



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102597780 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201080050386. 7

(22) 申请日 2010. 09. 21

(30) 优先权数据

0956477 2009. 09. 21 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 05. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2010/051968 2010. 09. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/033241 FR 2011. 03. 24

(73) 专利权人 奥佛涅 - 克莱蒙第一大学

地址 法国克莱蒙费朗

(72) 发明人 A · 爱斯查理尔 J · 布瑟罗勒斯

A · 阿罗伊 M · 拉兹顿斯基

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 7112403 B1, 2006. 09. 26, 摘要, 说明书第 1 栏第 39 行至第 2 栏第 32 行, 第 3 栏第 27-39, 56-62 行, 实施例, 权利要求 1-9, 图 1-5.

US 2006110792 A1, 2006. 05. 25, 全文.

US 2006013857 A1, 2006. 01. 19, 全文.

CN 1898378 A, 2007. 01. 17, 全文.

审查员 胡晓佳

权利要求书1页 说明书10页

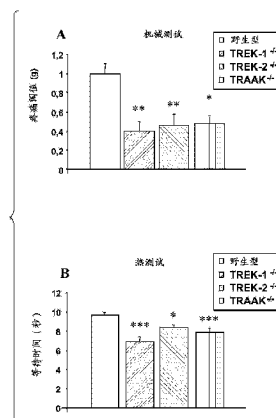
序列表6页 附图4页

(54) 发明名称

K2P 钾通道的激活剂作为止痛药的用途

(57) 摘要

本发明涉及疼痛的治疗和预防。更具体而言, 本发明证明了 K2P 钾通道参与吗啡的止痛效应。因此, 本发明提供了用于鉴定止痛药的筛选方法。



1. 用于鉴定没有致便秘和 / 或呼吸抑制效应的止痛化合物的筛选方法,所述方法包括下列步骤:

- a) 提供候选化合物;
- b) 确定所述候选化合物是否激活选自 TREK-1、TRAAK 和 TREK-2 的钾通道;
- c) 在体内在非人模型动物上测量所述候选化合物的止痛效应;
- d) 在体内在非人模型动物上测量所述化合物的致便秘和 / 或呼吸抑制效应。

2. 根据权利要求 1 的筛选方法,其中测量所述候选化合物的止痛效应包括仅测量激活所述钾通道的所述候选化合物的止痛效应。

3. 根据权利要求 1 的筛选方法,其中测量所述化合物的致便秘和 / 或呼吸抑制效应包括仅测量激活所述钾通道的所述化合物的致便秘和 / 或呼吸抑制效应。

4. 根据权利要求 2 的筛选方法,其中测量所述化合物的致便秘和 / 或呼吸抑制效应包括仅测量激活所述钾通道的所述化合物的致便秘和 / 或呼吸抑制效应。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的筛选方法,其还包括选择不具有致便秘和 / 或呼吸抑制效应的止痛化合物。

6. 用于鉴定没有致便秘和 / 或呼吸抑制效应的止痛化合物的筛选方法,所述方法包括下列步骤:

- a) 通过筛选候选化合物来鉴定选自 TREK-1、TRAAK 和 TREK-2 的钾通道的激活剂;
- b) 在体内在非人模型动物上测量所述激活剂的止痛效应;和
- c) 在体内在非人模型动物上测量所述激活剂的致便秘和 / 或呼吸抑制效应。

7. 根据权利要求 6 的筛选方法,其还包括选择不具有致便秘和 / 或呼吸抑制效应的止痛化合物。

8. 根据权利要求 1 至 4、6 和 7 中任一项的筛选方法,其中所述候选化合物为所述钾通道的天然配体、适体、肽或抗体。

9. 根据权利要求 1 至 4、6 和 7 中任一项的筛选方法,其中所述候选化合物为小的化学分子。

10. 根据权利要求 5 的筛选方法,其中所述候选化合物为所述钾通道的天然配体、适体、肽或抗体。

11. 根据权利要求 5 的筛选方法,其中所述候选化合物为小的化学分子。

K2P 钾通道的激活剂作为止痛药的用途

[0001] 本发明涉及疼痛的治疗和预防。更具体而言,本发明证明了 K2P 钾通道参与吗啡的止痛效应。因此,本发明提供了用于鉴定止痛药的筛选方法。

[0002] 可以将疼痛定义为与现有的或潜在的组织损伤相关的或在此类损伤方面所描述的、令人不快的、感觉和情感的体验。实际上,由患者所感觉到的疼痛的处置得自于产生疼痛的现象、个体接纳它的能力和处于认识它并治疗它的境地的专业人员的反应之间的相互作用。

[0003] 至少 50% 的住院的成人患者遭受疼痛(Durieux 等人,2001 Presse Med. 30:572-6)。手术后疼痛的强度可以是疼痛持续而超过该时期的风险因素(Basbaum 等人,1999 Curr Biol. 9:R429-31),并且其的有效控制与手术后并发症的减少相关联。顽固的慢性疼痛是生活质量重大改变、劳动能力丧失和残障的根源。它们导致大的护理消费以及许多的工作停止。在一项大的欧洲调查中,接受电话提问的对象中的五分之一声称遭受慢性疼痛,对于这些慢性疼痛,他们中的 85% 明确指出在最近六个月中咨询过医生至少一次。因此,在其每日的执业中,每个医生都面对此类患者,并且考虑到人口的老龄化,该数目还将增长。疼痛也是与癌症相关的最常见的症状。它涉及 30-50% 的各个阶段的癌症患者,和 65-90% 的晚期患者。受访的遭受慢性疼痛的患者中的很大部分指出他们正在接受药物止痛治疗。最常提及的处方药物是抗炎药和弱阿片样物质,而强阿片样物质以 5% 左右的频率被提及。关于非处方药物,所提及的药物是抗炎药和对乙酰氨基酚,以及在较小的程度上,弱阿片样物质,在可以无需处方就获得它们的国家中(Breivik 等人,2006 Eur J Pain. 10:287-333)。

[0004] 关于其“益处 / 风险”比根据患者(对于所述治疗的个体易感性、老年受试者、儿童等)而不总是有利于有益效应的药物,疼痛的药物处置依然是有问题的。治疗革新并不常见,并且在许多适应症中仍然首选使用旧产品。

[0005] 阿片样物质止痛药集合了吗啡以及该生物碱的所有半合成或合成的衍生物。在治疗由过量的强烈伤害感受造成的疼痛(尤其是手术后疼痛和癌症疼痛)中,吗啡依然是参考产品。阿片样物质具有止痛效应,但是也具有致精神病、呼吸抑制、催吐、心血管效应,对于平滑肌肉系统和对于免疫系统。与阿片样物质的使用相关的不希望的效应的特征在于:在超过一半的患者中的几乎系统性的便秘、恶心和呕吐,经常的镇静,需要监视的呼吸抑制的风险,和在老年受试者中的幻觉和精神错乱,其尽管罕见,但需要减少剂量。此外,致便秘效应是一个主要障碍,特别是在老年人中和在癌学中。

[0006] 吗啡通过激活阿片样物质受体而产生其效应,在所述阿片样物质受体中人们知道三种亚型(μ 、 δ 和 κ)。治疗(镇痛)效应和不希望的效应(例如,便秘和呼吸抑制)优先地牵涉 μ 受体的激活(Roy 等人,1998 Brain Res Mol Brain Res. 56:281-3)。因此,使这些效应瓦解的愿望使得必须在该受体的下游进行工作。尽管还不知道准确的作用机制,但吗啡与 μ 受体的结合引起 $G_{i/o}$ 蛋白的激活,腺苷酸环化酶的抑制,磷脂酶 C 的激活,和因此,电压依赖性钙通道的抑制以及钾通道的激活(Zuo,2005 Anesth. Analg. 101:728-34)。在钾通道之中,两种内向整流通道,即 GIRK 通道和依赖于 ATP 的通道(K_{ATP}),已被描述为部

分地参与吗啡的止痛效应 (Ocaña 等人, 2004 Eur J Pharmacol. 500 :203-19)。然而, 至今尚未描述其他钾通道 (例如 K2P 钾通道) 可能参与吗啡的止痛效应。

[0007] 为了缓解吗啡的不希望的效应, 制药工业目前开发出了, 要么对于 μ 受体没有作用的阿片样物质止痛药, 要么然而仅对抗致便秘效应而不对抗呼吸抑制效应的 μ 受体的外周拮抗剂。但是, 第一类有着具有比 μ 受体的激动剂更小的止痛效能的风险, 而第二类应当与阿片样物质一起共开处方。

[0008] 因此, 希望获得这样的止痛药, 其与吗啡一样有效, 但不具有致便秘和呼吸抑制效应, 这是分别在频率和严重性方面而言两种主要的不希望的效应。

[0009] 发明描述

[0010] 本发明首次证明了, K2P 钾通道, 更特别地 TREK-1 和 TRAAK 的 K2P 钾通道, 参与吗啡的止痛效应。因此, 编码 TREK-1 或 TRAAK 的基因的缺失导致抑制了阿片剂的止痛效应。此外, 编码 TREK-1 或 TRAAK 的基因的缺失并不减少吗啡的致便秘和 / 或呼吸抑制效应。因此, TREK-1 或 TRAAK 通道对于止痛作用来说是必需的, 但不参与这些不希望的效应。因此, 可以将 TREK/TRAAK 家族的 K2P 钾通道用作靶标以用于筛选具有更好的“益处 / 风险”比的与吗啡同样有效的新型止痛药。

[0011] 因此, 本发明提供了用于分离有效且良好耐受的新型止痛药的筛选方法, 并因此使得能够合成、验证、开发和配制如此选择出的止痛药。

[0012] K2P 钾通道作为靶标的用途

[0013] 由于 TREK-1 和 TRAAK 钾通道参与吗啡的止痛效应, 但不参与它的不希望的效应, 因而 TREK/TRAAK 家族的 K2P 钾通道在用于鉴定止痛化合物的筛选过程中作为靶标是有用的。如此鉴定出的止痛化合物的特征在于, 它们不具有致便秘和 / 或呼吸抑制效应。

[0014] 因此, 本发明涉及用于鉴定止痛化合物的筛选方法, 所述方法包括下列步骤:

[0015] a) 通过筛选候选化合物来鉴定 K2P 钾通道的激活剂;

[0016] b) 测量所述激活剂的止痛效应; 和任选地,

[0017] c) 测量所述激活剂的致便秘和 / 或呼吸抑制效应。

[0018] 根据本发明的方法可以包括选择不具有致便秘和 / 或呼吸抑制效应的止痛化合物的额外步骤。

[0019] 在本文中, “止痛化合物”是指能够减弱或消除疼痛的化合物。

[0020] 在本文中, “K2P 钾通道”是指 UniProt No. TC 1. A. 1. 8 家族 (也称为“二孔结构域钾通道家族”)。优选地, 根据本发明的 K2P 钾通道选自 TREK/TRAAK 家族的成员, 更特别地选自 TREK-1、TREK-2 和 TRAAK。

[0021] 在本文中, “TREK-1 通道”是指这样的 K2P 钾通道, 该 K2P 钾通道包含至少一个其序列显示在条目 Swiss-Prot No. 095069 (SEQ ID NO:1) 中或其序列衍生自该序列的亚基。优选地, TREK-1 通道是由两个亚基构成的通道, 所述亚基具有选自序列 SEQ ID NO:1 和其衍生序列的序列。例如, TREK-1 通道可以是由两个具有序列 SEQ ID NO:1 的亚基构成的同源二聚体通道。

[0022] 在本文中, “TREK-2 通道”是指这样的 K2P 钾通道, 该 K2P 钾通道包含至少一个其序列显示在条目 Swiss-Prot No. P57789 (SEQ ID NO:2) 中或其序列衍生自该序列的亚基。优选地, TREK-2 通道是由两个亚基构成的通道, 所述亚基具有选自序列 SEQ ID NO:2 和其

衍生序列的序列。例如, TREK-2 通道可以是由两个具有序列 SEQ ID NO:2 的亚基构成的同源二聚体通道。

[0023] 在本文中,“TRAAK 通道”是指这样的 K2P 钾通道,该 K2P 钾通道包含至少一个其序列显示在条目 Swiss-Prot No. Q9NYG8(SEQ ID NO:3)中或其序列衍生自该序列的亚基。优选地,TRAAK 通道是由两个亚基构成的通道,所述亚基具有选自序列 SEQ ID NO:3 和其衍生序列的序列。例如, TRAAK 通道可以是由两个具有序列 SEQ ID NO:3 的亚基构成的同源二聚体通道。

[0024] “衍生序列”尤其包括剪接变体、等位基因变体和在非人哺乳动物物种中的同源序列。衍生序列尤其包括与序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 之一至少 50、60、70、80、85、90、95 或 99% 同一的序列。

[0025] “与参考序列至少 95% (例如) 同一的氨基酸序列”是指与参考序列相同的序列,除了对于参考序列的每个具有一百个氨基酸的部分来说,该序列可以包含至多五个突变(置换、缺失和 / 或插入) 之外。因此,对于长度为 100 个氨基酸的参考序列来说,95 个氨基酸的片段和相对于参考序列而言包含 5 个置换的 100 个氨基酸的序列是与参考序列 95% 同一的序列的两个实例。同一性百分比通常通过使用序列分析软件来确定。将待比较的氨基酸序列进行比对,以获得同一性程度的最大值。为此,可能需要在序列中人工引入间隔(“缺口”)。一旦实现了最佳比对,就通过记录相对于位置总数而言的所有这样的位置(对于所述位置来说,两个所比较的序列的氨基酸是相同的) 来建立同一性程度。例如可以使用程序“needle”,其借助于“Needleman-Wunsch”总体比对算法来找到两个序列在整个其长度上的最佳比对(具有缺口)。该程序尤其可在网站 ebi.ac.uk 上得到。

[0026] 衍生序列可以通过一个或多个氨基酸的置换、缺失和 / 或插入而不同于参考序列,并且这在这样的位置处,从而这些修饰不显著地损害所述肽的生物学活性。所述置换尤其可以相应于保守置换。

[0027] 在一个特别的实施方案中,衍生物的序列仅通过保守置换的存在而不同于序列 SEQ ID NO:1、2 或 3。所述保守置换是相同类别的氨基酸的置换,例如具有不带电荷的侧链的氨基酸(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、半胱氨酸和酪氨酸)、具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸和谷氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸) 的置换。

[0028] 在本文中,“K2P 钾通道的激活剂”是指能够增加 K2P 钾通道的生物学活性的化合物。与吗啡相反,根据本发明的激活剂的效应不在于激活阿片样物质受体。因此,它们没有致便秘和 / 或呼吸抑制效应。优选地,所述激活剂直接作用于 K2P 钾通道,即它们与所述通道直接相互作用。所述激活剂还可以通过信号传导级联来激活 K2P 钾通道。在该第二种情况下,所述激活剂必须在阿片样物质受体的下游起作用,即它们调节位于 K2P 钾通道上游但位于阿片样物质受体下游的该级联的组分的活性。K2P 钾通道的激活剂在阿片样物质受体的下游起作用这一事实可以通过比较在阿片样物质受体的抑制剂(例如,纳洛酮) 存在和不存在下 K2P 钾通道的活性来容易地进行测试。K2P 钾通道的活性在阿片样物质受体的抑制剂存在和不存在下是相同的这一事实表明,所述激活剂在阿片样物质受体的下游起作用。

[0029] 用于确定化合物是否能够增加 K2P 钾通道的生物学活性的方法是本领域技术人员熟知的。

[0030] 例如,可能的是,通过使用由 Alloui 等人(EMBO J. 200625:2368-76)所描述的方法来鉴定 TREK-1 通道的激活剂。这样的方法可以例如包括下列步骤:

[0031] - 提供表达 TREK-1 通道的细胞(例如, DRG 神经元);

[0032] - 测量在候选化合物不存在下的电流;和

[0033] - 测量在候选化合物存在下的电流;

[0034] 其中在候选化合物存在下的电流增加表明,所述候选化合物是 TREK-1 通道的激活剂。所述电流例如可以通过诸如花生四烯酸的化合物或者通过细胞内酸化来诱导。更特别地,当于在 Alloui 等人(EMBO J. 200625:2368-76)中所描述的条件下,通过称为“在完整细胞条件下的膜片钳”的技术来评价电流强度时, TREK-1 通道的激活剂能够引起来自野生型小鼠的背根神经节神经元的电流强度的增加。

[0035] 也可能的是,通过使用由 Duprat 等人(Mol. Pharmacol. 2000, 57:906-912)所描述的方法来鉴定 TREK-1 通道的激活剂。在该方法中,用编码 TREK-1 的基因转染异源表达系统(例如, COS 细胞),然后通过称为“在完整细胞条件下的膜片钳”的技术来测量电流。

[0036] 在 Alloui 等人(EMBO J. 200625:2368-76)中和在 Duprat 等人(Mol. Pharmacol. 2000, 57:906-912)中所描述的方法也可应用于除了 TREK-1 之外的其他 K2P 钾通道的研究,通过用对于所希望研究的通道(例如, TREK-2 或 TRAAK)来说无效的动物代替对于 TREK-1 来说无效的动物来进行。

[0037] 备选地,该筛选方法可以通过使用适于筛选钾通道的调节剂的高通量筛选平台来实施(Falconer 等人, 2002 J Biomol Screen. 7:460-5; Ford 等人, 2002 Prog Drug Res. 58:133-68)。

[0038] 如此鉴定出的止痛化合物的特征在于,它们不具有致便秘和/或呼吸抑制效应。此外,它们还可以没有其他不希望的效应。

[0039] 在本文中,具有“止痛效应”的化合物是指能够减弱或消除疼痛的化合物。化合物的止痛效应可以通过本领域技术人员熟知的任何方法来测量,例如通过 von Frey 机械敏感性测试或者通过将尾巴浸没在热水中的热测试(参见实施例 1 和 2)。

[0040] 在本文中,具有“致便秘效应”的化合物是指能够减少排粪的化合物。化合物的致便秘效应可以通过本领域技术人员熟知的任何方法来测量,例如通过使用收集粪便的总体方法(参见实施例 1 和 4)。

[0041] 在本文中,具有“呼吸抑制效应”的化合物是指能够减少呼吸频率的化合物。化合物的呼吸抑制效应可以通过本领域技术人员熟知的任何方法来测量,例如通过借助于气压体积描计器来测量呼吸频率(参见实施例 1 和 5)。

[0042] “没有致便秘和/或呼吸抑制效应”的化合物是指这样的化合物,在所述化合物存在下排粪和/或呼吸频率大于或等于在所述化合物不存在下所观察到的值的 70%、80%、90% 或 95%。优选地,在所述化合物存在下,排粪和/或呼吸频率不以统计学上显著的方式减少。由于致便秘和/或呼吸抑制效应是剂量依赖性的,因而优选地,在相对于吗啡产生止痛效应所处的剂量而言等镇痛的剂量处,来评价止痛化合物的致便秘和/或呼吸抑制效应的缺乏。

[0043] 在这些筛选方法的情形下, 候选化合物可以例如相应于 K2P 钾通道的天然配体、化学分子、适体、肽和抗体。在一个优选的实施方案中, 候选化合物为小的化学分子(“小分子”)。

[0044] 在一个特别的实施方案中, 本发明旨在用于鉴定止痛化合物的筛选方法, 其包括下列步骤:

[0045] a) 提供候选化合物;

[0046] b) 确定所述候选化合物是否激活 K2P 钾通道;

[0047] 其中所述候选化合物激活所述 K2P 钾通道的确定表明所述候选化合物是止痛化合物。

[0048] 该方法还可以包括测量激活所述 K2P 钾通道的所述候选化合物的止痛效应的步骤, 和 / 或测量激活所述 K2P 钾通道的所述化合物的致便秘和 / 或呼吸抑制效应的步骤。

[0049] 根据本发明的方法可以包括选择不具有致便秘和 / 或呼吸抑制效应的止痛化合物的额外步骤。

[0050] K2P 钾通道作为靶标以用于在候选化合物的筛选过程中鉴定止痛化合物的用途是本发明的另一个目标。更确切地, 这样的用途旨在鉴定 K2P 钾通道的激活剂, 其具有止痛效应。

[0051] 根据本发明的筛选方法可以在体外或在体内施行。当这些方法牵涉在模型动物(例如, 大鼠或小鼠)上的实验时, 在这些方法结束时处死这些动物。因此, 这些方法可以包括处死可能已经使用了的模型动物的额外步骤。

[0052] K2P 钾通道的激活剂的治疗用途

[0053] 既然已知 TREK-1 和 TRAAK 通道的无效导致吗啡的止痛效应降低而不影响不希望的效应(例如, 致便秘和 / 或呼吸抑制效应), 因而 TREK-1 和 TRAAK 通道的激活剂是没有吗啡的这些不希望的效应的止痛药。因此, 本发明涉及用于在疼痛的治疗或预防中使用的 TREK/TRAAK 家族的 K2P 钾通道的激活剂。此类激活剂对于治疗或预防疼痛来说是特别有利的, 因为它们没有致便秘和 / 或呼吸抑制效应。

[0054] 疼痛可以具有各种不同的性质。它可以是急性的或慢性的。它可以例如为手术后疼痛、与痛觉过敏发作相关的疼痛、与癌症相关的疼痛、骨关节疼痛、内脏疼痛或神经病性疼痛, 所述疼痛出现在生命的任何时期。在一个优选的实施方案中, 它为慢性疼痛, 和更特别地, 慢性疼痛综合征例如纤维肌痛、易激惹性肠或无实体的疼痛。在另一个优选的实施方案中, 它为与癌症有关或无关的肠的、胃的或肺的疼痛, 例如与结肠直肠癌相关、与结肠癌相关、与胃癌相关、与溃疡性结肠炎相关、与慢性炎症性肠病(用缩写“MICI”或“IBD”来称呼)相关、与易激惹性肠相关、与肺癌相关或与哮喘相关的疼痛。

[0055] 可以在任何阶段治疗疼痛。“治疗”是指治疗性的处理(其旨在至少减轻、抑制或阻止疼痛)。“预防”是指预防性的处理(其旨在降低疼痛出现的风险)。

[0056] 所述激活剂可以例如相应于 K2P 钾通道的天然配体、化学分子、适体、肽或抗体。

[0057] 根据本发明的激活剂可以例如相应于本领域已知的 K2P 钾通道的激活剂。如此, TREK/TRAAK 家族的通道被拥有大的极性头的溶血磷脂(溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰肌醇)和多不饱和脂肪酸(亚麻酸、花生四烯酸)可逆地打开(Fink 等人, 1998 EMBO J. 17:3297-308)。咖啡酸的酯, 尤其是 1-3, 4-二羟基- α -氰基肉桂酸肉桂酯(CDC)

和咖啡酸乙氧苯酯(CAPE),增加牛肾上腺束细胞上的 TREK-1 电流(Danthi 等人,2004 Mol Pharmacol. 65:599-610)。最后,芬那酸类(例如,氟芬那酸、尼氟酸和甲芬那酸)在异源表达系统中激活 TREK-1、TREK-2 和 TRAAK 通道(Takahira 等人,2005 Pflugers Arch. 451:474-8)。上面具体提及的化合物是根据本发明的激活剂的实例。

[0058] 因此,根据本发明的激活剂可以例如选自溶血磷脂、多不饱和脂肪酸、咖啡酸的酯或芬那酸。

[0059] 备选地,可以通过在上文中在标题为“K2P 钾通道作为靶标的用途”的那一节中所描述的筛选方法来分离 K2P 钾通道的激活剂。

[0060] 本发明还涉及制造包含 K2P 钾通道的激活剂的药物的方法,所述方法包括下列步骤:

[0061] a) 产生所述药物;

[0062] b) 测量所述药物的止痛效应;和任选地,

[0063] c) 测量所述药物的致便秘和/或呼吸抑制效应。

[0064] 使得能够测试不同生产批次的品质的这样的制造方法,在药物的工业生产过程中是有用的。更特别地,该方法使得能够验证,给定批次的包含 K2P 钾通道的激活剂的药物具有止痛效应,并且不具有致便秘和/或呼吸抑制效应。在步骤(a)中,所述药物可以通过本领域技术人员已知的任何方法来产生。通常,此类药物的产生包括合成 K2P 钾通道的激活剂,随后将其配制成药物产品。

[0065] 根据本发明的药物可以用于通过任何合适的途径(例如,口服、舌下、鼻、颊、透皮、静脉内、皮下、肌内和/或直肠途径)进行施用。在药物中,活性成分(即根据本发明的激活剂)与药学上可接受的载体(即任何溶剂、分散介质、吸收延迟剂等,其在人或动物中不产生副反应,例如变应反应)相组合。所述药学上可接受的载体是本领域技术人员熟知,并且包括在“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Publishing Company, Easton, USA, 1985)中所描述的那些。

[0066] 本发明还涉及疼痛的治疗或预防方法,所述方法包括向有此需要的个体施用治疗有效量的 K2P 钾通道的激活剂。所述个体优选地是哺乳动物,更特别地是人。有效治疗剂量可以容易地由本领域技术人员来确定。

[0067] 本发明还涉及 K2P 钾通道的激活剂在制备用于治疗或预防疼痛的药物中的用途。

[0068] 下面的实施例和附图举例说明了本发明,而不限本发明的范围。

[0069] 附图描述

[0070] 图1:在基础状态下,基因敲除动物(KO)显示出对于 von Frey 机械测试(A)和对于热测试(B)的超敏感性,相对于野生型动物(WT)而言(WT 对 KO;Student-t 检验:*, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$, $n=8/15$, 每组)。

[0071] 图2:在野生型和 TREK-1^{-/-}动物中,在 von Frey 机械测试(A)或者尾巴浸没在 46°C 的水中的热测试(B)之中吗啡的剂量效应。将结果表达为相对于用载体进行处理的相同基因型的小鼠的值而言伤害感受阈值的变化。无论使用何种测试,统计学分析均总体显示了吗啡的剂量效应($F=153.3$, $P<0.001$; $F=17.5$, $P<0.001$)和基因型效应($F=143.2$, $P<0.001$; $F=14.2$, $P<0.001$)。相对于野生型动物而言,在 TREK-1^{-/-}小鼠中吗啡的止痛效应减小了(双向 Anova, post hoc Student Newman Keuls; ***, $P<0.001$, $n=6/9$, 每剂量和每基

因型)。

[0072] 图3:(A)在野生型和 TREK-1^{-/-} 动物中,在注射载体或吗啡(1;3;或 5mg/kg, s. c.) 后两小时内积累的粪便的量。统计学分析总体显示了吗啡的剂量效应(P<0.001),但未显示基因型效应(n=5/6,每剂量和基因型)。(B)在野生型和 TREK-1^{-/-} 动物中,由剂量渐增的吗啡(5;10;20 或 50mg/kg, s. c.) 所引起的呼吸抑制。统计学分析总体显示了吗啡的剂量效应(P<0.001),但未显示基因型效应(n=6/8,每剂量和基因型)。

[0073] 图4:在野生型和 TRAAK^{-/-} 动物中,在 von Frey 机械测试(A)或尾巴浸没在 46℃ 的水中的热测试(B)之中吗啡(5mg/kg, s. c.) 的抗伤害感受效应。将结果表达为相对于用载体进行处理的相同基因型的小鼠的值而言伤害感受阈值的变化。无论使用何种测试,统计学分析均显示,相对于野生型动物而言,在 TRAAK^{-/-} 小鼠中吗啡的止痛效应减小了(Student-t 检验:***, P<0.001, n=12/14, 每组)。(C)在野生型和 TRAAK^{-/-} 动物(n=6,每剂量和基因型)中,在注射载体或吗啡(5mg/kg, s. c.) 后两小时内积累的粪便的量。

[0074] 序列表的序列的描述

[0075] SEQ ID NO:1 相应于 TREK-1 通道的亚基的序列。

[0076] SEQ ID NO:2 相应于 TREK-2 通道的亚基的序列。

[0077] SEQ ID NO:3 相应于 TRAAK 通道的亚基的序列。

实施例

[0078] 实施例 1:实验方案

[0079] 动物

[0080] 将重量为 20 至 30 克的 C57Bl/6J (Charles River Lab, France)、TREK-1^{-/-}、TREK-2^{-/-} 和 TRAAK^{-/-} (IPMC, Nice Sophia Antipolis) 雄性小鼠置于具有可随意获得的食物和水的笼子中,在具有 12 小时/12 小时的昼/夜周期并且温度调节至 22℃ 的环境中。关于 KO 动物的产生的细节先前已经作了描述(Heurteaux 等人, 2004 EMBO J. 23:2684-95; Guyon 等人, 2009 J. Neurosci. 29:2528-33)。实验由相同的实验者在安静的小屋中以盲法来进行,同时注意遵守关于动物实验的规章要求。

[0081] 分子

[0082] 使用了下述分子:盐酸吗啡(Cooper, Melun, France)、盐酸纳洛酮(Sigma Chemical Co., St Louis, MO)。在 NaCl (0.9%) 中即时制备溶液。在注射吗啡或载体前 15 分钟施用纳洛酮(1mg/kg, s. c.)。

[0083] 伤害感受的测试

[0084] 所使用的测试包括使用热刺激的测试(将尾巴浸没在 46℃ 的热水中的测试)和使用机械刺激的测试(对于 von Frey 纤维测试的机械敏感性)。热敏感性通过将尾巴浸没在处于 46℃ 的伤害感受温度的水中的测试来测量(Janssen 等人, 1963 Arzneimittelforschung. 13:502-7)。用手抓住动物,并将尾巴浸没在水浴中直至动物缩回尾巴或者直至设置为 30 秒的“截止”。通过相差不超过一秒的两个最初等待时间的平均值来定义基础阈值(预处理)。在实验开始前一周期期间,使动物习惯于所述固定。机械敏感性通过在动物的爪下应用力量渐增(0.01 至 2g)的 Von Frey 纤维(Bioseb)来测量(Tal 和 Bennett, 1994 Pain. 57:375-82)。在该测试前 20 分钟,将动物置于箱子(85x 35mm, 小鼠

之间有不透明的分隔,底部安装有铁栅栏以用于达到足弓)中,以使其习惯。将纤丝垂直地紧压在小鼠的右后爪下直至它们弯曲。重复该操作五次,然后在没有获得任何反应的情况下转至下一根纤丝。当所施加的压力相应于动物的触觉敏感性阈值时,动物具有与反射跳(battement réflexe)等价的缩回爪的反应。那么就将该纤丝的压力值保留作为阈值。

[0085] 肠通过(transit intestinal)

[0086] 通过使用在注射吗啡或载体(NaCl 0.9%)后2小时期间动态地收集粪便的总体方法来进行肠通过的评价。在该测试前20分钟,将动物置于箱子(85x35mm,小鼠之间有不透明的分隔,底部安装有铁栅栏以用于收集粪便)中,以便习惯。在注射吗啡或载体后2小时期间每一小时收集粪便,并且在收集后立即称量。

[0087] 呼吸频率的测量

[0088] 通过使用包括允许对数只动物进行平行测量的8个隔间的气压体积描计器(Emka Technologies, VA, USA),以非侵入性方式来测量呼吸频率(Drorbaugh 和 Fenn, 1955 Pediatrics. 16:81-7;Matthes 等人,1998 J Neurosci. 18:7285-95)。使用软件 IOX(Emka Technologies, VA, USA)来计算呼吸频率。施用每个剂量的吗啡或载体,并且在四只野生型小鼠和四只 TREK-1^{-/-}小鼠中平行地评价它们对于呼吸频率的效应。在注射前15分钟期间,使动物习惯于所述隔间。在该15分钟的时间段期间的呼吸频率的分析揭示了稳定的呼吸频率。因此,使用在该时间段期间的呼吸频率的平均值来使吗啡或载体对于在测试时间段(90分钟)期间的呼吸频率的效应标准化。

[0089] 统计学分析

[0090] 实验数据通过使用软件 Sigma STAT(用于 Windows 的 3.0 版本)(STAT32 Software Inc., San Diego, California)来进行分析。

[0091] 实施例2:TREK-1、TREK-2 和 TRAAK 通道在伤害感受生理学中的作用

[0092] 无论使用何种测试(von Frey 机械敏感性测试(图 1A)或尾巴浸没在 46℃的热水中的热测试(图 1B)),均显示 TREK-1^{-/-}或 TRAAK^{-/-}动物具有比野生型动物显著更低的疼痛阈值。还显示, TREK-2^{-/-}动物的疼痛阈值显著低于野生型动物的疼痛阈值(图 1A 和 1B)。

[0093] 实施例3:TREK-1 通道在吗啡的止痛作用中的作用

[0094] 由于在注射吗啡或载体前, TREK-1^{-/-}动物具有比野生型动物的疼痛阈值显著更低的疼痛阈值(图 1A 和 1B),因此对于每只动物,计算了注射前和注射后的值之间的差异,然后进行比较。

[0095] 使用双向 Anova 来进行的数据的统计学分析显示了吗啡(F=153.3;p<0.001;F=17.5;p<0.001)和基因型(F=143.2;p<0.001;F=14.2;p<0.001)的主要效应,分别关于热测试和机械测试。此外,尽管在所述两种基因型中吗啡均增加了在 46℃的热水中缩回尾巴的等待时间和机械疼痛阈值,但吗啡的这些止痛效应在 TREK-1^{-/-}动物中相对于野生型动物而言非常显著地减少了(图 2A 和 2B)。

[0096] 总之,这证明, TREK-1 通道参与吗啡的止痛效应。

[0097] 实施例4:TREK-1 通道的缺失对于由吗啡所引起的便秘的影响

[0098] 阿片样物质受体是在由吗啡所引起的对于胃肠通过的抑制之中的关键角色(Reisine 和 Pasternak,1996, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 编者:Hardman JG, Gilman AG 和 Limbird, 第 521-555 页)。

[0099] 因此,研究了吗啡对于 TREK-1^{-/-}动物的通过的影响,以便评价缺失对于该不希望的效应的影响。吗啡对于胃肠功能的效应通过测量在注射吗啡或载体后 2 小时期间每一小时所收集的粪便的产生来进行评价。为了确保所述两种基因型在其食物和水的消耗方面没有差异,对每只动物(笼子包含 3 至 5 只动物)测量该消耗并标准化,并且对于 3 个笼子/基因型将数据求平均值。

[0100] 在不存在用吗啡进行处理的情况下,没有观察到任何差异(食物的消耗:野生型动物,3.17±0.23;TREK-1^{-/-},3.21±0.14g/动物/24 小时;水的消耗:野生型动物,3.69±0.41;TREK-1^{-/-},4.03±0.05mL/动物/24 小时)。用载体进行的处理在所述两种基因型中给出了相同的粪便产生特性谱,这暗示所述两种基因型在正常条件下在其胃肠功能方面没有差异。相对于用载体进行的处理而言,在受试时间段期间在所述两种基因型中吗啡引起相当的排粪减少(图 3A)。

[0101] 该实验证明,TREK-1 通道不参与吗啡的致便秘效应。

[0102] 实施例 5:TREK-1 通道的缺失对于由吗啡所引起的呼吸抑制的影响

[0103] 在吗啡的不希望的效应之中,最有害的当然是呼吸抑制,其在过量的情况下可以导致死亡。由吗啡所引起的呼吸抑制还通过阿片样物质受体的激活而发生(Santiago 和 Edelman,1985 J Appl Physiol. 59:1675-85;Reisine 和 Pasternak,1996, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 编者:Hardman JG, Gilman AG 和 Limbird, 第 521-555 页),此外,其编码 μ 受体的基因已被无效的小鼠受到保护而免于该不希望的效应(Matthes 等人,1998 J Neurosci. 18:7285-95;Dahan 等人,2001 Anesthesiology. 94:824-32;Romberg 等人,2003 Br J Anaesth. 91:862-70)。为了确定由吗啡所引起的呼吸抑制是否通过编码 TREK-1 通道的基因的缺失而被改变,在注射吗啡或载体后通过使用气压体积描计器测量了野生型动物和 TREK-1^{-/-}动物的呼吸频率。

[0104] 基础呼吸频率在所述两种基因型中没有差别。此外,无论何种基因型,5mg/kg 的剂量的载体或吗啡均不影响呼吸频率。相反地,无论何种基因型,施用 10、20 和 50mg/kg 的剂量的吗啡均导致剂量依赖性的呼吸频率减少,这在所述基因型之间没有差别(图 3B)。

[0105] 编码 TREK-1 的基因的缺失没有降低吗啡的呼吸抑制效应。因此,TREK-1 通道与该不希望的效应无关。

[0106] 实施例 5:TRAAK 通道在吗啡的止痛作用和致便秘效应中的作用

[0107] 为了测试 TRAAK 通道参与吗啡的止痛作用这一假设,使用了野生型小鼠和对于 TRAAK 通道来说的基因敲除小鼠(TRAAK^{-/-}),并且测量了通过皮下途径注射的剂量为 5mg/kg 的吗啡的效应。

[0108] 无论使用何种测试(von Frey 机械敏感性测试或尾巴浸没在 46℃ 的热水中的热测试),均发现在注射吗啡或载体前,TRAAK^{-/-}动物具有比野生型动物的疼痛阈值显著更低的疼痛阈值(图 1A 和 1B)。

[0109] 然后,测量了在注射吗啡或载体后的值,并且对于每只动物计算了注射前和注射后的值之间的差异。使用 Student-t 检验来进行的数据的统计学分析显示,吗啡的止痛效应在 TRAAK^{-/-}动物中相对于野生型动物而言显著地减少了(图 4A 和 4B)。

[0110] 该结果显示,TRAAK 通道也参与吗啡的止痛效应。

[0111] 还研究了在 TRAAK^{-/-}动物中由吗啡所引起的便秘。吗啡对于胃肠功能的效应通过

测量在注射吗啡或载体后 2 小时期间每一小时所收集的粪便的产生来进行评价。为了确保所述两种基因型在其食物和水的消耗方面没有差异,对每只动物(笼子包含 3 至 5 只动物)测量该消耗并标准化,并且对于 3 个笼子 / 基因型将数据求平均值。

[0112] 在不存在用吗啡进行处理的情况下,没有观察到任何差异(食物的消耗:野生型动物, 3.17 ± 0.23 ; TRAAK^{-/-}, 3.58 ± 0.52 g/ 动物 /24 小时;水的消耗:野生型动物, 3.69 ± 0.41 ; TRAAK^{-/-}, 4.25 ± 0.48 mL/ 动物 /24 小时)。用载体进行的处理在所述两种基因型中给出了相同的粪便产生特性谱,这暗示所述两种基因型在正常条件下在其胃肠功能方面没有差异。相对于用载体进行的处理而言,在受试时间段期间在所述两种基因型中吗啡引起相当的排粪减少(图 4C)。

[0113] 该结果证明, TRAAK 通道不参与吗啡的致便秘效应。

[0001]

序列表

<110> UNIVERSITE D' AUVERGNE CLERMONT I
 <120> K2P钾通道的激活剂作为止痛药的用途
 <130> BFF 09A0386
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> 智人

 <220>
 <221> VARSPLIC
 <222> (1).. (16)
 <223> MIPASASRERPGYRAGV -> MMNPRAKRDFYL (在同种型3中)

 <220>
 <221> VARSPLIC
 <222> (2).. (16)
 <223> 缺少 (在同种型2中)

 <400> 1
 Met Leu Pro Ser Ala Ser Arg Glu Arg Pro Gly Tyr Arg Ala Gly Val
 1 5 10 15

 Ala Ala Pro Asp Leu Leu Asp Pro Lys Ser Ala Ala Gln Asn Ser Lys
 20 25 30

 Pro Arg Leu Ser Phe Ser Thr Lys Pro Thr Val Leu Ala Ser Arg Val
 35 40 45

 Glu Ser Asp Thr Thr Ile Asn Val Met Lys Trp Lys Thr Val Ser Thr
 50 55 60

 Ile Phe Leu Val Val Val Leu Tyr Leu Ile Ile Gly Ala Thr Val Phe
 65 70 75 80

 Lys Ala Leu Glu Gln Pro His Glu Ile Ser Gln Arg Thr Thr Ile Val
 85 90 95

 Ile Gln Lys Gln Thr Phe Ile Ser Gln His Ser Cys Val Asn Ser Thr
 100 105 110

 Glu Leu Asp Glu Leu Ile Gln Gln Ile Val Ala Ala Ile Asn Ala Gly
 115 120 125

 Ile Ile Pro Leu Gly Asn Thr Ser Asn Gln Ile Ser His Trp Asp Leu
 130 135 140

 Gly Ser Ser Phe Phe Phe Ala Gly Thr Val Ile Thr Thr Ile Gly Phe
 145 150 155 160

 Gly Asn Ile Ser Pro Arg Thr Glu Gly Gly Lys Ile Phe Cys Ile Ile
 165 170 175

 Tyr Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Phe Gly Phe Leu Leu Ala Gly Val
 180 185 190

[0002]

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

<210> 2
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> VARSPLIC
 <222> (1)..(12)
 <223> MFPLYTDFFLSL -> MKGDRTEGCRSDS (在同种型B中)

<220>
 <221> VARSPLIC
 <222> (1)..(12)

[0003]

<223> MFFLYIDFFLSL -> MKFPIETPRKQVNWDPK (在同种型C中)

<220>

<221> VARIANT

<222> (512)...(512)

<223> A 至 T 置换

<400> 2

```

Met Phe Phe Leu Tyr Thr Asp Phe Phe Leu Ser Leu Val Ala Val Pro
1           5           10           15

Ala Ala Ala Pro Val Cys Gln Pro Lys Ser Ala Thr Asn Gly Gln Pro
                20           25           30

Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Pro Arg Leu Ser Ile Ser Ser Arg
          35           40           45

Ala Thr Val Val Ala Arg Met Glu Gly Thr Ser Gln Gly Gly Leu Gln
50           55           60

Thr Val Met Lys Trp Lys Thr Val Val Ala Ile Phe Val Val Val Val
65           70           75           80

Val Tyr Leu Val Thr Gly Gly Leu Val Phe Arg Ala Leu Glu Gln Pro
          85           90           95

Phe Glu Ser Ser Gln Lys Asn Thr Ile Ala Leu Glu Lys Ala Glu Phe
          100           105           110

Leu Arg Asp His Val Cys Val Ser Pro Gln Glu Leu Glu Thr Leu Ile
115           120           125

Gln His Ala Leu Asp Ala Asp Asn Ala Gly Val Ser Pro Ile Gly Asn
130           135           140

Ser Ser Asn Asn Ser Ser His Trp Asp Leu Gly Ser Ala Phe Phe Phe
145           150           155           160

Ala Gly Thr Val Ile Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asn Ile Ala Pro Ser
165           170           175

Thr Glu Gly Gly Lys Ile Phe Cys Ile Leu Tyr Ala Ile Phe Gly Ile
180           185           190

Pro Leu Phe Gly Phe Leu Leu Ala Gly Ile Gly Asp Gln Leu Gly Thr
195           200           205

Ile Phe Gly Lys Ser Ile Ala Arg Val Glu Lys Val Phe Arg Lys Lys
210           215           220

Gln Val Ser Gln Thr Lys Ile Arg Val Ile Ser Thr Ile Leu Phe Ile
225           230           235           240

Leu Ala Gly Cys Ile Val Phe Val Thr Ile Pro Ala Val Ile Phe Lys
245           250           255

Tyr Ile Glu Gly Trp Thr Ala Leu Glu Ser Ile Tyr Phe Val Val Val
260           265           270

```

[0004]

Thr Leu Thr Thr Val Gly Phe Gly Asp Phe Val Ala Gly Gly Asn Ala
 275 280 285
 Gly Ile Asn Tyr Arg Glu Trp Tyr Lys Pro Leu Val Trp Phe Trp Ile
 290 295 300
 Leu Val Gly Leu Ala Tyr Phe Ala Ala Val Leu Ser Met Ile Gly Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Arg Val Leu Ser Lys Lys Thr Lys Glu Glu Val Gly Glu Ile
 325 330 335
 Lys Ala His Ala Ala Glu Trp Lys Ala Asn Val Thr Ala Glu Phe Arg
 340 345 350
 Glu Thr Arg Arg Arg Leu Ser Val Glu Ile His Asp Lys Leu Gln Arg
 355 360 365
 Ala Ala Thr Ile Arg Ser Met Glu Arg Arg Arg Leu Gly Leu Asp Gln
 370 375 380
 Arg Ala His Ser Leu Asp Met Leu Ser Pro Glu Lys Arg Ser Val Phe
 385 390 395 400
 Ala Ala Leu Asp Thr Gly Arg Phe Lys Ala Ser Ser Gln Glu Ser Ile
 405 410 415
 Asn Asn Arg Pro Asn Asn Leu Arg Leu Lys Gly Pro Glu Gln Leu Asn
 420 425 430
 Lys His Gly Gln Gly Ala Ser Glu Asp Asn Ile Ile Asn Lys Phe Gly
 435 440 445
 Ser Thr Ser Arg Leu Thr Lys Arg Lys Asn Lys Asp Leu Lys Lys Thr
 450 455 460
 Leu Pro Glu Asp Val Gln Lys Ile Tyr Lys Thr Phe Arg Asn Tyr Ser
 465 470 475 480
 Leu Asp Glu Glu Lys Lys Glu Glu Glu Thr Glu Lys Met Cys Asn Ser
 485 490 495
 Asp Asn Ser Ser Thr Ala Met Leu Thr Asp Cys Ile Gln Gln His Ala
 500 505 510
 Glu Leu Glu Asn Gly Met Ile Pro Thr Asp Thr Lys Asp Arg Glu Pro
 515 520 525
 Glu Asn Asn Ser Leu Leu Glu Asp Arg Asn
 530 535
 <210> 3
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>

[0005]

```

<221> VARSPLIC
<222> (1)..(1)
<223> M -> MITAPQEPPARPLQAGSGAG PAPGRAM (在同种型2中)

<220>
<221> VARIANT
<222> (328)..(328)
<223> P 全 L 置换

<400> 3
Met Arg Ser Thr Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Ser Gly Ala Leu Val Phe Arg Ala Leu Glu Gln Pro His Glu
20 25 30

Gln Gln Ala Gln Arg Glu Leu Gly Glu Val Arg Glu Lys Phe Leu Arg
35 40 45

Ala His Pro Cys Val Ser Asp Gln Glu Leu Gly Leu Leu Ile Lys Glu
50 55 60

Val Ala Asp Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Pro Glu Thr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Ser Asn Ser Ser His Ser Ala Trp Asp Leu Gly Ser Ala Phe Phe Phe
85 90 95

Ser Gly Thr Ile Ile Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asn Val Ala Leu Arg
100 105 110

Thr Asp Ala Gly Arg Leu Phe Cys Ile Phe Tyr Ala Leu Val Gly Ile
115 120 125

Pro Leu Phe Gly Ile Leu Leu Ala Gly Val Gly Asp Arg Leu Gly Ser
130 135 140

Ser Leu Arg His Gly Ile Gly His Ile Glu Ala Ile Phe Leu Lys Trp
145 150 155 160

His Val Pro Pro Glu Leu Val Arg Val Leu Ser Ala Met Leu Phe Leu
165 170 175

Leu Ile Gly Cys Leu Leu Phe Val Leu Thr Pro Thr Phe Val Phe Cys
180 185 190

Tyr Met Glu Asp Trp Ser Lys Leu Glu Ala Ile Tyr Phe Val Ile Val
195 200 205

Thr Leu Thr Thr Val Gly Phe Gly Asp Tyr Val Ala Gly Ala Asp Pro
210 215 220

Arg Gln Asp Ser Pro Ala Tyr Gln Pro Leu Val Trp Phe Trp Ile Leu
225 230 235 240

Leu Gly Leu Ala Tyr Phe Ala Ser Val Leu Thr Thr Ile Gly Asn Trp
245 250 255

Leu Arg Val Val Ser Arg Arg Thr Arg Ala Glu Met Gly Gly Leu Thr

```

[0006]

260	265	270
Ala Gln Ala Ala Ser Trp Thr Gly Thr Val Thr Ala Arg Val Thr Gln		
275	280	285
Arg Ala Gly Pro Ala Ala Pro Pro Pro Glu Lys Glu Gln Pro Leu Leu		
290	295	300
Pro Pro Pro Pro Cys Pro Ala Gln Pro Leu Gly Arg Pro Arg Ser Pro		
305	310	315
Ser Pro Pro Glu Lys Ala Gln Pro Pro Ser Pro Pro Thr Ala Ser Ala		
325	330	335
Leu Asp Tyr Pro Ser Glu Asn Leu Ala Phe Ile Asp Glu Ser Ser Asp		
340	345	350
Thr Gln Ser Glu Arg Gly Cys Pro Leu Pro Arg Ala Pro Arg Gly Arg		
355	360	365
Arg Arg Pro Asn Pro Pro Arg Lys Pro Val Arg Pro Arg Gly Pro Gly		
370	375	380
Arg Pro Arg Asp Lys Gly Val Pro Val		
385	390	

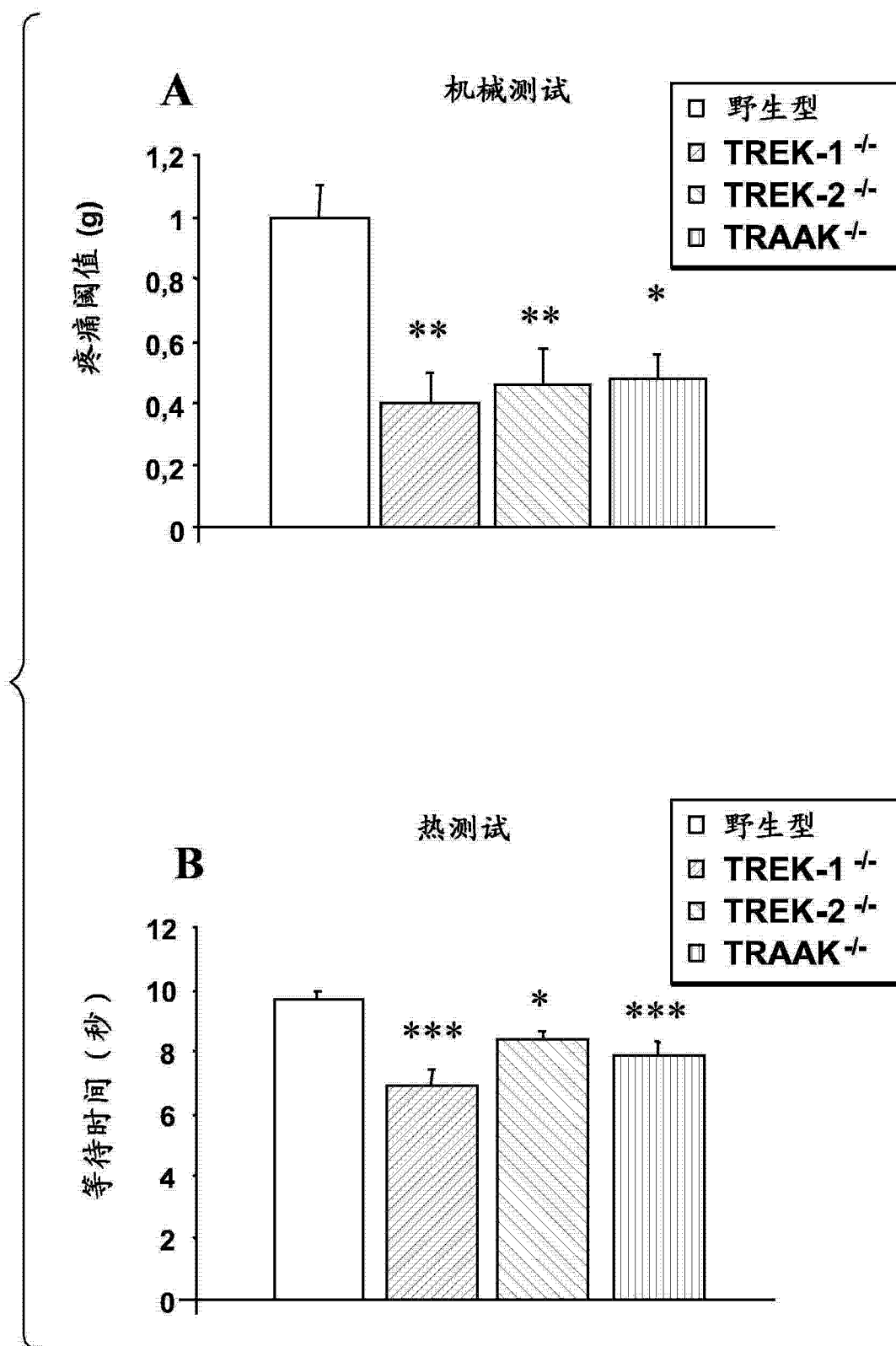


图 1

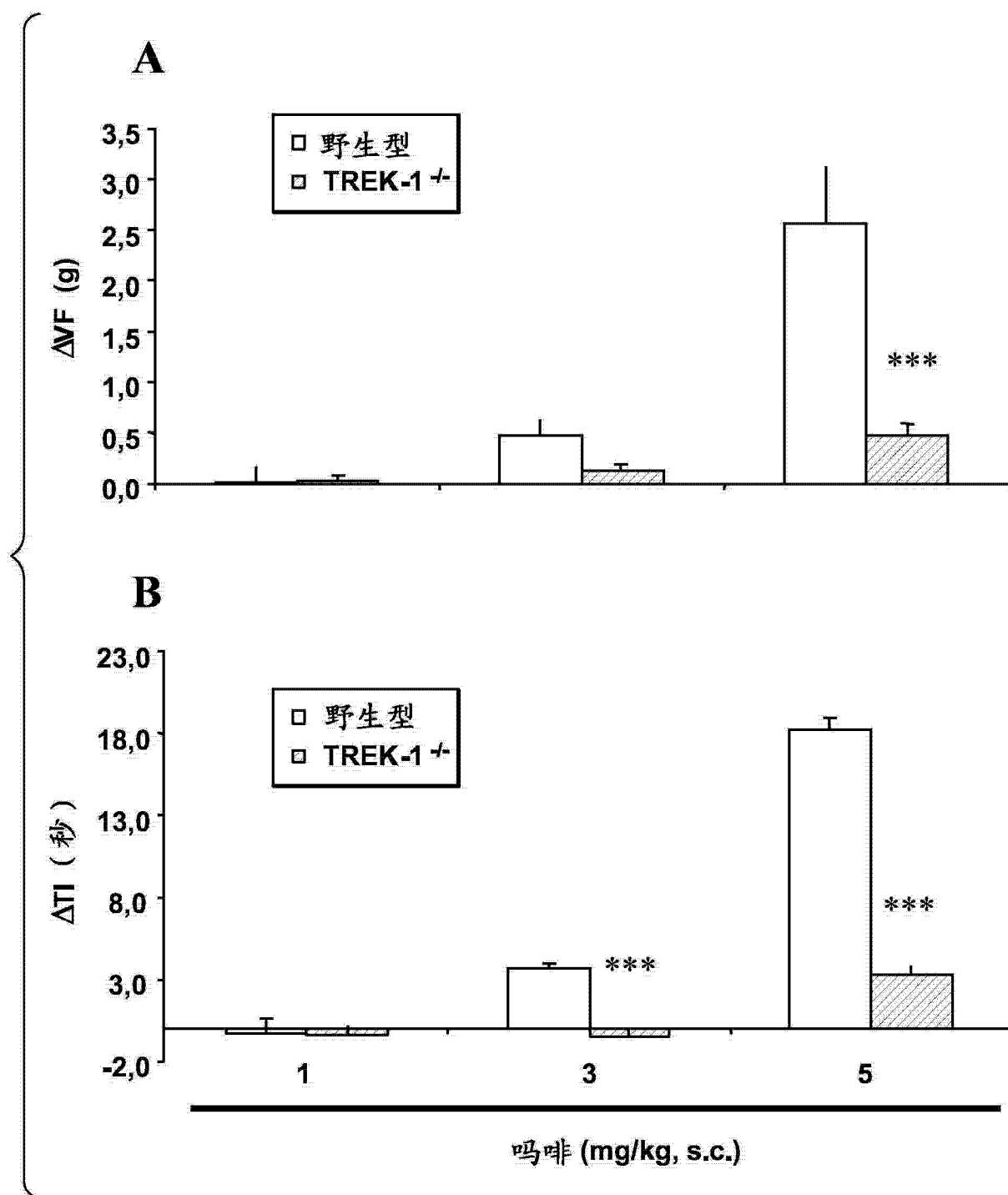


图 2

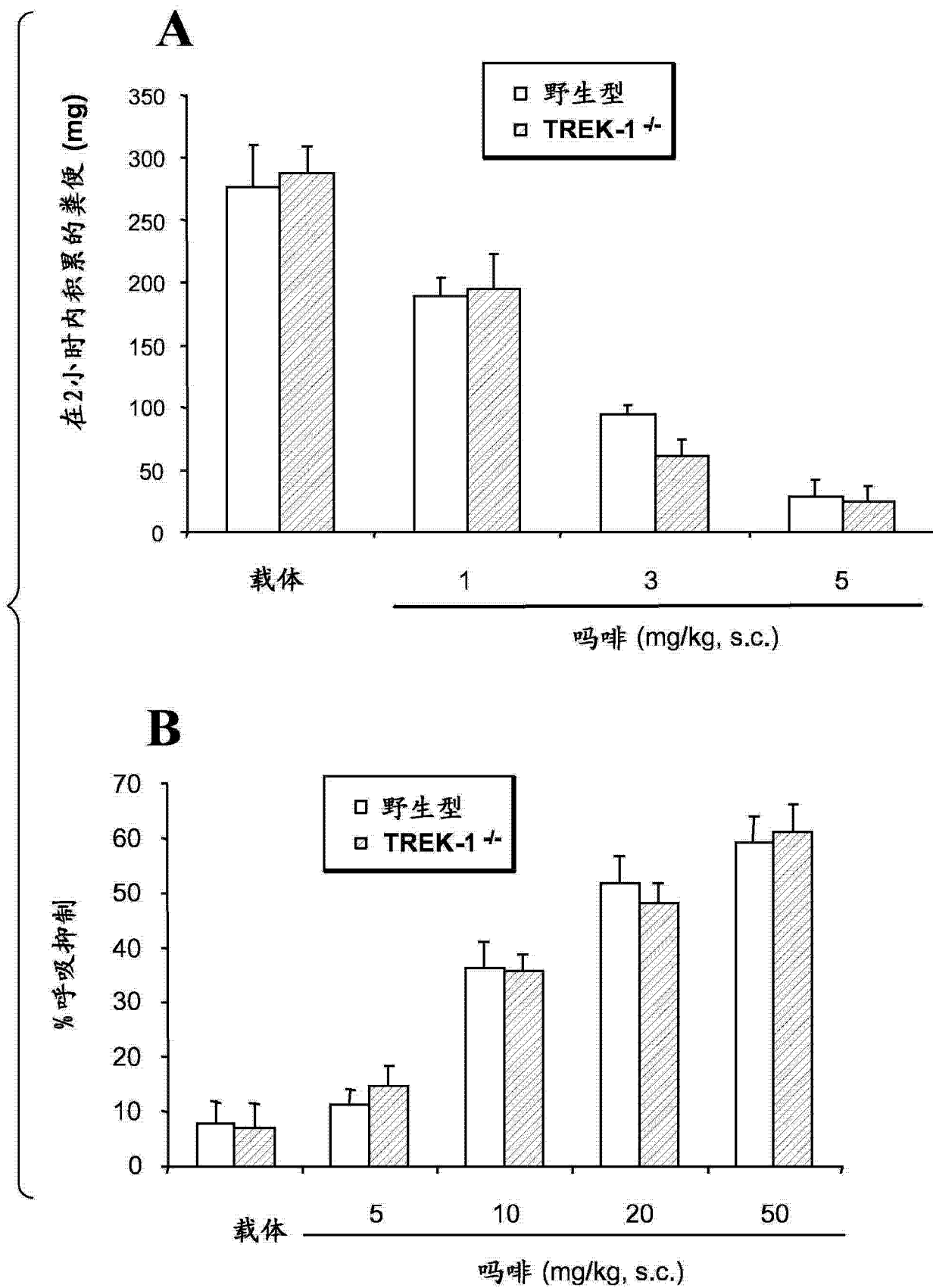


图 3

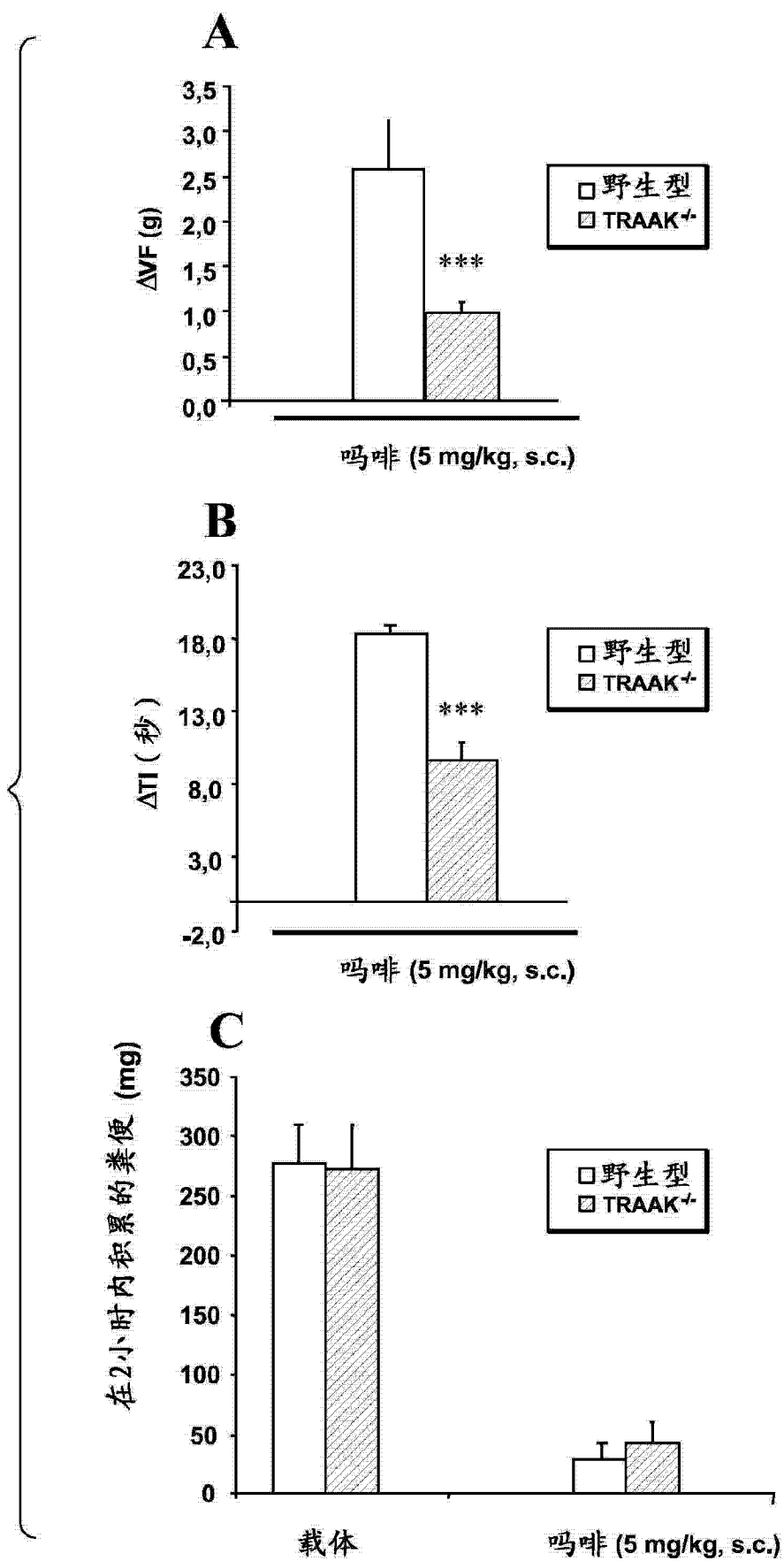


图 4