text{低對照組})} \right)$$

2. 結果

2.1. 電生理細胞株鑑定

2.1.1. 母本細胞株

電生理數據得自於離子閘公司(Iongate GmbH)。利用 CHO-K1 細胞來建立安定的 CHO-NCX1、CHO-NCX2 和 CHO-NCX3 細胞株。在高胞內 Na⁺濃度下施加胞外 Ca²⁺時，母本細胞不會展現出明顯的電流反應(0.12±0.07 pA/pF，第 2 圖)。在所述條件下使用鎳不會產生假性結果。典型的電

流示於第 3 圖。

2.1.2. CHO-NCX 細胞株

CHO-NCX1 細胞在施加 Ca^{2+} 之後顯示出外向恆定電流，且在 4 秒鐘之後幾乎不會失活。相對峰值電流為 1.40 ± 0.18 pA/pF ($n=3$ ，第 4a 圖)。藉由施加 5 mM 之鎳可完全且可逆地阻斷電流($91.3 \pm 3.3\%$)。

CHO-NCX2 細胞在反向模式之條件下顯示出外向電流。相對峰值電流為 2.95 ± 0.70 pA/pF ($n=6$ ，第 4b 圖)。電流以 1.26 ± 0.11 秒的時間常數衰減，且藉由施加 5 mM 之鎳可完全且可逆地阻斷電流(洗除： $100.2 \pm 1.9\%$)。

CHO-NCX3 細胞在反向模式之條件下顯示出外向電流，而電流以 0.80 ± 0.08 秒的時間常數衰減。相對峰值電流為 3.46 ± 1.11 pA/pF ($n=4$ ，第 4c 圖)。且藉由施加 5 mM 之鎳可完全且可逆地阻斷電流(洗除： $111.5 \pm 2.4\%$)。典型電流示於第 5 圖。

2.2. 分析參數

2.2.1. NCX1 分析法

用以分析「反向」模式之以 HTS 為基礎的 NCX1 分析法並未見諸文獻。短桿菌肽的施加方法則可從膜片鉗制和螢光測量的組合式實驗知悉。所有的參數均需要被最佳化。由於同時進行的「正向」和「反向」模式分析法之間存在有運用上的彈性，所以「正向」模式分析法中所使用的緩衝液條件(例如 Ca^{2+} 濃度、pH)以及每個培養井內的細胞數目均可適用，並顯現出良好的結果。

第一項實驗係檢驗短桿菌肽的濃度和儲存條件對於 NCX1 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響(第 6a、b 圖)。

從 S/B 和 z' 變數觀之, 20 μM 的短桿菌肽濃度對於 Ca^{2+} -輸入活性展現出最佳的結果。較低的濃度由於具有低度的動力學而顯得不足夠, 而較高濃度則造成細胞副作用(第 6a、b 圖)。工具化合物 A000135933 的 IC_{50} 值(亦見於第 11a、b 圖)不受到不同的短桿菌肽濃度所影響(第 7a 圖)。短桿菌肽溶於乙醇中, 而該溶劑的影響必須被鑑定。最高為 2% 的乙醇顯示出不會影響分析法中之背景螢光值, 而濃度增加則致使螢光略為增強(第 7b 圖)。

短桿菌肽溶液的製備和儲存乃是一重要步驟, 因為短桿菌肽在高溫下會降解。在後續實驗中, 短桿菌肽被溶解並儲存於不同溫度。短桿菌肽溶液必須被製備並儲存在 4 $^{\circ}\text{C}$, 否則短桿菌肽會極為快速地降解(第 8 圖)。

移液管高度、預浸和混合等不同 FLIPR 設定值均被檢驗, 以改善 S/B 和 z' 變數(第 9a、b 圖)。70 μl 的移液管高度以及兩個混合循環可達成最佳的 z' 變數。

利用前述參數針對化合物之培育情形來檢驗二種溫度(16 和 22 $^{\circ}\text{C}$)(第 10a 圖)。16 $^{\circ}\text{C}$ 可獲得最佳結果, 而從 S/B、 z' 和 IC_{50} 的結果(A000135933)觀之, 最佳培育時間為 45 分鐘(第 10b 圖)。

「反向」模式分析法的一個關鍵需求在於化合物的敏感性。NCX1 方案的工具化合物為 A000135933, 以「正向」模式分析法進行篩選所得到的一種亞胺噻唑。該化合物在

「正向」分析法中具有一為 $5.9\ \mu\text{M}$ 的 IC_{50} 值，在膜片鉗制實驗中則為 $1.44\ \mu\text{M}$ 。該化合物在「正向」分析法中作為基準對照組。在「反向」分析法中，A000135933 於不同的短桿菌肽濃度下接受測試，以檢驗其效應。第 11a 和 b 圖顯示對於經 $20\ \mu\text{M}$ 短桿菌肽活化後之 NCX1 活性的典型抑制效應，以及經計算所得之劑量反應關係。

從基準體(A000135933)的 S/B 和 IC_{50} 觀之，NCX1 細胞株具有安定性達 2 個月。

工具化合物 A000135933 對於 NCX1 之 Ca^{2+} -輸入活性的效應示於第 11a 圖，且 IC_{50} 位於 $1\ \mu\text{M}$ 左右(第 11b 圖)。z' 值位於 0.7 和 0.8 之間。為了將本分析法(「反向」)與螢光為主之細胞 Ca^{2+} -輸出模式分析法(「正向」)以及一種被稱為 SURFE²R 的電生理技術(離子閘生技公司，法蘭克福市)進行比較，將 18 種化合物的 IC_{50} 以及 11 種化合物在 $10\ \mu\text{M}$ 下的抑制效應分別予以測試(第 12a、b 圖)。

「反向」分析法通常較「正向」分析法更敏感 3-5 倍(第 12a 圖，黑點)，且數據以一為 0.86 的 r^2 值彼此相關。一些化合物並未展現顯著升高的抑制性(第 8a 圖，紅點)。其他的化合物則以遠為更高的效力抑制 NCX1(第 8a 圖，藍點)，這或許為一種輸送模式專一性效應。「反向」分析中所得之化合物在 $10\ \mu\text{M}$ 下的抑制百分率高於(達 20%) SURFE²R 所得數值(第 12b 圖)，但與 SURFE²R 技術之間具有良好相關性，具有一為 0.83 的 r^2 。

2.2.2. NCX2 分析法

用以分析「正向」或「反向」模式的 NCX2 分析法並未見諸文獻。由於分析法的敏感度和效果有限，「正向模式」分析法並未成功地建立。為求清楚起見，本說明書未就此
5 出示數據。「反向」模式分析法係以短桿菌肽的施加為基礎。短桿菌肽形成可通透鹼金族金屬的孔洞。由短桿菌肽所引發的 Ca^{2+} 流入是間接且呈現 NCX 依賴性的。添加短桿菌肽後的 NCX1 活化載述於針對原代神經元所進行的放射性離子流動或螢光測量實驗中(Kiedrowski et al., Journal of
10 Neurochemistry, 2004)。由於針對不同亞型所同時進行的 NCX 分析法之間存在有相容性，所以「反向」模式 NCX1 分析法中所使用的緩衝液條件(例如 Ca^{2+} 濃度、pH)、細胞數目、培育時間以及短桿菌肽濃度均適用於 NCX2 分析法中。

15 第一項實驗係檢驗緩衝液條件、培育時間、短桿菌肽濃度和儲存條件對於 NCX2 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響(第 13a、b 圖)。

NCX2 在螢光增加之動力學上略慢於 NCX1。測量時間必須延長至 10 分鐘。這些緩衝液系統、細胞數目、培育時間、短桿菌肽濃度(20 μM)和儲存條件顯示出極為良好的結果。這些參數無需進一步最佳化。短桿菌肽溶於乙醇中，
20 而該溶劑的影響必須被鑑定。最高為 3% 的乙醇顯示出不會影響分析法中之背景螢光值(第 14 圖)。

「反向」模式分析法的一個關鍵需求在於化合物的敏

感性，但並沒有工具化合物針對 NCX2 所進行的電生理數據。NCX1 方案的主要工具化合物為 A000135933，其為 NCX1-篩選中所得的一種亞胺噻唑。該化合物在「反向」分析法中對於 NCX1 具有一為 $1.8\ \mu\text{M}$ 的 IC_{50} 值，在膜片鉗制實驗中則為 $1.44\ \mu\text{M}$ 。將 A000135933 對於經 $20\ \mu\text{M}$ 短桿菌肽活化後之 NCX2 活性的效應予以檢驗(第 16a 圖)。經計算所得之劑量反應關係顯示於第 15b 圖。

從基準體(A000135933)的 S/B 和 IC_{50} 觀之，NCX2 細胞株具有安定性達 2 個月。工具化合物 A000135933 對於 NCX2 之 Ca^{2+} -輸入活性的效應顯示於第 15a 圖，且對於 NCX2 的 IC_{50} ($1.25\pm0.19\ \mu\text{M}$, $n=26$ ，實例第 15b 圖)略低於對於 NCX1 的 IC_{50} ($1.78\pm1.03\ \mu\text{M}$, $n=55$)，顯示該化合物對於 NCX2 更具效力。 z' 值位於 0.75 和 0.85 之間。以 NCX2 「反向模式」分析法來測驗 125 種得自於 NCX1 方案的化合物，並與 NCX1 數據進行比較。其結果概述於第 16 圖。

幾乎所有對於 NCX1 活性有影響的化合物亦會抑制 NCX2 (第 16 圖)。許多化合物以高於 NCX1 超過二倍的效力來抑制 NCX2。僅有 4 種化合物對於 NCX1 具有超過二倍的選擇性。這些數據顯示可能獲得 NCX1 選擇性化合物。

2.2.3. NCX3 分析法

NCX3 分析法並未見諸文獻。由於分析法的敏感度和效果有限，「正向模式」分析法並未成功地建立。為求清楚起見，本說明書未就此出示數據。「反向」模式分析法係以短桿菌肽的施加為基礎。短桿菌肽形成可通透鹼金族金屬

的孔洞。由短桿菌肽所引發的 Ca^{2+} 流入是間接且呈現 NCX 依賴性的。添加短桿菌肽後的 NCX1 活化載述於針對原代神經元所進行的放射性離子流動或螢光測量實驗中 (Kiedrowski et al., Journal of Neurochemistry, 2004)。由於針對不同亞型所同時進行的 NCX 分析法之間存在有相容性，所以「反向」模式 NCX1 分析法中所使用的緩衝液條件(例如 Ca^{2+} 濃度、pH)、細胞數目、培育時間以及短桿菌肽濃度均適用於 NCX3 分析法中。

第一項實驗係檢驗緩衝液條件、培育時間、短桿菌肽濃度和儲存條件對於 NCX3 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響(第 18a、b 圖)。

NCX3 在螢光增加之動力學上相較 NCX1 和 NCX2 為快速。測量時間必須延長至 10 分鐘。這些緩衝液系統、培育時間、短桿菌肽濃度(20 μM)和儲存條件顯示出極為良好的結果。這些參數無需進一步最佳化。短桿菌肽溶於乙醇中，而該溶劑的影響必須被鑑定。最高為 2% 的乙醇顯示出不會影響分析法中之背景螢光值(第 19 圖)，超過 2% 則致使背景螢光值略為增加。

「反向」模式分析法的一個關鍵需求在於化合物的敏感性，但並沒有工具化合物針對 NCX3 所進行的電生理數據。NCX1 方案的主要工具化合物為 A000135933，其為 NCX1-篩選中所得得到的一種亞胺噻唑。該化合物在「反向」分析法中對於 NCX1 具有一為 1.8 μM 的 IC_{50} 值，在膜片鉗制實驗中則為 1.44 μM 。在「反向」分析法中對於 NCX2

的 IC_{50} 為 $1.25\ \mu M$ 。將 A000135933 對於經 $20\ \mu M$ 短桿菌肽活化後之 NCX3 活性的效應予以檢驗(第 21a 圖)。經計算所得之劑量反應關係顯示於第 19b 圖。

從基準體(A000135933)的 S/B 和 IC_{50} 觀之，NCX3 細胞株具有安定性達 2 個月。工具化合物 A000135933 對於 NCX3 之 Ca^{2+} -輸入活性的效應顯示於第 19a 圖，且 IC_{50} 為 $1.63\pm 0.30\ \mu M$ ($n=23$ ，實例第 19b 圖)。這些數據顯示工具化合物對於一特定亞型不具有選擇性(IC_{50} NCX1： 1.78 ± 1.03 ； IC_{50} NCX2： 1.25 ± 0.19)。z' 值位於 0.70 和 0.85 之間。以 NCX3「反向模式」分析法來測驗 125 種得自於 NCX1 方案的化合物，並與 NCX1 和 NCX2 數據進行比較。其結果概述於第 20a 和 20b 圖。

幾乎所有對於 NCX1 活性有影響的化合物亦會抑制 NCX3 (第 20a 圖)。許多化合物以高於 NCX1 超過二倍的效力來抑制 NCX3。6 種化合物對於 NCX1 具有超過二倍的選擇性。相較於 NCX2—9 種化合物對於 NCX2 更具效力，而 2 種物質對於 NCX3 較為有效(第 20b 圖)。這些數據顯示可能獲得 NCX 亞型的選擇性化合物。

【圖式簡單說明】

第 1 圖：

(a)NCX1 的胺基酸序列，以序列辨識編號第 1 號來表示；

(b)NCX2 的胺基酸序列，以序列辨識編號第 2 號來表示；

(c)NCX3 的胺基酸序列，以序列辨識編號第 3 號來表示。

第 2 圖：CHO-K1 細胞在添加 2 mM Ca^{2+} 之後的峰值電流 ($n=3$)。

5 第 3 圖：CHO-K1 細胞在添加 2 mM Ca^{2+} 並施加 5 mM 鎳之後的典型電流。

第 4 圖：

(a) CHO-NCX1 細胞在添加 2 mM Ca^{2+} 之後的峰值電流 ($n=3$)；

10 (b) CHO-NCX2 細胞在添加 2 mM Ca^{2+} 之後的峰值電流 ($n=6$)；

(c) CHO-NCX3 細胞在添加 2 mM Ca^{2+} 之後的峰值電流 ($n=6$)。

第 5 圖：

15 (a) CHO-NCX1 細胞在添加 2 mM Ca^{2+} 、施加 5 mM 鎳並進行洗除之後的典型電流；

(b) CHO-NCX2 細胞在添加 2 mM Ca^{2+} 、施加 5 mM 鎳並進行洗除之後的典型電流；

20 (c) CHO-NCX3 細胞在添加 2 mM Ca^{2+} 、施加 5 mM 鎳並進行洗除之後的典型電流；。

第 6 圖：

(a)不同濃度的短桿菌肽(— 0 μM , 10 μM , --- 15 μM , ···· 20 μM 以及 ——25 μM)對於 NCX1 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響。添加 NCX1 抑制劑 A000135933 的效應顯示在含

有 20 μM 短桿菌肽下(●---)；

(b)不同濃度的短桿菌肽(10 μM 、15 μM 、20 μM 以及 25 μM)在不含有(■，高對照組)和含有(■，低對照組)10 μM 之 NCX1 抑制劑 A000135933 下對於 NCX1 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響。z'變數被標註為▼。

第 7 圖：

(a)不同濃度的短桿菌肽(10 μM 、15 μM 、20 μM 以及 25 μM)對於 NCX1 抑制劑 A000135933 之 IC_{50} (■)的影響；

(b)在沒有短桿菌肽的刺激下，不同濃度的乙醇在不含有(■)或含有(■)NCX 抑制劑 A000135933 之下對於 CHO-NCX1 細胞的 Fluo4-螢光的影響。

第 8 圖：被溶解並儲存在不同溫度下的 20 μM 短桿菌肽在不含有 NCX1 抑制劑 A000135933(■，高對照組)和含有 10 μM 之 A000135933 (■，低對照組)之下對於 NCX1 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響。

第 9 圖：

(a)不同移液管高度下的高對照組(■，緩衝液)、低對照組(■，10 μM A000135933)和 z'-變數(▼)；

(b)不同數目的混合循環下的高對照組(■，緩衝液)、低對照組(■，10 μM A000135933)和 z'-變數(▼)。

第 10 圖：

(a)化合物培育期間(30 分鐘)不同溫度下的高對照組(■，緩衝液)、低對照組(■，10 μM A000135933)和 z'-變數(▼)；

(b) 在 16°C 下經歷不同化合物培育時間的高對照組 (■, 緩衝液)、低對照組 (■, $10\ \mu\text{M}$ A000135933) 和 z' -變數 (▼)。

第 11 圖：

(a) 不同濃度的 A000135933 ($\cdots\cdots 30\ \mu\text{M}$, $--- 15\ \mu\text{M}$, $\cdots\cdots 7.5\ \mu\text{M}$, $—— 3.75\ \mu\text{M}$, $\cdot\cdot\cdot\cdot 1.88\ \mu\text{M}$, $--- 0.94\ \mu\text{M}$, $—— 0.5\ \mu\text{M}$) 在添加 $20\ \mu\text{M}$ 短桿菌肽之後 (培育: 22°C , 30 分鐘) 對於 NCX1 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響；

(b) A000135933 的劑量反應關係。IC₅₀ 值為 $0.97\ \mu\text{M}$ 。

第 12 圖：

(a) 18 種接受螢光為主之細胞 Ca^{2+} -輸出 (「正向」) 和 Ca^{2+} -輸入 (「反向」) 分析法的化合物之 IC₅₀ 相關性；

(b) 11 種接受螢光為主之細胞 Ca^{2+} -輸入分析法 (「反向」) 和電生理 SURFE²R 技術的化合物在 $10\ \mu\text{M}$ 下之 % 抑制率相關性。

第 13 圖：

(a) 相對於 NCX1 ($\cdots\cdots$), NCX2 在不含有 (——) 和含有 (---) $20\ \mu\text{M}$ 之短桿菌肽下的 Ca^{2+} -輸入活性。添加 NCX 抑制劑 A000135933 對於 NCX2 活性的效應顯示在含有 $20\ \mu\text{M}$ 短桿菌肽下 ($\cdots\cdots$)；

(b) $20\ \mu\text{M}$ 短桿菌肽在不含有 (■, 高對照組) 和含有 (■, 低對照組) $10\ \mu\text{M}$ 之 NCX1 抑制劑 A000135933 下在 5 日內對於 NCX2 之 Ca^{2+} -輸入活性的效應。 z' 變數被標註為 ▼。

第 14 圖：在沒有短桿菌肽的刺激下，不同濃度的乙醇對於 CHO-NCX2 細胞的 Fluo4-螢光的影響(■)。

第 15 圖：

(a)不同濃度的 A000135933 (——30 μM ，--- 15 μM ，
5 --- 7.5 μM ，……3.75 μM ，·-·-·-1.88 μM ，·-·-·- 0.94 μM ，
—— 0.5 μM 以及—— 0 μM) 在添加 20 μM 短桿菌肽之後(培
育：22°C，45 分鐘)對於 NCX2 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響；

(b) A000135933 的劑量反應關係。其在此實例中之 IC_{50}
10 值為 1.4 μM 。

第 16 圖：125 種化合物對於 NCX2 和 NCX1 之 IC_{50} 的
比較。這些化合物係以螢光為主之細胞 Ca^{2+} -輸入分析法
(「反向」)來測試。暗灰色線(——)標示出相等效力線，而淡
灰色虛線(---)指出對於一特定亞型的二倍效力分隔線。

第 17 圖：

(a)相對於 NCX1 (——)和 NCX2 (……)，NCX3 在不含有
15 (·-·-·-)和含有(---) 20 μM 之短桿菌肽下的 Ca^{2+} -輸入活
性。添加 NCX 抑制劑 A000135933 對於 NCX3 活性的效應
顯示在含有 20 μM 短桿菌肽下(——)；

(b) 20 μM 短桿菌肽在不含有(■，高對照組)和含有
20 (■，低對照組) 10 μM 之 NCX 抑制劑 A000135933 下在 5
日內對於 NCX3 之 Ca^{2+} -輸入活性的效應。z'變數被標註為
▼。

第 18 圖：在沒有短桿菌肽的刺激下，不同濃度的乙醇
對於 CHO-NCX3 細胞的 Fluo4-螢光的影響(■)。

第 19 圖：

(a)不同濃度的 A000135933 (……30 μM , ·-·-·- 15 μM , --- 7.5 μM , ·-·-·- 3.75 μM , --- 1.88 μM , 0.94 μM , — 0.5 μM 以及—— 0 μM) 在添加 20 μM 短桿菌肽之後(培育：22°C，45 分鐘)對於 NCX3 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響；

(b) A000135933 的劑量反應關係。其在此實例中之 IC_{50} 值為 1.76 μM 。

第 29 圖：

(a) 125 種化合物對於 NCX3 和 NCX1 之 IC_{50} 的比較。這些化合物係以螢光為主之細胞 Ca^{2+} -輸入分析法(「反向」)來測試。暗灰色線(—)標示出相等效力線，而淡灰色虛線(---)指出對於一特定亞型的二倍效力分隔線；

(b) 125 種化合物對於 NCX3 和 NCX2 之 IC_{50} 的比較。這些化合物係以螢光為主之細胞 Ca^{2+} -輸入分析法(「反向」)來測試。暗灰色線(—)標示出相等效力線，而淡灰色虛線(---)指出對於一特定亞型的二倍效力分隔線；

【主要元件符號說明】

無

序列表

- <110> 賽諾菲安萬特(sanofi-aventis)
 <120> 檢測鈉/鈣交換劑(NCX)“反向模式”調節的化合物之螢光為主的分析法
 <130> DE2008/024
 5 <150> 08290265.1
 <151> 2008-03-20
 <160> 3
 <170> PatentIn 第 3.3 版
 <210> 1
 10 <211> 973
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1

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

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

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

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

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

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

Asp Arg Phe Met Ser Ser Ile Glu Val Ile Thr Ser Gln Glu Lys Glu
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

DE2008-024.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE2008-024.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE2008-024.ST25.txt

Phe Ile Gly Asp Leu Ala Ser His Phe Gly Cys Thr Ile Gly Leu Lys
820 825 830
Asp Ser Val Thr Ala Val Val Phe Val Ala Leu Gly Thr Ser Val Pro
835 840 845
Asp Thr Phe Ala Ser Lys Val Ala Ala Thr Gln Asp Gln Tyr Ala Asp
850 855 860
Ala Ser Ile Gly Asn Val Thr Gly Ser Asn Ala Val Asn Val Phe Leu
865 870 875 880
Gly Ile Gly Val Ala Trp Ser Ile Ala Ala Ile Tyr His Ala Ala Asn
885 890 895
Gly Glu Gln Phe Lys Val Ser Pro Gly Thr Leu Ala Phe Ser Val Thr
900 905 910
Leu Phe Thr Ile Phe Ala Phe Ile Asn Val Gly Val Leu Leu Tyr Arg
915 920 925
Arg Arg Pro Glu Ile Gly Gly Glu Leu Gly Gly Pro Arg Thr Ala Lys
930 935 940
Leu Leu Thr Ser Cys Leu Phe Val Leu Leu Trp Leu Leu Tyr Ile Phe
945 950 955 960
Phe Ser Ser Leu Glu Ala Tyr Cys His Ile Lys Gly Phe
965 970

<210> 2
<211> 921
<212> PRT
5 <213> 智人
<400> 2

Met Ala Pro Leu Ala Leu Val Gly Val Thr Leu Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10 15
Pro Cys Ser Gly Ala Ala Thr Pro Thr Pro Ser Leu Pro Pro Pro Pro
20 25 30
Ala Asn Asp Ser Asp Thr Ser Thr Gly Gly Cys Gln Gly Ser Tyr Arg
35 40 45
Cys Gln Pro Gly Val Leu Leu Pro Val Trp Glu Pro Asp Asp Pro Ser
50 55 60
Leu Gly Asp Lys Ala Ala Arg Ala Val Val Tyr Phe Val Ala Met Val
65 70 75 80
Tyr Met Phe Leu Gly Val Ser Ile Ile Ala Asp Arg Phe Met Ala Ala
85 90 95
Ile Glu Val Ile Thr Ser Lys Glu Lys Glu Ile Thr Ile Thr Lys Ala
100 105 110

DE2008-024.ST25.txt

Asn Gly Glu Thr Ser Val Gly Thr Val Arg Ile Trp Asn Glu Thr Val
 115 120 125
 Ser Asn Leu Thr Leu Met Ala Leu Gly Ser Ser Ala Pro Glu Ile Leu
 130 135 140
 Leu Ser Val Ile Glu Val Cys Gly His Asn Phe Gln Ala Gly Glu Leu
 145 150 155 160
 Gly Pro Gly Thr Ile Val Gly Ser Ala Ala Phe Asn Met Phe Val Val
 165 170 175
 Ile Ala Val Cys Ile Tyr Val Ile Pro Ala Gly Glu Ser Arg Lys Ile
 180 185 190
 Lys His Leu Arg Val Phe Phe Val Thr Ala Ser Trp Ser Ile Phe Ala
 195 200 205
 Tyr Val Trp Leu Tyr Leu Ile Leu Ala Val Phe Ser Pro Gly Val Val
 210 215 220
 Gln Val Trp Glu Ala Leu Leu Thr Leu Val Phe Phe Pro Val Cys Val
 225 230 235 240
 Val Phe Ala Trp Met Ala Asp Lys Arg Leu Leu Phe Tyr Lys Tyr Val
 245 250 255
 Tyr Lys Arg Tyr Arg Thr Asp Pro Arg Ser Gly Ile Ile Ile Gly Ala
 260 265 270
 Glu Gly Asp Pro Pro Lys Ser Ile Glu Leu Asp Gly Thr Phe Val Gly
 275 280 285
 Ala Glu Ala Pro Gly Glu Leu Gly Gly Leu Gly Pro Gly Pro Ala Glu
 290 295 300
 Ala Arg Glu Leu Asp Ala Ser Arg Arg Glu Val Ile Gln Ile Leu Lys
 305 310 315 320
 Asp Leu Lys Gln Lys His Pro Asp Lys Asp Leu Glu Gln Leu Val Gly
 325 330 335
 Ile Ala Asn Tyr Tyr Ala Leu Leu His Gln Gln Lys Ser Arg Ala Phe
 340 345 350
 Tyr Arg Ile Gln Ala Thr Arg Leu Met Thr Gly Ala Gly Asn Val Leu
 355 360 365
 Arg Arg His Ala Ala Asp Ala Ser Arg Arg Ala Ala Pro Ala Glu Gly
 370 375 380
 Ala Gly Glu Asp Glu Asp Asp Gly Ala Ser Arg Ile Phe Phe Glu Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Tyr His Cys Leu Glu Asn Cys Gly Ser Val Leu Leu Ser Val

405

410

415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE2008-024.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Tyr Cys His Ile Arg Gly Phe
915 920

- <210> 3
- <211> 924
- <212> PRT
- <213> 智人
- <400> 3

5

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

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

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

DE2008-024.ST25.txt

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

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

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

Arg Phe Met Ala Ser Ile Glu Val Ile Thr Ser Gln Glu Arg Glu Val
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE2008-024.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE2008-024.ST25.txt

Leu Gly Glu His Pro Lys Leu Glu Val Ile Ile Glu Glu Ser Tyr Glu
 660 665 670
 Phe Lys Thr Thr Val Asp Lys Leu Ile Lys Lys Thr Asn Leu Ala Leu
 675 680 685
 Val Val Gly Thr His Ser Trp Arg Asp Gln Phe Met Glu Ala Ile Thr
 690 695 700
 Val Ser Ala Ala Gly Asp Glu Asp Glu Asp Glu Ser Gly Glu Glu Arg
 705 710 715 720
 Leu Pro Ser Cys Phe Asp Tyr Val Met His Phe Leu Thr Val Phe Trp
 725 730 735
 Lys Val Leu Phe Ala Cys Val Pro Pro Thr Glu Tyr Cys His Gly Trp
 740 745 750
 Ala Cys Phe Ala Val Ser Ile Leu Ile Ile Gly Met Leu Thr Ala Ile
 755 760 765
 Ile Gly Asp Leu Ala Ser His Phe Gly Cys Thr Ile Gly Leu Lys Asp
 770 775 780
 Ser Val Thr Ala Val Val Phe Val Ala Phe Gly Thr Ser Val Pro Asp
 785 790 795 800
 Thr Phe Ala Ser Lys Ala Ala Ala Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asp Ala
 805 810 815
 Ser Ile Gly Asn Val Thr Gly Ser Asn Ala Val Asn Val Phe Leu Gly
 820 825 830
 Ile Gly Leu Ala Trp Ser Val Ala Ala Ile Tyr Trp Ala Leu Gln Gly
 835 840 845
 Gln Glu Phe His Val Ser Ala Gly Thr Leu Ala Phe Ser Val Thr Leu
 850 855 860
 Phe Thr Ile Phe Ala Phe Val Cys Ile Ser Val Leu Leu Tyr Arg Arg
 865 870 875 880
 Arg Pro His Leu Gly Gly Glu Leu Gly Gly Pro Arg Gly Cys Lys Leu
 885 890 895
 Ala Thr Thr Trp Leu Phe Val Ser Leu Trp Leu Leu Tyr Ile Leu Phe
 900 905 910
 Ala Thr Leu Glu Ala Tyr Cys Tyr Ile Lys Gly Phe
 915 920

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98108689 $G01N\ 33/58$ (2006.01)
 ※申請日：98.3.18 ※IPC 分類： $G01N\ 33/68$ (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

檢測鈉/鈣交換劑(NCX)“反向模式”調節的化合物之螢光為主的分析法

FLUORESCENCE BASED ASSAY TO DETECT
 SODIUM/CALCIUM EXCHANGER (NCX) “REVERSE MODE”
 MODULATING COMPOUNDS

二、中文發明摘要：

轉運蛋白是深具潛力的新興標的家族，提供科學和經濟上的機會。鈉/鈣交換劑是一種用以從各種各樣的細胞中移出 Ca^{2+} 的重要機轉。在心臟中，它使得已經由 Ca^{2+} 通道進入的 Ca^{2+} 流出以啟動收縮作用，同時 Na^+ 進入心臟細胞。鑑定出不僅可調節鈉/鈣交換劑之鈣輸出活性(正向模式)亦可調節鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性(反向模式)的化合物具有顯著的利益。本發明係關於一種用以檢測 NCX 的“反向模式”調節化合物之螢光為主的分析法。本發明又關於一種包含有表現出 NCX 之細胞的部件套組，以及該部件套組在測試一化合物作為 NCX 之促效劑或拮抗劑的活性上之用途。

三、英文發明摘要：

Transporters are an emerging target family with enormous potential, offering scientific and economic opportunities. The sodium/calcium exchanger is an important mechanism for removing Ca^{2+} from diverse cells. In heart, it extrudes Ca^{2+} that has entered through Ca^{2+} channels to initiate contraction, while Na^{+} enters the heart cell. It is of considerable interest to identify compounds that modulate, not only the calcium export activity (forward mode), but also the calcium import activity (reverse mode) of sodium/calcium exchangers. The present invention is directed to a fluorescence-based assay for detecting NCX “reverse mode” modulating compounds. It further refers to a kit of parts comprising cells expressing NCX and the use of the kit of parts to test a compound for activity as an agonist or antagonist of NCX.

七、申請專利範圍：

1. 一種用以測定一鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性的分析法，其包含：
 - a) 提供表現出一鈉/鈣交換劑的細胞；
 - b) 提供一用以測定胞內鈣的呈色物質；
 - c) 令細胞與一鈉/鈣交換劑之活化劑相接觸；以及
 - d) 將該呈色物質受鈣調控所產生之發光訊號變化與一對照組實驗所產生的一發光訊號進行比較。
2. 如申請專利範圍第 1 項之分析法，其中該鈉/鈣交換劑為下列名單中之一種 NCX 蛋白：NCX1、NCX2、NCX3；或是下列名單中之一種 NCKX 蛋白：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5。
3. 如申請專利範圍第 1 項之分析法，其中該鈉/鈣交換劑為下列名單中之一種 NCX 蛋白：NCX1、NCX2、NCX3。
4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項之分析法，其中該鈉/鈣交換劑具有哺乳動物來源，較佳為源自於大鼠、小鼠、犬、牛、豬、猿或人。
5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項之分析法，其中該等細胞係選自於由 CHO、HEK、COS7 及 JURKAT 細胞所構成的群組中。
6. 如申請專利範圍第 1 至 5 項之分析法，其中該呈色物質係呈一可進入細胞且被水解成一染料的染料前驅物而被添加於細胞中，藉此，該染料與鈣在該等細胞內相複合並提供一發光訊號。

7. 如申請專利範圍第 1 至 6 項之分析法，其中該發光訊號為螢光，且該監測步驟 c) 運用一個 FLIPR 裝置。
8. 如申請專利範圍第 6 項之分析法，其中該染料前驅物為一種乙醯氧甲酯衍生物。
9. 如申請專利範圍第 6 項之分析法，其中該染料為鈣敏性螢光染料 fluo-4。
10. 一種如申請專利範圍第 1 至 9 項之分析法的用途，其係用以測試一化合物作為一鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性的促效劑或拮抗劑之活性。
11. 一種如申請專利範圍第 1 至 9 項之分析法的用途，其係用以診斷一伴隨鈉/鈣交換劑的變化表現而發生的疾病。
12. 一種用以測定一鈉/鈣交換劑對於一化合物之添加所反應的鈣輸入活性之分析法，其包含：
 - a) 提供表現出一鈉/鈣交換劑的細胞；
 - b) 提供一用以測定胞內鈣的呈色物質；
 - c) 令細胞與一化合物相接觸，其中該等細胞在接受該化合物處理之前，已經先被一鈉/鈣交換劑之活化劑所處理；以及
 - d) 將該呈色物質受鈣調控所產生之發光訊號變化與一對照組實驗所產生的一發光訊號進行比較。
13. 如申請專利範圍第 12 項之分析法，其中該鈉/鈣交換劑為下列名單中之一種 NCX 蛋白：NCX1、NCX2、NCX3；或是下列名單中之一種 NCKX 蛋白：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5。

14. 如申請專利範圍第 12 項之分析法，其中該鈉/鈣交換劑為下列名單中之一種 NCX 蛋白：NCX1、NCX2、NCX3。
15. 如申請專利範圍第 12 至 14 項之分析法，其中該鈉/鈣交換劑具有哺乳動物來源，較佳為源自於大鼠、小鼠、犬、牛、豬、猿或人。
16. 如申請專利範圍第 12 至 15 項之分析法，其中該等細胞係選自於由 CHO、HEK、COS7 及 JURKAT 細胞所構成的群組中。
17. 如申請專利範圍第 12 至 16 項之分析法，其中該呈色物質係呈一可進入細胞且被水解成一染料的染料前驅物而被添加於細胞中，藉此，該染料與鈣在該等細胞內相複合並提供一發光訊號。
18. 如申請專利範圍第 12 至 17 項之分析法，其中該發光訊號為螢光，且該監測步驟 c) 運用一個 FLIPR 裝置。
19. 如申請專利範圍第 17 項之分析法，其中該染料前驅物為一種乙醯氧甲酯衍生物。
20. 如申請專利範圍第 17 項之分析法，其中該染料為鈣敏性螢光染料 fluo-4。
21. 如申請專利範圍第 12 至 20 項之分析法，其中該化合物為一鈉/鈣交換劑之拮抗劑。
22. 一種部件套組，其包含：
 - a) 表現出一鈉/鈣交換劑的冷凍乾燥細胞；
 - b) 一呈色物質；
 - c) 一化合物緩衝液；以及

d)一呈色物質緩衝液。

23. 如申請專利範圍第 22 項之部件套組，其中該呈色物質為鈣敏性螢光染料 fluo-4。
24. 如申請專利範圍第 22 及 23 項之部件套組，其中該鈉/鈣交換劑為下列名單中之一種 NCX 蛋白：NCX1、NCX2、NCX3；或是下列名單中之一種 NCKX 蛋白：NCKX1、NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5。
25. 如申請專利範圍第 22 及 23 項之部件套組，其中該鈉/鈣交換劑為下列名單中之一種 NCX 蛋白：NCX1、NCX2、NCX3。
26. 如申請專利範圍第 24 至 25 項之部件套組，其中該鈉/鈣交換劑具有哺乳動物來源，較佳為源自於大鼠、小鼠、犬、牛、豬、猿或人。
27. 一種如申請專利範圍第 22 至 26 項之部件套組的用途，其係用以測試一化合物作為一鈉/鈣交換劑之鈣輸入活性的促效劑或拮抗劑之活性。
28. 一種如申請專利範圍第 22 至 26 項之部件套組的用途，其係用以診斷一伴隨鈉/鈣交換劑的變化表現而發生的疾病。

八、圖式：

第 1 圖

(a) 序列辨識編號第 1 號：

MYNMRRLSLS	PTFSMGFHL	VTVSLLFSHV	DHVIAETEME	GEGNETGECT	GSYYCKKGV	60
LPIWEPQDPS	FGDKIARATV	YFVAMVYMFL	GVSIIADRFM	SSIEVITSQE	KEITIKKPNG	120
ETTKTTVRIW	NETVSNLTLM	ALGSSAPEIL	LSVIEVCGHN	FTAGDLGPST	IVGSAAFNMF	180
IIIALCVYV	PDGETRRIKH	LRVFFVTAAW	SIFAYTWLYI	ILSVISPGVV	EVWEGLLTFF	240
FFPICVFAW	VADRRLLFYK	YVYKRYRAGK	QRGMIEHEG	DRPSSKTEIE	MDGKVVNSHV	300
ENFLDGAFLV	EVDERDQDDE	EARREMARIL	KELKQKHPDK	EIEQLIELAN	YQVLSQQQKS	360
RAFYRIQATR	LMTGAGNLIK	RHAADQARKA	VSMHEVNTTEV	TENDPVSKIF	FEQGTQCLE	420
NCGTVALTII	RRGGDLTNTV	FVDFRTEDGT	ANAGSDYEFT	EGTVVFKPGD	TQKEIRVGII	480
DDDI FEEDEN	FLVHLSNVKV	SSEASEDGIL	EANHVSTLAC	LGSPSTATVT	IFDDDHAGIF	540
TFEFPVTHVS	ESIGIMEVKV	LRTSGARGNV	IVPYKTIEGT	ARGGGEDFED	TCGELEFQND	600
EIVKTISVKV	IDDEEYEKNK	TFFLEIGEPR	LVEMSEKKAL	LLNELGGFTI	TGKYLFGQPV	660
FRKVHAREHP	ILSTVITIAD	EYDDKQPLTS	KEEEERRIAE	MGRPILGEHT	KLEVIIIEESY	720
EFKSTVDKLI	KKTNLALVVG	TNSWREQFIE	AITVSAGEDD	DDDECGEELK	PSCFDYVMHF	780
LTVFWKVLFA	FVPPTTEYWN	WACFIVSILM	IGLLTAFIGD	LASHFGCTIG	LKDSVTAVVF	840
VALGTSVPDT	FASKVAATQD	QYADASIGNV	TGSNAVNVFL	GIGVAWSIAA	IYHAANGEQF	900
KVSPGTLAFS	VTLFTIFAFI	NVGVLRYRRR	PEIGGELGGP	RTAKLLTSCL	FVLLWLLYIF	960
FSSLEAYCHI	KGF					973

(b) 序列辨識編號第 2 號：

MAPLALVGVT	LLLAAPPCSG	AATPTPSLPP	PPANDSDTST	GGCQGSYRCQ	PGVLLPVWEP	60
DDPSLGDKAA	RAVVYFVAMV	YMFLGVSIIA	DRFMAAIEVI	TSKEKEITIT	KANGETSVGT	120
VRIWNETVSN	LTLMALGSSA	PEILLSVIEV	CGHNFQAGEL	GP GTIVGSAA	FNMVVIIVAVC	180
IYVIPAGESR	KIKHLRVFFV	TASWSIFAYV	WLYLILAVFS	PGVVQVWEAL	LTLVFFPVCV	240
VFAWMADKRL	LFYKYVYKRY	RTDPRSGIII	GAEGDPPKSI	ELDGT FVGAE	APGELGGLGP	300
GPAEARELDA	SRREVIQILK	DLKQKHPDKD	LEQLVGIANY	YALLHQQKSR	AFYRIQATRL	360
MTGAGNVLR	HAADASRRRA	PAEGAGEDED	DGASRIFFEP	SLYHCLENCG	SVLLSVTCQG	420
GEGNSTFYVD	YRTEDGSAKA	GSDYEYSEGT	LVFKPGETQK	ELRIGIIDDD	IFEDEHFFV	480
RLNLNRVGDA	QGMFEPDGGG	RPKGRLVAPL	LATVTILDDD	HAGIFS FQDR	LLHVSECMGT	540
VDVRVVRSSG	ARGTVRLPYR	TVDGTARGGG	VHYEDACGEL	EFGDDETMKT	LQVKIVDDEE	600
YEKKDNFFIE	LGQPQWLKRG	ISALLLNQGD	GDRKLTAEED	EARRIAEMGK	PVLGENCRLE	660
VIIIEESYDFK	NTVDKLIKKT	NLALVIGTHS	WREQFLEAIT	VSAGDEEEEEE	DGSREERLPS	720
CFDYVMHFLT	VFWKVLFAV	PPTEYCHGWA	CFGVSILVIG	LLTALIGDLA	SHFGCTVGLK	780
DSVNAVVFVA	LGTSIPDTFA	SKVAALQDQC	ADASIGNVTG	SNVNVFLGL	GVAWSVAAVY	840
WAVQGRPFV	RTGTLAFSVT	LFTVFAFVGI	AVLLYRRRPH	IGGELGGPRG	PKLATTALFL	900
GLWLLYILFA	SLEAYCHIRG	F				921

(c) 序列辨識編號第 3 號：

```

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

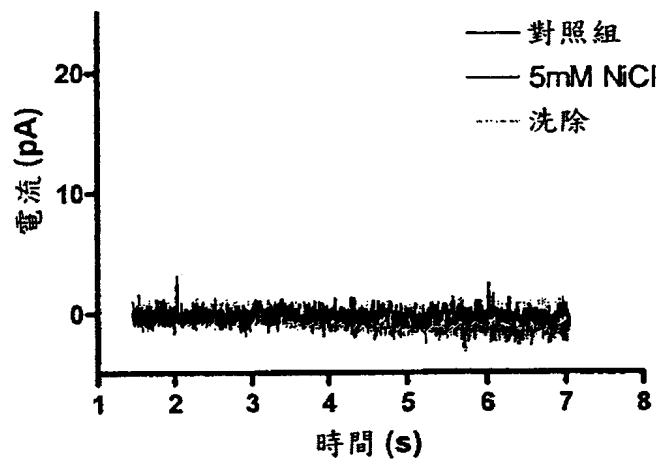
```

第 2 圖

	慢電容 補償 [pF]	峰值電流 [pA]	相對峰值電流 [pA/pF]
平均值	13.00	1.00	0.12
SEM	4.73	0.58	0.07

第 3 圖

CHO- 對照組



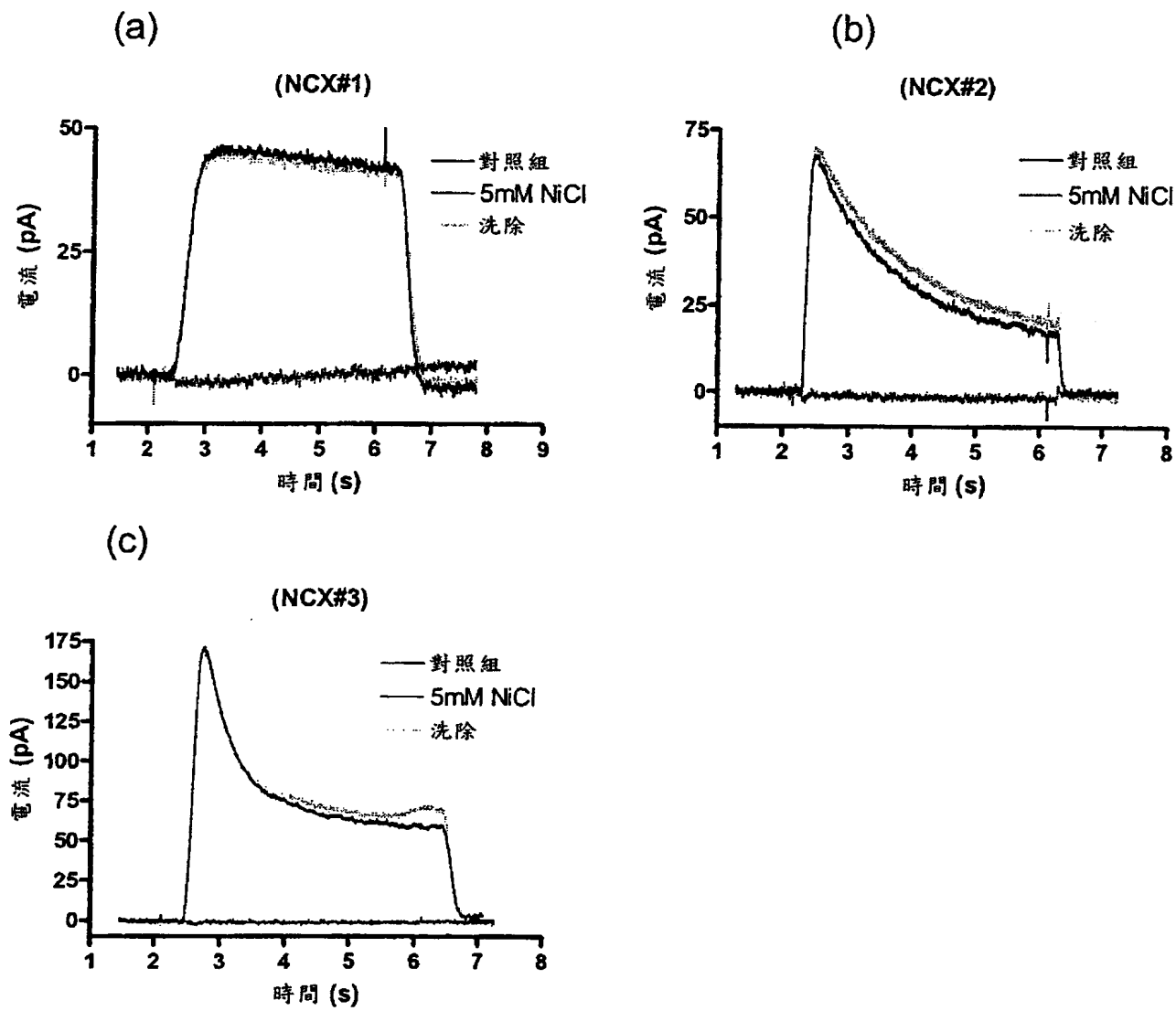
第 4 圖

(a)					
	慢電容補償 [pF]	峰值電流 [pA]	相對峰 值電流 [pA/pF]	輸送電荷量 [pC]	相對電荷 [pC/pF]
平均值	26.20	38.33	1.40	146.48	5.36
SEM	1.93	2.85	0.18	12.49	0.78

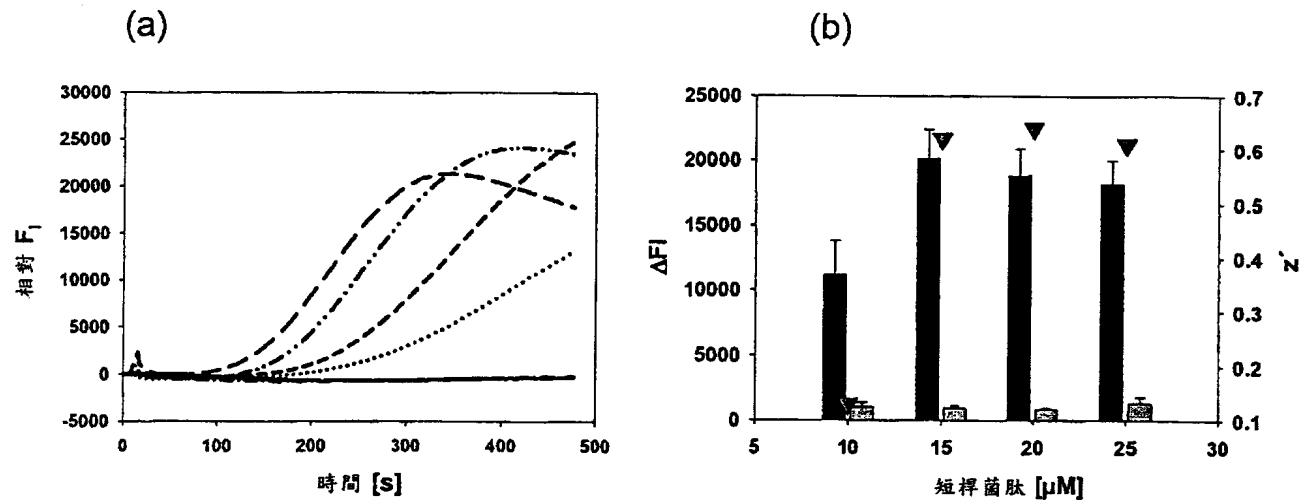
(b)					
	慢電容補償 [pF]	峰值電流 [pA]	相對峰 值電流 [pA/pF]	輸送電荷量 [pC]	相對電荷 [pC/pF]
平均值	22.17	59.50	2.95	119.23	5.99
SEM	2.57	10.90	0.70	27.10	1.67

(c)					
	慢電容補償 [pF]	峰值電流 [pA]	相對峰 值電流 [pA/pF]	輸送電荷量 [pC]	相對電荷 [pC/pF]
平均值	32.35	105.75	3.46	171.53	5.84
SEM	5.60	28.25	1.11	52.93	2.25

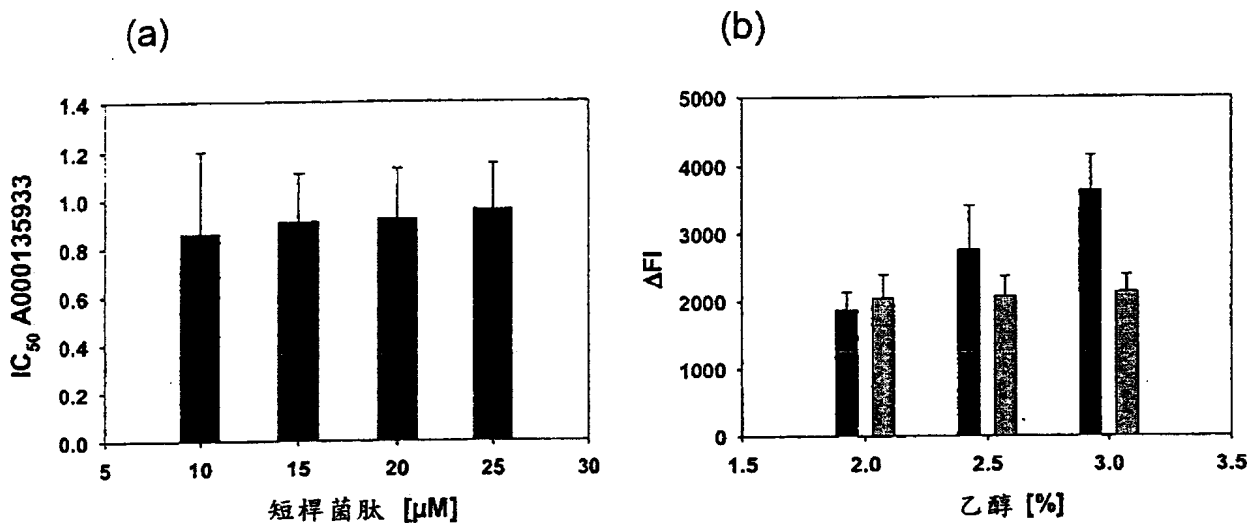
第 5 圖



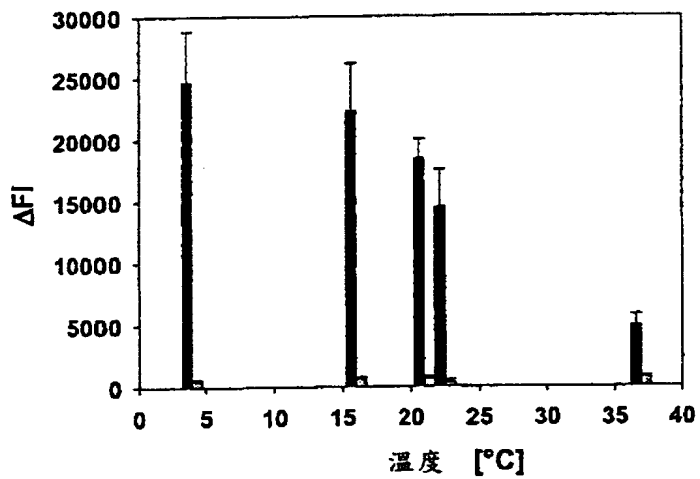
第 6 圖



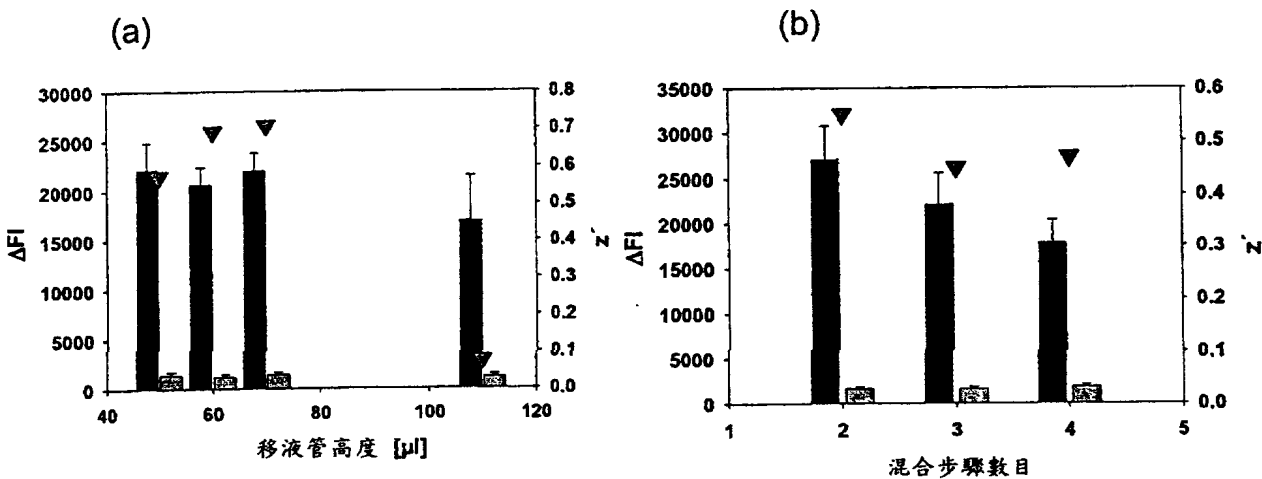
第 7 圖



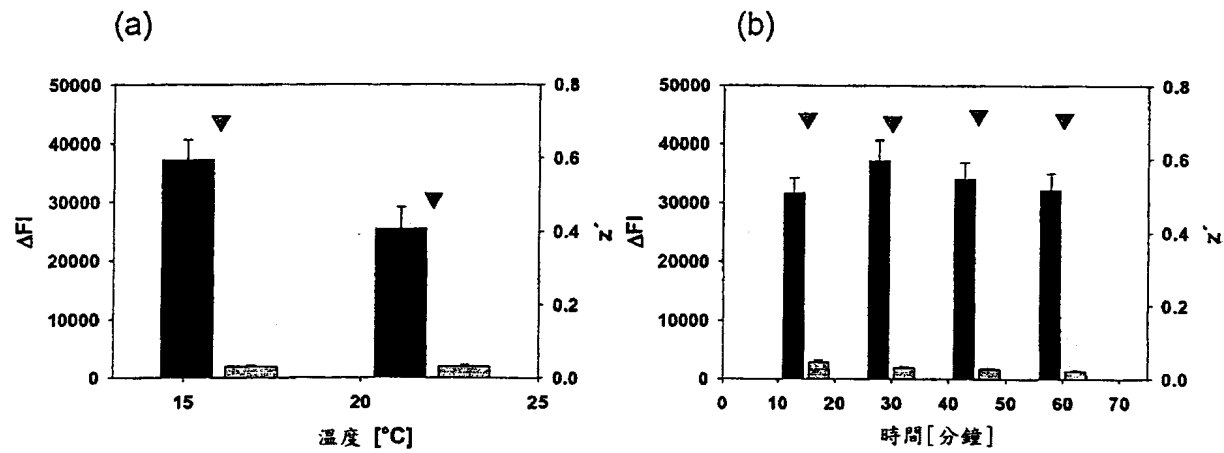
第 8 圖



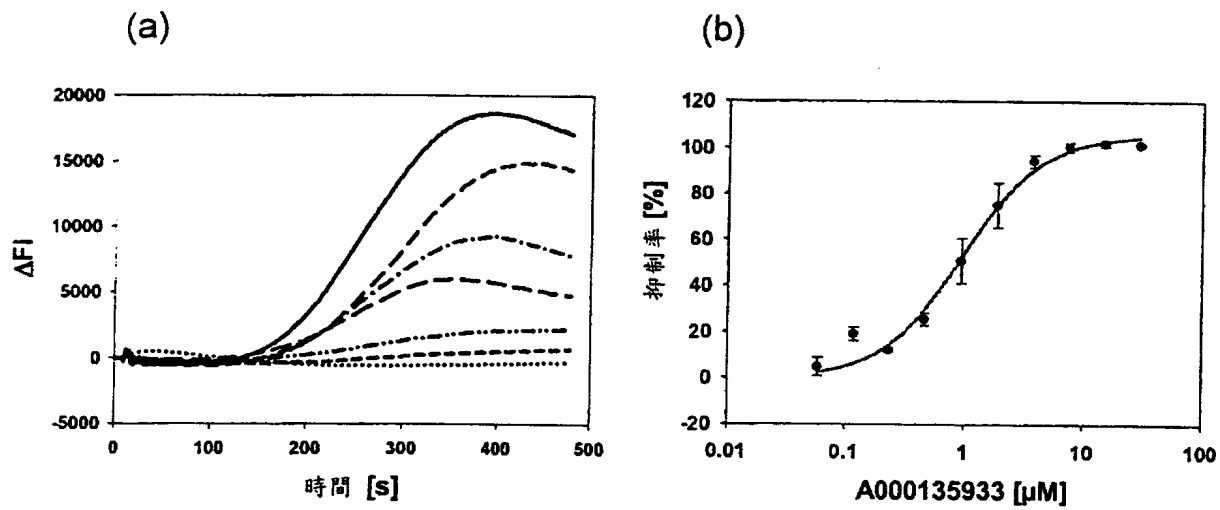
第 9 圖



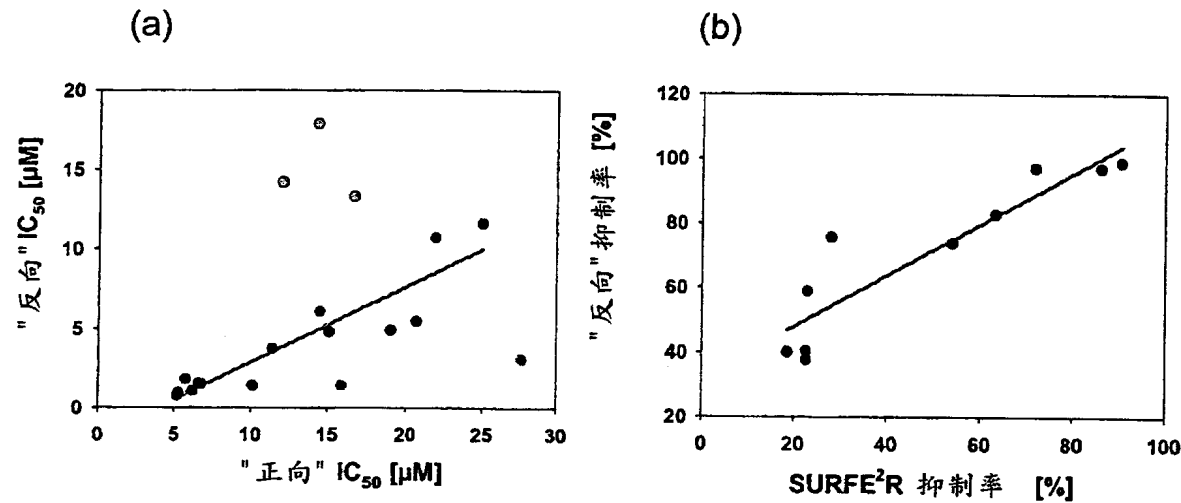
第 10 圖



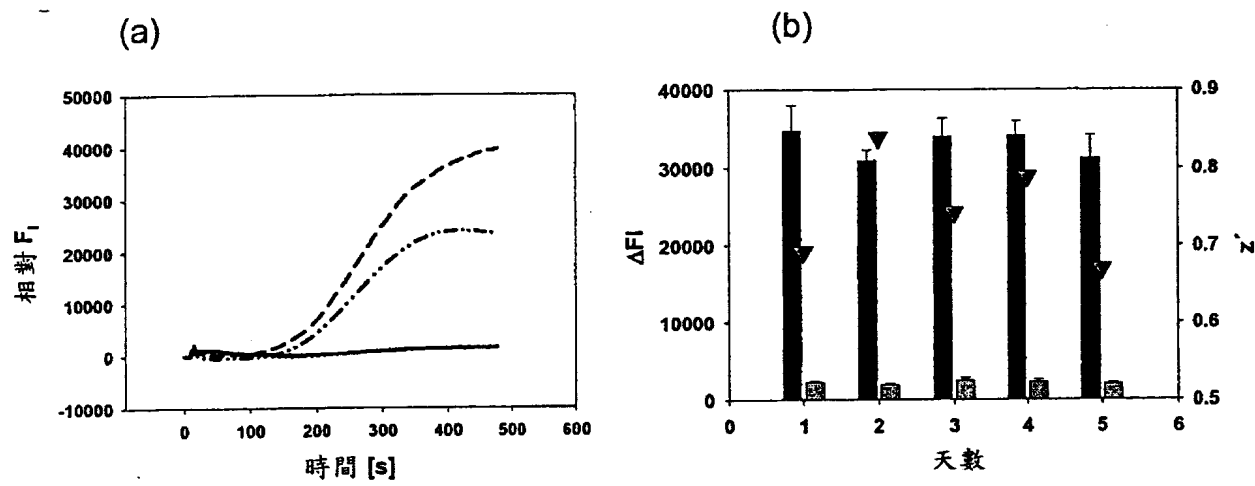
第 11 圖



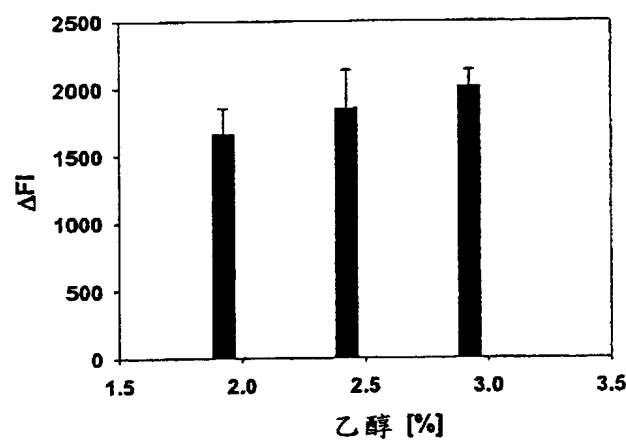
第 12 圖



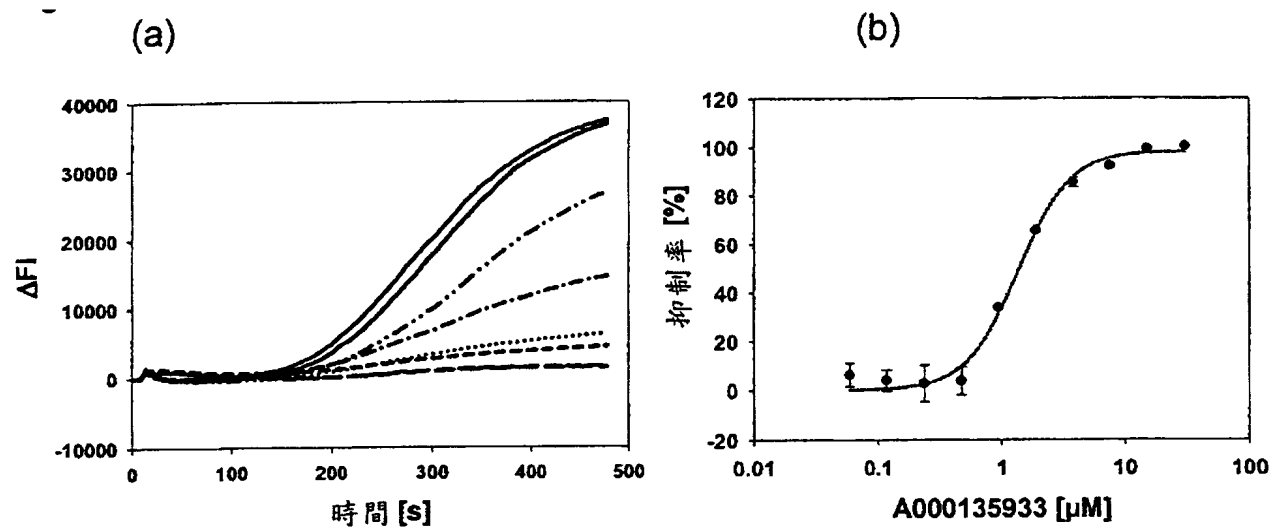
第 13 圖



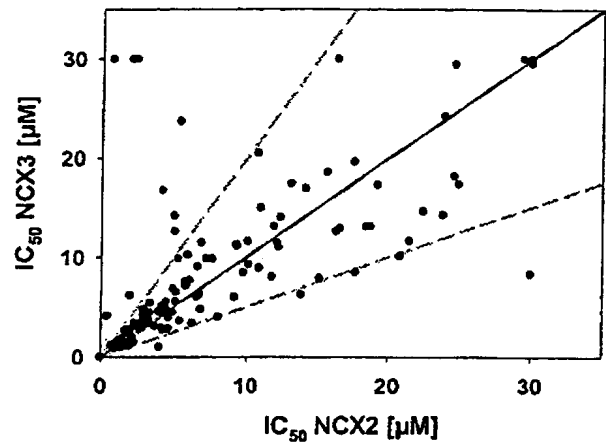
第 14 圖



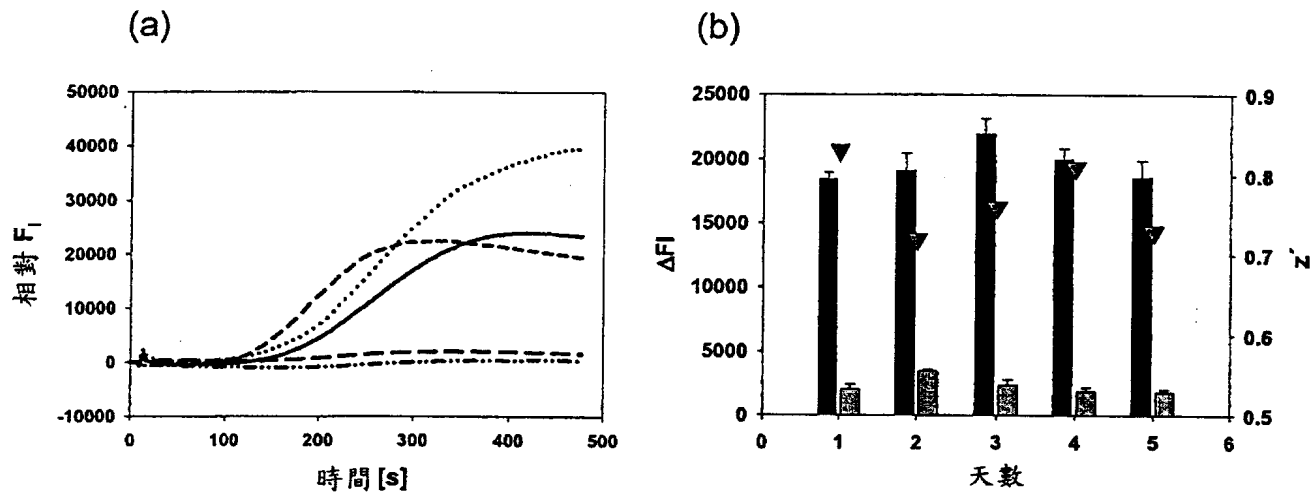
第 15 圖



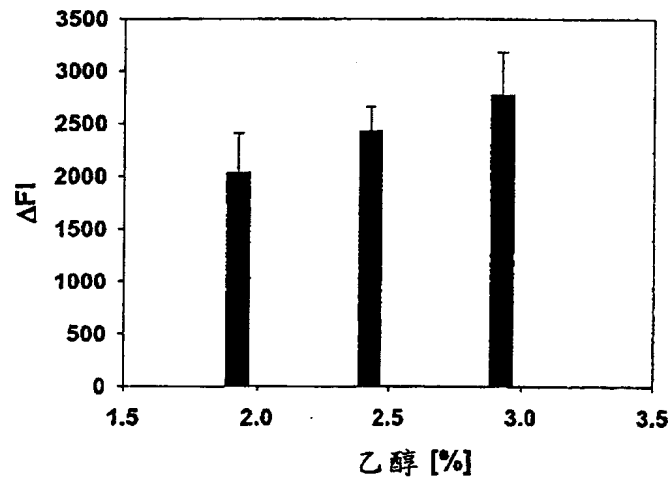
第 16 圖



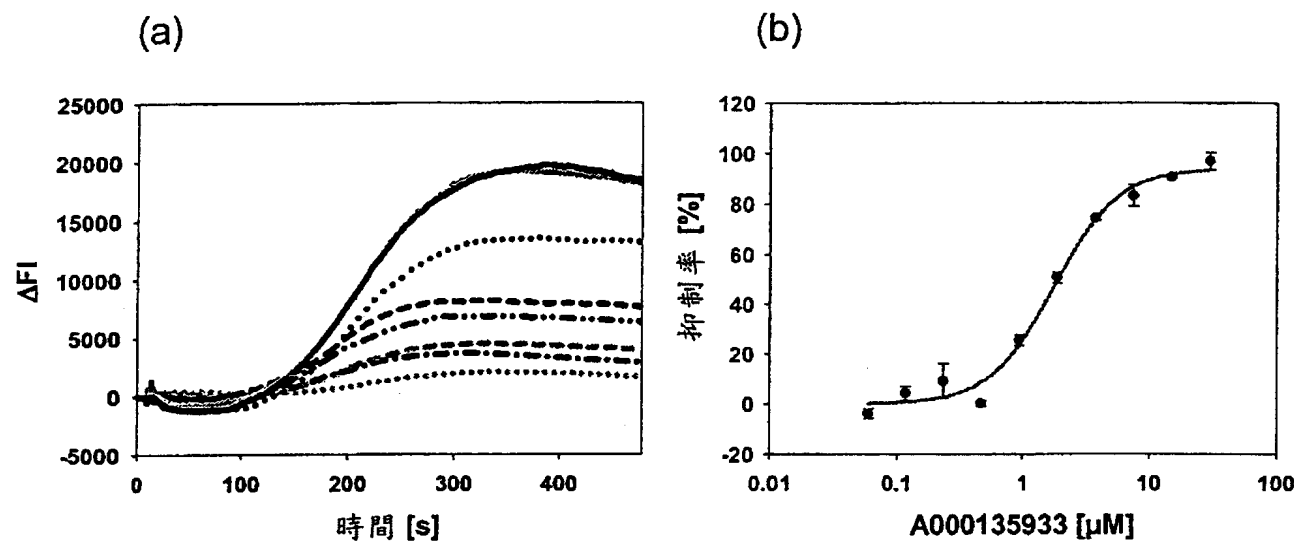
第 17 圖



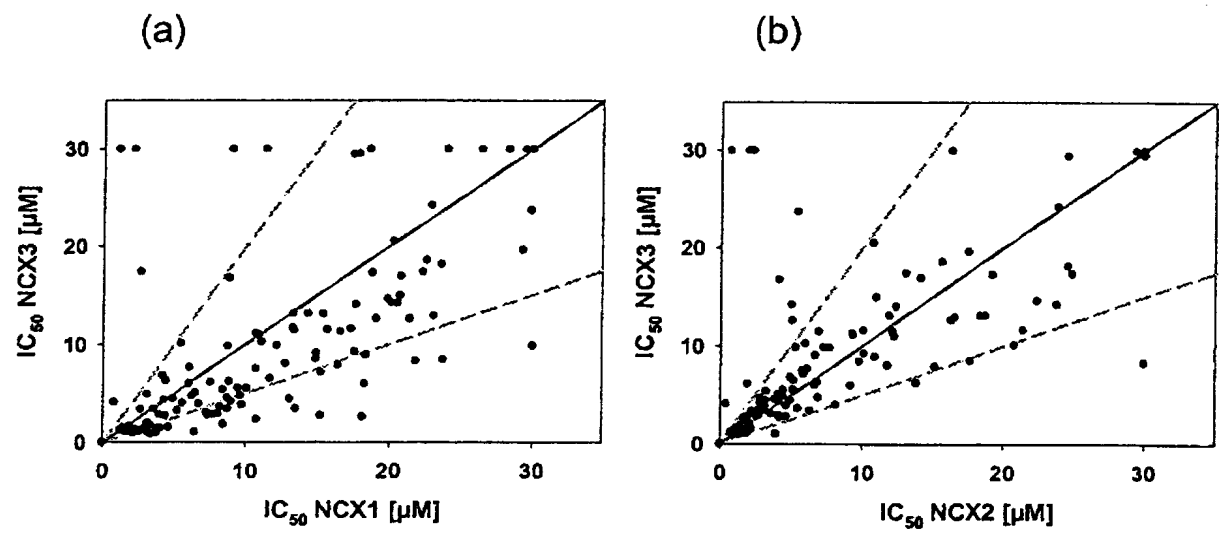
第 18 圖



第 19 圖



第 20 圖



四、指定代表圖：

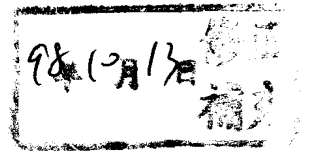
(一)本案指定代表圖為：第（ 16 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無



第 19 圖：

(a)不同濃度的 A000135933 (.....30 μM , ······ 15 μM , --- 7.5 μM , ······ 3.75 μM , --- 1.88 μM , 0.94 μM , — 0.5 μM 以及 — 0 μM) 在添加 20 μM 短桿菌肽之後(培育：22°C，45 分鐘)對於 NCX3 之 Ca^{2+} -輸入活性的影響；

(b) A000135933 的劑量反應關係。其在此實例中之 IC_{50} 值為 1.76 μM 。

第 20 圖：

(a) 125 種化合物對於 NCX3 和 NCX1 之 IC_{50} 的比較。這些化合物係以螢光為主之細胞 Ca^{2+} -輸入分析法(「反向」)來測試。暗灰色線(—)標示出相等效力線，而淡灰色虛線(---)指出對於一特定亞型的二倍效力分隔線；

(b) 125 種化合物對於 NCX3 和 NCX2 之 IC_{50} 的比較。這些化合物係以螢光為主之細胞 Ca^{2+} -輸入分析法(「反向」)來測試。暗灰色線(—)標示出相等效力線，而淡灰色虛線(---)指出對於一特定亞型的二倍效力分隔線；

【主要元件符號說明】

無