

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03823488.2

[51] Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月1日

[11] 授权公告号 CN 100473662C

[22] 申请日 2003.7.25 [21] 申请号 03823488.2

[30] 优先权

[32] 2002.8.1 [33] US [31] 60/400,774

[86] 国际申请 PCT/US2003/023296 2003.7.25

[87] 国际公布 WO2004/013285 英 2004.2.12

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.31

[73] 专利权人 阿瑞那制药公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 约翰·W·亚当姆斯

丹尼尔·T·康诺利

[56] 参考文献

CN1207126A 1999.2.3

the sequence of H. sapiens BAC clone CTB -  
20D2. Gattung S. NCBI, Vol. AAB63815 .  
2000

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责  
任公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 10 页 说明书 119 页 附图 10 页

[54] 发明名称

治疗缺血性心脏病及充血性心衰竭的人类 G  
蛋白偶联受体及其调节物

[57] 摘要

本发明涉及鉴别候选化合物是否为孤儿 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 调节物的方法。优选为人类 GPCR。在一些实施方案中, GPCR 由心肌细胞内源表达。在一些实施方案中, GPCR 与 Gi 偶联并降低细胞内 cAMP 的含量。在一些实施方案中, GPCR 的过量表达会促进心肌细胞的存活。在一些实施方案中, GPCR 的过量表达可挽救心肌细胞免于缺氧/复氧诱导的细胞凋亡。在一些实施方案中, 患有充血性心衰竭个体体内的 GPCR 被下调。本发明的激动剂可有效用作治疗包含心肌梗塞、心肌梗塞后重造, 以及充血性心衰竭等缺血性心脏病的治疗剂。

1. 一种鉴定候选化合物是否为心脏保护的调节物的方法，包含下列步骤：

(a) 将候选化合物与 G 蛋白偶联受体接触，所述 G 蛋白偶联受体包含一种选自如下的氨基酸序列：

(i) 与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列；或

(ii) SEQ ID NO: 3 的组成性活化形式的氨基酸序列；

其中的 G 蛋白偶联受体偶联至 G 蛋白；以及

(b) 确定 G 蛋白偶联受体功能是否已被调节；

其中该 G 蛋白偶联受体功能的改变表示该候选化合物为该心脏保护的调节物。

2. 一种鉴定心肌细胞的存活或者心肌细胞的凋亡的调节物的方法，包含下列步骤：

(a) 将候选化合物与 G 蛋白偶联受体接触，所述 G 蛋白偶联受体包含(i) 与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列；或

(ii) SEQ ID NO: 3 的组成性活化形式的氨基酸序列；

其中 G 蛋白偶联受体偶联至 G 蛋白；以及

(b) 确定 G 蛋白偶联受体功能是否已被调节；

其中该 G 蛋白偶联受体功能的改变表示该候选化合物为该心肌细胞的存活或者心肌细胞的凋亡的调节物。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中 G 蛋白偶联受体包括选自如下的氨基酸序列：

(a) SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列；

(b) SEQ ID NO: 2 的氨基酸 2-433；

(c) SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列；

(d) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 2-433;

(e) SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

4. 权利要求 1 或 2 的方法，其中筛选候选化合物作为缺血性心脏病的药剂。

5. 权利要求 4 的方法，其中缺血性心脏病为心肌梗塞，心肌梗塞后重建或者充血性心衰竭。

6. 权利要求 1 或 2 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体形成与 G 蛋白的融合蛋白的一部分。

7. 权利要求 1 或 2 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 或者 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

8. 权利要求 1 或 2 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列。

9. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 G 蛋白偶联受体为重组体。

10. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 G 蛋白偶联受体为组成性活化的。

11. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述确定是通过测量第二信使的含量进行的。

12. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述确定是通过测量第二信使的含量进行的，所述第二信使选自环 AMP，环 GMP，三磷酸肌醇，二酰甘油及  $\text{Ca}^{2+}$ 。

13. 权利要求 12 的方法，其中细胞内 cAMP 的含量降低。

14. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述确定是通过使用黑色素分析进行的。

15. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述确定通过通过测量结合至含有所述 G 蛋白偶联受体的膜的 GTP  $\gamma$  S 进行的。

16. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述确定是通过使用 Gq(del)/Gi 融合构建体分析进行的。

17. 权利要求 1 或 2 的方法，还包括将调节物配制在药物组合物中的步骤。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述调节物是 G 蛋白偶联受体的激动剂，部分激动剂，反激动剂或者拮抗剂。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述调节物是 G 蛋白偶联受体的激动剂或者部分激动剂。

20. 权利要求 1 或 2 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体存在于宿主细胞或其分离的膜的表面上。

21. 权利要求 20 的方法，其中的宿主细胞是哺乳动物宿主细胞，酵母宿主细胞或者载黑素宿主细胞。

22. 权利要求 1 或 2 的方法，进一步包含将候选化合物对 G 蛋白偶联受体的调节与通过 G 蛋白偶联受体与 G 蛋白偶联受体的已知调节物接触对 G 蛋白偶联受体的第二调节相比较的步骤。

23. 一种制造心脏保护或者心肌细胞的存活或者心肌细胞的凋亡的调节物的方法，包含如下步骤：

- (a) 根据权利要求 1 或 2 的方法鉴定所述调节物；以及
- (b) 合成 (a) 中鉴定的调节物。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述调节物为 G 蛋白偶联受体的激动剂，部分激动剂，反激动剂或拮抗剂。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述调节物是 G 蛋白偶联受体的激动剂或者部分激动剂。

26. 权利要求 23 的方法，其中所述调节物降低细胞内 cAMP 的含量。

27. 一种调节 RUP41 G 蛋白偶联受体活性的体外方法，所述 G 蛋白偶联受体包含：

- (i) 与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列；或
- (ii) SEQ ID NO: 3 的组成性活化形式的氨基酸序列；

其中所述 G 蛋白偶联受体偶联至 G 蛋白；

所述方法包括将该 G 蛋白偶联受体与根据权利要求 1 或 2 的方法鉴定的调节物接触的步骤。

28. 权利要求 27 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 或者 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

29. 权利要求 27 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括与 SEQ ID NO: 3 具有至少 95% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列。

30. 权利要求 27 的方法，其中所述接触包含将调节物施用于含有所述 G 蛋白偶联受体的膜，或者含有所述 G 蛋白偶联受体的细胞或组织。

31. 一种筛选缺血性心脏病或者选自心输出量降低和静脉压升高的心血管失调的药剂的候选化合物的方法，所述方法包括：

(a) 提供 G 蛋白偶联受体，其中的 G 蛋白偶联受体包括：

(i) 与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列；或

(ii) SEQ ID NO: 3 的组成性活化形式的氨基酸序列；

其中所述 G 蛋白偶联受体偶联至 G 蛋白；以及

(b) 筛选抗所述 G 蛋白偶联受体的候选化合物。

32. 权利要求 31 的方法，其中的缺血性心脏病为心肌梗塞，心肌梗塞后重建或者充血性心衰竭。

33. 权利要求 31 的方法，其中 G 蛋白偶联受体包括选自如下的氨基酸序列：

(a) SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列；

(b) SEQ ID NO: 2 的氨基酸 2-433；

(c) SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列；

(d) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 2-433；

(e) SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

34. 权利要求 31 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体形成与 G 蛋白的融合蛋白的一部分。

35. 权利要求 31 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 或者 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

36. 权利要求 31 的方法,其中 G 蛋白偶联受体包括与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 95%同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列。

37. 权利要求 31 的方法,其中所述 G 蛋白偶联受体为重组体。

38. 权利要求 31 的方法,其中所述方法包括鉴定 G 蛋白偶联受体的激动剂或部分激动剂。

39. 权利要求 38 的方法,还包括将所述激动剂或部分激动剂配制在药物组合物中的步骤。

40. 权利要求 31 的方法,其中的 G 蛋白偶联受体存在于宿主细胞或其分离的膜的表面上。

41. 权利要求 40 的方法,其中的宿主细胞是哺乳动物宿主细胞,酵母宿主细胞或者载黑素宿主细胞。

42. 一种制造缺血性心脏病或者选自心输出量降低和静脉压升高的心血管失调的药剂的方法,包含如下步骤:

(a) 根据权利要求 38 的方法鉴定 G 蛋白偶联受体的激动剂或部分激动剂; 以及

(b) 合成 (a) 中鉴定的激动剂或部分激动剂。

43. 权利要求 42 的方法,其中所述的激动剂或部分激动剂降低 cAMP 的细胞内水平。

44. 一种筛选缺血性心脏病或者选自心输出量降低和静脉压升高的心血管失调的药剂的候选化合物的方法,其中所述方法包括进行鉴定候选化合物是否为 RUP41 G 蛋白偶联受体的配体的方法,其中所述 G 蛋白偶联受体包含

(a) 与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列；或

(b) SEQ ID NO: 3 的组成性活化形式的氨基酸序列；

所述方法包含下列步骤：

(a') 在存在或不存在所述候选化合物的条件下，将所述 G 蛋白偶联受体与任选标记的 G 蛋白偶联受体的已知配体接触；

(b') 检测所述已知配体与所述 G 蛋白偶联受体的复合物；以及

(c') 确定在候选化合物存在的情况下是否比不存在的情况形成更少的所述复合物；

其中所述确定表示该候选化合物为所述 G 蛋白偶联受体的配体。

45. 权利要求 44 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 或者 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

46. 权利要求 44 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列。

47. 权利要求 44 的方法，其中所述受体为重组体。

48. 权利要求 44 的方法，其中筛选候选化合物可用于放射性显影的化合物，从而用于鉴定一个个体具有发展成缺血性心脏病的危险。

49. 权利要求 48 的方法，其中所述缺血性心脏病为心肌梗塞，心肌梗塞后重建或者充血性心衰竭。

50. 权利要求 48 或者 49 的方法，其中的个体为哺乳动物。

51. 权利要求 48 或者 49 的方法，其中的个体为人。

52. 制备人 RUP41 G 蛋白偶联受体的转基因非人哺乳动物的方法，所述 G 蛋白偶联受体包含：

(a) 与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列；或

SEQ ID NO: 3 的组成性活化形式的氨基酸序列

包括将编码人 RUP41 G 蛋白偶联受体的多核苷酸导入非人哺乳动物的生殖系的步骤。

53. 权利要求 52 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列。

54. 权利要求 52 的方法，其中的 G 蛋白偶联受体包括与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列。

55. 根据权利要求 52 的方法制备的转基因非人哺乳动物在鉴定化合物是否具有保护心脏的效果中的应用。

56. 权利要求 53 的应用，其中所述化合物为根据权利要求 1 或 2 的方法鉴定的调节物。

57. 权利要求 53 的应用，其中所述化合物为根据权利要求 44 的方法鉴定的配体。

58. G 蛋白偶联受体在筛选候选化合物作为缺血性心脏病，心脏保护，心血管失调或者改变心血管功能的药物中的应用，所述 G 蛋白偶联受体包含：

(a) 与 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列；或

(b) SEQ ID NO: 3 的组成性活化形式的氨基酸序列。

59. 权利要求 58 的应用，其中的 G 蛋白偶联受体包括选自如下的氨基酸序列：

- (a) SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列；
- (b) SEQ ID NO: 2 的氨基酸 2-433；
- (c) SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列；
- (d) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 2-433；
- (e) SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

60. 权利要求 58 的应用，其中的缺血性心脏病为心肌梗塞，心肌梗塞后重建或者充血性心衰竭。

61. 权利要求 58 的应用，其中的心血管失调选自如下：

- (a) 心输出量降低；以及
- (b) 静脉压升高。

62. 权利要求 58 的应用，其中心血管功能的改变选自如下：

- (a) 降低心脏肥大；
- (b) 增加心脏射血量；
- (c) 降低心室腔体积；以及
- (d) 降低心肌细胞凋亡。

63. 权利要求 58 的应用，其中的 G 蛋白偶联受体形成与 G 蛋白的融合蛋白的一部分。

64. 权利要求 58 的应用，其中的 G 蛋白偶联受体包括 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 或者 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

65. 权利要求 58 的应用，其中的 G 蛋白偶联受体包括与 SEQ ID NO: 3 具有至少 95% 同一性的 G 蛋白偶联受体的氨基酸序列。。

66. 权利要求 58 的应用，其中的 G 蛋白偶联受体为重组体。

67. 权利要求 58 的应用，其中的 G 蛋白偶联受体为组成性活化的。

68. 权利要求 58 到 67 任一项的应用，其中筛选的是 G 蛋白偶联受体的激动剂。

69. 权利要求 58 到 67 任一项的应用，其中筛选的是 G 蛋白偶联受体的部分激动剂。

## 治疗缺血性心脏病及充血性 心衰竭的人类 G 蛋白偶联受体及其调节物

本专利申请要求下列由 U.S. 快递邮件向美国专利商标局提交的临时申请为其优先权, 即 2002 年 8 月 1 日提交的美国临时申请 60/400,774。前述申请在此处全部引入作为参考。

### 技术领域

本发明涉及鉴别候选化合物是否为孤儿 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 调节物的方法。优选人类 GPCR。在一些实施方案中, GPCR 由心肌细胞内源表达。在一些实施方案中, GPCR 与 Gi 偶联, 且降低细胞内 cAMP 的浓度。在一些实施方案中, GPCR 的过度表达会促进心肌细胞的存活。在一些实施方案中, GPCR 的过度表达可挽救心肌细胞免于缺氧/复氧诱导的细胞凋亡。在一些实施方案中, 具有充血性心衰竭的个体体内的 GPCR 被下调。本发明的激动剂可有效作为治疗缺血性心脏病, 包含心肌梗塞、心肌梗塞后重造, 以及充血性心衰竭的治疗剂。

### 背景技术

#### A. 缺血性心脏病及充血性心衰竭

充血性心衰竭 (CHF) 影响约 5 百万美国人, 且每年有 50 万个新病例被诊断出来。CHF 的临床症状为心脏病使心脏输出量降低, 静脉压升高, 且伴随着分子异常进而导致心脏衰竭持续恶化以及未成熟心肌细胞 (肌细胞) 的死亡 (源于; 心衰竭: 病理生理学, 分子生物, 及临床管理 (Heart Failure: Pathophysiology, Molecular Biology, and Clinical Management), Katz, AM, Lippincott Williams and Wilkins, 2000)。由于成人心脏中已丧失的细胞无法更替, 因此肌细胞 (心肌细胞) 死亡为心衰竭自然史中的关键因素。因为一旦出现心衰竭症状, 5 年存活率低于 50%, 所以任何未考虑加速心肌死亡的分子过程的心衰

竭定义皆忽略了这种症状的主要临床特征。因此，许多研究小组近来的研究着重于调节心肌死亡与存活的分子机制及信号路径。细胞培养及小动物已经实验清楚的证实心肌细胞上的 G 蛋白偶联受体为心脏收缩功能的重要调节物，并且也参与心肌细胞死亡与存活的调节[参见，Adams 及 Brown 的，*Oncogene* (2001) 20:1626-1634]。然而，目前临床上并没有可用来抑制心肌细胞死亡或直接活化存活路径的药物。最近所公开的小鼠及大鼠的试验结果证实，存活路径的活化[Lee 等人，*Endocrinology* (1999) 140:4831-40]或心肌细胞死亡路径的抑制剂[Laugwitz 等人，*Hum Gene Ther* (2001) 12:2051-63]可显著提高心脏功能及动物的存活率。因此其清楚显示，相似的治疗策略极可能用于治疗人类的心衰竭。

## B.G 蛋白偶联受体

虽然人体内存在多种受体，但是最多且与治疗有关的受体就是以 G 偶联受体 (GPCR) 为代表。据估计存于人类基因组中的 3 万至 4 万个基因中，估计约有 2% 用来编码 GPCRs。其内源性配体已被确定的受体，包含 GPCRs 被称为“已知”受体，然而其内源性配体尚未确定的受体，则被称为“孤儿”受体。

GPCRs 是药品开发的重要领域：100 种已知 GPCRs 中约有 20 种，将近 60% 已开发成处方药剂。例如，在 1999 年，前 100 品牌的处方药剂中有下列药物与 GPCRs 有关（括号内表示该药剂主要治疗的疾病和/或失调症）：

Claritin® (过敏)	Prozac® (忧郁)	Vasotec® (高血压)
Paxil® (忧郁)	Zoloft® (忧郁)	Zyprexa® (精神失常)
Cozaar® (高血压)	Imitrex® (偏头痛)	Zantac® (逆流症)
Propulsid® (逆流症)	Risperdal® (精神分裂症)	Serevent® (哮喘)
Pepcid® (逆流症)	Gaster® (溃疡)	Atrovent® (支气管痉挛)
Effexor® (忧郁)	Depakote® (癫痫)	Cardura® (前列腺增生)
Allegra® (过敏)	Lupron® (前列腺癌)	Zoladex® (前列腺癌)

Diprivan® (麻木)	BuSpar® (焦虑)	Ventolin® (支气管痉挛)
Hytrin® (高血压)	Wellbutrin® (忧郁)	Zyrtec® (鼻炎)
Plavix® (心肌梗塞/中风)	Toprol-XL® (高血压)	Tenormin® (心绞痛)
Xalatan® (青光眼)	Singulair® (哮喘)	Diovan® (高血压)
Harnal® (前列腺增生)		

(Med Ad News 1999 Data)

GPCRs 共享一共同的结构基元，其具有 7 个介于 22 至 24 个疏水性氨基酸的序列，形成 7 个  $\alpha$  螺旋，其中每一螺旋都跨膜（每一跨膜螺旋由编号定义，即跨膜螺旋-1 (TM-1)，跨膜螺旋-2 (TM-2) 等）。跨膜螺旋由细胞膜外部或“胞外”侧上的跨膜螺旋-2 与跨膜螺旋-3，跨膜螺旋-4 与跨膜螺旋-5，以及跨膜螺旋-6 与跨膜螺旋-7 之间的氨基酸链连接[其分别称为“胞外”区域 1、2 和 3(EC-1、EC-2 与 EC-3)]。跨膜螺旋由位于细胞膜内部或“胞内”侧的跨膜螺旋-1 与跨膜螺旋-2，跨膜螺旋-3 与跨膜螺旋-4，跨膜螺旋-5 与跨膜螺旋-6 之间的氨基酸链连接(其分别称为“胞内”区域 1、2 和 3(IC-1、IC-2 与 IC-3))。受体的“羧基” (“C”) 末端位于细胞内的胞内空间，而受体的“氨基” (“N”) 末端位于细胞外的胞外空间。

一般而言，当配体与受体结合（一般称为受体的“活化”）时，受体的构造会改变，进而促进胞内区与胞内“G 蛋白”间的偶联。已有报告 GPCRs 对 G 蛋白而言是“混杂的”，亦即 GPCR 可与一个以上的 G 蛋白相互作用。参见 Kenakin, T., 43 生命科学(Life Science) 1095 (1988)。虽然目前存在其它的 G 蛋白，Gq, Gs, Gi, Gz 及 Go 是已经得到鉴定的 G 蛋白。配体活化的 GPCR 与 G 蛋白的偶联，起始一信号级联过程（即所谓的“信号传导”）。在正常情况下，信号传导最后将导致细胞活化或细胞抑制。虽然不希望被理论束缚，但是 IC-3 环与受体羧基末端被认为会与 G 蛋白相互作用。

在生理条件下，GPCRs 以介于两种不同构造：“不活化”状态及

“活化”状态的平衡形式存在于细胞膜中。不活化状态下的受体无法连接胞内信号传导路径激活导致生物反应的信号传导。将受体的构造改变为活化状态，可使其与传导路径连接（通过 G 蛋白）并产生生物反应。

受体可由配体或如药剂的化合物稳定在活化状态。近来发现，包含但不限于受体氨基酸序列的修饰可提供有别于配体或药物的手段来促进并稳定受体于活化状态。通过刺激配体与受体的结合效果，这些方法可有效地将受体稳定于活化状态。这种不依赖于配体的稳定方式被称作“组成型受体活化”。

#### 发明概述

本发明涉及孤儿 GPCR，此处命名为 RUP41。RUP41 与 GPR22（GenBank® Accession No.U66581）有关。

RUP41 由心肌细胞内源表达。人类 RUP41 的表达谱可由 Affmetrix 基因芯片进行确定并通过多组织点印迹及 Northern 印迹加以验证。由基因组 DNA 扩增的大鼠同源 RUP41 的部分编码序列已被鉴定并且公开。大鼠 RUP41 聚核苷酸序列的这个片段与所公开的小鼠 RUP41 聚核苷酸序列（XM\_137998）具有 97% 的同一性。本发明公开的 RUP41 与 Gi 偶联，引起腺苷酸环化酶的抑制且抑制 cAMP 的产生。本发明进一步公开了在局部缺血及肥大性心脏的实验模型中，内源性 RUP41 含量的降低。本发明还公开了 RUP41 的过量表达可促进心肌细胞的存活。本发明公开的 RUP41 的特性显示 RUP41 的激动剂可用于治疗与心肌细胞凋亡有关的心脏病。

本发明的一部分为鉴定候选化合物是否为 RUP41 的调节物的方法。在其它一些实施方案中，本发明涉及调节 RUP41 活性的方法，包含 RUP41 与 RUP41 的调节物接触的步骤。在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。在一些实施方案中，调节物为激动

剂。

在一些实施方案中，上述接触发生于体外。在一些实施方案中，RUP41 调节物在确定调节物是否有效抑制心肌细胞凋亡的方法中，被导入心肌细胞凋亡的细胞培养模型中。在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。在一些实施方案中，调节物为激动剂。

在一些实施方案中，上述接触发生于体内。在一些实施方案中，RUP41 调节物在确定上述调节物是否有效降低与上述缺血性心脏病及心衰竭相关的病理学特征的方法中被施用给小鼠及大鼠缺血性心脏病及心衰竭的手术模型。在其它实施方案中，RUP41 调节物在确定上述调节物是否有利于心肌重建或功能的方法中被施用给心肌梗塞试验动物。在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。在一些实施方案中，调节物为激动剂。

RUP41 的调节物可用作治疗缺血性心脏病，包含心肌梗塞，心肌梗塞后重建，及充血性心衰竭的治疗剂。在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。在一些实施方案中，调节物为激动剂。

人 RUP41 第一对等位基因的聚核苷酸序列及编码的多肽序列提供于序列表中分别为 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:2 多肽编码区对应于 SEQ ID NO:1 的核苷酸 237 至 1538)。人 RUP41 多肽第二对等位基因的氨基酸序列 (GenBank® Accession No.AAB63815)，包含在 SEQ ID NO:2 氨基酸 425 位半胱氨酸取代赖氨酸的单一取代，为 SEQ ID NO:3(对应的编码序列为 GenBank® Accession No.AC002381 的 79,559 至 80,860 核苷酸)。小鼠 RUP41 的聚核苷酸序列及编码的多肽序列分别为 SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5。包含部分大鼠 RUP41 编码序列的聚核苷酸序列公开为 SEQ ID NO:6。

在第一方面，本发明描述了一种鉴定候选化合物是否为 RUP41 GPCR 的调节物的方法，上述受体包含选自下列的多肽：

- (a) SEQ ID NO:2 的多肽；
- (b) SEQ ID NO:3 的多肽；以及
- (c) SEQ ID NO:5 的多肽；

或其片段或变体，其中受体偶联 G 蛋白，包含步骤如下：

- (a') 将候选化合物与受体接触；
- (b') 确定受体功能是否被调控，其中受体功能的改变显示候选化合物为上述 GPCR 的调节物。

本发明也涉及鉴定候选化合物是否为保护心脏的调节物的方法，包含下列步骤：

(a) 将候选化合物与 GPCR 接触，上述受体包含一种选自下列的多肽：

- (i) SEQ ID NO:2 的多肽；
- (ii) SEQ ID NO:3 的多肽；以及
- (iii) SEQ ID NO:5 的多肽；

或其片段或变体，其中受体偶联 G 蛋白；以及

- (b) 确定受体功能是否被调控；
- 其中受体功能的改变表示候选化合物为保护心脏的调节物。

在一些实施方案中，上述受体包含选自 SEQ ID NO:2 的氨基酸 2 至 433 及 SEQ ID NO:3 的氨基酸 2 至 433 的多肽序列。

在一些实施方案中，RUP41 GPCR 为内源性的。

RUP41 GPCR 的等位基因变体也在本发明的范围内。

SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 多肽的哺乳动物直向同源物也在本发明的范围内。在一些实施方案中，上述哺乳动物同源

基因包含小鼠 RUP41, 大鼠 RUP41, 猪 RUP41 及非人类灵长动物 RUP41。

与 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, 或 SEQ ID NO:5 的 RUP41 多肽具有至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99% 同一性的变体多肽也在本发明的范围中。尤其是在一些实施方案中, 利用局部比对基本查询工具 (“BLAST”) 评价多肽序列的同源性, 上述 BLAST 在本领域是公知的的技术[参见, 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; 其公开在此处引入作为参考]。上述变体多肽可包含一个或多个氨基酸的缺失, 插入, 及取代。选自 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, 或 SEQ ID NO:5 的 RUP41 多肽的组成性活化形式的变体多肽也在本发明的范围中。在一些实施方案中, 上述 RUP41 多肽的组成性活化形式为 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的多肽, 其中在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的 312 位的氨基酸苯丙氨酸被赖氨酸取代。

在一些实施方案中, 上述 RUP41 GPCR 是重组体。

在一些实施方案中, 上述 RUP41 GPCR 包括一个或者多个附加表位。在一些实施方案中, 上述附加表位为血凝素 (HA) 附加表位。在一些实施方案中, 上述附加表位为 FLAG 附加表位。在一些实施方案中, 上述附加表位为 V5 附加表位。提供上述 HA, FLAG 或者 V5 附加表位的方法是本领域技术人员公知的 (例如, Clontech, Palo Alto, CA 和 Invitrogen, Carlsbad, CA)。

在一些实施方案中, 上述 G 蛋白调节细胞内 cAMP 的含量。在一些实施方案中, 上述 G 蛋白为 Gi。

在一些实施方案中，通过利用黑色素细胞分析进行上述测定。在一些实施方案中，色素聚集增加。在一些实施方案中，色素扩散减少。

在一些实施方案中，通过测定选自环 AMP (cAMP)，环 GMP (cGMP)，肌醇三磷酸 (IP<sub>3</sub>)，二酰甘油 (DAG) 和 Ca<sup>2+</sup>的第二信使的含量进行上述测定。在一些实施方案中，上述第二信使为 cAMP。在一些实施方案中，cAMP 的含量减少。在一些实施方案中，在用 CART-TSH 共转染的 COS-7 细胞中进行上述测定。

在一些实施方案中，用含有上述 GPCR 的膜进行上述测定。在一些实施方案中，上述膜通过用 Brinkman Polytron™ 匀浆化处理细胞进行制备。在一些实施方案中，上述膜制备物通过用上述组织匀浆器 (polytron) 每次 10-20 秒匀浆化 3 次进行制备。

在一些实施方案中，通过测定由减少细胞内 cAMP 的含量介导的活性进行上述测定。在一些实施方案中，上述活性是促进细胞存活。在一些实施方案中，上述细胞是新生大鼠心室肌细胞 (NRVM)。在一些实施方案中，上述活性是从低氧/复氧诱导的细胞凋亡拯救细胞。在一些实施方案中上述细胞为 NRVM。

在一些实施方案中，上述 G 蛋白是嵌合 Gq(del)Gi α 亚基并且通过测定 IP<sub>3</sub> 或者 Ca<sup>2+</sup>进行上述测定。

在一些实施方案中，通过测定与包含上述 GPCR 的膜结合的 GTP γ S 进行上述测定。在另外一些实施方案中，上述 GTP γ S 用 [<sup>35</sup>S] 标记。

在一些实施方案中，在 GPCR 的已知配体存在的条件下进行上述接触。在一些实施方案中，上述已知配体是 GPCR 的激动剂。

在一些实施方案中，上述方法还包括将由候选化合物对受体的调

节与由受体与受体的已知调节物接触对受体的第二种调节相比较。

第二方面，本发明描述了 RUP41 GPCR 的调节物或者根据本发明的第一方面的方法鉴定的保护心脏的调节物。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $60\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $90\mu\text{M}$ , 及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{M}$ ,  $7\mu\text{M}$ ,  $8\mu\text{M}$ ,  $9\mu\text{M}$ , 及  $10\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物是抗体或者包含至少一个结构域的其衍生物。

在第三方面，本发明描述了调节 RUP41 GPCR 活性的方法，上述受体包括选自下列的多肽：

- (a) SEQ ID NO:2 的多肽；
- (b) SEQ ID NO:3 的多肽；以及
- (c) SEQ ID NO:5 的多肽；

或其片段或变体，其中受体偶联 G 蛋白，包含将受体与本发明第二方面的调节物接触的步骤。

在一些实施方案中，上述受体包含选自 SEQ ID NO: 2 的 2-433 位氨基酸以及 SEQ ID NO: 3 的 2-433 位氨基酸的上述多肽片段。

RUP41 GPCR 的等位基因变体也在本发明的范围内。

SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 多肽的哺乳动物直向同源物也在本发明的范围中。在一些实施方案中，上述哺乳动物直向同源物包含小鼠 RUP41，大鼠 RUP41，猪 RUP41 及非人类灵长动物 RUP41。

与 SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，或 SEQ ID NO:5 的 RUP41 多肽具有至少 90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 同一性的变体多肽也在本发明的范围中。尤其是在一些实施方案中，利用局部比对基本查询工具（“BLAST”）评价多肽序列的同源性，上述 BLAST 在本领域是公知的技术[参见，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; 其公开在此处全部引入作为参考]。上述变体多肽可包含一个或多个氨基酸的缺失，插入，及取代。SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，或 SEQ ID NO:5 的 RUP41 多肽的组成性活化形式的变体多肽也在本发明的范围中。在一些实施方案中，上述 RUP41 多肽的组成性活化形式为 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID

NO:3 的多肽, 其中在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的 312 位氨基酸的苯丙氨酸被赖氨酸取代。

在一些实施方案中, 上述调节物选自激动剂, 部分激动剂, 反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中, 上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $60\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $90\mu\text{M}$ , 及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{M}$ ,  $7\mu\text{M}$ ,  $8\mu\text{M}$ ,  $9\mu\text{M}$  及  $10\mu\text{M}$  的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中, 上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中, 上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中, 调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中, 上述调节物为激动剂。

在一些实施方案中, 上述接触包含将调节物施用于包含受体的膜。

在一些实施方案中, 上述接触包含将调节物施用于包含受体的细胞或者组织。

在一些实施方案中，上述接触包含将调节物施用于包含受体的个体。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

在一些实施方案中，上述方法被用于鉴定调节物是否具有预防或治疗心血管失调的疗效，上述心血管失调包含：

- (a) 心脏输出减少；以及
- (b) 静脉压增加；

包含下列步骤：

- (a') 将调节物施用于心肌细胞凋亡的细胞培养模型中；以及
- (b') 确定上述凋亡是否被抑制，其中上述确定通过选自如下的

测定进行：

- (i) 测量细胞数目；
- (ii) 测量 DNA 片段；以及
- (iii) 测量核染色体凝聚；

其中对抑制凋亡的确定显示调节物具有上述疗效。

在一些实施方案中，利用 DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚) 染色剂进行核染色体凝聚的测量。

在一些实施方案中，上述方法被用来鉴定调节物是否具有预防或治疗缺血性心脏病的疗效，上述缺血性心脏病包含：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭；

包含如下步骤：

- (a') 将上述调节物施用于心肌细胞凋亡的细胞培养模型中；以

及

(b') 确定上述凋亡是否被抑制，其中上述确定通过如下测定进行：

- (i) 测量细胞数目；
- (ii) 测量 DNA 分裂；以及
- (iii) 测量核染色体凝聚。

在一些实施方案中，用 DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚) 染料测量核染色体凝聚。

在一些实施方案中，上述方法被用来鉴定调节物是否具有预防或治疗心血管失调的疗效，上述心血管失调包含：

- (a) 心脏输出减少；以及
- (b) 静脉压增加；

包含如下步骤：

(a') 将调节物施用于或者不施用于心血管失调的小鼠或大鼠模型；以及

- (b') 确定施用调节物是否具有下列效果：
  - (i) 降低心脏肥大；
  - (ii) 增加心脏射血量；
  - (iii) 降低心室体积；以及
  - (iv) 减少心肌细胞凋亡；

其中上述效果的确定显示上述调节物具有上述疗效。

在一些实施方案中，上述方法被用来鉴定调节物是否具有预防或治疗缺血性心脏病的疗效，上述缺血性心脏病包含：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭；

包含如下步骤：

(a') 将调节物施用或者不施用于缺血性心脏病的小鼠或大鼠模型；以及

(b') 确定施用调节物是否具有选自如下的效果：

- (i)降低心脏肥大；
- (ii)增加心脏射血量；
- (iii)降低心室体积；以及
- (iv)减少心肌细胞凋亡。

其中上述效果的确定显示上述调节物具有上述疗效。

在一些实施方案中，上述个体需要预防或治疗心血管失调，上述心血管失调选自：

- (a) 心脏输出减少；以及
- (b) 静脉压增加。

在一些实施方案中，上述个体需要预防或治疗缺血性心脏病，选自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭。

在一些实施方案中，上述个体需要改变心血管功能，选自：

- (a) 减小心脏肥大；
- (b) 增加心脏射血量；
- (c) 降低心室体积；以及
- (d) 减少心肌细胞凋亡。

在一些实施方案中，上述个体为遗传倾向有心血管失调的小鼠或大鼠，上述心血管失调选自：

- (a) 心脏输出降低；以及
- (b) 静脉压增加；

在一些实施方案中，上述方法被用来鉴定调节物是否具有预防或治疗心血管失调的疗效，上述心血管失调包含：

- (a) 降低心脏输出；以及
- (b) 增加静脉压；

包含如下步骤：

(a') 将调节物施用或者不施用于遗传倾向有心血管失调的小鼠或大鼠模型；以及

(b') 确定施用调节物是否具有选自如下的效果：

- (i) 降低心脏肥大；
- (ii) 增加心脏射血量；
- (iii) 降低心室体积；以及
- (iv) 降低心肌细胞凋亡；

其中上述效果的确定显示上述调节物具有上述疗效。

在一些实施方案中，上述个体为遗传倾向有缺血性心脏病的小鼠或大鼠，上述缺血性心脏病选自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭。

在一些实施方案中，上述方法被用来鉴定调节物是否具有预防或治疗缺血性心脏病的疗效，上述缺血性心脏病包含：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭；

包含如下步骤：

(a') 将调节物施用或者不施用于遗传倾向有缺血性心脏病的上述小鼠或大鼠；以及

- (b') 确定施用调节物是否具有选自如下的效果：
  - (i) 降低心脏肥大；

- (ii) 增加心脏射血量;
- (iii) 降低心室体积; 以及
- (iv) 降低心肌细胞凋亡;

其中上述效果的确定显示上述调节物具有上述疗效。

第四方面, 本发明描述了需要改变心血管功能的个体体内改变上述功能的方法, 包含将第二方面上述的治疗有效量调节物与 RUP41GPCR 接触, 上述受体包含选自如下的多肽:

- (a) SEQ ID NO:2 的多肽;
- (b) SEQ ID NO:3 的多肽; 以及
- (c) SEQ ID NO:5 的多肽;

或其等位基因变体。

在一些实施方案中, 上述心肌功能的改变选自:

- (a) 降低心脏肥大;
- (b) 增加心脏射血量;
- (c) 降低心室体积; 以及
- (d) 减少心肌细胞凋亡;

在一些实施方案中, 上述调节物选自激动剂, 部分激动剂, 反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中, 上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $60\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $90\mu\text{M}$ , 及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{M}$ ,  $7\mu\text{M}$ ,  $8\mu\text{M}$ ,  $9\mu\text{M}$  及  $10\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3

的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

在一些实施方案中，上述接触通过口服施用上述调节物进行。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第五方面，本发明描述了需要预防或者治疗心血管失调的个体预防或者治疗心血管失调的方法，包含将第二方面上述的治疗有效量调节物与 RUP41GPCR 接触，上述受体包含选自如下的多肽：

- (a) SEQ ID NO:2 的多肽；
  - (b) SEQ ID NO:3 的多肽；以及
  - (c) SEQ ID NO:5 的多肽；
- 或其等位基因变体。

在一些实施方案中，上述心血管失调选自：

- (a) 心脏输出降低；以及
- (b) 静脉压增加。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $60\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $90\mu\text{M}$ , 及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{M}$ ,  $7\mu\text{M}$ ,  $8\mu\text{M}$ ,  $9\mu\text{M}$  及  $10\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

在一些实施方案中，上述接触通过口服施用上述调节物进行。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第六方面，本发明描述了需要预防或者治疗缺血性心脏病的个体预防或者治疗缺血性心脏病的方法，包含将第二方面上述的治疗有效量调节物与 RUP41GPCR 接触，上述受体包含选自如下的多肽：

(a) SEQ ID NO:2 的多肽；

- (b) SEQ ID NO:3 的多肽；以及
  - (c) SEQ ID NO:5 的多肽；
- 或其等位基因变体。

在一些实施方案中，上述缺血性心脏病选自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭。在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $60\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $90\mu\text{M}$ , 及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{M}$ ,  $7\mu\text{M}$ ,  $8\mu\text{M}$ ,  $9\mu\text{M}$  及  $10\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

在一些实施方案中，上述接触通过口服施用上述调节物进行。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第七方面，本发明描述了制备组合物的方法，包含鉴定 RUP41 GPCR 的调节物，然后将载体与调节物混合，其中调节物可由第一方面的方法鉴定。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $60\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $90\mu\text{M}$ , 及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{M}$ ,  $7\mu\text{M}$ ,  $8\mu\text{M}$ ,  $9\mu\text{M}$  及  $10\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

在一些实施方案中，可由第一方面的方法鉴定的上述调节物由第一方面的方法鉴定。

在一些实施方案中，上述调节物为第二方面的调节物。

第八方面，本发明描述了一种药学及生理学用的组合物，主要由第二方面的调节物组成或者包括第二方面的调节物。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $60\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $90\mu\text{M}$ , 及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{M}$ ,  $7\mu\text{M}$ ,  $8\mu\text{M}$ ,  $9\mu\text{M}$  及  $10\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

第九方面，本发明描述了一种改变心血管功能的方法，包含给需要上述改变心血管功能的个体提供或者施用第八方面的上述药学或者生理学可接受的组合物，上述心血管功能的改变选自：

- (a) 降低心脏肥大；
- (b) 增加心脏射血量；
- (c) 降低心室体积；以及
- (d) 减少心肌细胞凋亡。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第十方面，本发明描述了一种治疗心血管失调的方法，包含给需要上述治疗的个体提供或者施用第八方面的上述药学或者生理学可接受的组合物，上述心血管失调选自：

- (a) 心脏输出降低；以及
- (b) 静脉压增加。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第十一方面，本发明描述了一种治疗缺血性心脏病的方法，包含给需要上述治疗的个体提供或者施用第八方面的上述药学或者生理学可接受的组合物，上述缺血性心脏病选自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭；

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，

上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第十二方面，本发明描述了利用第二方面的调节物制备用于治疗个体心血管失调的药物的方法。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ， $10\mu\text{M}$ ， $20\mu\text{M}$ ， $30\mu\text{M}$ ， $40\mu\text{M}$ ， $50\mu\text{M}$ ， $60\mu\text{M}$ ， $70\mu\text{M}$ ， $80\mu\text{M}$ ， $90\mu\text{M}$ ，及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ， $2\mu\text{M}$ ， $3\mu\text{M}$ ， $4\mu\text{M}$ ， $5\mu\text{M}$ ， $6\mu\text{M}$ ， $7\mu\text{M}$ ， $8\mu\text{M}$ ， $9\mu\text{M}$  及  $10\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

在一些实施方案中，上述接触通过口服施用上述调节物进行。

在一些实施方案中，上述心血管失调选自：

- (a) 心脏输出降低；以及
- (b) 静脉压增加。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第十三方面，本发明描述了利用第二方面的调节物制备用于治疗个体缺血性心脏病的药物的方法。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $100\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $60\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $90\mu\text{M}$ , 及  $100\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$  至  $10\mu\text{M}$  之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $6\mu\text{M}$ ,  $7\mu\text{M}$ ,  $8\mu\text{M}$ ,  $9\mu\text{M}$  及  $10\mu\text{M}$  值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，上述调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

在一些实施方案中，上述接触通过口服施用上述调节物进行。

在一些实施方案中，上述缺血性心脏病选自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人类灵长动物或人。最好是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第十四方面，本发明描述了制备基因敲除小鼠的方法，其中上述基因敲除小鼠有患心血管失调的倾向，上述心血管失调选自：

- (a) 降低心脏输出；以及
- (b) 增加静脉压；

包含基因敲除编码 SEQ ID NO:5 多肽的基因的步骤。

在一些实施方案中，上述基因敲除为心肌选择性的。

第十五方面，本发明描述了制备基因敲除小鼠的方法，其中上述基因敲除小鼠有患缺血性心脏病的倾向，上述缺血性心脏病选自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；及
- (c) 充血性心衰竭；

包含基因敲除编码 SEQ ID NO:5 多肽的基因的步骤。

在一些实施方案中，上述基因敲除为心肌选择性的。

第十六方面，本发明描述了第十四或者第十五方面的基因敲除小鼠。

第十七方面，本发明描述了利用第十六方面的基因敲除小鼠鉴定候选化合物是否具有预防或治疗心血管失调的疗效，上述心血管失调包含：

- (a) 降低心脏输出；以及
- (b) 增加静脉压；

包含如下步骤：

- (a') 将化合物施用或者不施用小鼠；以及
- (b') 确定施用调节物是否具有选自如下的效果：
  - (i) 降低心脏肥大；
  - (ii) 增加心脏射血量；
  - (iii) 降低心室体积；以及
  - (iv) 减少心肌细胞凋亡；

其中上述效果的确定显示上述调节物具有上述疗效。

第十八方面，本发明描述了利用第十六方面的基因敲除小鼠鉴定候选化合物是否具有预防或者治疗缺血性心脏病的疗效，上述缺血性心脏病选自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭。

包含如下步骤：

- (a') 将化合物施用或者不施用于小鼠；以及
- (b') 确定施用调节物是否具有选自如下的效果：
  - (i) 降低心脏肥大；
  - (ii) 增加心脏射血量；
  - (iii) 降低心室体积；以及

(iv) 降低心肌细胞凋亡；

其中上述效果的确定显示上述调节物具有上述疗效。第十九方面，本发明描述了制备基因敲除大鼠的方法，其中上述基因敲除大鼠倾向有心脏失调，选自：

(a) 降低心脏输出；以及

(b) 增加静脉压；

包含基因敲除在高度严格条件下与 SEQ ID NO:6 的多核苷酸杂交的基因的步骤。

在一些实施方案中，上述基因敲除为心肌选择性的。

第二十方面，本发明描述了制备基因敲除大鼠的方法，其中上述基因敲除大鼠有患缺血性心脏病的倾向，上述缺血性心脏病选自：

(a) 心肌梗塞；

(b) 心肌梗塞后重建；及

(c) 充血性心衰竭；

包含基因敲除在高度严格条件下与 SEQ ID NO:6 的多核苷酸杂交的基因的步骤。

在一些实施方案中，上述基因敲除为心肌选择性的。

第二十一方面，本发明描述了第十九或者第二十方面的基因敲除大鼠。

第二十二方面，本发明描述了利用第二十一方面的基因敲除大鼠鉴定候选化合物是否具有预防或治疗心血管失调的疗效，上述心血管失调包含：

(a) 降低心脏输出；以及

(b) 增加静脉压；

包含如下步骤：

- (a') 将化合物施用或者不施用于大鼠；以及
- (b') 确定施用调节物是否具有选自如下的效果：
  - (i) 降低心脏肥大；
  - (ii) 增加心脏射血量；
  - (iii) 降低心室体积；以及
  - (iv) 减少心肌细胞凋亡；

其中上述效果的确定显示上述调节物具有上述疗效。

第二十三方面，本发明描述了利用第二十一方面的基因敲除大鼠鉴定候选化合物是否具有预防或者治疗缺血性心脏病的疗效，上述缺血性心脏病选自：

- (a) 心肌梗塞；
- (b) 心肌梗塞后重建；以及
- (c) 充血性心衰竭。

包含如下步骤：

- (a') 将化合物施用或者不施用于大鼠；以及
- (b') 确定施用调节物是否具有选自如下的效果：
  - (i) 降低心脏肥大；
  - (ii) 增加心脏射血量；
  - (iii) 降低心室体积；以及
  - (iv) 降低心肌细胞凋亡；

其中上述效果的确定显示上述调节物具有上述疗效。

第二十四方面，本发明描述了分离的大鼠 RUP41 多核苷酸，选自：

- (a) 包含紧邻跨越 SEQ ID NO:6 的至少 75 核苷酸的多核苷酸；
- (b) 包含紧邻跨越 SEQ ID NO:6 的至少 150 核苷酸的多核苷酸；
- (c) 包含紧邻跨越 SEQ ID NO:6 的至少 250 核苷酸的多核苷酸；
- (d) 包含紧邻跨越 SEQ ID NO:6 的至少 350 核苷酸的多核苷酸；

及

(e) 包含紧邻跨越 SEQ ID NO:6 的至少 500 核苷酸的多核苷酸；  
在一些实施方案中，紧邻跨越不包含 SEQ ID NO:6 的第 514 位核苷酸。

在一些实施方案中，上述分离的大鼠 RUP41 多核苷酸包含，编码与人类 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的 RUP41 GPCR 直向同源的内源性大鼠 RUP41 GPCR 的核苷酸序列，主要由其组成，或者由其组成。

与上述 (a) 到 (e) 任一项的 RUP41 多核苷酸具有至少 60%，70%，80%，85%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 同一性的变体多核苷酸也在本发明的范围内。在一些实施方案中，利用局部比对基本查询工具 (“BLAST”) 评价多核苷酸序列的同源性，上述 BLAST 在本领域是公知的技术[参见，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; 其公开在此处全部引入作为参考]。上述变体多核苷酸可包含一个或多个核苷酸的缺失，插入，及取代。一个进一步的实施方案中，本发明描述了上述分离的多核苷酸的互补多核苷酸。

第二十五方面，发明描述了一种重组载体，上述载体包含第二十四方面的分离的多核苷酸。在一些实施方案中，上述重组载体为表达载体。在一些实施方案中，上述表达载体是真核表达载体。适合的表达载体对于本领域技术人员而言是很显而易见的。

在一些实施方案中，上述重组载体被用于瞬间或者稳定转染的方法中。在一些实施方案中，上述重组载体被用于感染方法中。

在一些实施方案中，上述重组载体是用于使 RUP41 基因失活方法中的靶载体。

在一些实施方案中，上述重组载体是被分离的载体。

第二十六方面，发明描述了包含第二十五方面的重组载体的原核或者真核宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞为原核的，且用上述重组载体稳定转化。在一些实施方案中，宿主细胞为真核的，且用上述重组载体瞬间转化。在其它一些实施方案中，上述宿主细胞为真核的，且用上述重组载体稳定转移。

在一些实施方案中，宿主细胞为真核细胞，优选为哺乳动物细胞，且更优选地选自 293, 293T, CHO 及 COS-7 细胞。在一些实施方案中，宿主细胞为真核细胞，更优选地为黑色素细胞。其它适合的宿主细胞对本领域技术人员而言是显而易见的。

在一些实施方案中，宿主细胞为哺乳动物胚胎干细胞，或胚胎干细胞细胞，且上述重组载体被用于使 RUP41 基因失活的方法中。在一些实施方案中，宿主细胞为哺乳动物胚胎体细胞，且上述重组载体被用于使 RUP41 基因失活的方法中。

其它实施方案包含一种原核或真核宿主细胞与第二十四观点多肽再结合。

在一些实施方案中，重组载体为被分离的。

第二十七方面，本发明描述了包含组成性活性 G 蛋白偶联受体和 G 蛋白的 GPCR 融合蛋白构建物，上述受体包含选自如下的 RUP40 多肽：

- (a) SEQ ID NO:2 的多肽；
- (b) SEQ ID NO:3 的多肽；以及
- (c) SEQ ID NO:5 的多肽；

或其片段或者变体。

在一些实施方案中，上述受体包含选自 SEQ ID NO:2 的氨基酸 2 至 433 及 SEQ ID NO:3 的氨基酸 2 至 433 的多肽序列。

RUP41 GPCR 的等位基因变体也在本发明的范围内。

SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 多肽的哺乳直向同源物也在本发明考虑的范围。在一些实施方案中，上述哺乳动物直向同源物包含小鼠 RUP41，大鼠 RUP41，猪 RUP41 及非人类灵长类动物 RUP41。

与 SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，或 SEQ ID NO:5 的 RUP41 多肽具有至少 90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 同一性的变体多肽也在本发明考虑的范围。尤其是在一些实施方案中，利用局部比对基本查询工具（“BLAST”）评价多肽序列的同源性，上述 BLAST 在本领域是公知的技术[参见，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; 其公开在此处全部引入作为参考]。上述变体多肽可包含一个或多个氨基酸的缺失，插入，及取代。SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，或 SEQ ID NO:5 的 RUP41 多肽的组成性活化形式的变体多肽也在本发明考虑的范围。第二十八方面，本发明描述了鉴定候选化合物是否为 RUP 41 GPCR 配体的方法，上述受体包含选自如下的多肽：

- (a) SEQ ID NO:2 的多肽；
- (b) SEQ ID NO:3 的多肽；以及
- (c) SEQ ID NO:5 的多肽；

或其片段或者变体，包含如下步骤：

- (a') 在上述候选化合物存在或不存在下将上述受体与任选标记

的已知接触；

(b') 确定已知上述已知配体与受体间的复合物；以及

(c') 确定在候选化合物存在的条件下上述复合物是否比不存在候选化合物的条件下形成的少；

其中确定显示候选化合物为上述受体的配体。

在一些实施方案中，上述受体包含选自 SEQ ID NO:2 的氨基酸 2 至 433 及 SEQ ID NO:3 的氨基酸 2 至 433 的上述多肽片段。

RUP41 GPCR 的等位基因变体也在本发明考虑的范围中。

SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 多肽的哺乳动物直向同源物也在本发明考虑的范围中。在一些实施方案中，上述哺乳动物直向同源物包含小鼠 RUP41，大鼠 RUP41，猪 RUP41 及非人类灵长类动物 RUP41。

与 SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，或 SEQ ID NO:5 的 RUP41 多肽具有至少 90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 同一性的变体多肽也在本发明考虑的范围中。尤其是在一些实施方案中，利用局部比对基本查询工具（“BLAST”）评价多肽序列的同源性，上述 BLAST 在本领域是公知的技术[参见，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; 其公开在此处全部引入作为参考]。上述变体多肽可包含一个或多个氨基酸的缺失，插入，及取代。SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，或 SEQ ID NO:5 的 RUP41 多肽的组成性活化形式的变体多肽也在本发明考虑的范围中。在一些实施方案中，RUP41 多肽的组成性活化形式为 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的多肽，其中在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 氨基酸 312 位的苯丙氨酸被赖氨酸取代。

在一些实施方案中，受体的上述已知配体为第二方面的调节物。

在一些实施方案中，上述已知的配体包含选自如下的标记：

- (a) 放射性同位素；
- (b) 酶；以及
- (c) 荧光物质。

在一些优选的实施方案中，上述标记为放射性同位素。在一些实施方案中，上述放射性同位素为  $^3\text{H}$ 。

第二十九方面，本发明描述了放射显影的方法，包含给需要上述放射显影的个体提供或施用放射性标记的化合物，其中上述化合物选自第二方面的调节物以及第二十八方面的配体。

在一些实施方案中，上述个体为哺乳类动物。在一些实施方案中，上述哺乳动物为马，牛，羊，猪，猫，狗，兔子，小鼠，大鼠，非人灵长类动物或人。更优选是小鼠，大鼠或人。最优选是人。

第三十方面，本发明描述了人类 RUP41 GPCR 的非人类转基因哺乳动物。在一些实施方案中，上述非人类哺乳动物为小鼠，大鼠或猪。

在一些实施方案中，上述人类 RUP41 GPCR 包含选自如下的多肽：

- (a) SEQ ID NO:2 的多肽；
- (b) SEQ ID NO:2 的多肽，其中在 SEQ ID NO:2 的 312 位的苯丙氨酸被赖氨酸取代；
- (c) SEQ ID NO:3 的多肽；以及
- (d) SEQ ID NO:3 的多肽，其中在 SEQ ID NO:3 的 312 位上的苯丙氨酸被赖氨酸取代。

RUP41 GPCR 的等位基因变体也在本发明考虑的范围內。

在一些实施方案中，上述人类 RUP41 的转基因表达是心肌细胞选择性的。

第三十一方面，本发明使用第三十方面的转基因非人类哺乳动物鉴定本发明的化合物是否具有保护心脏的疗效。

在一些实施方案中，上述非人类哺乳动物为小鼠，大鼠或猪。

上述化合物可通过下述方法评价保护心脏的疗效：将上述化合物施用于上述转基因非人类哺乳动物并确定上述施用是否引起实施例 18 的体内大鼠模型或者其小鼠或者猪类似物的体内模型相对于只施用介质的上述转基因非人类哺乳动物 IS/AAR 的降低。

在一些实施方案中，上述化合物可以通过将上述化合物施用于上述转基因非人类哺乳动物并且确定上述施用是否引起下述效果评价保护心脏的疗效：

- (a) 降低心脏肥大；
- (b) 增加心脏射血量；
- (c) 降低心室体积；以及
- (d) 减少心肌细胞凋亡；

其中上述效果的确定显示化合物具有上述疗效。

在一些实施方案中，本发明的上述化合物为第二方面的调节物。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 100 $\mu$ M 之间值

的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 60 $\mu$ M, 70 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 及 100 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 10 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 6 $\mu$ M, 7 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 9 $\mu$ M 及 10 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，上述调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。在一些实施方案中，本发明的上述化合物是第三十方面的配体。

第三十二方面，本发明描述了制备 RUP41 GPCR 的调节物的方法，包含如下步骤：

- (a) 鉴定权利要求 1 或 2 的方法的上述调节物；以及
- (b) 合成 (a) 中鉴定的调节物。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 100 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M,

30 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 60 $\mu$ M, 70 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 及 100 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 10 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 6 $\mu$ M, 7 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 9 $\mu$ M 及 10 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中, 上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中, 上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中, 上述调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中, 上述调节物为激动剂。

第三十三方面, 本发明描述了用于改变心血管功能的第二方面的调节物。

在一些实施方案中, 心血管功能的上述改变选自:

- (a) 降低心脏肥大;
- (b) 增加心脏射血量;
- (c) 降低心室体积; 以及
- (d) 减少心肌细胞凋亡。

在一些实施方案中, 上述调节物选自激动剂, 部分激动剂, 反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 100 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或

IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 60 $\mu$ M, 70 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 及 100 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 10 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 6 $\mu$ M, 7 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 9 $\mu$ M 及 10 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中，上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中，上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中，上述调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中，上述调节物为激动剂。

第三十四方面，本发明描述了第二方面的调节物用于预防或治疗心血管失调。

在一些实施方案中，上述心血管失调选自：

- (a) 降低心脏输出；以及
- (b) 增加静脉压。

在一些实施方案中，上述调节物选自激动剂，部分激动剂，反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 100 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中，上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M,

30 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 60 $\mu$ M, 70 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 及 100 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 10 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 6 $\mu$ M, 7 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 9 $\mu$ M 及 10 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中, 上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中, 上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中, 上述调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中, 上述调节物为激动剂。

第三十五方面, 本发明描述了第二方面的调节物用于预防或治疗缺血性心脏病。

在一些实施方案中, 上述缺血性心脏病选自:

- (a) 心肌梗塞;
- (b) 心肌梗塞后重建; 以及
- (c) 充血性心衰竭。

在一些实施方案中, 上述调节物选自激动剂, 部分激动剂, 反激动剂及拮抗剂。

在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 100 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M,

30 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 60 $\mu$ M, 70 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 及 100 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M 至 10 $\mu$ M 之间值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。在一些实施方案中, 上述调节物具有小于 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 6 $\mu$ M, 7 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 9 $\mu$ M 及 10 $\mu$ M 值的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的人类 RUP41 GPCR 上的 EC50 或 IC50。

在一些实施方案中, 上述调节物降低了细胞内 cAMP 的含量。

在一些实施方案中, 上述调节物为选择性的。

在一些实施方案中, 上述调节物是口服可生物利用的。

在一些实施方案中, 上述调节物为激动剂。

申请人保留排除本发明任一实施方案的任一种或者多种候选化合物的权利。申请人也保留排除本发明任一实施方案的任一种或者多种调节物的权利。申请人还保留排除本发明任一实施方案的任一多核苷酸或者多肽的权利。申请人另外保留排除本发明任一实施方案的任一缺血性心脏病或任一心血管失调或心肌细胞凋亡失调的权利。

#### 附图说明

图 1 仅为说明性而非限制性的, 图 1 显示了针对“靶受体”的候选化合物的初级扫描结果, 所述“靶受体”为内源性组成性活化 Gs 偶联的 GPCR 的 Gs $\alpha$  融合蛋白。“化合物 A”的结果提供于 A2 道。“化合物 B”的结果提供于 G9 道。

2A 至 C 图.A.使用常规高密度寡核苷酸微阵列在人组织样品上进行微阵列分析, 所述常规高密度寡核苷酸微阵列包含监控 RUP41 基因表达水平的探针。柱状图显示了二次测量的每一个组织图谱中 RUP41

的相对表达水平（平均差分）及标准误差。每一组织名以垂直文字排列的方式显示在每个柱上。

柱状图检查显示人大脑和心脏中 RUP41 的表达。

B.人类多组织点印迹显示在成人及胎儿心脏组织中 RUP41 mRNA 的高水平表达。RUP41 mRNA 表达也可以在不同局部大脑组织中检测出。

C.人类多组织 Northern 印迹显示在心脏及大脑中 RUP41 mRNA 的高水平表达。

图 3.原位杂交显示 RUP41 在成年大鼠心脏中的广泛心肌表达。反义 RUP41 放射性标记的探针检测到 RUP41 在所有心室中的表达。反义对照（GAPDH）及心房特异性（心钠素，ANF）探针被用于其它部分以显示心脏部分探针标记的特异性。

图 4A 至 B。A.RT-PCR 显示了 RUP41 转录本在不含血清的条件下保持 24 小时的新生大鼠心室心肌（NRVMs）中的表达。在向培养基中加入脱羟肾上腺素(PE)或小牛血清(NCS)后 RUP41 转录本水平显著下降并且与肥大表现型相关。G3PDH PCR 产物显示用作 PCR 反应的不同模板水平以及凝胶上样量的一致性。

B.用包括脱羟肾上腺素(PE)，佛波醇 12-豆蔻酸 13-乙酸酯(PMA)，前列腺素 F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α)的肥大剂以及小牛血清(NCS)处理 24 小时后 Northern 印迹显示 NRVMs 中 RUP41 mRNA 表达水平的降低。相应于所有肥大刺激物心肌肥大的遗传标志心钠素(ANF)被上调。28S rRNA 亚甲基蓝染色显示 RNA 的完整性以及相等的上样量。

图 5.上图.在超负荷压力诱导的心脏肥大的体内小鼠模型中 RUP41 mRNA 被下调。对从进行横向主动脉缩窄(TAC)或者假手术(SHAM) 7 天的小鼠分离的总 RNA 进行 Northern 印迹分析。ANF 的增加表达显示 TAC 心脏中形成天然肥大应答。28S rRNA 亚甲基蓝染色显示 RNA 的完整性以及相等的上样量。

底部.经密度测量法分析 RUP41 信号并且标准化到 28S rRNA 信号。

\* 6 个假手术以及 6 个 TAC 样品的方差统计分析显示 RUP41

mRNA 的明显减少,  $P < 0.00005$ 。

图 6. Northern 印迹显示从经受缺氧 6 小时的 NRVMs 分离的总 RNA 中 RUP41 mRNA 的水平降低。缺氧后(H6/R24)复氧 24 小时后 RUP41 mRNA 水平恢复到对照(正常氧)水平。c-fos 表达(缺氧-6)水平的增加显示肌细胞对低含氧环境的胁迫应答。28S rRNA 亚甲基蓝染色显示 RNA 的完整性以及相等的上样量。

图 7A-B. A. 对从人心脏分离的总 RNA 进行 RT-PCR。充血性心力衰竭(CHF)的病人 RNA 与正常心脏功能(正常的)的病人 RNA 相比 RUP41 转录水平下降。向每一 PCR 反应中添加人 GAPDH 引物作为模板浓度以及上样量一致性的内部对照。

B. \*方差统计分析显示 CHF 病人与正常人相比 RUP41 转录本明显减少,  $p < 0.05$ 。心肌梗塞(MI)病人 RUP41 转录本水平与正常心脏没有差别。

图 8. 上图 .COS-7 细胞用 pCMV-HARUP41(HA-RUP41) 或 pCMV-HA 主链(CMV)以及组成型活性的 Gs-偶联的促甲状腺激素受体(pCMV-CART-TSHR)共-转染。[HARUP41 相应于血球凝集素(HA)-标记的 RUP41。]此外, 共-转染 CRE-荧光素酶报告基因构建体以确定在百日咳毒素(PTX)存在或者不存在的条件下 cAMP 活化途径的活性。共-表达 CART-TSHR 以及 HARUP41 的细胞中荧光素酶报道基因的活性比共-表达 CART-TSHR 以及 pCMV-HA 对照的细胞中的活性小, 显示 RUP41 与 Gi 的偶联。用 PTX 处理由 RUP41 抑制 cAMP 的减少证明 Gi 与这种受体的偶联。

底部 . 在百日咳毒素 (PTX) 存在或者缺乏的条件下用 pCMV-HA(CMV) or pCMV-HARUP41(RUP41)构建体转染 COS-7 细胞。毛喉素( $1 \mu M$ )刺激的 cAMP 水平的增加由 RUP41 的表达抑制。用 PTX 处理由 RUP41 抑制 cAMP 的减少证明 Gi 与这种受体的偶联。

图 9A-B. A. 用各种感染复数的编码 RUP41 的重组腺病毒 (AdRUP41)处理 NRVMs, 所述感染复数由每细胞噬斑形成单位(PFU)中的病毒效价定义。腺病毒感染后 24 小时, 分离总 RNA 并且使用 Northern 印迹分析确定病毒表达 RUP41 的水平。在 50PFU/细胞, 就可

检测到 RUP41 的表达，但是高水平表达显示在 100 PFU/细胞。

B.100 PFU/细胞感染 AdRUP41 48 小时的 NRVMs 显示无血清培养基中细胞存活率的增加。用结合鬼笔环肽以及 Hoechst 33342 的德克萨斯红共-染色 NRVMs。

图 10.寡核小体 DNA 断裂(也称为形成序列梯)显示缺氧(8 小时)后复氧(24 小时)刺激了感染 100 PFU/细胞对照(AdGFP)腺病毒的 NRVMs(H8/N24)细胞凋亡的增加。然而，腺病毒介导的 RUP41(100 PFU/细胞)的超量表达降低了由除去血清(normox)以及缺氧后复氧(H8/N24)诱导的 DNA 断裂的水平。

### 发明详述

关于受体的科学文献已经采用了大量涉及对受体具有各种作用的配体。为了清楚和一致的目的，下列定义将贯穿本专利文献使用。当这些术语的定义与其它定义冲突时，应参照下列定义：

激动剂是指当其结合于受体时激活胞内应答的物质(例如，配体，候选化合物)。在一些实施方案中，激动剂是之前不知当其与受体结合时激活胞内应答(例如，增强 GTP  $\gamma$  S 结合于薄膜或降低胞内 cAMP 的水平)的物质。在一些实施方案中，激动剂是之前不知当其与受体结合时抑制分解的那些物质。

别构调节物是指影响受体的功能活性但不抑制内源配体与受体结合的物质(例如，配体，侯选化合物)。别构调节物包括反激动剂，部分激动剂以及拮抗剂。

本发明使用的氨基酸缩写列举在表格 A 中：

表格 A

丙氨酸	ALA	A
精氨酸	ARG	R
天冬酰胺	ASN	N
天冬氨酸	ASP	D
半胱氨酸	CYS	C

谷氨酸	GLU	E
谷氨酰胺	GLN	Q
甘氨酸	GLY	G
组氨酸	HIS	H
异亮氨酸	ILE	I
亮氨酸	LEU	L
赖氨酸	LYS	K
甲硫氨酸	MET	M
苯丙氨酸	PHE	F
脯氨酸	PRO	P
丝氨酸	SER	S
苏氨酸	THR	T
色氨酸	TRP	W
酪氨酸	TYR	Y
缬氨酸	VAL	V

拮抗剂是指与激动剂竞争性结合于受体相同的位点但不激活胞内应答，并且可以因此抑制由激动剂引起的胞内应答的物质(例如，配体，候选化合物)。在激动剂存在的条件下拮抗剂不减少基线胞内应答。在一些实施方案中，拮抗剂是之前不知当结合于受体时能与拮抗剂竞争抑制细胞应答的那些物质，例如其中的细胞应答是指 GTP  $\gamma$  S 结合于膜或降低胞内 cAMP 的水平。

这里的抗体是指包括单克隆抗体以及多克隆抗体。抗体进一步包括 IgG, IgA, IgD, IgE 以及 IgM。抗体包括含有单链整个抗体的整个抗体，以及其抗原结合片段，包括 Fab, Fab', F(ab)2 以及 F(ab')2。抗体可以是任何动物来源的抗体。优选地抗体是人，鼠科动物，兔，山羊，豚鼠，仓鼠，骆驼，驴，绵羊，马或小鸡。优选地，抗体具有解离常数或者 Kd 值小于  $5 \times 10^{-6}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $5 \times 10^{-7}M$ ,  $10^{-7}M$ ,  $5 \times 10^{-8}M$ ,  $10^{-8}M$ ,  $5 \times 10^{-9}M$ ,  $10^{-9}M$ ,  $5 \times 10^{-10}M$ ,  $10^{-10}M$ ,  $5 \times 10^{-11}M$ ,  $10^{-11}M$ ,  $5 \times 10^{-12}M$ ,  $10^{-12}M$ ,  $5 \times 10^{-13}M$ ,  $10^{-13}M$ ,  $5 \times 10^{-14}M$ ,  $10^{-14}M$ ,  $5 \times 10^{-15}M$  以及  $10^{-15}$  的结合亲和性。本发明的抗体可以通过本领域已知的任一合适方法进行制备。

细胞凋亡(又名细胞程序死亡)是指一种细胞死亡形式,其中细胞通过细胞内操纵的信号转导系统诱导细胞程序性死亡。相反,坏死是指细胞被外源因素杀死。

候选化合物是指扫描技术可使用的分子(例如而非限制性的为一种化合物)。优选地,术语“候选化合物”不包括公众已知作为受体的反激动剂,激动剂或拮抗剂的化合物;更优选地,不包括先前已被确定对至少一种哺乳动物具有疗效的化合物;并且最优选地,不包括先前已被确定对人类具有治疗效用的化合物。

心脏射血部分是指单次收缩从左心室排射出的血液部分。例如,如果 100 ml 血液存在于左心室中并且收缩后喷出 90 ml,那么心脏射血部分是 90%。

心脏肥大是指心肌增大。心脏肥大通常而不是总是对增加施加于心肌上的血液动力学负载的适应反应。

密码子是指一组三个核苷酸(或核苷酸的等效物)通常包括与磷酸基结合的核苷(腺嘌呤核苷(A),鸟嘌呤核苷(G),胞嘧啶核苷(C),尿嘧啶核苷(U)以及胸腺嘧啶(T),并且当其被翻译时编码氨基酸。

组合物是指包括至少一个组分的物质;“药用组合物”是组合物的实例。

化合物的效果是指测定的化合物抑制或刺激受体功能的能力;即,激活/抑制信号转导途径和受体结合亲合性对比。检测化合物效果的示范性方式公开于本专利文献的实施例部分。

这里的包括,基本上由...组成以及由...组成根据它们的标准含义进行定义。M.P.E.P.中显示的定义控制本领域的定义并且统制 Federal

Circuit 判例法显示的 定义控制 M.P.E.P 中的显示的含义。

充血性心衰竭( CHF)是指心脏失去其有效泵出血液能力的失调。随着年龄的增长充血性心衰竭会更普遍。缺血性心脏病是充血性心衰竭最普遍的原因, 占有病例的 60 - 70%。增加大于 12 mmHg 静脉压是充血性心衰竭的一个主要的 Framingham 原则, 相当于大于 25 秒循环时间的心输出量的减少。

组成型活性受体是指通过除了通过受体结合其配体或其化学等同物的方式稳定在活性态的受体。组成型活性型受体可以是内源或非-内源的。

组成型激活的受体是指已被修饰从而组成型活化的内源性受体。CART 是组成型激活的受体技术的缩写并且在这里当在 GPCR 前加上前缀时应该被理解为鉴定所述带前缀的 GPCR 为组成型激活的受体。

组成性受体活化是指在不将受体与其配体或其化学等同物结合的条件下激活受体。

接触或接触是指无论是在体外系统或者体内系统中将至少两部分结合在一起。

降低被用来指可测量量的减少并且使用时与术语“减少”, “减小”, “降低”以及“变少”同义。

超声波心动描记法是指利用声波测定心脏结构以及活动物功能的方法。

内源性是指哺乳动物天然产生的物质。

内源性应被理解为包括所述哺乳动物基因组内表示的基因的变体以及其编码的等位基因多肽变体。相比之下，这里的术语非内源性应该指不是由哺乳动物(例如但不限于人)天然产生的。例如但不限于，不是内源形式组成型活化但是当进行操纵时变成组成型活化形式的受体在这里最优选地是指“非-内源性组成型活化的受体”。这两个术语均可用于描述“体内”以及“体外”系统。例如但不限于在筛选方法中内源或非-内源性受体可以指体外筛选系统。例如但不限于，当哺乳动物的基因组被操作包括非-内源性组成型活化受体时可以通过体内系统筛选候选化合物。

表达载体在这里被定义为在表达载体的合适宿主细胞重组体中，转录克隆的 DNA 以及转录的 mRNA 翻译所需的 DNA 序列。适当构建的表达载体应该含有宿主细胞中自主复制的复制起点，选择性标记，有限的限制性酶切位点，可以具有高拷贝数的潜能以及活化的启动子。所述待转录的克隆的 DNA 可操作的连接于所述表达载体内的组成型或条件活化的启动子。例如但不限于，pCMV 是表达载体。

本发明上下文公开的 G 蛋白偶联受体融合蛋白以及 GPCR 融合蛋白是指包括融合到至少一个 G 蛋白，最优选地，这种 G 蛋白的  $\alpha$  亚基的内源组成型活化 GPCR 或非-内源组成型活化 GPCR 的非-内源性蛋白，G 蛋白优选地与和内源孤儿 GPCR 天然偶联的 G 蛋白类型相同。例如但不限于，在内源状态，如果 G 蛋白“Gs 蛋白质  $\alpha$ ”是与 GPCR 偶联的主要 G 蛋白，基于特异性 GPCR 的 GPCR 融合蛋白将是包括融合 Gs  $\alpha$  的 GPCR 的非-内源性蛋白；在一些情况下，如下所列举，非-主要的 G 蛋白可以融合至 GPCR。G 蛋白可以直接融合至组成型活化 GPCR 的 C-末端或在二者之间可能有间距。

宿主细胞是指其中能够包含载体的细胞。宿主细胞可以是原核或真核细胞。在一些实施方案中宿主细胞是真核细胞，优选地哺乳动物细胞，且更优选地选自 293, 293T, CHO 以及 COS - 7 细胞。在一些

实施方案中，宿主细胞是真核细胞，更优选为黑色素细胞。

在这里使用的需要治疗是指由护理者(就人来说例如为医生，护士，护士从业者等；就动物来说为兽医，包括非-人哺乳动物)判断个体或需要或将受益于治疗。这种判断是基于多种护理者专业知识的范围内的因素，但包括个体或动物生病或者将生病的知识，作为可由本发明的化合物治疗的病症。

静脉压增加应该是指由于循环系统变弱所引起的血泊静脉系(静脉)中发展的血压增加。

在这里使用的个体是指任一种动物，包括哺乳动物，优选小鼠，大鼠，其它啮齿类动物，兔子，狗，猫，猪，牛，绵羊，马或灵长类动物，最优选人。

与术语“应答”相关的抑制是指与缺乏化合物的情况下相反在存在化合物的条件下应答减少或受到阻止。

反激动剂是指与内源形式或者组成型活化型受体结合从而降低所观察到的受体基线胞内的应答的物质(例如，配体候选化合物)。

缺血性心脏病应该是指由心组织缺氧引起的失调，其中心脏的肌肉受到影响并且心脏不能适当泵血。缺血性心脏病是美国最常见的心肌病。

分离的是指从原始环境(例如，如果是天然存在的自然环境)取出的物质。例如存在于活动物体内的天然存在的多核苷酸或多肽未经分离但是从自然系统的一些或所有共存物质分离的相同的多核苷酸或DNA或多肽是经分离的。这种多核苷酸可以是载体的一部分和/或这种多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分并且仍然是被分离的因为载体或组

合物不是自然环境的一部分。

这里的基因敲除小鼠/ RAT 包括已经重组体方法操作的小鼠或大鼠因此精选的单个基因已被灭活或以使所有其它的未受影响的基因保留的方式敲除基因。

已知的受体是指特异于该受体的内源性配体已被鉴定的内源性受体。

配体是指特异于天然存在的受体的分子。

在这里使用的术语调节或修饰是指特定活性功能或分子的量，质量或效果的增减。

心肌梗塞是指由于不充分供氧的心肌区域的损伤或坏死。心肌梗塞通常由阻塞一个冠状动脉(给心肌带来血液和氧气的血管)的凝块所引起。凝结阻止血液和氧气到达心脏的那个区域导致那个区域心脏细胞的死亡。非-孤儿受体是指特异于鉴定的配体的内源性天然存在的分子，其中配体与受体的结合激活胞内信号途径。孤儿受体是指该受体的特异性配体尚未被鉴定的或未知的内源性受体。部分激动剂是指当结合于受体时比完整激动剂更小程度/幅度活化胞内应答的物质(例如，配体，候选化合物)。

药物组合物是指包括至少一种活性成分的组合物，其中所述组合物可用于研究哺乳动物(例如但不限于人)的指定效果。本领域技术人员将理解和认识到上述技术适于确定活性成分是否具有基于技术人员需要的所希望的效果。

多核苷酸是指以单链或者双链体形式超过一个核苷酸的 RNA，DNA，或 RNA/DNA 杂交体序列。本发明的多核苷酸可以通过任一已

知的方法制备，包括合成的，重组体，离体繁殖或其组合，以及利用本领域已知的任一提纯法。

多肽是指不考虑聚合物长度的氨基酸的聚合物。因此，肽，寡肽和蛋白包括在本发明定义的多肽的范围内。这个术语不特指或排除的表达后修饰。例如，包括共价连接的葡糖基基团，乙酰基，磷酸基脂基等等的多肽清楚地由术语多肽包括。

心肌梗塞后重建。心肌梗塞损失的心肌组织引起心室上持续的过量血液动力学负载。心室肥大建立了一种据此心脏补偿负载增加的原理机制。然而，在血液动力学超负荷面前这种适应于持续心脏性能的能力是有限的并且当长期维持时就变成病态适应。逐渐地，因为扩大的心室逐渐增大并且收缩功能变弱，所以适应的肥大表现型转变为心衰竭。对心脏中心肌梗塞的适应性以及不适应性应答的自然史被称作“重建”。

关于心肌梗塞后重建，有大量关于病理学进展的信息参数：

- (a) 如果心脏肥大增加，是有害的；
- (b) 如果心脏肌细胞程序死亡增加，是有害的；
- (c) 如果心脏射血部分减少，是有害的；以及
- (d) 如果心室容积增加，是有害的。

用超声波心动描记法可以进行活动物包括大鼠以及小鼠射血部分，心室扩张的测定。这些参数通常在最初检查。为了正确地确定涉及的致病机制，然而，一般进一步需要处死动物以测定心肌细胞的程序死亡。

引物在这里是指特异性寡核苷酸序列，其互补于靶核苷酸序列并且被用于杂交至靶核苷酸序列。引物用作 DNA 聚合酶，RNA 聚合酶或逆转录酶催化的核苷酸聚合的起点。

受体功能是指受体的正常操作以接收刺激物并且调节细胞内的功能，包括但不限于通过G-蛋白调节基因转录，调节离子的流入或流出，作用催化反应，和/或调节活性。

减少心输出量是指减少衰竭心脏的泵排量由此减少心室每次收缩注入循环系统(动脉)的血液。

第二信使是指受体活化产生的胞内应答。第二信使可以包括例如肌醇三磷酸( IP3)，甘油二酯( DAG)，环化 AMP ( cAMP)，环鸟苷酸( cGMP)以及  $Ca^{2+}$ 。可以测定第二信使来确定受体活化。此外，可以测定第二信使应答以直接鉴定候选化合物，包括例如反激动剂，部分激动剂，激动剂以及拮抗剂。

信噪比是指响应活化，扩增或刺激产生的信号，其中信号超出响应非-活化，非-扩增或非-刺激的背景噪声或基态水平。

跨距是指位于基因，例如目标 GPCR 的最后一个密码子或者最后一个氨基酸后，但是起始密码子或者目标 G 蛋白的开始区域之前的翻译的氨基酸的数目。翻译的氨基酸的数目可以是一个，两个，三个，四个等等以及高达十二个。

与术语“应答”相关的刺激是指在存在化合物的条件下与缺乏化合物条件相比应答加强。

受试者是指灵长类动物，包括但不限于人类和狒狒以及宠物诸如狗和猫，实验动物诸如大鼠和小鼠以及家畜诸如马，绵羊以及牛。

本发明使用的治疗有效量是指引起组织，系统，动物，个体或者人生物学或者药物应答的活性化合物或者药剂的量，所述组织，系统，

动物，个体或者人正在被研究人员，兽医，医生或者其它临床医生研究，所述生物学或者药物应答包括下列的一种或者多种活性：

(1) 预防疾病；例如预防可能易患疾病，体况或者失调但是还没有经历或者显示所述疾病的病理或者症状的个体的疾病，体况或者失调，

(2) 抑制疾病；例如抑制正在经历或显示疾病，体况或者失调的病理和/或症状的个体的疾病，体况或失调（即，阻止病理和/或症状的进一步发展），以及

(3) 改善疾病；例如改善正在经历或显示疾病，体况或者失调的病理和/或症状的个体的疾病，体况或失调（即，逆转病理和/或症状）。

这里的转基因小鼠/大鼠应该包括通过重组体手段被工程改造携带异体基因，或者转基因，选择作为其自身的部分遗传物质的小鼠或者大鼠。

心室体积是指测量的心脏的左或者右心室内部尺寸。在衰竭的心脏中，心室增大。

## A. 介绍

下列部分的顺序是为了阐述效率而非也不应该被理解为是对本发明的内容或者附属权利要求的限制。

## B. 筛选候选化合物

### 1. 一般的 GPCR 筛选分析技术

当 G 蛋白受体活化时，其结合 G 蛋白（例如，Gq, Gs, Gi, Gz, Go）并且激发 GTP 与 G 蛋白的结合。然后 G 蛋白起 GTP 酶的作用并且缓慢水解 GTP 到 GDP，借此在正常情况下受体失活。然而，活化的受体继续将 GDP 转化为 GTP。不可水解的 GTP 类似物， $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ，可用于监控与表达活化受体的膜的加强结合。据报道  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  可用于监控在配体缺乏或者存在的条件下 G 蛋白与膜的偶联。这种监控的

一个实例，以及其他公知的以及本领域可获得的实例由 Traynor 和 Nahorski 于 1995 年发表。这种分析系统的一种优选应用是候选化合物的最初初筛，因为所述系统一般可用于所有 G 蛋白偶联受体而不管是否是与受体的胞内区域互作的特定 G 蛋白。

## 2. 具体的 GPCR 筛选分析技术

一旦利用“一般的”G 蛋白偶联受体分析（即，选择作为激动剂或者反激动剂的化合物的分析）鉴定了候选化合物，在一些实施方案中，优选进行进一步的筛选以证实所述化合物作用于受体位点。例如，通过“一般的”分析鉴定的化合物可能不与受体结合，但是但是可能紧紧“不偶联”于细胞内结构域的 G 蛋白。

### a. G<sub>s</sub>, G<sub>z</sub> 以及 G<sub>i</sub>.

G<sub>s</sub> 激活腺苷酸环化酶。另一方面 G<sub>i</sub>（以及 G<sub>z</sub> 和 G<sub>o</sub>）抑制腺苷酸环化酶。腺苷酸环化酶催化 ATP 转化到 cAMP；因此，偶联 G<sub>s</sub> 蛋白的活化 GPCRs 与 cAMP 细胞含量的增加相关。另一方面，偶联 G<sub>i</sub>（或者 G<sub>z</sub>, G<sub>o</sub>）蛋白的活化 GPCRs 与 cAMP 细胞内含量的减少相关。通常参见“突触传递的间接机制（Mechanisms of Transmission Synaptic）”，第 8 章，从神经元到大脑（From Neuron To Brain）（第三版）Nichols, J.G.等编辑，Sinauer Associates, Inc.（1992）。因此，检测 cAMP 的分析可被用于确定候选化合物是否为例如受体的反激动剂（即，这种化合物将减少 cAMP 的含量）。可以使用本领域测定 cAMP 的多种方法；在一些实施方案中，优选的方法依赖于使用基于 ELISA 形式的抗 cAMP 抗体。可以使用的另一种分析是全细胞第二信使报告物系统分析。基因的启动子启动特定基因编码的蛋白的表达。cAMP 通过促进 cAMP - 应答的 DNA 结合蛋白或者转录因子（CREB）的结合驱动基因表达，然后所述 cAMP - 应答 DNA 结合蛋白或者转录因子（CREB）与启动子在被称作 cAMP 效应元件的特异性位点结合并且驱动基因的表达。报告系统可被构建为在报告基因前具有包含多个 cAMP 效应元件的启动子，例如，β - 半乳糖苷酶或者荧光素酶报告系统。因此，活化的 G<sub>s</sub> -

结合的受体引起 cAMP 的聚集然后活化基因以及报告蛋白的表达。然后可以利用标准生物化学分析检测报告蛋白诸如  $\beta$ -半乳糖苷酶或者荧光素酶 (Chen 等人 1995)。

#### b. G $\alpha$ 以及 G $\beta$ .

G $\beta$  以及 G $\alpha$  与磷脂酶 C 的激活有关, 其依次水解磷脂 PIP<sub>2</sub>, 释放两种胞内信使: 二酰甘油 (DAG) 以及肌醇 1,4,5-三磷酸 (IP<sub>3</sub>)。IP<sub>3</sub> 的增加积累与 G $\beta$ -以及 G $\alpha$ -相关受体的激活有关。通常参见“突触传递的间接机制 (Mechanisms of Transmission Synaptic)”, 第 8 章, 从神经元到大脑 (From Neuron To Brain) (第三版) Nichols, J.G. 等编辑, Sinauer Associates, Inc. (1992)。检测 IP<sub>3</sub> 积累的分析可被用于确定候选化合物是否为例如 G $\beta$ -或 G $\alpha$ -相关受体的反激动剂 (即, 这种化合物将减少 IP<sub>3</sub> 的含量)。G $\beta$ -相关受体可以利用 AP1 报告分析检验, 因为 G $\beta$ -依赖的磷脂酶 C 引起包含 AP1 成分的基因的活化; 因此, 活化的 G $\beta$ -相关受体将证明这种基因表达的增加, 借此其反激动剂将证明这种表达的减少以及激动剂将证明这种表达的增加。可以获得这种检测的市售分析。

### 3. GPCR 融合蛋白

通过利用内源, 组成性活化的 GPCR 或者非内源性组成性活化的 GPCR 用于筛选直接鉴定反激动剂或者激动剂的候选化合物提供了一种有价值的筛选方法, 通过定义, 受体即使在缺乏结合其上的内源性配体时也是活化的。因此, 为了区分, 例如在存在候选化合物的条件下非内源性受体以及在缺乏化合物条件下的非内源性受体, 为了使这种区分颗粒被理解为这种化合物是反激动剂或者激动剂或者对这种受体没有作用, 在一些实施方案中, 优选使用可以加强这种分化的方法。在一些实施方案中, 优选采用 GPCR 融合蛋白的方法。

通常, 利用上述分析技术一旦确定非内源性 GPCR 已经被组成性活化, 就可以确定与内源性 GPCR 偶联的主要 G 蛋白。G 蛋白与 GPCR

的偶联提供了可被评价的信号途径。在一些实施方案中，优选利用哺乳动物表达系统进行筛选，因而期待其中具有内源性 G 蛋白的系统。因此，根据定义，在这种系统中，非内源性组成性活化的 GPCR 将连续地发信号。在一些实施方案中，优选地加强这种信号是在例如受体的反激动剂存在的条件下，当与反激动剂接触时，更可能更容易地，尤其是在筛选过程中区分受体。

GPCR 融合蛋白是用来加强与非内源性 GPCR 偶联的 G 蛋白的效力。在一些实施方案中，GPCR 融合蛋白优选内源性组成性活性 GPCR 或者非内源性组成性活化 GPCR 进行筛选，因为这种方法加强了在这种筛选技术中产生的信号。这对促进显著的“信噪比”是很重要的；这种显著的比值对于筛选本发明公开的候选化合物是优选的。

用于表达 GPCR 融合蛋白的构建物的构建是在本领域技术人员熟知的范围内。市售的表达载体以及系统提供了各种可以满足研究者特定需求的方法。构建这种 GPCR 融合蛋白构建物的重要标准包括但不限于 GPCR 序列以及 G 蛋白序列都在框架内（优选地，内源 GPCR 的序列在 G 蛋白序列的上游），而且 GPCR 的终止密码子被缺失或者替换使得 GPCR 表达后，也可以表达 G 蛋白。GPCR 可以直接连接到 G 蛋白，或者可以在二者之间具有间隔物残基（优选地，仅仅约 12 个残基，虽然这个数目可以由本领域技术人员很容易地确定）。为方便起见，优选使用间隔物。在一些实施方案中，优选地偶联至非内源性 GPCR 的 G 蛋白在构建 GPCR 融合蛋白构建物前即被鉴定。因为只有少数 G 蛋白被鉴定，优选地包括 G 蛋白序列的构建物（即，通用 G 蛋白构建物，参见以下的实施例 5（a））可用于在其中插入内源 GPCR 序列；这就给大规模筛选各种具有不同序列的不同内源性 GPCRs 提供了更高的效率。

如上所述，偶联至  $G_i$ ,  $G_z$  以及  $G_o$  的活化的 GPCRs 可以抑制 cAMP 的形成，使得基于这些类型的 GPCRs 的分析具有挑战性[即，活化后

cAMP 信号减弱，使得直接鉴定例如激动剂（将进一步减弱这种信号）具有挑战性]。如本发明下面所公开，已经确定对于这些类型的受体而言，可能建立不是基于 GPCR 内源性 G 蛋白的 GPCR 融合蛋白，以建立基于活环化酶的分析。因此，例如内源性 Gi 偶联受体可以融合到 Gs 蛋白，使得融合构建物在表达后，可以“驱动”或者“启动”内源性 GPCR 与例如 Gs 偶联而非与“天然的”Gi 蛋白偶联，从而建立基于环化酶的分析。因此，对于 Gi, Gz 以及 Go 偶联受体而言，在一些实施方案中，当使用 GPCR 融合蛋白以及所述分析是基于检测腺苷酸环化酶的活性时，优选用 Gs（或者激发腺苷酸环化酶形成的同等物 G 蛋白）构建融合构建物。

表 B

G 蛋白	GPCR 活化对产生 cAMP 的影响(即, 组成性活化或者激动剂结合)	GPCR 活化对 IP <sub>3</sub> 聚集的影响(即, 组成性活化或者激动剂结合)	与反激动剂接触对产生 cAMP 的影响	与反激动剂接触对 IP <sub>3</sub> 聚集的影响
G <sub>s</sub>	增加	N/A	减少	N/A
G <sub>i</sub>	减少	N/A	增加	N/A
G <sub>z</sub>	减少	N/A	增加	N/A
G <sub>o</sub>	减少	增加	增加	减少
G <sub>q</sub>	N/A	增加	N/A	减少

相同效果为利用 Gq 蛋白与 G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>z</sub>, 或 G<sub>o</sub> 蛋白融合的 G 蛋白融合构建体。在一些实施方案中, 优选的融合构建体可以是其中的 G 蛋白  $\alpha$  亚基 (“G $\alpha$ q”) 的前六个氨基酸被删除, 且在 G $\alpha$ q 的 C 末端后 5 个氨基酸被目的 G 蛋白的 G $\alpha$  的相应氨基酸取代。例如, 融合构建体可以具有与 G<sub>i</sub> 蛋白融合的 Gq (6 氨基酸), 产生 “Gq/G<sub>i</sub> 融合构建体”。此融合构建体将促进内源性 G<sub>i</sub> 偶联受体偶联至其非内源性 G 蛋白, Gq, 使得第二信使, 例如, 三磷酸肌醇或二酰甘油, 可以代替 cAMP 的产生被测量到。

#### 4. 靶 G<sub>i</sub> 偶联的 GPCR 与信号增强剂 G<sub>s</sub> 偶联的 GPCR 的共转染 (基于 cAMP 的分析)

G<sub>i</sub> 偶联受体已知抑制腺苷酸环化酶, 因此, 降低 cAMP 的产量, 其使得 cAMP 水平的评定具有挑战性。在一些实施方案中, 测量活化后显示主要偶联 G<sub>i</sub> 的受体活化的 cAMP 产量降低的有效技术可以通过共转染增强子与连接 GPCR 的 G<sub>i</sub>, 所述增强子为例如活化后主要与 G<sub>s</sub> 偶联的非内源性组成性活化的受体 (如 TSHR-A6231; 参见以下)。显而易见, 活化的 G<sub>s</sub> 偶联受体可基于 cAMP 产量的增加进行确定。G<sub>i</sub> 偶联受体的活化引起 cAMP 产量的降低。因此, 共转染技术目的在于方便地利用这些 “相对” 作用。例如, 非内源性组成性活化的 G<sub>s</sub> 偶联受体 (“信号增强子”) 与单独的表达载体的共转染提供了基线的 cAMP 信号 (即, 虽然 G<sub>i</sub> 偶联受体将降低 cAMP 的量, 但是这种 “减少” 将

与由组成性活化的 Gs 偶联的信号增强子引起的 cAMP 含量的显著增加相关)。接着带有“靶受体”的信号增强剂与 Gi 偶联的靶受体的反激动剂的共转染将增加测出的 cAMP 信号,同时 Gi 偶联的靶受体的激动剂将减少这种信号。

直接利用这种方法鉴定的候选化合物应该独立地进行评价从而保证这些候选化合物并不靶向信号增强受体(其可以在筛选针对共转移受体之前或之后进行)。

## C. 药物化学

### 候选化合物

本领域已知的任一分子可用来测试其调节(增加或减少)本发明 GPCR 活性的能力。为了鉴定调节活性的化合物,候选化合物可直接提供给表达所述 GPCR 的细胞。

本发明的实施方案非常适合于筛选调节,例如,抑制、拮抗或刺激受体产量或者活性的化学分子文库。化学文库可以为肽文库,肽模拟物文库,化学合成文库,重组体,例如,噬菌体表达文库,以及体外基于翻译的文库,其它非肽合成有机文库等。本发明的实施方案非常适合于筛选含有生物材料的内源性候选化合物,包含但不限制血浆及组织提取物,以及筛选已知具有生化活性的内源性化合物文库。

在一些实施方案中,与通过组合化学技术产生的化合物一起进行候选化合物的直接鉴定,通过组合化学技术制备了用于这种分析的数以千计的化合物。候选化合物可为化学文库的一个成员。所述化学文库可包含任一数目的单独成员,例如几十至几百至几千至几百万合适的化合物,例如,肽,类肽及其它寡化合物(环状或直线),及基于模板的小分子,例如苯并二氮杂,乙内酰脲,双芳香基,碳环及多环化合物(例如,萘,吩噻嗪,吡啶,类固醇等),碳水化合物及氨基酸衍生物,二氢吡啶,二苯甲基以及杂环化合物(例如,trizine,吲哚,

噻唑烷等)。引用的数目以及列举的化合物类型是说明性的而非限制性的。优选的化合物文库包括低分子量的化合物以及可能的治疗剂。

示范性的化学文库可以从几个来源市售获得 (ArQule, Tripos/PanLabs, ChemDesign, Pharmacopoeia)。在一些情况下, 利用组合的策略产生这些化学文库, 所述组合策略将文库每一成员的同源性编码在附着了成员化合物的基质上, 从而可以直接以及间接鉴定作为有效调节物的分子。因此, 在许多组合方法中, 化合物平面上的位置具体指明化合物的成份。而且, 在一个实施例中, 一个单独的平面位置可有 1 至 20 个化学物质, 其可通过施用于含有目标相互作用的小孔筛选得到。因此, 如果检测到调节, 可以分析反应的较小集合的调节活性。通过这种方法, 可以筛选很多候选化合物。

许多适合使用的文库是本领域已知的并且可用于提供根据本发明试验的化合物。或者, 可以利用常规方法构建文库。此外, 更一般地, 也可以使用结构性限制的有机多样性 (例如, 非肽) 文库。例如, 可以使用苯并二氮杂文库 (参见例如, Bunin 等的, 1994, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:4708-4712)。

在本发明另一个实施方案中, 组合化学可被用于鉴定本发明的 GPCR 调节物。组合化学能够建立包含几十万化合物的文库, 其中的很多可以结构相似。同时, 高通量筛选程序能够筛选这些大量的文库对已知靶的亲合性, 已经开发了新的方法从而获得较小尺寸但是最大化学多样性的文库。(参见例如, Matter, 1997, Journal of Medicinal Chemistry 40:1219-1229)。

一种组合化学方法, 亲和指纹分析, 先前已被用来测试小分子的分散文库对给定蛋白质组的结合亲合性。由扫描获得的指纹被用于预测单独的文库成员对其它目的蛋白或者受体的亲合性 (在本发明中, 本发明的受体)。所述指纹与从已知与目的蛋白反应的其它化合物获

得的指纹比较以预测文库化合物是否可以进行类似的反应。例如，不是测试大文库中与复合物或蛋白质成分相互作用的每一个配体，仅测试与已知具有所述活性的其它化合物具有指纹相似性的那些配体。

（参见，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）。

#### 被鉴定为调节物的候选化合物

一般，这种扫描的结果将为有一致核结构的化合物；因此这些化合物可围绕优选的核结构进行其它化学修饰从而进一步加强其药学特性。这种技术对于本领域技术人员而言是已知的，并且在本申请中将不再详细描述。

在一些实施方案中，上述鉴定的调节物是可生物利用的。已经开发了大量本领域普通技术人员可以使用的计算方法用于预测可口服生物利用的药物[Ooms 等人，*Biochem Biophys Acta*(2002) 1587:118-25；Claek & Grootenhuis, *Curr Opin Drug 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；其中每一个公开物都在此处全部引入作为参考]。此外，阳离子发射层析成像（PET）已被很多小组成功用于在口服施用药物后的哺乳动物体内获得药物分布的直接测定，所述哺乳动物包含非人类灵长类动物及人体[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；其中每一个公开物都在此处全部引入作为参考]。页参见下面的实施例 19。

#### D. 药物组合物

本发明提供了通过给需要治疗（或预防）的个体施用治疗有效量的本发明调节物进行治疗（或预防）的方法[也参见，见 PCT 申请 PCT/IB02/01461，国际公开号 WO 02/066505，公开于 2002 年 8 月 29 日；其中每一个公开物都在此处全部引入作为参考]。在一个优选的方面，调节物是纯化的形式。个体优选为动物，包含但不限于诸如牛，猪，马，鸡，猫，狗，兔子，大鼠，小鼠，等，且优选为哺乳动物，且最优选为人。

本发明的调节物可施用于非人类动物 [参见下面的实施例]及/或人，单独的或药用组合物的形式，在药用组合物的情况下本发明的调节物与合适的载体或赋型剂利用本领域技术人员公知的技术进行混合。合适的药用载体本领域技术人员可以获得；例如，参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Edition, 1980, Marking Publishing Co.,(Oslo 等人编)。

然后药学或生理可接受的组合物以治疗有效量提供。治疗有效量是指调节物的量足以预防或者缓解缺血性心脏病症状或生理状态，所述缺血性心脏病包含心肌梗塞，心肌梗塞后重建，及充血性心衰竭，所述剂量由本发明描述的方法说明性而非限制性的确定。在一些实施方案中，治疗有效量是指调节物的量足以预防或者缓解心血管失调的症状或生理状态，所述心血管失调包含降低心脏输出，增加静脉压，所述剂量由本发明描述的方法说明性而非限制性的确定。在一些实施方案中，治疗有效量是指调节物的量足以影响心血管功能的所需改变，所述心血管功能的改变包含减小心脏肥大，增加心脏射血量，降低心室容积，降低心肌细胞凋亡，所述剂量由本发明描述的方法说明性而非限制性的确定。很清楚，本发明的调节物可以单独或者与其它药用或者生理用化合物组合提供。其它用以治疗本发明失调的化合物是本领域公知的。本发明的一个方面包含本发明公开的实施方案的应用，进一步包括一种或者多种选自如下的药剂：卡托普利(captopril)，马来

酸依那普利片 (Enalapril Maleate), lininopril, 雷米普利 (Ramipril), perindopril, 呋塞米 (Furosemide), 托拉塞米 (torasemide), chlorothiazide, hydrochlorothiazide, amiloride hydrochloride, 螺内酯 (spironolactone), 阿替洛尔 (atenolol), 比索洛尔 (bisoprolol), carvedilol, metoprolol tartrate, 及地高辛 (digoxin)。

在一些实施方案中, 缺血性心脏病选自心肌梗塞, 心肌梗塞后重建, 及充血性心衰竭。在一些实施方案中, 心肌失调选自降低心脏输出及增加静脉压。在一些实施方案中, 心血管功能的需要改变选自心脏肥大, 心脏射血量增加, 心室体积降低, 及心肌细胞凋亡降低。

#### 施用途径

合适的施用途径包含利用本领域已知的方法口服, 鼻, 直肠, 跨粘膜, 或肠施用, 非肠道输送, 包含肌内, 皮下, 脊椎内注射, 以及鞘内, 直接心室内, 静脉内, 腹膜内, 鼻内, 肺内 (吸入) 或眼内注射。其它尤其优选的施用途径为气雾剂以及贮存制剂。本发明的药剂的持续释放剂型, 尤其是贮存制剂很清楚被考虑在内。在一些实施方案中, 施用途径为口服。

#### 成份/配方

用于本发明的药用或者生理用组合物核药剂可以常规方式利用一种或者多种生理上可接受的载体包括赋型剂核助剂进行配制。合适的制剂依赖于所选择的施用途径。

某些描述于此的药剂将包含药用或者生理用载体以及至少一种本发明的调节物。用以注射时, 本发明的药剂可制配置在水溶液中, 优选为生理用缓冲液中, 诸如 Hanks 溶液, Ringer 溶液, 或生理盐水缓冲液诸如磷酸或双碳酸溶液。经粘膜施用时, 制剂中使用使用适合渗透屏障的渗透剂。这种渗透剂一般来说是本领域已知的。

可以口服的药用或者生理用制剂包含由凝胶制成的推动配合胶囊，由凝胶和诸如甘油或者山梨糖醇的增塑剂制成的软的，密封胶囊。推动配合胶囊可包含与填充剂如乳糖，粘合剂如淀粉，和/或润滑剂诸如滑石或硬脂酸镁及任选的稳定剂混合的活性成份。在软胶囊中，活性成份可溶于或悬浮于合适的液体中，诸如脂肪油，液体石蜡，或液体聚乙二醇。另外，可添加稳定剂。所有的口服制剂都应该在适于口服的剂量。

口腔施用时，组合物可以采用传统方式配制的片剂或者锭剂的剂型。

吸入施用时，本发明使用的化合物以从喷雾器中的压缩团气雾剂喷射递送的方式方便地递送，所述喷雾器使用例如二氧化碳的气体推进剂。在压缩气雾剂的情况下，可以通过提供阀门递送特定量确定剂量单位。用于吸入器或者吹药器的胶囊及例如凝胶的药筒可以配制成含有化合物以及诸如乳糖或者淀粉的合适粉末基体的粉末混合物。

化合物可被配制成通过注射，例如通过弹丸注射或者连续注射用于非肠道给药。注射制剂可以单位剂量存在，例如在安瓿瓶或者多剂量的容器中，通式向其中添加防腐剂。组合物可以为水介质的悬浮，溶液或乳化液的形式，并且可以含有诸如悬浮，稳定和/或分散剂的制剂试剂。

非肠道给药的药用或者生理用制剂包括以水溶形式的活性化合物的水溶液。水溶悬浮液可包含增加悬浮液粘度的物质，诸如羧甲基纤维素钠，山梨糖醇或葡聚糖。任选地，悬浮液也可以含有合适的稳定剂或者提高化合物溶解性从而制备高度浓缩溶液的试剂。

或者，活性成份可为粉末或冻干形式的成份以在使用前与合适的介质，诸如无菌无热原水混合。

除了上述的制剂外，化合物也可以配制成长效制剂。这种长效制剂可以通过植入（例如，皮下或肌内）或通过肌内注射。因此，例如，化合物可以与合适的聚合物或疏水性材料（例如可接受油的乳化剂）或离子交换树脂一起配制，或为微溶衍生物，例如为微溶盐。

在一个特别的实施方案中，化合物可经由控制释放系统递送。在一个实施方案中，可以使用泵（Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit.Ref.Biom.Eng.14:201-240; Buchwald 等, 1980, Surgery 88:507-516; Saudek 等, 1989, N.Engl. J. Med. 321:574-579）。在另一个实施方案中，可使用聚合材料（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 和 Ball 编辑, Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.23:61; Levy 等, 1985, J. Neurosurg. 71:858-863）。其它控制释放系统由 Langer 论述在综述中（1990, Science 249:1527-1533）。

另外，可以使用持续释放系统递送化合物，诸如包含治疗剂的固体疏水聚合物的半渗透基质。多种持续释放材料已被建立并且是本领域技术人员公知的。持续释放胶囊可以，依赖于其化学性质，释放化合物几周至超过 100 天。

依靠治疗剂的化学性质及生物稳定性，可以使用稳定调节物的其它策略。

药学及生理学组合物也可以包含合适的固体或胶体相的载体或赋形剂。这种载体或赋形剂的例子包括，但不限于碳酸钙，磷酸钙，多种糖类，淀粉，纤维素衍生物，凝胶，以及诸如聚乙二醇的聚合物。

## 有效剂量

适合本发明使用的药学及生理学化合物包括其中含有可以实现治疗目的的有效量活性成分的组合物。更具体的，治疗有效量是指预防接受治疗的受试者出现的症状发展或者缓解所述症状的有效量。有效量的确定是本领域技术人员公知的，尤其是根据本发明提供的详细公开。

对于用于本发明的任一化合物而言，治疗有效剂量可最初由细胞培养分析进行估计。例如，可以在动物模型中配制剂量，以达到循环浓度范围，其包含或含有显示体外系统中保护细胞免于死亡的浓度点或范围。[参见，下面的实施例的体外分析及体内动物模型。]这种信息可被用于更精准地确定用于人体的剂量。

治疗有效量是指使得患者的症状缓解的化合物的量。这种化合物的毒性及疗效可由细胞培养或实验动物的标准药理方法进行确定，用于确定 LD<sub>50</sub>（50%试验群的致死剂量）及 ED<sub>50</sub>（50%试验群的治疗有效剂量）确定。毒性与疗效的剂量比为治疗指数，且其可表示为 LD<sub>50</sub>与 ED<sub>50</sub>的比。表现出高治疗指数的化合物是优选的。

从细胞培养物分析及动物试验获得的数据可被用于配制用在人体的剂量范围。这种化合物的剂量优选落在循环浓度范围内，所述循环浓度范围包含少量或无毒性的 ED<sub>50</sub>。剂量可以根据采用的剂型以及使用的给药途径在这个范围内改变。每个医生可以根据病人的状况选择准确的制剂，给药途径以及剂量。（见，Fingl 等人，1975，“治疗的药理学基础（The Pharmacological Basis of Therapeutics）”第一章）。

剂量及间隔可以单独调节从而使得提供的活性化合物的血浆浓度根据特定的状态足以预防或者治疗本发明所述的失调。需要获得这些效果的剂量取决于个体特性及给药途径。

剂量间隔也可以利用最低有效浓度的值进行确定。化合物应该利用保持血浆水平高于最低有效浓度 10-90%倍, 优选 30-99%之间, 最优选 50-90%之间的给药方案进行施用。在局部给药或者选择性摄入的情况下, 药物的有效局部浓度可能不与血浆浓度相关。

组合物的施用量当然取决于进行治疗的受试体, 受试体的体重, 病痛的严重性, 给药方式以及处方大夫大判断。

本发明调节物量的优选剂量范围为 0.1 至 100mg/kg 体重, 所述本发明调节物可以每日或者规律性施用达到需要的效果, 包括但不限于预防或治疗本发明所述的缺血性心脏病, 预防或治疗本发明所述的心血管失调, 或者影响本发明所述的心血管功能所需的改变。其它优选的剂量范围为 0.1 至 30mg/kg 体重。其它优选的剂量范围为 0.1 至 10mg/kg 体重。其它优选的剂量范围为 0.1 至 3.0mg/kg 体重。当然, 这些每日剂量可以在一天的时间内周期性小剂量的递送或者施用。应该注意这些剂量范围仅仅是指优选的范围并且并不意味着是对本发明的限制。

#### E. 治疗方法

本发明尤其涉及预防或治疗缺血性心脏病, 包含心肌梗塞, 心肌梗塞后重建, 以及充血性心衰竭的方法, 包含给需要这种治疗的个体提供本发明的调节物。本发明尤其涉及预防或治疗心血管失调, 包含降低心脏输出及增加静脉压的方法, 包含给需要这种治疗的个体提供本发明的调节物。本发明还涉及影响心血管功能需要的改变, 包含降低心脏肥大, 增加心脏射血体积, 降低心室提及, 以及减少心肌细胞凋亡的方法, 包含给需要这种治疗的个体提供本发明的调节物。在一些实施方案中, 所述调节物为口服可生物利用的。在些实施方案中, 调节物在药用组合物中通过口服提供给个体。优选地, 个体为哺乳动物, 并且最优选为人类。

## F.其它应用

调节（增加，降低，或阻断）心肌细胞保护的 RUP41 受体功能的试剂可通过将候选化合物与 RUP41 受体接触并且确定候选化合物对 RUP41 受体功能的影响进行鉴定。调节 RUP41 受体功能的化合物的选择可以通过将其对 RUP41 受体的影响与其对其它受体的影响的比较进行评价。在鉴定了调节 RUP41 受体功能的化合物后，这些候选化合物可以在其它分析中进行进一步的试验，所述其它分析包括但不限于体内模型，用以对它们活性进行证实以及定量分析。RUP41 受体功能的调节物可用于治疗涉及正常或异常 RUP41 受体功能的疾病及生理状况。

调节（增加，降低，或阻断）心脏保护的试剂可通过将候选化合物与 RUP41 受体接触以及确定候选化合物对 RUP41 受体功能的影响进行鉴定。在一些实施方案中，上述心脏保护包含预防或降低心肌细胞死亡。在一些实施方案中，所述心肌细胞死亡包含心肌细胞凋亡。在一些实施方案中，所述心脏保护包含保护心肌防止缺血。在一些实施方案中，所述心脏保护包含降低梗塞面积。在一些实施方案中，在一些实施方案中，所述心脏保护包含改善缺血后收缩性的恢复。在一些实施方案中，所述心脏保护包含抑制恶性缺血诱导的心律不齐。调节 RUP41 受体功能的化合物的选择可以通过将其对 RUP41 受体的影响与其对其它受体的影响的比较进行评价。在鉴定了调节 RUP41 受体功能的化合物后，这些候选化合物可以在其它分析中进行进一步的试验，所述其它分析包括但不限于体内模型，用以对它们活性进行证实以及定量分析。RUP41 受体功能的调节物可用于治疗涉及正常或异常 RUP41 受体功能的疾病及生理状况。

本发明还涉及被鉴定为 RUP41 的调节物或者配体的本发明化合物的同位素标记形式，其不仅可用于放射性显影[见 Lemstra 等人，*Gerontology*(2003) 49:55-60；Myers 等人，*J Psychopharmacol*(1999)13:352-7；其公开物在此处全部引入作为参考]，

而且还可以用于体外核体内分析中，用于将 RUP41 在组织样品中，包括人类的组织样品中定位以及定量分析，并且用以通过抑制同位素标记的化合物的结合鉴定 RUP41 配体。本发明进一步的目的是开发包含这种同位素标记化合物的新的 RUP41 分析方法。通过举例而非限制的方式，可以想象通过放射性显影观察到的 RUP41 可以鉴定一个个体具有发展成缺血性心脏病的危险，所述缺血性心脏病包含心肌梗塞，心肌梗塞后重建以及充血性心衰竭。

本发明包含被鉴定为 RUP41 调节物或配体的本发明化合物的放射性同位素的形式。

在一些实施方案中，放射线同位素标记形式的化合物与所述化合物相同，但是实际上一个或者多个原子被原子质量或者质量数与通常天然发现（即，天然存在）的原子的原子质量或者质量数不同的原子替换或者取代。可掺入本发明化合物的合适的放射性核素包括但不限于  $^2\text{H}$ （氘）， $^3\text{H}$ （氚）， $^{11}\text{C}$ ， $^{13}\text{C}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{13}\text{N}$ ， $^{15}\text{N}$ ， $^{15}\text{O}$ ， $^{17}\text{O}$ ， $^{18}\text{O}$ ， $^{18}\text{F}$ ， $^{35}\text{S}$ ， $^{36}\text{Cl}$ ， $^{82}\text{Br}$ ， $^{75}\text{Br}$ ， $^{76}\text{Br}$ ， $^{77}\text{Br}$ ， $^{123}\text{I}$ ， $^{124}\text{I}$ ， $^{125}\text{I}$ ，及  $^{131}\text{I}$ 。掺入本发明的放射性标记的化合物的放射性核素将依赖于放射性标记的化合物的具体应用。例如，对于体外 RUP41 标记及竞争分析而言，掺入  $^3\text{H}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{82}\text{Br}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^{131}\text{I}$ ， $^{35}\text{S}$  的化合物通常是最有用的。对于放射性显影应用而言， $^{11}\text{C}$ ， $^{18}\text{F}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^{123}\text{I}$ ， $^{124}\text{I}$ ， $^{131}\text{I}$ ， $^{75}\text{Br}$ ， $^{76}\text{Br}$ ，或  $^{77}\text{Br}$  通常是最有用的。在一些实施方案中，放射性核素选自  $^3\text{H}$ ， $^{11}\text{C}$ ， $^{18}\text{F}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^{124}\text{I}$ ， $^{131}\text{I}$ ， $^{35}\text{S}$  及  $^{82}\text{Br}$ 。

将放射同位素掺入有机化合物的合成方法可应用于本发明的化合物并且为本领域所公知。这些合成方法，例如，将活性水平的氚掺入靶分子，如下所述：

A. 用氚气催化还原-此过程一般产生特异性活性产品并且需要卤化或不饱和前体。

B. 用硼氢化钠 [ $^3\text{H}$ ] 还原-此过程非常便宜并且需要含有可还原官

能团的前体，诸如醛，酮，内酯，酯类等。

C. 用氢化锂铝 [ $^3\text{H}$ ] 还原-此过程提供理论上特异性活性的产品。其也需要含有可还原官能团的前体，诸如醛，酮，内酯，酯类等。

D. 氘气暴露标记-此过程包含在存在合适催化剂的条件下将含有可交换质子的前体暴露于氘气。

E. 使用甲基碘 [ $^3\text{H}$ ] 进行 N-甲基化-此过程一般被用来通过用高特异性活化的甲基碘 ( $^3\text{H}$ ) 处理合适的前体制备 O-甲基或 N-甲基 ( $^3\text{H}$ ) 产物。此方法一般允许较高特异性的活性，如例如，约 70 至 90 Ci/mmol。

将活性水平的  $^{125}\text{I}$  掺入靶分子的合成方法包括：

A. Sandmeyer 及相似反应-此过程将芳基或杂芳基胺转化成重氮盐，诸如四氟硼酸盐，且随后利用  $\text{Na}^{125}\text{I}$  转化成  $^{125}\text{I}$  标记的化合物。一种典型的过程由 Zhu, D.-G. 及其合作者公开于 J.Org.Chem.2002, 67, 943-948 中。

B. 酚的邻位  $^{125}\text{I}$  化作用-此过程允许  $^{125}\text{I}$  掺入酚的邻位，如 Collier, T.L. 及其合作者公开于 J.Labeled Compd Radiopharm.1999, 42, S264-S266 中。

C. 芳基或杂芳基溴化物的  $^{125}\text{I}$  交换-此方法一般为 2 个步骤。第一步为利用例如，Pd 催化的反应[即， $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ ] 或通过芳基或杂芳基锂，在卤化三烷基锡或六烷基二锡[如  $(\text{CH}_3)_3\text{SnSn}(\text{CH}_3)_3$ ] 存在下将芳基或杂芳基溴化物转化成相应的三烷基锡中间物。代表性过程由 Bas, M.-D. 及其合作者报道于 J.Labeled Compd Radiopharm.2001, 44, S280-S282 中。

在一些实施方案中，放射性同位素标记的化合物与所述化合物相同，除了添加一个或者多个含有放射性核素的取代基。在一些进一步的实施方案中，化合物为多肽。在一些更进一步的实施方案中，化合物为抗体或其抗原结合片段。在一些更进一步的实施方案中，所述抗体为单克隆抗体。上述合适的放射性核素包括但不限于  $^2\text{H}$  (氘)， $^3\text{H}$  (氚)， $^{11}\text{C}$ ， $^{13}\text{C}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{13}\text{N}$ ， $^{15}\text{N}$ ， $^{15}\text{O}$ ， $^{17}\text{O}$ ， $^{18}\text{O}$ ， $^{18}\text{F}$ ， $^{35}\text{S}$ ， $^{36}\text{Cl}$ ， $^{82}\text{Br}$ ，

$^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ , 及  $^{131}\text{I}$ 。掺入本发明列举的放射性标记的化合物的放射性核素将依赖于放射性标记的化合物的具体应用。例如, 对于 RUP41 标记以及竞争分析而言, 掺入  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  的化合物通常最有用。对于放射性显影应用而言,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ , 或  $^{77}\text{Br}$  通常是最有用的。在一些实施方案中, 放射性核素选自  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  及  $^{82}\text{Br}$ 。

添加一种或多种包含放射性核素的取代基的方法为本领域技术人员所熟知, 并且包括但不限于通过酶促法[Marchalonis JJ, *Biochemical Journal*(1969)113:299-305; Thorell JI and Jahansson BG, *Biochimica et Biophysica Acta*(1969)251:363-9; 每个公开物全部在此处引入作为参考], 以及或者通过氯胺-T/Iodogen/Iodobead 法[Hunter WM and Greenwood FC, *Nature*(1962) 194:495-6; Greenwood FC 等, *Biochemical Journal*(1963) 89:114-23; 每个公开物全部在此处引入作为参考]添加放射性同位素碘。

所公开的受体和方法的其它应用尤其是基于本专利文献的综述对于本领域技术人员而言是显而易见的。

## 实施例

下列实施例为说明目的, 并且并不限制本发明。虽然本发明公开了具体的核酸及氨基酸序列, 但是本领域的普通技术人员应该有能力对这些序列进行微小的修饰同时达到与下面报道的相同或大致上相同的结果。本发明公开的突变方法不依赖于这种方法而是基于一种算法以及与位于人类 GPCRS 的 TM6 区内的保守脯氨酸残基的位置距离。一旦这种方法是安全的, 本领域技术人员就应该有能力对其进行微小修饰达到与本发明公开的大致上相同的结果(即, 组成性活性)。这种修饰方法在本发明公开的范围之内。

下列的提供是为了说明的目的并且并不意味着是一种限制。本领域

域的一个普通技术人员根据本发明所公开的内容可以设计同样的分析和方法，所有构成了本发明的一部分。虽然对本领域技术人员而言可以采用多种表达载体，但是为了利用内源性和非内源性 GPCRs 利用的目的，在一些实施方案中，优选采用的载体为 pCMV。这种载体在 1998 年 10 月 13 日保藏在用于专利目的的布达佩斯条约承认的生物材料样品国际保藏单位美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)。由 ATCC 测试 DNA 并且确定且可执行确定。ATCC 指定了下列的保藏编号 pCMV: ATCC #203351。在一些实施方案中，优选采用腺病毒表达载体。

与本发明主题相关并且是本领域普通技术人员已知的重组 DNA 技术参见 Maniatis 等人的, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(1989) Cold Spring Harbor Laboratory; 美国专利 6,399,373; 以及 PCT 申请 PCT/IB02/01464, 公开于 2002 年 8 月 29 日, 公开号 WO/02/066506; 其中每个的公开内容在此处全部引入作为参考。

### 实施例 1

#### 内源性人类 RUP41 的全长克隆

本发明公开的 RUP41 是基于 GenBank 数据库的信息进行鉴定的。当检索数据库时，登录号为 U66581 的 cDNA 克隆被鉴定为 7 号染色体的人基因组序列。全长 RUP4 通过使用下列引物以及人基因组 DNA 作为模板的 PCR 进行克隆：

5'-TCCCCCGGGAAAAAACAACCTGCTCCAAA-3' (SEQ ID NO: 7; 正义)

5'-TAGGATCCATTTGAATGTGGATTTGGTGAAA-3' (SEQ ID NO: 8; 反义, 包含 BamHI 位点)。

使用带有由厂商提供的缓冲系统的 rTth 聚合酶 (Perkin Elmer), 0.25mM 的每种引物以及 0.2mM 的每一种的 4 种核苷酸进行扩增。循环条件为 94°C, 1 分钟, 50°C, 1 分钟, 及 72°C, 1.5 分钟, 共 30 个

循环。5'PCR 引物用激酶作用并且用 BamHI 酶解 1.38kb 的 PCR 片段并克隆到 pCMV 表达载体的 EcoRV-BamHI 位点。参见核酸序列 SEQ ID NO: 1 推测的氨基酸序列 SEQ ID NO: 2。

## 实施例二

制备非内源性，组成性活化的人类 RUP41

本领域技术人员应该能够选择突变核酸序列的技术。下面显示的是用于产生人 GPCRs 非内源性形式的技术。下面显示的 RUP41 的突变是基于一种算法，通过该方法从保守脯氨酸（或其内源性的保守取代物）残基（位于 GPCR 的 TM6 区，接近 TM6/IC3 的界面）的第 16 个氨基酸（位于 GPCR 的 IC3 区）突变，优选突变为丙氨酸，组氨酸，精氨酸或赖氨酸残基，最优选突变为赖氨酸残基。

非内源性组成性活化的全长人 RUP41 位于 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的 312 位的苯丙氨酸残基突变为赖氨酸（F312K）实现。

### 1.转化位点-Directed™ 诱变

制备非内源性人 GPCRs 可以通过根据说明书使用转化位点-Directed™ 诱变试剂盒（Clontech）在人 CPGRs 的基础上实现。使用两种诱变引物，最优选为产生赖氨酸突变的赖氨酸诱变寡核苷酸，以及选择标记寡核苷酸。为了方便起见，以常规的形式将密码子突变引入人 GPCR。

### 2.QuikChange™ 位点-Directed™ 诱变

也可以通过使用 QuikChange™ Site-Directed™ 诱变试剂盒（Stratagene，根据说明书）实现非内源性人 GPCRs 的制备。优选内源性 GPCR 作为模板并且采用两个诱变引物，以及最优选的赖氨酸诱变寡核苷酸以及选择性标记寡核苷酸（包含于试剂盒中）。为了方便起见，以常规的形式掺入新的人 GPCR 的密码子突变以及单独的寡核苷酸。实施例 3

## 受体表达

虽然本领域有多种细胞可用于表达蛋白，但是最优选采用哺乳动物细胞或者黑色素细胞。主要原因是根据经验进行的预测，即，利用例如酵母细胞表达 GPCR，虽然可以向所述试验流程中引入可能不（实际上在酵母中不）包括哺乳动物系统演化的受体偶联，遗传机制以及分泌途径的非哺乳动物细胞，而且从非哺乳动物细胞获得的结果，虽然可能有用，但是不如从哺乳动物细胞或者黑色素细胞获得的优选。虽然所使用的具体哺乳动物细胞的预测依赖于技术人员的具体需要，但是哺乳动物细胞 CHO, COS-7, 293, 及 293T 尤其优选。参见下列有关黑色素细胞，包含实施例 8。

### a. 瞬间转染

在第一天，以  $6 \times 10^6$ /10cm 平皿将 293 细胞铺板。第二天，制备两个反应试管（每个试管后的比例为每个平板）：试管 A 由将  $4 \mu\text{g}$  DNA（例如，pCMV 载体；带有受体 cDNA 的 pCMV 载体，等）混合在 0.5ml 的无血清 DMEM（Gibco BRL）中进行制备；试管 B 由将  $24 \mu\text{g}$  脂质转染胺试剂（Gibco BRL）混合于 0.5ml 的无血清 DMEM 中进行制备。试管 A 及 B 通过倒置（数次）进行混合，随后在室温下培养 30 至 45 分钟。混合物被称作“转染混合物”。铺板的 293 细胞用  $1 \times$  PBS 清洗，随后添加 5ml 的无血清 DMEM。将 1ml 的转染混合物添加至细胞，然后在  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  下培养 4 小时。转染混合物通过抽吸除去，随后添加 10ml 的 DMEM/10% 胎牛血清。细胞在  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  下培养。在培养 48 小时后，收集细胞并用于分析。

### b. 稳定的细胞系

约  $12 \times 10^6$  的 293 细胞在 15cm 的组织培养皿上铺板。在含 10% 胎牛血清和 1% 丙酮酸钠，L-谷氨酰胺和抗生素的 DME 高葡萄糖培养基。293 细胞铺板后 24 小时（或  $\sim 80\%$  的铺满率），利用  $12 \mu\text{g}$  的 DNA 转染细胞。 $12 \mu\text{g}$  的 DNA 与  $60 \mu\text{l}$  的脂质转染胺试剂和 2 的无血清 DME

高葡萄糖培养基混合。从平皿抽吸培养基，且用无血清的培养基清洗细胞一次。将 DNA，脂质转染胺试剂和培养基混合物连同 10ml 无血清培养基添加平皿中。随后在 37°C 培养 4 至 5 小时，抽吸培养基并且添加 25ml 的含血清培养基。转染 24 小时后，再次抽吸培养基，并且添加带有血清的新鲜培养基。转染 48 小时后，抽吸培养基并且添加含有终浓度为 500 $\mu$ m/ml 的遗传霉素（G418 药物）的含血清培养基。选择转染的细胞中含有 G418 抗性基因的阳性转染细胞。进行选择时，每 4 到 5 天更换一次培养基。在选择期间，细胞生长形成稳定的集合，或者分裂用于稳定的克隆选择。

#### 实施例 4

##### 用于确定 GPCR 活化的分析

多种方法用于评估人 GPCRs 的活化。下面列举的是说明性的，本领域普通技术人员应该能够优选地对于技术人员的需要有益的那些技术。

##### 1. 细胞膜结合分析： $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 分析

当 G 蛋白偶联受体在其活化状态，如由于配体结合或组成性活化，受体偶联 G 蛋白并且刺激 GDP 的释放以及随后 GTP 与 G 蛋白的结合。G 蛋白受体复合物的  $\alpha$  亚基起 GTPase 的作用并且缓慢水解 GTP 至 GDP，在这时通常受体失活。活化的受体继续将 GDP 转换成 GTP。非水解的 GTP 类似物， $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ，可被用来证实 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  与表达活性受体的膜的增强结合。使用 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  结合来测量活化的优点在于：（a）其一般可应用与全部 G 蛋白偶联受体；（b）其靠近膜表面使其不可能挑选影响细胞内级联的分子。

此分析利用 G 蛋白偶联受体刺激 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  结合表达相关受体的膜。因此，此分析可用于直接鉴定方法从而筛选内源性 GPCRs 及非内源性，组成性活化的 GPCRs 的候选化合物。此分析是通用的，并且可用于所有 G 蛋白偶联受体的药物发现。

[<sup>35</sup>S]GTP γ S 分析为培养于 20 mM HEPES 及 1 至 20 mM 氯化镁中（可调节此量优化结果，虽然 20 mM 是优选的）pH7.4，约 0.3 至约 1.2 nM [<sup>35</sup>S]GTP γ S 之间的结合缓冲液（可调节此量优化结果，虽然 1.2 是优选的），及 12.5 至 75 μg 的膜蛋白（可调节此量优化结果）及 10 μM GDP（可调节此量优化结果）1 小时。然后加入麦芽凝集素粒（25 μl；Amersham）且在室温培养混合物 30 分钟。然后将试管 1500×g，室温下离心 5 分钟，且在闪烁计数器中计数。

## 2.腺苷酸环化酶

设计用于基于细胞分析的 Flash Plate™ 腺苷酸环化酶试剂盒（New England Nuclear；Cat.NO.SMP004A）可以进行修饰用于粗原生质膜的分析。Flash Plate 微孔中可包含一闪烁覆盖层其亦包含特异性抗体识别的 cAMP。微孔中产生的 cAMP 可通过直接竞争放射性 cAMP 指示剂与 cAMP 抗体的结合进行定量。随后提供的是测定表达受体的全细胞中 cAMP 水平改变的简要方案。

在瞬间转染后 24 小时收集转染的细胞。小心抽移培养基且丢弃。10 毫升 PBS 缓慢添加至细胞的每一平皿中，然后小心抽吸。向每一微孔板中添加 1ml 的 Sigma 细胞裂解缓冲液及 3 毫升的 PBS。从微孔板移出细胞并将细胞悬浮液收集于 50 毫升的圆锥形离心管中。接着细胞在室温下以 1, 100 rpm 离心 5 分钟。将细胞沉淀小心再悬浮于合适体积的 PBS 中（约 3 毫升/板）。然后利用血球计数器对细胞计数，并且添加另外的 PBS 得到合适数量的细胞（最终体积为约 50 μl/孔）。

制备 cAMP 标准以及检测缓冲液[含有 1 μ Ci 指示剂 <sup>125</sup>I cAMP (50 μ l)到 11 ml 检测缓冲液]并且根据厂家的说明书进行保存。制备新鲜的分析缓冲液用于筛选并且含有 50 μ l 激化缓冲液，3 μ l 试验化合物(12 μ M 终分析浓度)以及 50 μ l 的细胞，将分析缓冲液储藏在冰上直至使用。通过向适当的微孔中添加 50 μ l 的 cAMP 标准，然后向微孔 H-11

以及 H12 中添加 50  $\mu$ l 的 PBSA 起始分析。将 50  $\mu$ l 的激活缓冲液添加到所有的微孔中。利用能够分配 3  $\mu$ l 化合物溶液的针型工具将 DMSO (或选择的候选者化合物)添加到适当的微孔中, 终分析浓度为 12  $\mu$ M 试验化合物以及 100  $\mu$ l 的总分析体积。然后将细胞添加至微孔且在室温下温育 60 分钟。然后将含有指示剂 cAMP 的 100  $\mu$ l 的检测混合物添加至微孔。然后另外温育板 2 小时然后在 Wallac MicroBeta 闪烁计数器中计数。然后从标准 cAMP 曲线推断每微孔 cAMP 的值, 所述标准 cAMP 包含在每个分析板中。

### 3. 基于细胞的 cAMP 用于 Gi 偶联的靶 GPCRs

TSHR 为 Gs 偶联 GPCR, 其引起 cAMP 在激活后的累积。通过突变氨基酸残基 623 (即, 将丙氨酸残基改变为异亮氨酸残基)组成型激活 TSHR。预计 Gi 偶联的受体抑制腺苷酸环化酶, 并且因此减少 cAMP 的产生水平, 从而可以进行 cAMP 水平攻击的估计。用于测定作为 Gi 偶联的受体组成性激活指示的 cAMP 产生减少的有效技术可以通过共转染, 最优选地非-内源性组成型活化的 TSHR (TSHR-A623I) (或内源性的组成型活化的 Gs 偶联的受体)作为“信号增强剂”, 用 Gi 连接的靶 GPCR 建立 cAMP 的基线水平进行。在产生 Gi 偶联受体的非-内源性形式后, 然后与信号增强剂共转染靶 GPCR 的非-内源性形式, 并且它为可用于筛选的物质。当使用 cAMP 分析时, 我们将利用这种方法有效地产生信号; 这种方法优选用于抗 Gi 偶联受体的候选化合物的直接鉴定。人们注意到当使用这种方法时, 靶 GPCR 的反激动剂, Gi 偶联的 GPCR 将增加 cAMP 信号并且激动剂将减少 cAMP 信号。

在第一天, 将 293 细胞以  $2 \times 10^4$ /微孔进行铺板。第二天, 制备两个反应试管 (每个试管后的比例为每个平板): 试管 A 由将 2  $\mu$ g 的转染到哺乳动物细胞的每种受体的 DNA, 总共 4  $\mu$ g 的 DNA [例如, pCMV 载体; 带有突变的 TSHR (TSHR-A623I) 的 pCMV 载体; TSHR-A623I 和 GPCR 等受体 cDNA 的 pCMV 载体, 等]混合在 1.2ml 的无血清 DMEM (Gibco BRL) 中进行制备; 试管 B 由将 120  $\mu$ g 脂质转染胺试剂 (Gibco

BRL) 混合于 1.2ml 的无血清 DMEM 中进行制备。然后试管 A 及 B 通过倒置(数次)进行混合,随后在室温下培养 30 至 45 分钟。混合物被称作“转染混合物”。铺板的 293 细胞用 1XPBS 清洗,随后添加 10ml 的无血清 DMEM。然后将 2.4ml 的转染混合物添加至细胞,然后在 37 °C/5%CO<sub>2</sub> 下培养 4 小时。转染混合物通过抽吸除去,随后添加 25ml 的 DMEM/10%胎牛血清。细胞在 37 °C/5%CO<sub>2</sub> 下培养。在培养 24 小时后,收集细胞并用于分析。

设计用于基于细胞分析的 Flash Plate™ 腺苷酸环化酶试剂盒(New England Nuclear; Cat.NO.SMP004A) 却可以根据本领域技术人员的需要进行修饰用于粗原生质膜的分析。Flash Plate 微孔中可包含一闪烁覆盖层其亦包含特异性抗体识别的 cAMP。微孔中产生的 cAMP 可通过直接竞争放射性 cAMP 指示剂与 cAMP 抗体的结合进行定量。随后提供的是测定表达受体的全细胞中 cAMP 水平改变的简要方案。

在瞬间转染后 24 小时收集转染的细胞。小心抽移培养基且丢弃。10 毫升 PBS 缓慢添加至细胞的每一平皿中,然后小心抽吸。向每一微孔板中添加 1ml 的 Sigma 细胞裂解缓冲液及 3 毫升的 PBS。从微孔板移出细胞并将细胞悬浮液收集于 50 毫升的圆锥形离心管中。接着细胞在室温下以 1, 100 rpm 离心 5 分钟。将细胞沉淀小心再悬浮于合适体积的 PBS 中(约 3 毫升/板)。然后利用血球计数器对细胞计数,并且添加另外的 PBS 得到合适数量的细胞(最终体积为约 50μl/孔)。

制备 cAMP 标准以及检测缓冲液[含有 1 μ Ci 指示剂 <sup>125</sup>I cAMP (50 μ l)到 11 ml 检测缓冲液]并且根据厂家的说明书进行保存。制备新鲜的分析缓冲液用于扫描并且含有 50 μ l 激化缓冲液, 3 μ l 试验化合物(12 μ M 终分析浓度)以及 50 μ l 的细胞, 将分析缓冲液储藏在冰上直至使用。通过向适当的微孔中添加 50 μ l 的 cAMP 标准, 然后向微孔 H-11 以及 H12 中添加 50 μ l 的 PBSA 起始分析。将 50 μ l 的激化缓冲液添加到所有的微孔中。利用能够分配 3 μ l 化合物溶液的针型工具将 DMSO

(或选择的候选者化合物)添加适当的微孔中, 终分析浓度为  $12 \mu\text{M}$  试验化合物以及  $100 \mu\text{l}$  的总分析体积。然后将细胞添加至微孔且在室温下温育 60 分钟。然后将含有指示剂 cAMP 的  $100 \mu\text{l}$  的检测混合物添加至微孔。然后另外温育板 2 小时然后在 Wallac MicroBeta 闪烁计数器中计数。然后从标准 cAMP 曲线推断每微孔 cAMP 的值, 所述标准 cAMP 包含在每个分析板中。

#### 4. 基于报告基因的分析 Reporter-Based Assays

##### a. CRE-LUC 报告基因的分析分析(Gs-相关受体)

293 和 293T 细胞以  $2 \times 10^4$  个细胞/微孔的密度在 96 孔板上铺板, 并且在第二天利用脂质转染胺试剂 (BRL) 根据厂家的说明书进行转染。如下所述为每个 6-孔转染制备 DNA/脂质混合物:  $260\text{ng}$  的质粒 DNA 的  $100 \mu\text{l}$  DMEM 溶液与  $2 \mu\text{l}$  的脂质的  $100 \mu\text{l}$  DMEM 溶液(由  $200\text{ng}$  的 8xCRE-Luc 报告质粒,  $50\text{ng}$  含有内源性受体或者非内源性受体或者单独的 pCMV 的 pCMV, 以及  $10\text{ng}$  的 GPRS 表达质粒(GPRS 于 pcDNA3 中(Invitrogen)构成的  $260\text{ng}$  的质粒 DNA)混合。8XCRE-Luc 报告质粒制备如下: 通过将大鼠抑生长素启动子(-71/+51)克隆在 p $\beta$ gal-Basic 载体(Clontech)的 BglV-HindIII 位点获得载体 SRIF- $\beta$ -gal。通过从腺病毒模板 AdpCF126CCRE8 (参见, 7 Human Gene Therapy 1883 (1996))进行 PCR 获得 8 个拷贝的 cAMP 应答元件, 并且克隆到 SRIF- $\beta$ -gal 载体的 Kpn-BglV 位点, 产生 8xCRE- $\beta$ -gal 报告载体。通过用从 pGL3-basic 载体(Promega)获得的荧光素酶基因在 HindIII-BamHI 位点替换 8xCRE- $\beta$ -gal 报告载体的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因产生 8xCRE-Luc 报告质粒。30 分钟后, 在室温下温育, 用  $400 \mu\text{l}$  的 DMEM 稀释 DNA/脂质混合物, 并且将  $100 \mu\text{l}$  的稀释的混合物添加至每个微孔中。在细胞培养箱中培养 4 小时后, 将带有 10% FCS 的  $100 \mu\text{l}$  的 DMEM 添加至每个微孔中。第二天, 转染的细胞更换带有 10% FCS 的  $200 \mu\text{l}$ /微孔的 DMEM。8 小时后, 用 PBS 冲洗后, 微孔转变为不带酚红的  $100 \mu\text{l}$  /微孔的 DMEM。利用 LucLite™ 报告基因分析试剂盒(Packard) 根据厂

家的说明书在第二天测定荧光素酶的活性,并且在 1450 MicroBeta™ 闪烁和荧光计数器上读数(Wallac)。

#### b. AP1 报告基因分析 (Gq-相关受体)

检测 Gq 激活的方法取决于 Gq -依赖的磷脂酶 C 引起在其启动中含有 AP1 元件基因的激活的已知特性。Pathdetect™ AP-1 顺式-报告系统(Stratagene, Catalogue # 219073) 可根据上述方案参考 CREB 报告基因分析进行利用,除了磷酸钙沉淀的成分为 410 ng 的 pAP1-Luc, 80 ng pCMV-受体表达质粒以及 20 ng 的 CMV-SEAP。

#### c. SRF-LUC 报告基因分析(Gq-相关受体)

检测 Gq 激活的方法取决于 Gq-依赖的磷脂酶 C 引起在其启动中含有血清效应因子基因的激活的已知特性。Pathdetect™ SRF-Luc 报告系统(Stratagene)可用于分析例如 COS7 细胞中 Gq 偶联活性。利用哺乳动物 Transfection™ 试剂盒(Stratagene, 目录#\_200285)根据厂家的说明书,用系统的质粒组分以及显示的编码内源性或非-内源性 GPCR 的表达质粒转染细胞。B 简言之,根据每个厂家的说明书,将 410 ng 的 SRF-Luc, 80 ng 的 pCMV-受体表达质粒以及 20 ng 的 CMV-SEAP (分泌的碱性磷酸酶表达质粒; 在转染的细胞中测定碱性磷酸酶活性以调节样品之间转染率的变化)组合在磷酸钙沉淀中。一半的沉淀均等分配在 96-微孔板中的 3 个微孔上,将细胞保存在不含血浆的培养基中 24 小时。最后 5 小时,细胞用 1 μ M 的血管紧张素温育,如图所示。然后溶解细胞并且根据厂家的说明书,利用 Luclite™ 试剂盒(Packard, Cat. #\_6016911)以及“Trilux 1450 Microbeta 液体闪烁以及发光计数器(Wallac)”分析荧光素酶活性。可利用 GraphPad Prism™ 2.0a ( GraphPad Software 公司)分析数据。

#### 细胞内 IP<sub>3</sub> 累积分析(G<sub>q</sub>-相关的受体)

在第一天,含有受体(内源性的和/或非-内源性的)的细胞可以铺板在 24 微孔板上,通常密度为 1x10<sup>5</sup> 个细胞/微孔(尽管红棕色可以最佳化。

第二天，可以通过首先将 0.25  $\mu\text{g}$  的 DNA 混合在 50  $\mu\text{l}$  的不含血浆的 DMEM /微孔以及 2  $\mu\text{l}$  脂质转染胺试剂的 50  $\mu\text{l}$  不含血清的 DMEM/微孔中进行转染。轻轻地混合溶液并且在室温下温育 15-30 分钟。用 0.5 ml 的细胞 PBS 清洗并且将 400  $\mu\text{l}$  不含血浆的培养基与转染培养基混合并添加至细胞。然后将细胞在 37°C/5%CO<sub>2</sub> 温育 3-4 小时然后除去转染培养基并用 1ml/微孔的正常生长培养基替换。第三天用 <sup>3</sup>H-肌醇标记细胞。简要地，除去培养基并且用 0.5 ml 的 PBS 清洗细胞。接着将 0.5 毫升不含肌醇/不含血清的培养基（GIBCO BRL）添加至含有 0.25  $\mu\text{Ci}$  的 <sup>3</sup>H-myo-肌醇/孔的每个微孔中，且细胞在 37°C/5%CO<sub>2</sub> 下培养 16 至 18 小时。第四天，细胞以 0.5 毫升的 PBS 清洗并且添加 0.45 毫升包含无肌醇/不含血清培养基，10  $\mu\text{M}$  pargyline, 10mM 氯化锂分析培养基或 0.4 毫升分析培养基及 50  $\mu\text{l}$  10 $\times$  ketanserin (ket) 至最终浓度 10  $\mu\text{M}$ 。细胞接着在 37°C 培养 30 分钟。接着以 0.5 毫升 PBS 清洗细胞并且添加 200  $\mu\text{l}$  新鲜/冰过的冷终止溶液（1M 氢氧化钾；18mM 硼酸钠；3.8mM EDTA）至孔中。溶液保持在冰中 5 至 10 分钟或直到细胞溶解，接着以 200  $\mu\text{l}$  的新鲜/冰过的冷中和溶液中和（7.5% 盐酸）。然后将溶解物转入 1.5 毫升微量试管并且向每个试管中 1 毫升氯仿/甲醇（1: 2）。溶液涡旋 15 秒且将上层液相应用于 Bioead AG1-X8<sup>TM</sup> 阴离子交换树脂（100 至 200 孔径）。首先，树脂以 1: 1.25W/V 的水清洗，且将 0.9 毫升上层液相上样到管柱中。管柱以 10 毫升的 5mM 肌醇及 10 毫升的 5mM 硼酸钠/60mM 甲酸钠清洗。三磷酸肌醇洗脱进入包含 10 毫升有 2 毫升的 0.1M 甲酸/1M 的甲酸铵的闪烁混合物的发光瓶。管柱用 10 毫升的 0.1M 甲酸/3M 甲酸铵清洗且用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗 2 次并且储存于 4°C 的水中。

## 实施例 5

### 融合蛋白制备

#### a.GPCR: G<sub>s</sub> 融合构建体

设计组成性活化的 GPCR-G 蛋白融合构建体如下：大鼠 G 蛋白 GS $\alpha$  的 5' 及 3' 末端末端（长结构；Itoh, H 等人, 83 PNAS 3776(1986)）

被操作其中包含 HindIII (5'-AAGCTT-3') 序列。确认正确序列后 (包含侧接 HindIII 序列), 通过使用该载体的 HindIII 限制性位点, 通过亚克隆将全序列穿梭进入 pcDNA3.1(-) (Invitrogen, cat.No.V795-20)。G<sub>s</sub>α 序列的正确的起点在亚克隆进入 pcDNA3.1(-)后确定。然后验证在 HindIII 序列包含大鼠 G<sub>s</sub>α 基因的修饰的 pcDNA3.1(-); 此载体可用作“通用” G<sub>s</sub>α 蛋白载体。PcDNA3.1(-)载体包含多种在 HindIII 上游的已知限制性位点, 因此有益于在 G<sub>s</sub> 蛋白的上游插入内源性组成性活性 GPCR 的编码序列。相同的方法可利用来形成其它“通用”的 G 蛋白受体, 及当然, 其它市售的或者本领域技术人员公知的载体可被利用-重要的标准为 GPCR 序列为上游并且在 G 蛋白的读码框内。

#### b.Gq (6 氨基酸缺失) /Gi 融合构建体

Gq(del)/Gi 融合构建体设计可完成于下: N 末端 6 个氨基酸 (氨基酸 2 至 7, TLESIM Gαq-亚基的序列将缺失且 C 末端 5 个氨基酸, EYNLV 序列将用具有 DCGLF 序列的 Gαi 蛋白的相应氨基酸取代。这个融合构建体将通过使用下列引物的 PCR 获得:

5'-gatcAAGCTTCCATGGCGTGCTGCCTGAGCGAGGAG-3' (SEQ ID NO: 9) 以及

5'-gatcGGATCCTTAGAACAGGCCGCAGTCCTTCAGGTTTCAGC TGCAGGATGGTG-3' (SEQ ID NO: 10)

及包含小鼠 Gαq 野生形式的质粒 63313, 红血球凝集素尾作为模板。包含低程度加帽的核苷酸作为间隔区。

TaqPlus Precision DNA 聚合酶 (Stratagene) 将在随后循环中被用来复制, 其中步骤 2 至 4 重复 35 次: 95°C 2 分钟; 95°C 20 秒; 56°C 20 秒; 72°C 2 分钟; 及 72°C 7 分钟。PCR 产品将克隆于 pCRII-TOPO 载体 (Invitrogen) 中, 并且使用 ABI Big Dye Terminator 试剂盒 (P.E.Biosystems) 进行测序。从包含融合构建体序列的 TOPO 克隆嵌入物将由 2 步骤的克隆过程穿梭进入表达载体 pcDNA3.1(+) 的 HindII/BamHI 位点。也参见, PCT 申请编号 PCT/US02/05625, 公开号

WO02068600, 公开于 2002 年 9 月 6 日, 其公开内容全不在此处引入作为参考。

## 实施例 6

规约: 反激动剂与激动剂的直接鉴定

### A. [<sup>35</sup>S]GTP γ S 分析

在一些实施方案中, 内源性 GPCR 被用以直接鉴定作为例如激动剂或拮抗剂的候选化合物。在一些实施方案中, 内源性组成性活化的 GPCR 或非内源性组成性活化的 GPCR 被利用来直接鉴定作为例如反激动剂或激动剂的候选化合物。在一些实施方案中, 包含内源性, 组成性活化的 GPCR 或非内源性组成性活化的 GPCR 的 GPCR 融合蛋白被用来直接鉴定作为例如反激动剂或激动剂的候选化合物。在所述实施方案中, 提供随后的分析方案用于所述直接鉴定。

### 膜制备

在一些实施方案中, 包含目的 GPCR/融合蛋白且用以直接鉴定作为反激动剂, 激动剂或拮抗剂的候选化合物优选制备如下:

#### a. 材料

“膜刮除缓冲液”包含 20mM HEPES 及 10mM EDTA, pH7.4; “膜清洗缓冲液”包含 20mM HEPES 及 0.1mM EDTA, pH7.4; “结合缓冲液”包含 20mM HEPES, 100mM 氯化钠及 10mM 氯化镁, pH7.4。

#### b. 过程

全部的材料在整个过程中, 都保存在冰上。首先, 将从细胞铺满的单层抽吸培养基, 随后用 10 毫升冷 PBS 清洗, 随后吸出。此后, 5 毫升的膜刮除缓冲液将添加至刮除细胞; 然后将细胞提取物转入 50 毫升离心管中 (在 4°C, 20,000rpm 离心 17 分钟)。随后, 上层液将被吸出, 且在 4°C, 20000rpm 离心 17 分钟后颗粒将会再次悬浮于 30 毫升膜清洗缓冲液中。上层液将被吸出, 且颗粒将再次悬浮于缓冲液中。

然后使用 Binkman Polytron™ 匀浆机匀浆（15 至 20 秒破裂,直到全部材料于悬浮液中）。在此提及为“膜蛋白”。

### Bradford 蛋白质分析

在匀浆后,膜的蛋白质浓度将利用 Bradford 蛋白质分析测（蛋白质稀释至约 1.5 毫克/毫升,分份并进行冷冻（-80℃）待用；当冷冻时,将使用下列试验方案：在分析当天,冷冻的膜蛋白在室温下融化,随后进行涡旋,然后用 Polytron 在约 12×1,000rpm 匀浆约 5 至 10 分钟；值得注意,为了多重制备,在匀浆不同的制备物时,要对匀浆机彻底清洗。

#### a.材料

结合缓冲液（如上）；Bradford 染料；Bradford 蛋白质标准亦将被使用,参照说明书（Biorad, cat.No.500-0006）。

#### b.过程

准备复制管,一个包含膜,且一个作为“空白”。每一个包含 800μl 结合缓冲液。然后,将 10μl 的 Bradford 蛋白质标准液（1 毫克/毫升）添加至每一个试管,且将 10μl 膜蛋白添加至一个管（不是空白管）。此后,将 200μl 的 Bradford 染料添加至每一管中,随后涡旋。5 分钟后,试管将再涡旋,且将其中的物质转入小玻璃管。小玻璃管将使用 CECIL3041 分光光度计,在波长 595 下读数。

### 直接鉴定分析

#### a.材料

包含 37.5 毫升结合缓冲液及 2mg 的 GDP（Sigma, cat.No.G-7127）的 GDP 缓冲液,随后在结合缓冲液中连续稀释以含有 0.2μM 的 GDP（每孔的最终 GDP 浓度为 0.1μM 的 GDP）；每一个孔包含一种候选化合物,包含 100μl GDP 缓冲液（最终浓度,0.1μM GDP）,50μl 于结合缓冲液中的膜蛋白及 50μl 于结合缓冲液中的 [<sup>35</sup>S]GTP γ S（0.6nM）（2.5μl [<sup>35</sup>S]GTP γ S/10 毫升结合缓冲液）的 200μl 体积。

## b.过程

候选化合物最好使用 96 孔板形式扫描（其可以冷冻至 $-80^{\circ}\text{C}$ ）。膜蛋白（或包含排除了 GPCR 融合蛋白表达载体的膜，作为对照），将简单地匀浆直到悬浮。然后使用上述列举的 Bradford 蛋白质分析确定蛋白浓度确定。膜蛋白（及对照）将接着稀释至 0.25 毫克/毫升结合缓冲液中（最终分析浓度为  $12.5\mu\text{g}/\text{孔}$ ）。随后,将  $100\mu\text{l}$  的 GDP 缓冲液添加至 Wallac Scintistrip<sup>TM</sup>(Wallac)的每个微孔中。然后使用  $5\mu\text{l}$  的针状工具用来转移  $5\mu\text{l}$  的候选化合物至每一孔（即， $5\mu\text{l}$  于  $200\mu\text{l}$  总分析体积为 1: 40，因此最终候选化合物的扫描浓度为  $10\mu\text{M}$ ）。再次，为了避开污染物，在每一个转移步骤后，针状工具将用三种包含水（1X），乙醇（1X）及水（2X）储液器清洗-多余液体的在每次清洗后将多余液体从工具上甩掉并用纸或纸巾干燥。此后，将  $50\mu\text{l}$  的膜蛋白添加至每一孔中（包含没有 GPCR 融合蛋白的膜的对照孔亦被使用），且在室温下预先培养 5 至 10 分钟。此后，结合缓冲液中  $50\mu\text{l}$  的  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  ( $0.6\text{nM}$ ) 将添加至每一孔中，随后在室温下以震荡培养 60 分钟（再次，在此实施例中，板用金箔覆盖）。分析将通过在  $22^{\circ}\text{C}$ ， $4000\text{rpm}$  转动板 15 分钟停止。薄板用 8 歧管吸出且用板面密封。薄板用设定在“Prot.#37”（如操作说明书）的 Wallac1450 上读数。

## B.cAMP 分析

另一个直接鉴别作为反激动剂，激动剂，及拮抗剂的候选化合物的方法通过利用基于环化酶的分析完成。除了直接鉴定，这种分法可用作独立的方法提供上述  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  方法结果的确认。

修饰的 Flash Plate<sup>TM</sup> 腺苷酸环化酶试剂盒（New England Nuclear; Cat.No.SMP004A）根据下列方案优选用于直接鉴定用作内源性或者组成性 GPCRs 的反激动剂及激动剂的候选化合物直接鉴定。

转染的细胞在转染后 3 天收集。膜通过将包含 20mM HEPES,

pH7.4, 及 10mM 氯化镁的缓冲液中悬浮细胞的匀浆制备。匀浆最好在冰上使用 Brinkman Polytron™ 约 10 秒进行。产生的匀浆物在 4℃, 49,000X 克下离心 15 分钟。产生的颗粒接着再次悬浮于含有 20mM HEPE, pH7.4 及 0.1mM EDTA 的缓冲溶液中, 匀浆 10 秒, 随后在 4℃, 49,000X 克下离心 15 分钟。产生的颗粒接着储存于-80℃直到使用。直接鉴定扫描当天, 膜颗粒在室温下缓慢融化, 再次悬浮于含 20mM HEPES, pH7.4, 及 10mM 氯化镁的缓冲溶液中以产生最终蛋白质浓度 0.60 毫克/毫升 (悬浮的膜至于冰中直到使用)。

cAMP 标准及检测缓冲液[包含 2 $\mu$ Ci 示踪剂  $^{125}$ IcAMP (100 $\mu$ l) 至 11 毫升检测缓冲溶液]根据操作说明书进行制备及保存。分析缓冲溶液新鲜制备用以扫描且包含 20mM HEPES, pH7.4, 10mM 氯化镁, 20mM 磷酸肌酸 (Sigma), 0.1 单位/毫升的肌酸磷酸激酶 (Sigma), 50 $\mu$ M GTP (Sigma), 及 0.2mM ATP (Sigma)。分析缓冲溶液接着储存于冰中直到使用。

将候选化合物 (若冷冻, 在室温下融化) 与 40 $\mu$ l 膜蛋白 (30 $\mu$ g/孔) 及 50 $\mu$ l 分析缓冲溶液一起优选添加至 96 孔板 (3 $\mu$ l/孔; 12 $\mu$ M 最终分析浓度)。混合物在室温下伴随轻微震动培养 30 分钟。

培养后, 将 100 $\mu$ l 的检测缓冲溶液添加至每一个孔中, 随后培养 2 至 24 小时。然后使用“Prot.#31” (如操作说明) 由 Wallac MicroBeta™ 薄板进行计数。

举例而非限制的方式, 典型扫描分析薄板 (96 孔) 结果如图 1 所示。每一个条状柱代表不同孔化合物的结果, “靶受体”为内源性, 组成性活化的 Gs 偶联蛋白 GPCR 的 Gs $\alpha$  融合蛋白构建体。在第图 1 中的代表性结果也提供了基于每一薄板 (“m”) 结果平均值的标准偏差, 并且平均值乘以 2 个反向激动剂的随机选择偏爱作为最初扫描的“指引”包括选择降低平均板应答的应答百分比的候选化合物, 除以

两个标准偏差。相反的，选择的激动剂作为最初扫描的“指引”的激动剂选择的随机偏爱包括选择选择增加平均板应答的应答百分比的候选化合物，乘以两个标准偏差。以这些选择过程为基础，在随后孔中的候选化合物直接鉴定为分别在孔 A2 及 G9 中所述内源性 GPCR 推断的反激动剂（化合物 A）及激动剂（化合物 B）至。参见图 1。清楚显示：这些化合物不用这种 GPCR 内源性配体的任何知识就可直接鉴定。通过关注于基于受体功能的分析技术我们能够确定能降低此受体（化合物 A）功能活性和增加受体（化合物 B）功能活性的化合物。

### 实施例 7

#### 测量细胞内钙浓度的荧光显影板读取机（FLIPR）

从各自克隆系的靶受体（实验性）及 pCMV（阴性对照）稳定转染的细胞以  $5.5 \times 10^4$  细胞/孔接种在聚-D-赖氨酸预先处理的带有完全培养基（10%FBS, 2mM L-麸氨酸, 1mM 丙酮酸钠的 DMEM）的 96 孔板中（Becton-Dickinson, #356640）隔天分析用。为了制备 Fluo4-AM（Molecular Probe, #F14202）培养缓冲液储液，将 1 毫克 Fluo4-AM 溶解于 467 $\mu$ l DMSO 及 467 $\mu$ l Pluoronic 酸（Molecular Probe, #P3000）中以产生 1mM 储液,其可以储存于-20 $^{\circ}$ C 一个月。Fluo4-AM 为荧光钙指示染料。

候选化合物制备于清洗缓冲液中（1XHBSS/2.5mM Probenicid/20mM HEPES, pH7.4）。

在分析时，培养基从孔移除并且向细胞加入 100 $\mu$ l 的 4 $\mu$ M Fluo4-AM/2.5mM 的 Probenicid（Sigma, #P8761）/20mM HEPES/完全培养基，pH7.4。培养于 37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub> 60 分钟。

在培养 1 小时后，移除 Fluo4-AM 培养缓冲液且细胞以 2 倍 100 $\mu$ l 清洗缓冲溶液清洗。每一孔中剩余 100 $\mu$ l 清洗液。薄板再次培养于 37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub> 60 分钟。

FLIPR（荧光显影板读取机；分子设备）被设置在 30 秒添加 50 $\mu$ l 的候选化合物，且记录由候选化合物在另一个 150 秒中引起细胞内钙浓度（[Ca<sup>2+</sup>]）的瞬时改变。使用 FLIPR 软件,总荧光改变计数被用来确定激动剂活性。设备软件将荧光读书较准在 0 点给出相同的最初的读数。

在一些实施方案中，包含靶受体的细胞进一步包含混栖 G $\alpha$ 15/16 或嵌合 Gq/Gi $\alpha$  单位。

虽然先前提供了使用稳定转染的进行激动剂活性 FLIPR 分析，本领域技术人员对分析进行修改以鉴定拮抗剂的活性。上述本领域技术人员也可以容易地认识到,或者可以使用瞬间转染的细胞。

## 实施例 8

### 黑色素细胞技术

黑色素细胞为发现于低等脊椎动物的皮肤细胞。其包含称作黑色素体的有色素的细胞器。黑色素细胞能够在 G 蛋白偶联受体（GPCR）活化后将这些黑色素体沿着微管网再分配。这些色素移动的结果是发现细胞明显变亮或者变暗。在黑色素细胞中，从 Gi 偶联受体活化引起细胞内 cAMP 浓度降低造成黑色素细胞移动至细胞中央，产生引人注目的颜色变亮。若 cAMP 量接着升高，随着 Gs 偶联受体的活化，黑色素细胞再分配且细胞再次变暗。Gq 偶联受体活化产生的二酰甘油含量的增加也可诱导这种再分配。另外，此技术也适用于研究某些受体酪氨酸激酶。黑色素细胞反应发生于受体活化的几分钟内，且产生简单，较浓的颜色改变。此反应可简单使用常见吸收微板读取器或中度显影系统测定确定。不像其它皮肤细胞，黑色素细胞从神经嵴衍生并且表达全组分的信号蛋白。尤其是，细胞表达非常广的 G 蛋白范围，且几乎可以功能性表达所有的 GPCRs。

黑色素细胞可用来鉴别化合物，包含天然配体，GPCRs 激动剂。此方法可由引导能分配或聚集色素的色素细胞系的测试细胞对特殊刺激应答并且表达编码 GPCR 的内源性克隆实施。如果 GPCR 的活化诱导色素分散，活化刺激剂，例如黑色素，将色素沉积设定在试验细胞内色素最初分配的状态。如果 GPCR 的活化诱导色素聚集，用活化刺激剂细胞将最初的色素沉积设定在色素分散的位置。将测试细胞接着与化学化合物接触，并且确定细胞中的色素沉积是否从色素沉积的最初状态改变。由于候选化合物，包含但不限制偶联至 GPCR 的配体，引起的色素细胞的分配培养皿中变暗，同时色素细胞的聚集将变亮。

材料与方法随后参考美国专利 5462856 及美国专利 6051387。这些专利的公开内容在此处全部引入作为参考。

细胞在 96 孔板（一种受体/板）中铺板。转染后 48 小时，对每一板的一半的细胞用 10nM 黑色素处理。黑色素活化黑色素细胞内源性 Gi 结合受体，并造成其色素聚集。剩下一半的细胞转移至无血清培养基 0.7X L-15 (Gibco)。一小时后，在无血清培养基中的细胞保持在色素分配状态，同时黑色素处理的细胞在色素聚集状态。在这一点上，细胞用反应剂量的候选化合物处理。若平板的 GPCRs 与候选化合物结合，黑色素细胞将经历对化合物反应的颜色改变。若受体为 Gs 或 Gq 偶联受体，且若候选化合物为激动剂，接着黑色素聚集的黑色素细胞将经历色素分配。相反，若受体为 Gi 偶联受体，且若候选化合物为激动剂，那么色素分散的细胞将经历取决剂量的色素聚集。

## 实施例 9

### 人类 RUP41 的组织分布

#### A. AFFYMETRIX GENECHIP® 技术

氨基酸序列提供给 Affymetrix 使用 GeneChip® 技术用于设计及制造包含寡核苷酸的微阵列从而监控 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 的表达水平。同时微阵列上存在源于 Harvard Brain Bank 或市售获得的特定人

脑组织探针。根据厂商的说明书对 RNA 样品扩增，标记，杂交至微阵列，并杂交至微阵列，并且进行数据分析。

使用 GeneChip，研究人类 RUP41 的表达谱。参见图 2A 图。图 2A 为表示在各种组织中人 RUP41 的表达水平的图。对这些图的检查显示 RUP41 表达于大脑及心脏中。在远离大脑的组织中，RUP41 由心脏选择性表达。选择性表达的 RUP41 给由 RUP41 的调节物可能的副作用提供较少的机会。

点状图（图 2B）及 Northern 印迹（图 2C）结果符合 GeneChip 的结果。

#### B.RT-PCR

RT-PCR 应用至人 RUP41 表达的研究。使用的寡核苷酸为 RUP41 特异性的，并且使用 cDNA 作为模板。Taq DNA 聚合酶（Stratagene）被用来根据说明书在 40 $\mu$ l 的反应物中进行扩增。PCR 条件为 96 $^{\circ}$ C 2 分钟，随后 96 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒及 72 $^{\circ}$ C 2 分钟 30 循环，随后 72 $^{\circ}$ C 10 分钟。20 $\mu$ l 的反应物装载于 1.5% 琼脂胶以分析 RT-PCR 产物。

5'PCR 引物序列：

5'-GTAATAATTGCCCTCCGGCGAGC-3'（SEQ ID NO: 11）。

3'PCR 引物序列：

5'-CTAGTCTGTGACAACCTGAGG-3'（SEQ ID NO: 12）。

扩增的 DNA 片段为 390 个碱基对大小。

通过说明的方式，人 RUP41 的 RT-PCR 显示于图 7，之后，充血性心衰竭病人心脏组织的 RUP41 表达与正常心脏功能病人的心脏组织的 RUP41 表达进行比较。

本领域技术人员可以类似地对小鼠 RUP41 及大鼠 RUP41 进行 RT-PCR 形成。

### C.Northern 印迹

人类 RUP41 表达的 Northern 印迹分析由本领域技术人员的步骤产生。对应于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 1,104-1,538 的人 RUP41 编码区片段用作探针。

### 实施例 10

#### 原位杂交：成年大鼠心脏的 RUP41 表达

原位杂交证实成年大鼠心脏中心肌的广泛表达（见图 3）。反义 RUP41 放射性标记的探针检测到所有心室中 RUP41 的表达。反义对照（GAPDH）及心房特异性（心钠素，ANF）探针被用于其它部分从而证实了心脏部分探针标记的特异性。

#### 原位杂交

固定的心脏组织包埋入 50: 50 的 OCT: Aqua Mount (VWR, #41799-008, West Chester, PA) 混合物中并且冷冻于干冰/乙醇中。块状物保持在 -80°C 直到冷冻切片，这时制备 10 微米的连续切片。在冷冻切片后，将组织切片在密封盒中储存在 -20°C。

SEQ ID NO: 6 的大鼠 RUP41 的多核苷酸亚克隆于 PCR II-TOPO 载体中 (Invitrogen, Carlsbad, CA) SP6 及 T7 启动子侧接的位点。与 Seq ID NO: 6 的多核苷酸互补的 [<sup>35</sup>S]-放射性标记的反义大鼠 RUP41 mRNA 探针使用 Promega RiboProbe 转录试剂盒 (#P1460; Madison, WI) 的 SP6 RNA 聚合酶制备，最好如操作说明。对照放射性标记的有义探针类似使用 T7 RNA 聚合酶制备。

固定的组织切片解冻并在室温下进行一系列的固定后温育：PBS 3

分钟；10%福尔马林 10 分钟；PBS 10 分钟；及 PBS 10 分钟。

组织切片接着进行渗透作用及酰化作用。之后，组织切片用 K 蛋白酶（0.001%K 蛋白酶的 0.5M Tris, 0.25M EDTA 溶液, pH8.0）在 37°C 下温育 10 分钟，随后在室温下用水清洗 5 分钟。组织切片接着在室温下用三乙醇胺缓冲溶液（0.1M TEA, pH8.0）培养 5 分钟，随后在 0.1M TEA pH8.0 中的 2.5%醋酸酐中培养 5 分钟。组织切片接着在室温下以：2X SSC；50%乙醇；95%乙醇；及 100%乙醇各温育 2 分钟。组织切片接着风干并保持干燥直到后几天的杂交。

组织切片在 60°C, 0.47M 氯化钠, 54%甲酰胺以每切片 80 至 100 $\mu$ l 的体积杂交 20 小时。放射性标记的探针使用浓度为  $1 \times 10^7$ cpm/毫升。组织切片接着以 4X SSC 在室温下清洗 4 次，每次 10 分钟。未杂交探针用 RNase A（20 $\mu$ g/毫升于 0.5M 氯化钠, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH8）在 37°C 培养 30 分钟进行降解。组织切片接着以 2X SSC 在室温下清洗 2 次，每次 5 分钟，随后以 1X SSC 在室温下清洗 10 分钟，随后以 0.5X SSC 在室温下清洗 10 分钟。组织切片以 0.1X SSC 在 65°C 下清洗 30 分钟，随后以 0.1X SSC 在室温下清洗 5 分钟，随后以酒精脱水。

经过杂交的组织切片接着暴露于 X 射线膜且通过放射性自显影观察 RUP41 杂交信号。之后，组织切片暴露于 Biomax MR 膜 1 天，4 天，然后 1 星期。在放射性自显影后，组织切片使用 NTB-2 液体感光乳化剂浸泡。乳化剂浸泡的组织切片暴露在乳化剂 1 星期并且显影。在显影后，组织切片用 bisbenzimidazole (0.001%于 PBS) 进行反染色并且加盖。组织切片使用超聚光镜（银颗粒显现白色）及 DAPI 过滤体（观察 bisbenzimidazole 反染色）成象。

相同的方法使用放射性标记并且杂交于由部分大鼠 GAPDH 及心钠素（ANF）序列产生的探针。

## 实施例 11

### 肥大的新生鼠心室心肌的 RUP41 下调控

新生鼠心室心肌 (NRVMs) 如前所述进行制备[Adams, JW 等人, *J Biol Chem*(1996) 271: 1179-86; 其内容全部在此处引入作为参考其内容全部在此处引入作为参考]。简言之, 心脏从 1 至 2 天龄 SD 出初生大鼠获得且以胶原酶消化, 心肌通过 Percoll 梯度进行纯化。细胞置于用 0.1% 明胶预先覆盖以及添加了 10% 马血清, 5% 新生牛血清, 及抗体 (100 单位/毫升青霉素及 100 $\mu$ g/毫升链霉素) 的 4: 1 DMEM/培养基-199 中保持过夜的组织培养盘上。在培养基中培养 18 小时后, 心肌用维持培养基 (DMEM/培养基-199 加抗菌素) 清洗以除去死掉细胞及碎片且在实验期间用维持培养基再次更换。

图 4A RT-PCR 证实的新生鼠心室心肌 (NRVMs) 中 RUP41 转录本的维持在无血清情况下 24 小时。随后添加脱羟肾上腺素 (PE) 或新生牛血清 (NCS) 至培养基后 24 小时, RUP41 转录本的含显著下降, 且与显型肥大有关。脱羟肾上腺素使用浓度为 100 $\mu$ M (加 2 $\mu$ M 阻断  $\beta$  肾上腺受体, 且因此可以选择活化  $\alpha$  肾上腺受体)。新生牛血清使用浓度为 10%。G3PDH PCR 产物证实相当于用于 PCR 反应的模板量及胶负载量。

### RT-PCR

从如上描述于 NRVMs 分离的总 RNA 被用作根据说明书, 利用 RT-PCR 试剂盒 (Becton Dickenson) 产生反转录 DNA (RT-DNA) 的模板。由 PCR 测定 RT-DNA 样品中 RUP41 表达。PCR 条件为 96 $^{\circ}$ C 2 分钟, 随后 96 $^{\circ}$ C 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒及 72 $^{\circ}$ C 2 分钟 30 循环, 随后 72 $^{\circ}$ C 10 分钟。20 $\mu$ l 的反应物负载于 1.5% 琼脂糖胶以分析 RT-PCR 产物。

5'PCR 引物序列:

5'-GTAATAATTGCCCTCCGGCGAGC-3' (SEQ ID NO: 11)。

3'PCR 引物序列:

5'-CTAGTCTGTGACAACCTGAGG-3' (SEQ ID NO: 12)。

扩增的 DNA 序列为 390 碱基对。

图 4B.Northern 印迹证实以增肥剂处理, 包含脱羟肾上腺素(PE), 佛波醇 12-豆蔻酸 13-乙酸酯(PMA), 前列腺素 F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ )的肥大剂以及小牛血清(NCS)处理 24 小时后 NRVMs 中 RUP41 mRNA 表达水平的降低。脱羟肾上腺素使用 100 $\mu$ M (加 2 $\mu$ M 至阻断  $\beta$  肾上腺受体, 且因此允许  $\alpha$  肾上腺受体的选择性。佛波醇 12-豆蔻酸 13-乙酸酯使用 100nM。前列腺素 F2 $\alpha$  使用 1 $\mu$ M。新生牛血清使用 10%。心房利钠因子 (ANF), 一种心肌肥大基因标志相应所有肥大刺激上调。28S rRNA 的亚甲基蓝染色证实完整性及相同的 RNA 负载。

#### Northern 印迹分析

分离 1-2 天龄的大鼠 (SD) 心房心肌 (NRVMs) 且如先前所述放置于培养盘上。多种处理后, 根据厂商的说明书利用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 分离总 RNA。15 毫克的总 RNA 在含琼脂糖凝胶的甲醛上通过电泳方式分离并转移至 PVDF 膜 (Amersham)。对应于 SEQ ID NO: 6 的核苷酸 53-488 的大鼠 RUP41 编码区片段被用作 Northern 印迹分析的探针。使用标准方法产生 <sup>32</sup>P 标记的探针且在 55 $^{\circ}$ C 杂交至膜上。膜在高严格条件下清洗且在 -80 $^{\circ}$ C 暴露至 X 射线膜 2-4 天。

#### 实施例 12

过度肥大压迫的小鼠心脏实验种 RUP41 的下调

图 5 上。RUP41 mRNA 在过度心脏肥大压迫的体内小鼠模型中的下调。Northern 印迹分析在从横向主动脉收缩 (TAC) 或双盲操作 7 天的小鼠 (SHAM) 左心室分离的总 RNA 上进行。增加的 ANF 表达证实 TAC 心脏确实发生肥大反应。28S rRNA 的亚甲基蓝染色证实了 RNA 的完整性及相等的负载。对应于 SEQ ID NO: 4 核苷酸 775-1269 的小

鼠 RUP41 编码区片段被用作 Northern 印迹分析的探针。使用标准方法产生  $^{32}\text{P}$  标记的探针且在  $55^\circ\text{C}$  杂交至膜上。膜在高严格条件下清洗且在  $-80^\circ\text{C}$  暴露至 X 射线膜 2-4 天。

5 图下。RUP41 信号用光密度分析并标准化至 28S rRNA 信号。  
\*Anova 统计分析的 6 个双盲及 6 个 TAC 样品证实 RUP41 mRNA 显著降低,  $P < 0.00005$ 。

### 横向主动脉收缩 (TAC)

小鼠横向主动脉手术收缩完成如前述 (Rockman 等人, Proc Natl Acad Sci.1991 9 月 15 日; 88 (18): 8277-81)。简言之, 8 周龄小鼠 (C57/BL6) 以氯胺酮及甲苯噻嗪混合麻醉。在显微解剖下, 切开中线颈由显微术使导管及颈动脉管呈现。在成功气管内插管后, 插管连接至一定体积的 cuylced 啮齿类换气装置 (Harvard Apparatus), 以 0.2 毫升氧供应且呼吸率为 110/分钟。穿过一个小切口胸腔进入左上胸骨边缘的第二肋间, 且当针移动时, 由系上一个以 27 标准针的 7-0 耐龙缝合线产生一个窄 0.4cm 直径并且产生 65 至 70% 的可回复横向主动脉压缩 (TAC) 完成主动脉压缩。绑住气胸的主动脉后进行排空, 并且将动物的插管移开且使其恢复。

### 实施例 13

#### 组织缺氧的 NRVMs 中 RUP41 的下调

Northern 印迹证实在组织缺氧 6 小时的 NRVMs 分离的总 RNA 中 RUP41 mRNA 量的降低 (图 6)。在缺氧后复氧 24 小时 (H6/R24) 后 RUP41 mRNA 恢复至对照 (正常) 水平。c-fos 表达 (缺氧-6) 增加证实心肌对缺氧条件的胁迫应答。28S rRNA 的亚甲基蓝染色证实了 RNA 的完整性及相等的负载。对应于 SEQ ID NO: 6 核苷酸 53-488 的大鼠 RUP41 编码区片段被用作 Northern 印迹分析的探针。使用标准方法产生  $^{32}\text{P}$  标记的探针且在  $55^\circ\text{C}$  杂交至膜上。膜在高严格条件下清洗且在  $-80^\circ\text{C}$  暴露至 X 射线膜 2-4 天。

NRVMs 的缺氧处理描述于 Van Heugten 等人, *J Mol Cell Cardiol*(1994) 26: 1513-24, 其内容全部在此处引入作为参考。简言之, 使用灌注了 95%N<sub>2</sub> 及 5%CO<sub>2</sub> 的密闭培养箱实现组织缺氧。在缺氧处理一段时间后, 细胞从腔室移出至周遭空气且用无血清 DMEM/F12 培养基更换培养基。见下列的实施例 17。

#### 实施例 14

##### 充血性心衰竭人类的 RUP41 下调

图 7A。在人心脏分离的总 RNA 上进行 RT-PCR。RUP41 转录量在充血性心衰竭 (CHF) 病人较正常心脏功能 (正常) 病人的 RNA 中降低。将人类 GAPDH 引物添加至每一个 PCR 反应作为模板浓度及负载量的内部对照。

图 7B.\*Anova 统计分析证实 CHF 病人的 RUP41 转录本水平较正常人显著下降,  $p < 0.05$ 。心肌梗塞 (MI) 病人的 RUP41 转录本水平与正常心脏不同。

##### 人类心脏疾病样品

对市售获得的 (Clinomics) 诊断具有正常心脏功能的人, 充血性心衰竭 (CHF), 及心肌梗塞 (MI) 的病人解剖的心脏提取的总 RNA 进行 RT-PCR (如上)。RUP41 表达的相对量在 GAPDH 校准至内部对照后每一群体中进行确定。

#### 实施例 15

##### COS-7 细胞中 Gi 偶联至 RUP41

8 图上。COS-7 细胞用 pCMV-HARUP41(HA-RUP41)或 pCMV-HA 骨架 (CMV) 以及组成性活化的 Gs 偶联的甲状腺刺激激素受体 (pCMV-TSHR-A6231) 共转染。[HARUP41 对应于红血球凝集素(HA)-标记的 RUP41]。另外, CRE-萤光酶受体构建体在百日咳毒素 (PTX)

存在或不存在的条件下共转染以确定 cAMP 活化途径的活性。细胞中共表达 CART-TSHR 及 HARUP41 的萤光素酶报告活性较共表达 CART-TSHR 及 pCMV-HA 对照的细胞低，显示 RUP41 与 Gi 偶联。用 PTX 处理抑制由 RUP41 引起的 cAMP 降低证实了 Gi 与此受体的偶联。

8 图下。在百日咳毒素 (PTX) 存在或不存在下 COS-7 细胞与 pCMV-HA (CMV) 或 pCMV-HARUP41 (HA-RUP41) 构建体共转染。Forskolin (uM) 刺激的增加 cAMP 量由 RUP41 表达抑制。用 PTX 处理抑制由 RUP41 引起的 cAMP 降低证实了 Gi 与此受体的偶联。

#### RUP41 受体构建体

编码 SEQ ID NO: 3 的人 RUP41 多肽的氨基酸 2-433 的多核苷酸连接入 pCMV-HA 用于瞬间转染表达的研究。

#### 瞬时转染

使用 5'-HA 标记的 RUP41 表达构建体 (HA-pCMVRUP41) 进行 DNA 的转染。简言之，使用厂家说明书 (Roche) 所述的 Fugene-6 转染剂将 HA-pCMVRUP41 转染入在室斜面上铺板的 COS-7 或 HEK 细胞中。5'-HA 标记的 GPR (孤儿 GPCR; GenBank® 登录号 NM\_007223) 及 HA-pCMV 载体转染至 COS-7 及 HEK 细胞作为对照。

#### cAMP 测定

在用 RUP41 表达质粒转染 COS-7 细胞 24 小时后，以 PBS 清洗，且在收获细胞前培养于无血清有或无 100ng/毫升 PTX 的培养基中 37°C 下 18 小时用于 FlashPlate 分析 (PerkinElmer)，cAMP 的量根据厂家的说明书进行检测。

#### CRE-萤光酶报告分析

在用 pCMVRUP41 及 TSHR-A6231COS-7 表达质粒 (TSHR-A6231: RUP41 (或 CNV) DNA 比=1: 7 (w/w) 共转染后 24 小时，以 PBS 清

洗细胞，并在根据厂家的说明书使用 LucLite 萤光酶报告分析试剂盒 (Parkard) 进行 CRE 报告分析前培养于无血清有或无 100ng/毫升 PTX 的培养基中 37°C 下 18 小时用于 FlashPlate 分析 (PerkinElmer)，cAMP 的量根据厂家的说明书进行检测。

### 实施例 16

腺病毒介导的 RUP41 的过量表达促进 NRVMs 的存活

图 9A。NRVMs 用由每细胞噬斑形成单位 (PFU) 的病毒滴度限定的多重感染的编码 RUP41 (AdRUP41) 的重组腺病毒处理。腺病毒感染后 24 小时，分离总 RNA 且将 Northern 印迹分析用来确定病毒表达 RUP41 的水平。在 50 PFU/细胞 RUP41 时可以检测到表达，但高水平表达显示在 100 PFU/细胞。

图 9B。感染 AdRUP41 以 100 PFU/细胞 48 小时的 NRVMs 证实无血清培养基中细胞存活率的增加。NRVMs 用与德州红结合的 phalloidin 及 Hoechst33342 共染色。

### RUP41 载体构建体

为了腺病毒实验，在腺病毒 RUP41 (AdRUP41) 重组体产生前将编码 SEQ ID NO:3 的人 RUP41 多肽的多核苷酸亚克隆到 pShuttleCMV (Qbiogene) 中。

### 腺病毒感染

带有腺病毒载体的 NRVMs 的感染如先前所述 [Adams JW 等人, Circ Res(2000) 87: 1180-7; 其内容全部在此处引入作为参考]。简言之，在存在血清的条件下将 NRVMs 培养于薄覆盖 (3.5 毫克/cm<sup>2</sup>) 腔室斜面上 (Nunc) 过夜，在腺病毒感染前在不含血清的培养基中清洗及培养额外的 8 小时。在 0.1 至 500 PFU/细胞的剂量范围中，最理想的多重感染 (MOI) 被确定为 50 至 100 的噬斑形成单位 (PFU) /细胞。在 AdRUP41 或对照编码 GFP (AdGFP) 的腺病毒感染后的最初 48 小时，

50 PFU/细胞的 MOI 产生大于 95% 的感染效应（如由感染这种对照病毒的 NRVMs 中确定 GFP 表达）通式没有任何细胞毒作用。

#### 实施例 17

过量表达 RUP41 挽救 NRVMs 免于组织缺氧/复氧引起的细胞凋亡

寡核小体 DNA 断裂分析（又称途径）证实在缺氧（8 小时）后复氧（24 小时）刺激用对照（AdGFP）腺病毒以 100 PFU/细胞浓度感染的 NRVMs(H8/N24)细胞凋亡的增加。然而，腺病毒介导的 SEQ ID NO: 3 的人 RUP41 多肽(100 PFU/细胞)的过量表达降低了由血清损失（正常含氧量）及缺氧后复氧（H8/N24）诱导的 DNA 的断裂水平（图 10）。

#### 组织缺氧/复氧

分离的 NRVMs 在有血清（10%FBS, 5%HS）的条件下过夜培养，接着在缺氧处理前 24 小时用无血清培养基 DMEM-F12（Sigma）更换培养基。利用密闭的灌入 95%N<sub>2</sub> 及 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱实现缺氧[Van Heugten 等人, J Mol Cell Cardiol (1994) 26: 1513-24, 结合于此]。在缺氧处理一段时间后，从腔室移出细胞到环境中并且更换无血清 DMEM/F12 培养基。

#### DNA 断裂

根据厂家的说明书（Gentra）利用 PUREGENE DNA 分离试剂盒从 NRVMs 分离 DNA。等量 DNA 在 2%琼脂糖凝胶上分离通过用溴化乙锭染色在紫外光下进行检测。

#### 实施例 18

##### 保护心脏

本发明的调节物可以利用 Fryer 等人的体内大鼠模型显示出保护心脏作用[Circ Res(1999) 84: 846-51; 其内容全部在此处引入作为参考]。所述调节物由腹膜内注射施用。优选剂量为 0.1 至 100mg/kg。其它优选剂量选自 0.1mg/kg; 0.3mg/kg; 1.0mg/kg; 3.0mg/kg; 30mg/kg;

及 100mg/kg。安慰剂组只施用介质。在一些实施方案中，所述调节物为激动剂。

350 至 450 克的雄性 Wistar 大鼠被用于该研究的所有阶段。手术之前 1, 12, 24, 48, 或 72 小时经腹膜内注射给大鼠施用上述调节物或生理盐水。随后，大鼠经由腹膜内施用 thiobutababital sodium (Inaction, Research Biochemical International; 100 毫克/公斤) 进行麻醉。实施气管切开术，且气管用连接啮齿类呼吸机 (CIV-101 型, Columbus Instruments, 或 683 型, Harvard Apparatus) 的插管插入。大鼠在室温下以 60 至 65 次呼吸/分钟提供氧气。通过维持正末呼气压在 5 至 10 毫米水预防肺不张。对动脉 pH,  $P_{CO_2}$ , 及  $P_{O_2}$  通过控制在 15 分钟吸留气体，以及 60 分钟和 120 分钟的血液气体系统再灌注 (AVL995pH/血液气体分析仪, AVL Medical Instruments) 进行监控，且通过校正呼吸频率及/或潮气流维持在正常生理范围 (pH7.35 至 7.45;  $P_{CO_2}$  为 25 至 44 毫米汞柱; 及  $P_{O_2}$  为 80 至 110 毫米汞柱)。体温通过使用加热垫维持在 38°C，根据需要静脉内施用重碳酸盐从而维持动脉血液 pH 在正常生理范围内。

右侧颈动脉被插管经由连结至 Grass(模型 7)多波扫描器的 Gould PE 50 或 GOULD PE 23 压力转换器测量血压及心率。右侧颈静脉插管被灌入生理盐水，重碳酸盐及药物。再第五肋间进行左侧开胸术，然后进行心包切开术，并且调节左侧二尖瓣附件显示出左侧冠状动脉的位置。结扎线 (6-0 丙烯) 从左侧二尖瓣附件下的紧邻区域穿过冠状动脉以下进入左心室的右部分。缝合末端穿过丙烯管形成勒除器。冠状动脉由拉紧缝合末端阻断并用止血钳在心外膜表面上强压勒除器。冠状动脉阻断通过心外膜发绀证实，且随后血压降低。心脏再灌注经由放开止血钳以及松开勒除器启始，并且通过肉眼观察心外膜充血反应证实。在实验方案开始前稳定心率及血压。

大鼠随机分配于设计的实验组中。对照大鼠局部缺血前 30 分钟及

再灌注 2 小时前施用生理盐水 24 小时 (I/R)。为了显示由上述调节物诱导的急性心血管保护, 所述调节物在延长缺血损伤施用 1 小时。为了显示针对急性缺血损伤的延迟心血管保护, 所述调节物在 I/R 前以给定的剂量施用 12 或 24 小时。所述调节物在 I/R 前以给定的剂量施用 48 或 72 小时。

在完成上述方案的过程中, 阻断冠状动脉, 经颈静脉施用专利蓝色染料阴性染色确定危险区 (AAR)。大鼠以 15% 氯化钾实施安乐死。取出心脏, 左心室从剩余组织解剖出来, 随后切成 6 片薄-横切片。从而可以描绘出正常区, 染色蓝色, 与 AAR, 其随后保持粉红色。从非缺血区取出危险区, 组织置于分离的小药瓶中并用 1.0% 2,3,5-三苯基四唑化氯 (TTC) 染色剂的 100mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH7.4) 于 37°C 温育 15 分钟。TTC 为活以及非活性组织的指示剂。TTC 由存在于活心肌中的脱氢酶还原, 且产生甲腊 (formazan) 沉淀, 其诱导深红色, 反之梗塞区保持灰色 {Klein 等人, Virchows Arch [Pathol Anat](1981) 393: 287-97}。组织储存于 10% 甲醛药瓶中过夜, 且梗塞心肌在解剖显微镜下从 AAR 解剖出 (Cambridge Instruments)。梗塞大小 (IS), AAR, 及左心室重 (LV) 由重量分析确定。AAR 被表达为  $LV(AAR/LV)\%$ , 并且 IS 被表达为  $AAR(IS/AAR)\%$ 。

如果大鼠表现出严重的低血压 (<30 毫米汞柱收缩压) 或者如果由于新陈代谢的酸中毒或碱中毒不能将充分的血液气体值保持在正常生理范围, 就将这些大鼠从数据分析中排除。

全部数值表现为平均值±标准偏差。单向 ANOVA 的 Bonferroni 检验被用来确定是否在血液动力学, IS 及 AAR 小组中存在任一显著的差异。显著差异在  $P<0.05$  下确定。IS/AAR 减少表示新血管的保护。

## 实施例 19

### 口服生物可利用率

直接估计口服生物可利用率的内科分析方法为已知技术且可被使用[参见例如但不限于：Wang PC 等人，*Cardiovasc Drug Rev* (2002) 20: 137-52；及 Buchan P 等人，*Headache* (2002) Suppl2: S54-62；其内容全部在此处引入作为参考]。进一步说明性但非限制性的方式，所述其它分析方法可包含液相层析-串联质谱分析仪[Chavez-Eng CM 等人，*J Chromatogr B 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；其内容全部在此处引入作为参考]。

正电子发射断层扫描已经被成功用于 (PET) 直接获得口服药物后哺乳动物体内药物分布，包括生物可利用率的测定结果[Gulyas 等人，*Eur J Nucl Med Mol Imaging*(2002) 29: 1031-8；其内容全部在此处引入作为参考]。

或者，本发明调节物的口服生物利用率可在体内数据基础上确定，例如但不限于通过实施例 18 的老鼠模型。调节物由口服喂入的剂量范围为  $0.1\text{mg kg}^{-1}$  至  $100\text{mg kg}^{-1}$ 。调节物口服施用显示出对心血管的保护作用。调节物的效果显示出是剂量依赖性的并且可与腹膜内施用后的效果相媲美。通过口服达到 IS/AAR 的一半最大减少的调节物剂量可与通过腹膜内施用达到 IS/AAR 的一半最大减少的调节物剂量相媲美。通过说明的方式，若所述口服剂量为腹膜内剂量的 2 倍，那么调节物的口服生物利用率为 50%。更一般地，若所述口服剂量为  $\theta\text{ mg kg}^{-1}$  且腹膜内剂量为  $\rho\text{ mg kg}^{-1}$ ，则调节物的口服生物利用率为  $[(\rho / \theta) \times 100]$ 。

本领域普通技术人员可以很容易地明白，本发明调节物的口服生物利用率的确定除了本发明说明而非限制性列举的方法外，可使用体内动物细胞模型实现。本领域普通技术人员可以很容易地明白所述口服生物利用率的生物活性的读数除了是 IS/AAR 还可以是参数。很容易

想象施用的参考途径可以是腹膜内施用以外的途径。在一些实施方案中，所述施用参考路径可为静脉内注射施用。

在一些实施方案中，本发明调节物的口服生物利用率为腹膜内注射的至少 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%。

## 实施例 20

### 表达人 RUP41 GPCR 构成的转基因小鼠/大鼠/猪

本发明也提供了与表达人 RUP41 GPCR 的转基因非人哺乳动物的方法及组合物，所述 RUP41 GPCR 包含的多肽选自：

- (a) SEQ ID NO: 2 的多肽；
- (b) SEQ ID NO: 2 的多肽；其中在 SEQ ID NO: 2 的 312 位的苯丙氨酸被赖氨酸取代；
- (c) SEQ ID NO: 3 的多肽；以及
- (d) SEQ ID NO: 3 的多肽；其中在 SEQ ID NO: 2 的 312 位的苯丙氨酸被赖氨酸取代。

在一些实施方案中，所述非人哺乳动物为小鼠，大鼠或猪。

制备转基因动物诸如小鼠、大鼠以及猪的方法是本领域普通技术人员公知的，并且任何这样的方法可被用于本发明。简要地，转基因哺乳动物可通过例如，用具有编码人 RUP41 GPCR 的多核苷酸（“转基因”）转染多能干细胞诸如 ES 细胞进行制备。成功转化的 ES 细胞然后被导入到早期胚胎中，然后植入到同种哺乳动物的子宫中。在某些情况下，转化的（“转基因的”）细胞将包括所产生动物胚系的一部分且含有胚系转基因细胞的成年家畜然后与其它动物交配，由此最后生产出具有它们细胞中的转基因的转基因动物的种群，而且可以将转基因稳定地遗传给它们的任意一个后代。其它导入多核苷酸的方法可被使用，例如通过显微注射导入编码人 RUP41 GPCR 的多核苷酸到受精

卵或早期胚胎中。或者，可通过用含有转基因的逆转录酶病毒感染受精卵将转基因导入到动物中[Jaenisch, R, Proc Natl Acad Sci USA (1976) 73:1260 - 4]。转基因哺乳动物的制造方法描述在，例如，Wall 等, J Cell Biochem (1992) 49:113-20; Hogan 等, Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. (1986) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Costa 等, FASEB J (1999) 13:1762-73; WO 91/08216; 美国专利 4,736, 866; 以及美国专利 6,504,080; 每个的内容全部引入作为参考。

在一些实施方案中，所述人 RUP41 GPCR 的表达是心肌细胞-选择性的。在特定实施方案中，所述所述人 RUP41 GPCR 的心肌细胞-选择性表达被通过  $\alpha$  肌球蛋白重链启动子启动[Subramaniam A 等, J Biol Chem (1991) 266:24613 -20; 其内容在这里全部引入作为参考]。

## 实施例 21

### 心脏保护的体内转基因动物模型

本发明化合物可以显示出具有利用实施例 20 中描述的体内转基因动物模型进行心脏保护的作用。在特定实施方案中，所述动物为小鼠、大鼠或猪。

所述化合物可以通过，施用所述化合物给所述转基因动物，以及测定是否所述施用导致实施例 18 的体内大鼠模型或小鼠体内模型或类似的猪的 IS/AAR 相对于所述单独施用载体的转基因动物的 IS/AAR 有所减少进行评价。

在优选的实施方案中，所述化合物为本发明的调节物。在一些实施方案中，所述调节物降低 cAMP 的胞内水平。在一些实施方案中，所述调节物为激动剂。在一些实施方案中，所述化合物被通过腹膜内注射施用。优选的剂量为 0.1-100 mg/kg。其它优选的剂量选自：0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg; 1.0 mg/kg; 3.0 mg/kg; 10 mg/kg; 30 mg/kg and 100

mg/kg。安慰剂为单独施用的介质。在一些实施方案中，所述剂量每天施用。在一些实施方案中，所述剂量被施用持续下述的时间段：一周、两周、三周以及四周。应指出这些给药途径、剂量范围、施药频率以及给药持续时间是例证性的且不是对本发明的限制。

## 实施例 22

### RUP41 基因敲除的小鼠/大鼠/猪

#### 小鼠

优选的 DNA 构建体将包括，从 5'-末端到 3'-末端：(a)包含在小鼠 RUP41 基因组序列中的第一核苷酸序列；(b)含有阳性选择标记诸如新霉素抗性(neo)标记的核苷酸序列；以及(c)包含在小鼠 RUP41 基因组序列中且位于第一小鼠 RUP41 核苷酸序列(a)的基因组下游的第二核苷酸序列 通过本领域普通技术人员公知的方法分离小鼠 RUP41 基因组序列(Maniatis T 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory; 其全部内容引入作为参考)。用于分离小鼠 RUP41 基因组的探针来自编码小鼠 RUP41 多肽的 cDNA，其中所述的 cDNA 可利用来自小鼠心脏、肺或脂肪组织的模板 mRNA 获得。

在优选的实施方案中，这些 DNA 构建体也含有位于核苷酸序列 (a)上游或核苷酸序列(c)下游的阴性选择标记。优选地，阴性选择标记包括胸苷激酶 (*tk*) 基因 [Thomas 等, Cell (1986) 44:419-28]，潮霉素 β 基因 [Te Riele 等, Nature (1990) 348:649-51]，*hprt* 基因[Van der Lugt 等, Gene (1991) 105: 263-7; Reid 等, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:4299-4303] 或 Diphtheria 毒素 A 片段 (*Dt-A*) 基因 [Nada 等, Cell (1993) 73:1125-35; Yagi 等, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 9918-9922]，其内容整体引入作为参考。优选地，阳性选择标记位于小鼠 RUP41 外显子序列内，中断了编码小鼠 RUP41 多肽的序列。这些置换型载体被描述在，例如，Thomas 等, Cell (1986) 44:419-28; Thomas 等, Cell (1987) 51:503-12; Mansour 等, Nature (1988) 336:348-52; Koller 等, Annu Rev Immunol (1992)10:705-30; 以及美国专利 5,631,153; 其内

容整体引入作为参考。

第一和第二核苷酸序列(a)和(c)可随意地位于小鼠 RUP41 调节序列, 内含子序列, 外显子序列或含有调控和/或内含子和/或外显子序列的序列的中间。核苷酸序列(a)和(c)核苷酸序列的大小为 1 到 50 kb, 优选地从 1 到 10 kb, 更优选地 2 到 6 kb, 且最优选地 2 到 4 kb。

制备含有选择性基因敲除的小鼠的方法是本领域普通技术人员公知的, 且已经成功地使各种基因失活。

### 大鼠

对于大鼠的基因靶向技术为比用于小鼠的更为不实用且是很有积极兴趣的研究区域。一种方法是使大鼠胚胎干细胞(ESC)类细胞中的大鼠 RUP41 基因失活, 则然后在两个细胞晶胚融合后将具有失活的大鼠 RUP41 基因的细胞注射到大鼠胚囊中[Krivokharchenko 等, Mol Reprod Dev (2002) 61:460-5]。

在严格杂交条件下利用大鼠 RUP41 多核苷酸 SEQ ID NO:6 筛选大鼠基因组文库来鉴定大鼠基因。通过在类似条件下筛选大鼠心脏或脑 cDNA 文库来鉴定全长的或大体上全长的大鼠 RUP41 cDNA。严格核酸杂交的条件是本领域普通技术人员公知的[Maniatis T, 等(1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York]。

另一种可选的方法是将大鼠 ESC 类细胞中的大鼠 RUP41 基因失活, 然后将具有失活的大鼠 RUP41 基因的大鼠 ESC 类细胞的核转移到去核的卵母细胞中[Sato K 等, Hum Cell (2001) 14: 301-4; Wakayama and Yanagimachi, Semin Cell Dev Biol (1999) 10: 253-8; Hochedlinger and Jaenisch, Nature (2002) 415: 1035-8; Yanagimachi; Mol Cell Endocrinol (2002) 187: 241-8; 其内容在这里全部引入作为参考]。

[也参见, 例如 Zan 等, *Nature Biotechnology* (2003) 21: 645-51; 其内容在这里全部引入作为参考]中描述的类似或可选的用于小鼠的方法可用来制备 RUP41 的基因敲除大鼠。

### 猪

类似的或可选择的方法可用来制备 RUP41 的基因敲除猪[参见, 例如, Lai 等, *Science* (2002) 295: 1089-1092; 其内容在这里全部引入作为参考]。

### *CRE-LOXP* 系统:

含有选择性 RUP41 基因敲除心肌细胞的小鼠/大鼠/猪

### 小鼠

这些新的 DNA 构建体利用 P1 噬菌体的位点特异性重组系统。P1 噬菌体具有称为 Cre 的重组酶, 其与 34 碱基对 loxP 位点相互作用。loxP 位点含有两个通过 8 bp 保守序列分离的 13 bp 回文序列[Hoess RH 等, *Nucleic Acids Res* (1986) 14:2287-300; 其内容在这里全部引入作为参考]。具有相同取向的两个 loxP 位点之间通过 Cre 酶进行的重组导致 DNA 片段的缺失。

与同源重组技术联合使用的 Cre - loxP 系统首先被 Gu 等人所描述 [Gu H 等, *Cell* (1993) 73: 1155-64; Gu H 等, *Science* (1994) 265: 103-6; 其内容整体引入作为参考]。简而言之, 待插入基因组目标位置的核苷酸序列具有至少两个在相同方向上的 loxP 位点, 且位于待由重组体基因组切除的核苷酸序列的相应末端。切除作用需要重组细胞宿主的核内重组酶(Cre)的存在。重组酶可在期望的时间产生通过(a)在含有这些酶的培养基中温育重组细胞, 通过直接注射 Cre 酶到目的细胞中, 诸如通过酶脂转染到细胞中, 诸如 Baubonis 等描述的[Baubonis W 和 Sauer B, *Nucleic Acids Res* (1993) 21:2025-9; 其内容在这里全部引入作

为参考；(b) 用含有与重组细胞中功能性启动子可操作地连接的 Cre 编码序列的载体转染细胞宿主，其中启动子任选地是可诱导的，所述载体被导入到重组细胞宿主中，诸如描述在 [Gu H 等, Cell (1993) 73:1155-64;其内容在这里全部引入作为参考]以及 Sauer 等 [Sauer B and Henderson N, Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85:5166-70; 其内容在这里全部引入作为参考]; (c) 将含有与重组细胞中功能性启动子可操作地连接的 Cre 编码序列的多核苷酸导入到细胞宿主中，其中启动子是任选可诱导的，且所述多核苷酸被导入到细胞宿主的基因组中通过随机插入或者同源重组，诸如 Gu 等 [Gu H 等, Science (1994) 265: 103-6; 其内容在这里全部引入作为参考]描述的。

利用 Cre-loxP 系统的载体和方法被描述在，例如，Zou 等 (1994); Minamisawa S 等, J Biol Chem (1999) 274: 10066-70; Chen 等, J Biol Chem (1998) 273: 1252-6; Chen 等, Development (1998) 125: 1943-9; 每一个的内容在这里整体引入作为参考]。

在本发明优选的实施方案中，Cre 被引入细胞宿主的基因组通过上述的策略(c)，其中所述的启动子是心肌细胞选择性的并导致小鼠 RUP41 基因组序列的心肌细胞-选择性断裂(loxP 侧接的；“floxed”)。在一些实施方案中，所述心肌细胞-选择性启动子是肌球蛋白轻链 2 (*mlc-2v*)的心室特异性同种型的 [Minamisawa S 等, J Biol Chem (1999) 274:10066-70; Chen 等, J Biol Chem (1998) 273: 1252-6; 每一个的内容在这里整体引入作为参考]。含有插入 Cre 重组酶编码序列到内源性 *mlc-2v* 位点中的转基因小鼠(“*mlc-2v cre* 敲除小鼠”)已被描述在 [Chen 等, Development (1998) 125:1943-9; 其内容在这里全部引入作为参考]。插入选择性基因的方法在本领域普通技术人员知识范围内 [参见，例如，Chen 等, Development (1998) 125: 1943-9]。

在一些实施方案中，本发明描述了一种制备含有 RUP41 基因的心肌细胞-选择性敲除的小鼠的方法，包括将 floxed RUP41 基因与上述的

*mlc-2 cre* 等位基因杂交。

其它制备含有 RUP41 基因心肌细胞-选择性敲除的小鼠的方法是本领域普通技术人员公知的；参见，例如，Kuhn R 和 Torres RM, *Methods Mol Biol* (2002) 180: 175-204；Sauer B, *Methods* (1998) 14:381-92；Gutstein DE 等, *Circulation Research* (2001) 88: 333；Minamino T 等, *Circulation Research* (2001) 88: 587；和 Bex A 等, *J Urol* (2002) 168:2641-2644；其内容在这里全部引入作为参考。

### 大鼠

类似的或可选择的方法[参见，例如，Zan 等, *Nature Biotechnology* (2003) 21: 645-51；其内容在这里全部引入作为参考]可用来制备含有 RUP41 基因敲除的大鼠。

### 猪

类似的或可选择的方法可用来制备含有 RUP41 基因心肌细胞-选择性基因敲除的猪[参见，例如，Lai 等, *Science* (2002) 295:1089-1092；其内容在这里全部引入作为参考]。

本申请通篇引用了各种出版物、专利以及公开的专利申请。本申请中引用的这些出版物、专利以及公开的专利申请的内容被在这里整体引入作为参考。本领域技术人员可理解，对本发明进行的改进和延伸被包括在上述的发明内容以及权利要求的范围之中。

## 序列表

- <110> 阿瑞那制药公司 (Arena Pharmaceuticals, Inc.)
- <120> 治疗缺血性心脏病及充血性心衰竭的人类G蛋白偶联受体及其调节物  
(HUMAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR AND MODULATORS THEREOF FOR THE  
TREATMENT OF ISCHEMIC HEART DISEASE AND CONGESTIVE HEART FAILURE)
- <130> SCT050074-47
- <150> US 60/400,774
- <151> 2002-08-01
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 1881
- <212> DNA
- <213> Homo sapien
- <400> 1
- gttatttctt caaaaggaaa acacaat ttttctatc aaaacaatgc aaacttgatg 60
- gttcttaatt ctacattttc tattaatagt ttacaaactt aaaaatttaa ctaagtacac 120
- aattgaaaga ttttttttc ttacaaagaa cacgttatac gtcatttaa ttgccaaata 180
- tcaaatagtt tattctat ttttcttag ggaaaaaac caactgctcc aaaagaatgt 240
- gtttttctcc cattctgaa atcaaatgc agtctgaatc taacattaca gtgcgagatg 300
- acattgatga catcaacacc aatatgtacc aacctatc atatccgta agctttcaag 360
- tgtctctcac cggatttctt atgtagaaa ttgtgtggg actggcagc aacctcactg 420
- tattgtact ttactgatg aaatccaact taatcaactc tgcagtaac attattaca 480
- tgaatcttca tgtacttgat gtaataatt gtgtgggatg tattctctc actatagtta 540
- tcctctgct ttcactggag agtaaacctg ctctcattg ctgtttccat gaggttgtg 600
- tatcttttgc aagtgtctca acagcaatca acgttttgc taccatttg gacagatag 660
- acatctctgt aaaacctgca aaccgaattc tgacaatggg cagagctgta atgttaatga 720
- tatccatttg gatttttct ttttctctt tctgatcc tttattgag gtaaattttt 780

tcagtcttca aagtggaaat acctgggaaa acaagacact tttatgtgtc agtacaaatg 840  
 aatactacac tgaactggga atgtattatc acctgttagt acagatccca atattctttt 900  
 tcactgttgt agtaatgta atcacataca ccaaatact tcaggctctt aatattcgaa 960  
 taggcacaag attttcaaca gggcagaaga agaaagcaag aaagaaaaag acaatttctc 1020  
 taaccacaca acatgaggct acagacatgt cacaaagcag tgggtgggaga aatgtagtct 1080  
 ttggtgtaag aacttcagtt tctgtaataa ttgcctccg gcgagctgtg aaacgacacc 1140  
 gtgaacgacg agaaagacaa aagagagtct tcaggatgtc tttattgatt atttctacat 1200  
 ttcttctctg ctggacacca atttctgitt taaataccac cattttatgt ttaggccccaa 1260  
 gtgacctttt agtaaaatta agattgtgtt ttttagtcat ggcttatgga acaactatat 1320  
 ttcacctctt attatatgca ttcactagac aaaaatttca aaaggtcttg aaaagtaaaa 1380  
 tgaaaaagcg agttgtttct atagtagaag ctgatcccct gcctaataat gctgtaatac 1440  
 acaactcttg gatagatccc aaaagaaaca aaaaaattac ctttgaagat agtgaataa 1500  
 gagaaaaacg ttagtgcct caggttgtca cagactagag aaaagtctca gtttcaccaa 1560  
 atccacattc aatgagttt taaatttaaa ttgtaaaaac tgatattact gccaaatata 1620  
 agaaaaatat ttaagtatt ggttatgttg taaattttca atgtgaaatg ctaattagat 1680  
 aggtcatata tattcaattt cttcattact taatgtattt gttgcatggc agtttgtaa 1740  
 agtactatca tgtgtatatt ttgtcaatat tatgtccaac agaaaatatt catgtaagtc 1800  
 atatTTTTTA aggaataaat acatagcctt aaaacagtgt ataactttaa aatgtaaaaa 1860  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1881

<210> 2

<211> 433

<212> PRT

<213> Homo sapien

<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 35	Pro Leu Ser Phe Gln Val 40	Ser Leu Thr Gly Phe Leu 45
Met Leu Glu Ile Val 50	Leu Gly Leu Gly Ser Asn 55	Leu Thr Val Leu Val 60
Leu Tyr Cys Met Lys 65	Ser Asn Leu Ile Asn Ser 70	Val Ser Asn Ile Ile 75 80
Thr Met Asn Leu His 85	Val Leu Asp Val Ile Ile 90	Cys Val Gly Cys Ile 95
Pro Leu Thr Ile Val 100	Ile Leu Leu Leu Ser 105	Leu Glu Ser Asn Thr Ala 110
Leu Ile Cys Cys Phe 115	His Glu Ala Cys Val Ser 120	Phe Ala Ser Val Ser 125
Thr Ala Ile Asn Val 130	Phe Ala Ile Thr Leu Asp 135	Arg Tyr Asp Ile Ser 140
Val Lys Pro Ala Asn 145	Arg Ile Leu Thr Met Gly 150	Arg Ala Val Met Leu 155 160
Met Ile Ser Ile Trp 165	Ile Phe Ser Phe Phe Ser 170	Phe Leu Ile Pro Phe 175
Ile Glu Val Asn Phe 180	Phe Ser Leu Gln Ser Gly 185	Asn Thr Trp Glu Asn 190
Lys Thr Leu Leu Cys 195	Val Ser Thr Asn Glu Tyr 200	Tyr Thr Glu Leu Gly 205
Met Tyr Tyr His Leu 210	Leu Leu Val Gln Ile Pro 215	Ile Phe Phe Phe Thr Val 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 Arg Leu Val Pro Gln Val Val Thr  
420 425 430

Asp

<210> 3  
 <211> 433  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien  
 <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

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

Asp

<210> 4  
 <211> 1269  
 <212> DNA  
 <213> Mouse

<400> 4  
 atgcagtctg aatcaaactg cacggtgcga 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 gtgaccttc tgctctcact ggagagtaac 300  
 actgctctca tctgtgttt ccacgaagct tgtgtttcct ttgcaagtgt ttcgacagca 360  
 atcaacgttt ttgctattac tctggacaga tatgacatct ctgtaaaacc tgcaaacaga 420  
 attctgacaa tgggcagagc tgtaatgcta atgacatcca ttggatttt ttctttcttc 480  
 tcattcctga ttcccttcat tgaagtaaatt ttttcagtc 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 tttgggtgta gaacttcagt ttctgtaata   840
attgccctcc ggcgagccgt gaaacgccac cgggaacgac gagaacggca gaaaagagtc   900
ttcaaaatgt cgttattgat tatttctaca tttcttctct gttggacacc aatttctgtt   960
ttaaatacca ccattctatg tttaggccca agtgaccttt tagtaaaatt aagattgtgt  1020
tttctagtca tggcttatgg aacaacgata ttccaccctc tcttztatgc attcaccaga  1080
caaaagtffc aaaaggtcctt aaagagtaag atgaaaaagc gagttgtffc catagttgaa  1140
gctgatccca tgcctaataa cgctgtaata cacaactcat ggatagatcc taaaagaaac  1200
aaaaaggtta cctatgaaga cagtgaata agagagaaat gtttagtacc tcaggtgtc   1260
acagactag                                     1269

```

<210> 5  
<211> 422  
<212> PRT  
<213> Mouse

<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

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> Rat

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

<400> 6  
 atgcatgctc gagcggccgc cagtgtgatg gatatctgca gaattcgccc ttgtaataat 60  
 tgcctccgg cgagccgtga aacgacaccg ggaacgacga gagaggcaga aaagagtctt 120

caaaaatgtc gttatggata atttctacat ttcttctctg ttggacacca atttctgttt 180  
 taaataccac cattttatgt ttaggcccaa gtgacctttt agtaaaatta agattgtgtt 240  
 ttctagtcat ggcttatgga acaactatat tccatcctct cctgtatgca ttcaccagac 300  
 aaaaatttca aaaggtctta aaaagtaaga tgaaaaagcg agttgtttcc atagttgaag 360  
 ctgatcccat gcctaataac gctgtaatac acaactcatg gatagatcct aaaagaaaca 420  
 aaaaggttac ctacgaagac agtgaaataa gagagaaatg ttagtacct caggttgtca 480  
 cagactagaa gggcgaattc cagcacactg gcgnccgta ctagtggatc cgagctcggc 540  
 ac 542

<210> 7  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Novel Sequence

<400> 7  
 tccccggga aaaaaaccaa ctgctccaaa 30

<210> 8  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Novel Sequence

<400> 8  
 taggatccat ttgaatgtgg atttggtgaa a 31

<210> 9  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Novel Sequence

<400> 9  
 gatcaagctt ccatggcgtg ctgcctgagc gaggag 36

<210> 10  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Novel Sequence

<400> 10  
gatcggatcc ttagaacagg ccgcagtcct tcaggttcag ctgcaggatg gtg 53

<210> 11  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Novel Sequence

<400> 11  
gtaataattg ccctccggcg agc 23

<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Novel Sequence

<400> 12  
ctagtctgtg acaacctgag g 21

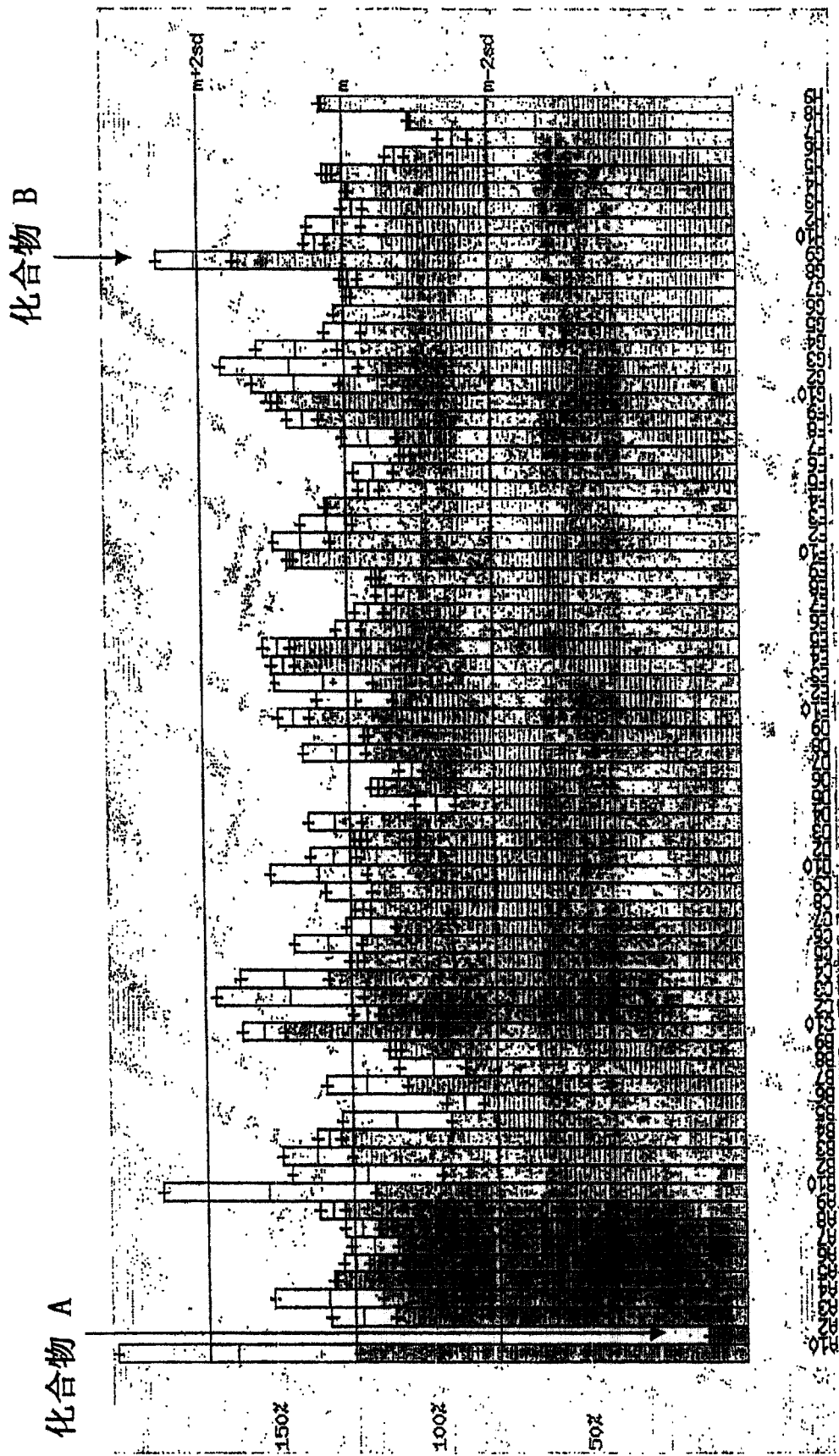
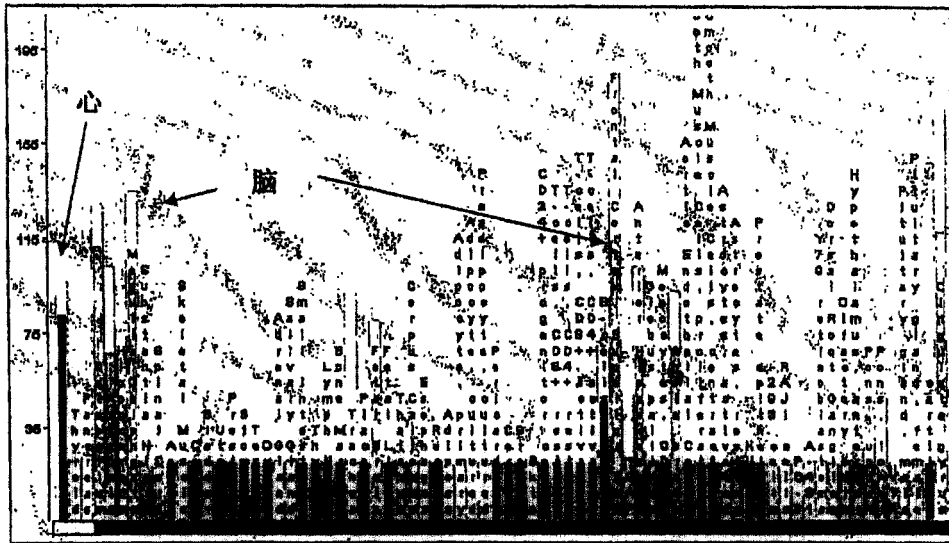


图 1

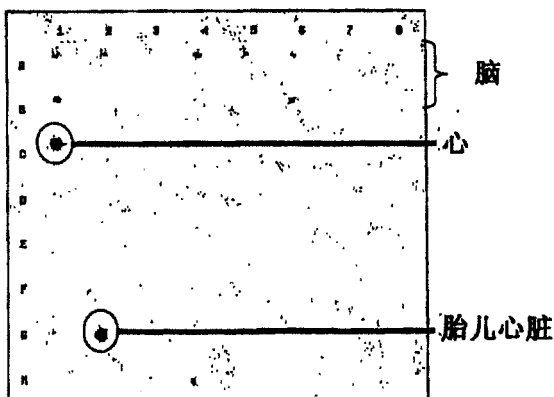
# 图 2

## 人组织中的RUP41表达谱

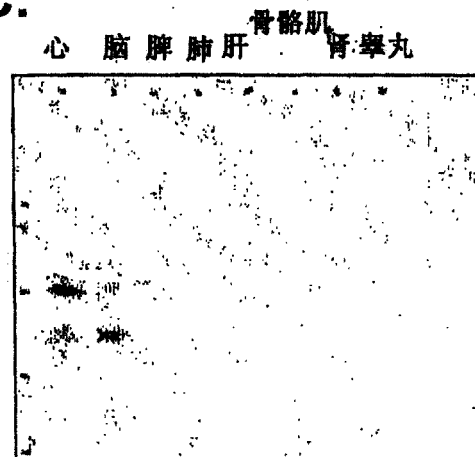
A.



B.



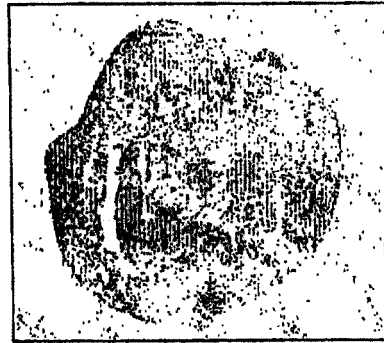
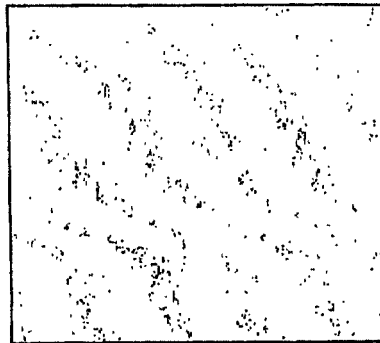
C.



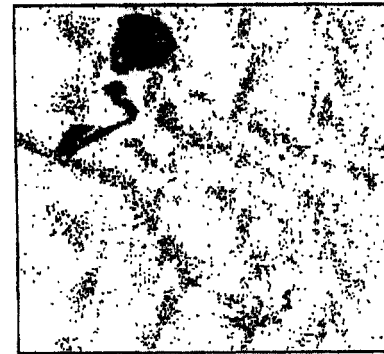
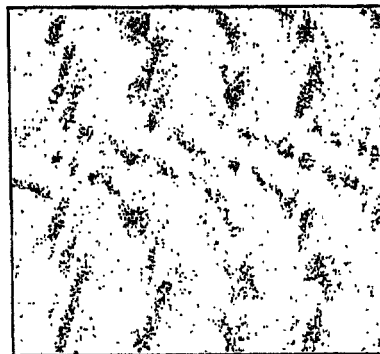
### 图 3

原位杂交：  
成年大鼠心脏中RUP41的表达

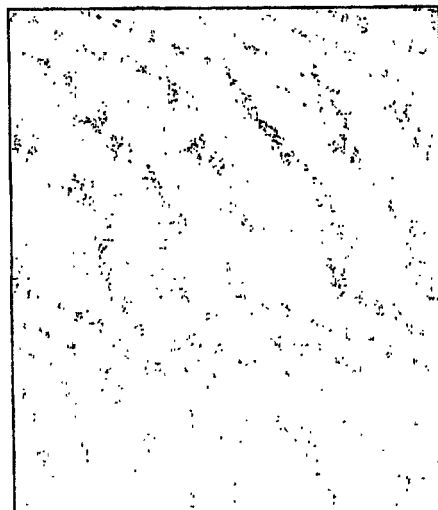
**GAPDH**



**ANF**



**RUP41**



正义

反义

### 图 4

肥大新生大鼠心室肌细胞中  
RUP41的下调

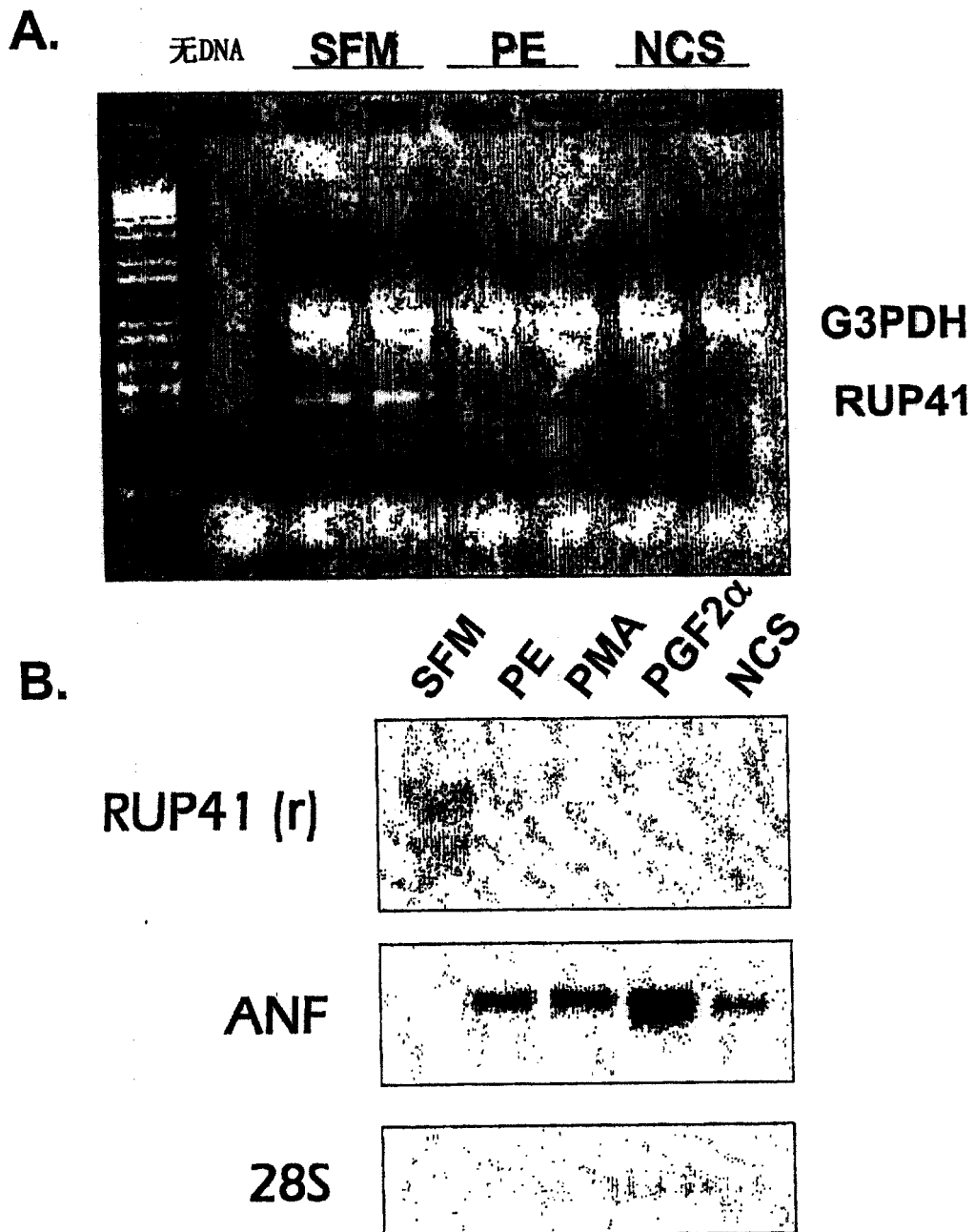


图 5

RUP41在遭受超负荷压力肥大的小鼠心脏中的下调

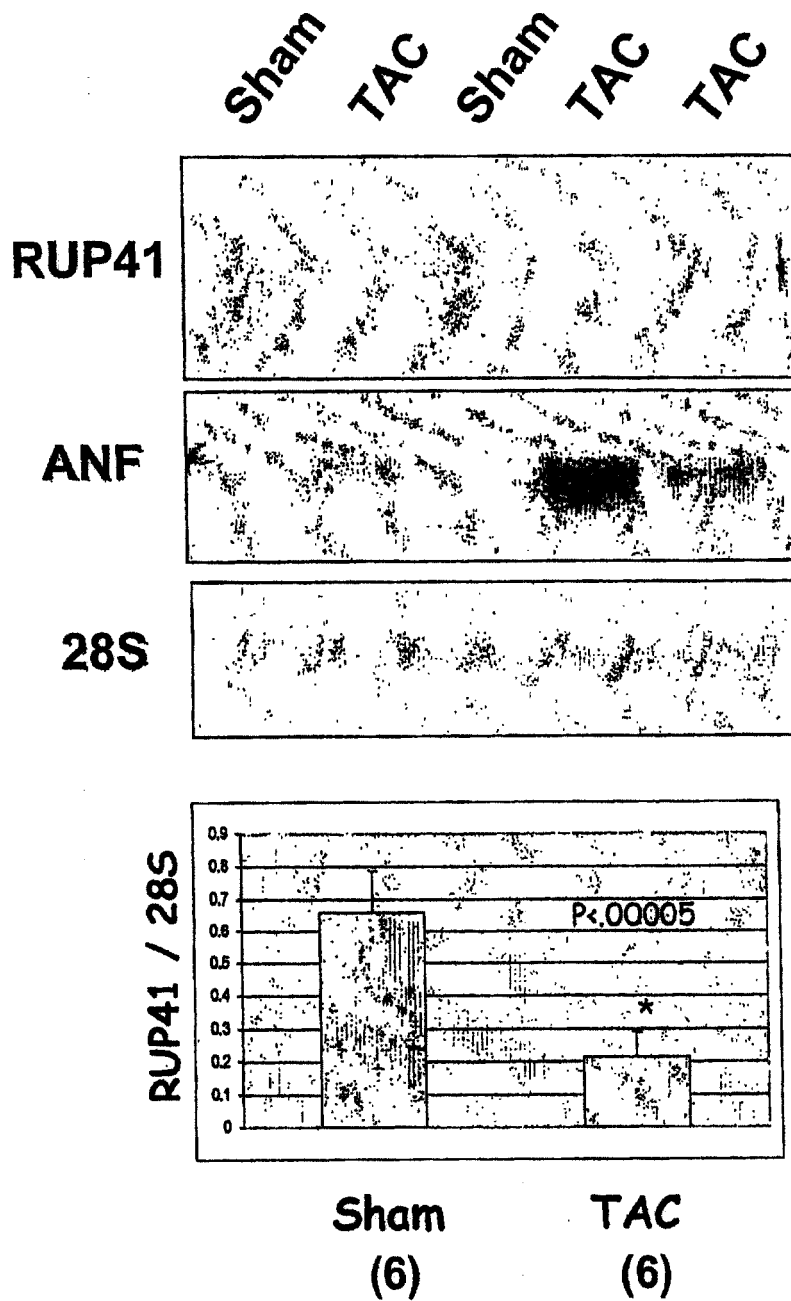


图 6

RUP41在遭受组织缺氧  
的NRVMs中的下调

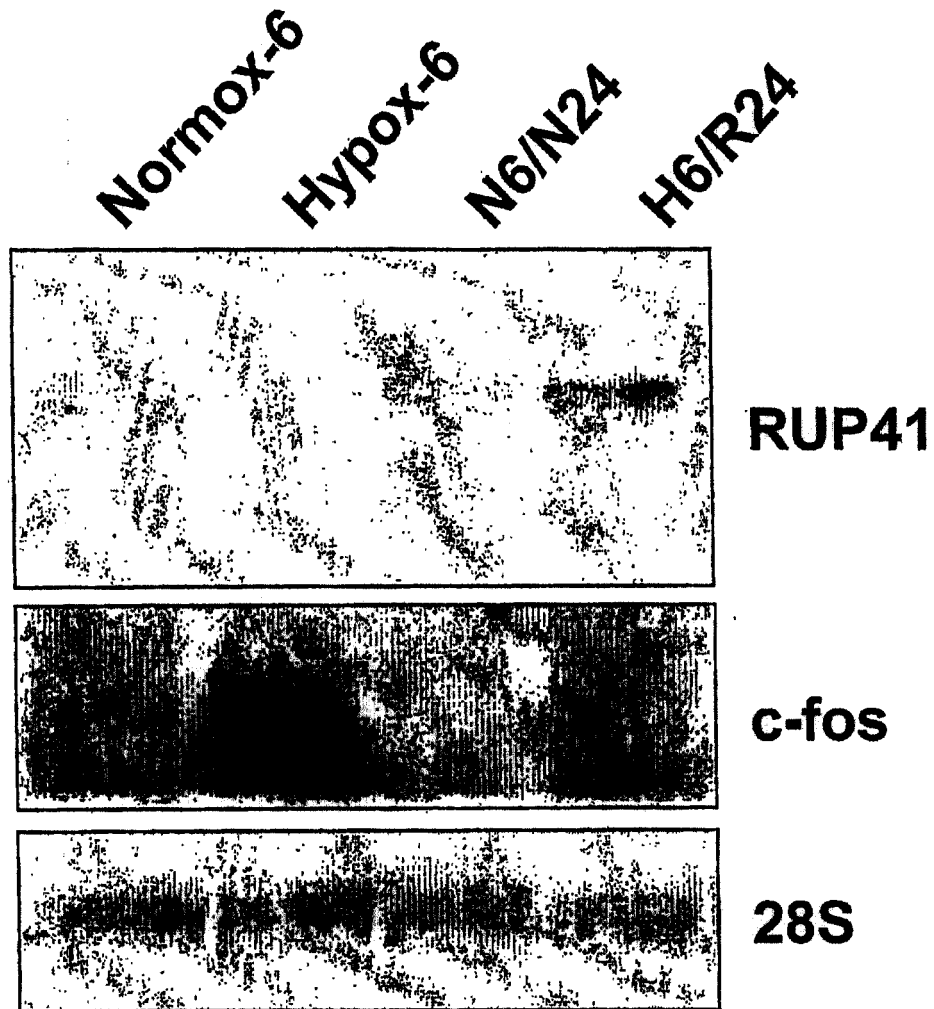
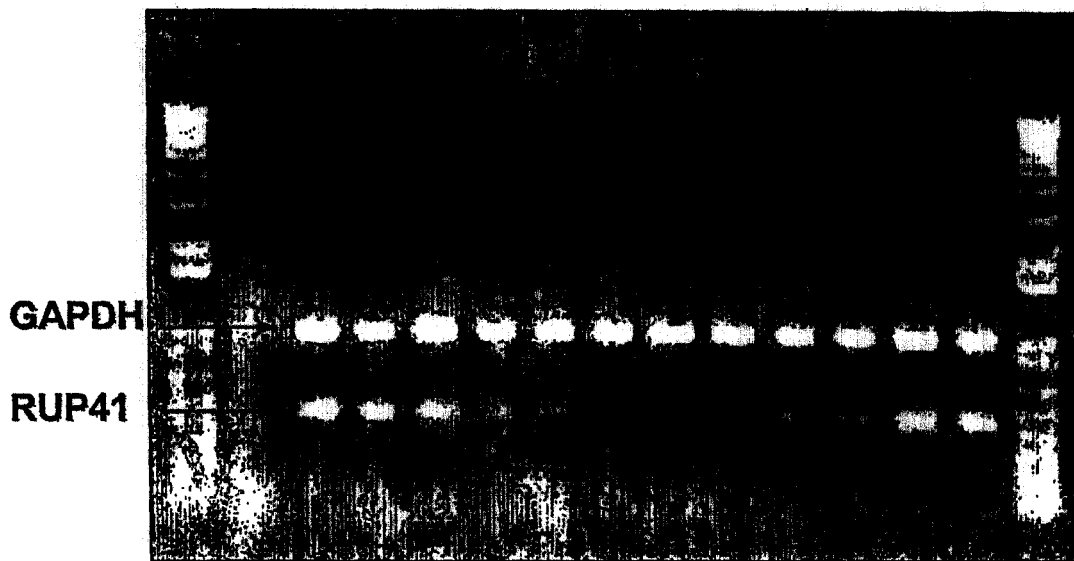


图 7

RUP41在遭受充血性心力衰竭的人体中的下调

A.



B.

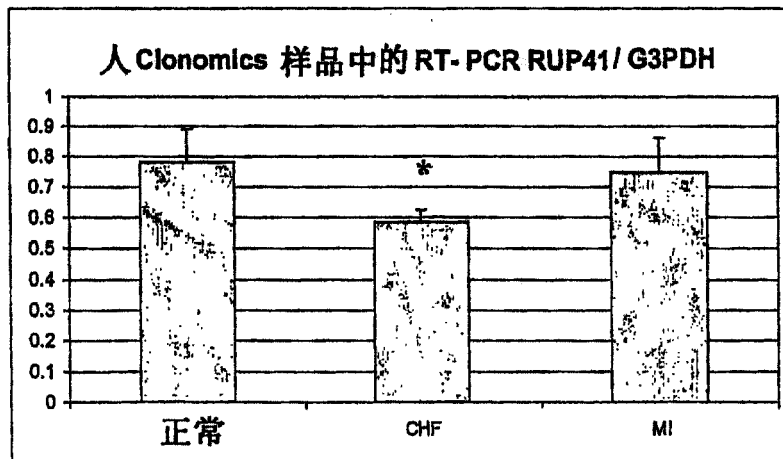
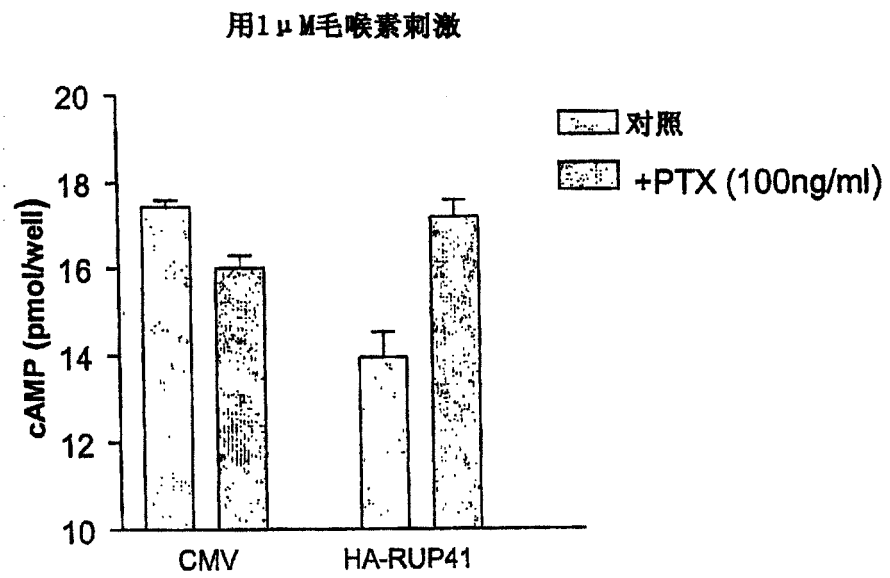
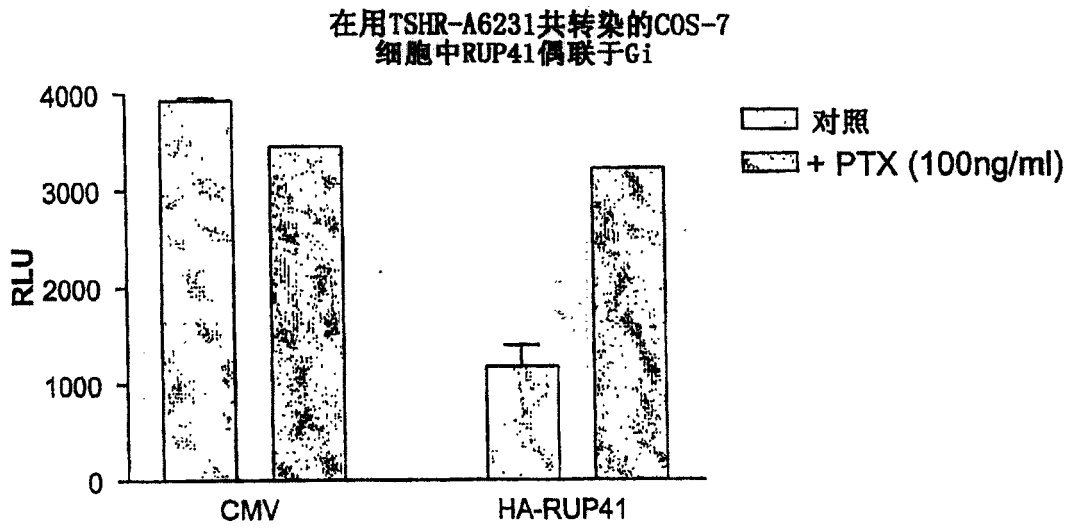


图 8



# 图 9

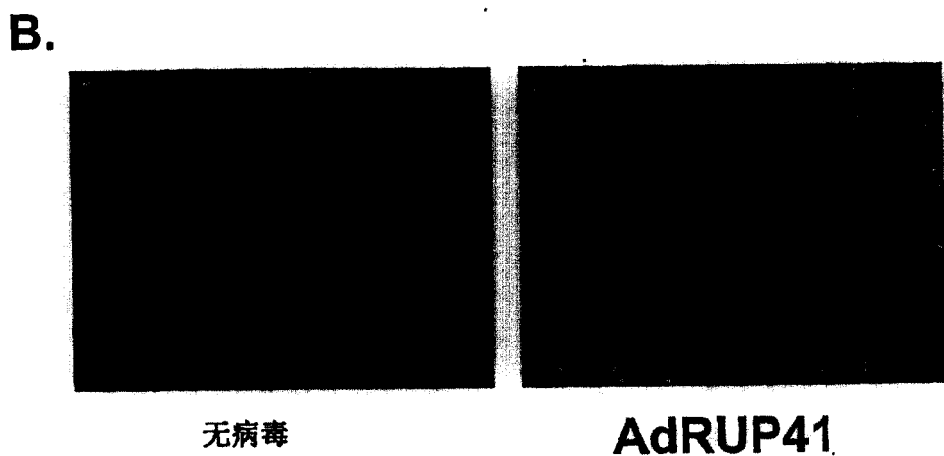
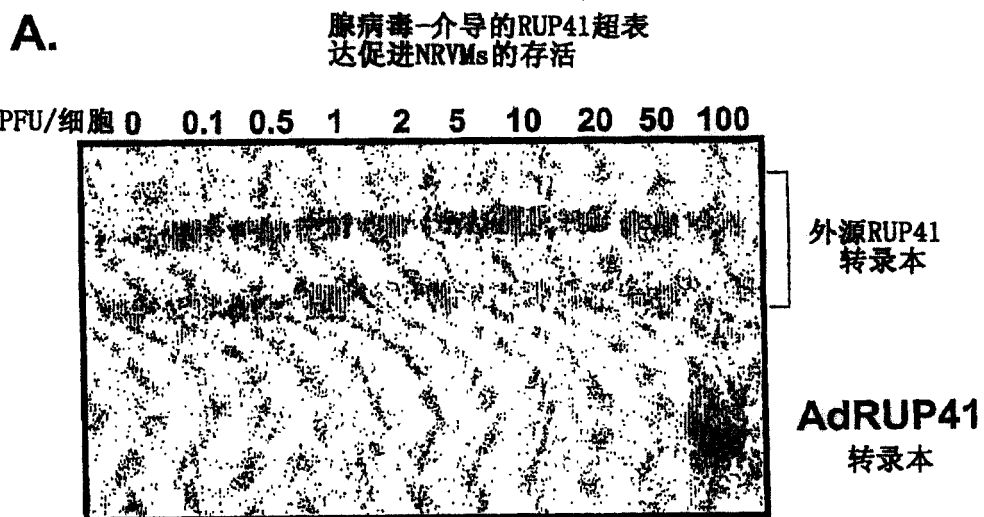
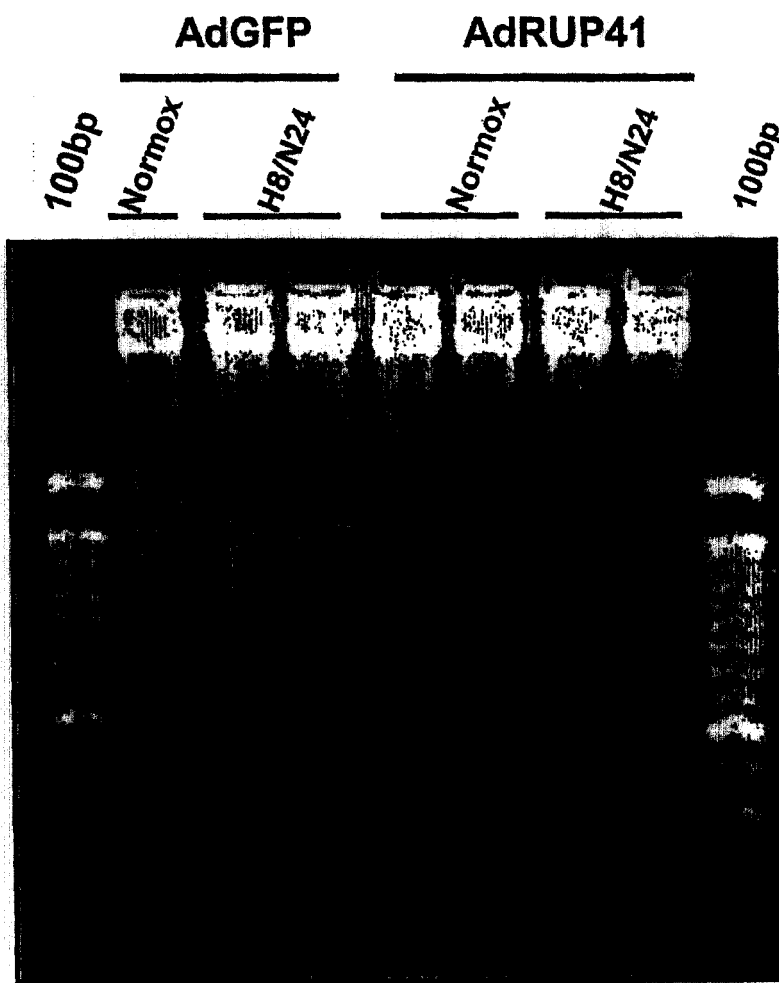


图 10

RUP41的超表达使NRVMs摆脱组  
织缺氧/复氧作用诱导的细胞凋亡



专利名称(译)	治疗缺血性心脏病及充血性心衰竭的人类G蛋白偶联受体及其调节物		
公开(公告)号	<a href="#">CN100473662C</a>	公开(公告)日	2009-04-01
申请号	CN03823488.2	申请日	2003-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	阿瑞那制药公司		
申请(专利权)人(译)	阿瑞那制药公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿瑞那制药公司		
[标]发明人	约翰W亚当姆斯 丹尼尔T康诺利		
发明人	约翰·W·亚当姆斯 丹尼尔·T·康诺利		
IPC分类号	C07K14/00 G01N33/53 A61K35/00 A61P9/00 A61P9/14 A01K67/027 A61K38/17 A61K45/00 A61K51/00 A61K51/08 A61P9/04 A61P9/10 A61P43/00 C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/14 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/567 G01N33/74		
CPC分类号	A01K2267/03 A61K51/08 G01N33/74 A01K2217/05 G01N2500/04 G01N2333/726 C07K14/705 A01K2217/075		
代理人(译)	杨青		
审查员(译)	杨振宇		
优先权	60/400774 2002-08-01 US		
其他公开文献	CN1684975A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)	gttatttctt caaaggaaa acacaatttt cttttatc aaaacaatgc aaacttgatg 60
本发明涉及鉴别候选化合物是否为孤儿G蛋白偶联受体(GPCR)调节物的方法。优选为人类GPCR。在一些实施方案中，GPCR由心肌细胞内源表达。在一些实施方案中，GPCR与Gi偶联并降低细胞内cAMP的含量。在一些实施方案中，GPCR的过量表达会促进心肌细胞的存活。在一些实施方案中，GPCR的过量表达可挽救心肌细胞免于缺氧/复氧诱导的细胞凋亡。在一些实施方案中，患有充血性心衰竭个体体内的GPCR被下调。本发明的激动剂可有效用作治疗包含心肌梗塞、心肌梗塞后重建，以及充血性心衰竭等缺血性心脏病的治疗剂。	gttcctaatt ctacatttct tattaatagt ttacaaactt aaaaattaa ctaagtacac 120 aattgaaaga ttttttttct ttacaagaa cacgttatac gtcattttaa ttgccaaata 180 tcaaatagtt tattctattt cactttctag ggaaaaaac caactgtcc aaaagaatgt 240 gtttttctcc catctggaa atcaacatgc agtctgaatc taacattaca gtgcgagatg 300 acattgatga catcaacacc aatagtacc aacctatc atatcgtta agctttcaag 360 tgtctctcac cggatttctt atgtagaaa ttgtgtggg acttggcagc aacctcactg 420 tattggtact ttactgcatg aaatccaact taatcaactc tgtcagtaac attattacaa 480 tgaattctca tgtacttgat gtaataattt gtgtgggatg tattcctcta actatagtta 540 tcctctgct ttactggag agtaacactg cctcatttg ctgtttccat gagcttgtg 600 tatctttgc aaggtctca acagcaatca acgtttttgc taccatttg gacagatag 660 acatctctgt aaaacctgca aaccgaattc tgacaatggg cagagctgta atgttaatga 720 tatocatttg gatttttctt tttttctctt tctgattcc ttttattgag gtaaatTTTT 780