

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680027934.8

[51] Int. Cl.

A01N 43/42 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 3 月 4 日

[11] 公开号 CN 101378656A

[22] 申请日 2006.6.5

[21] 申请号 200680027934.8

[30] 优先权

[32] 2005.6.7 [33] US [31] 60/688,546

[86] 国际申请 PCT/US2006/021807 2006.6.5

[87] 国际公布 WO2006/133128 英 2006.12.14

[85] 进入国家阶段日期 2008.1.29

[71] 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 乔恩·D·利文 罗伯特·O·梅辛

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 7 页 说明书 75 页 附图 6 页

[54] 发明名称

为治疗疼痛对 EPAC、磷脂酶 C ϵ 和磷脂酶 D 的抑制

[57] 摘要

本发明提供了通过抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 来减轻患者疼痛的方法、组合物和试剂盒。另外,本发明提供了目的在于鉴定出减轻疼痛的试剂的各种预筛选和筛选方法。本发明的方法可以包括对结合 Epac、PLC ϵ 或 PLD 的待测试剂进行分析。或者,可以对待测试剂的改变 Epac、PLC ϵ 或 PLD 多肽、多核苷酸或其作用的水平的的能力进行筛选。

- 1、减轻疼痛的方法，所述方法包括给有需要的患者进行有效量的选自下组的抑制剂的给药：Epac抑制剂、磷脂酶C- ϵ (PLC ϵ)抑制剂和磷脂酶D(PLD)抑制剂。
- 2、如权利要求1所述的方法，其中所述给药导致所述患者痛觉过敏降低。
- 3、如权利要求2所述的方法，其中所述给药对于所述患者的伤害感受无显著影响。
- 4、如权利要求1所述的方法，其中所述患者患有炎性痛。
- 5、如权利要求4所述的方法，其中所述炎性痛是急性的。
- 6、如权利要求4所述的方法，其中所述炎性痛是慢性的。
- 7、如权利要求4所述的方法，其中所述炎性痛是由于选自下组的病症引起的：晒伤、关节炎、结肠炎、心肌炎、皮炎、肌炎、神经炎、粘膜炎症、尿道炎、膀胱炎、胃炎、肺炎和胶原血管病。
- 8、如权利要求1所述的方法，其中所述患者患有神经性痛。
- 9、如权利要求8所述的方法，其中所述神经性痛是急性的。
- 10、如权利要求8所述的方法，其中所述神经性痛是慢性的。

11、如权利要求8所述的方法,其中所述神经性痛是由于选自下组的病症引起:灼痛、糖尿病、胶原血管病、三叉神经痛、脊髓损伤、脑干损伤、丘脑疼痛综合症、I型复杂区域疼痛综合症/反射性交感神经营养不良症、Fabry's综合症、小纤维神经病、癌症、癌症化疗、慢性酒精中毒、中风、脓肿、脱髓鞘疾病、病毒性感染、抗病毒治疗、艾滋病和艾滋病治疗。

12、如权利要求8所述的方法,其中所述神经性痛是由于选自下组的因素引起的:外伤、手术、截肢、毒素和化疗。

13、如权利要求1所述的方法,其中所述患者患有全身性疼痛症。

14、如权利要求13所述的方法,其中所述全身性疼痛症选自下组:纤维肌痛、过敏性肠综合症和颞下颌关节紊乱症。

15、如权利要求1所述的方法,其中所述抑制剂是Epac抑制剂。

16、如权利要求15所述的方法,其中所述Epac抑制剂直接对Epac起作用。

17、如权利要求15所述的方法,所述方法还包括:给患者施用以与Epac抑制剂不同机制起作用的止痛剂。

18、如权利要求1所述的方法,其中所述抑制剂是PLC ϵ 抑制剂。

19、如权利要求 15 所述的方法，其中所述 PLC ϵ 抑制剂直接对 PLC ϵ 起作用。

20、如权利要求 15 所述的方法，所述方法还包括：给患者施用以与 PLC ϵ 抑制剂不同机制起作用的止痛剂。

21、如权利要求 1 所述的方法，其中所述抑制剂是 PLD 抑制剂。

22、如权利要求 17 所述的方法，其中所述 PLD 抑制剂直接对 PLD 起作用。

23、如权利要求 21 所述的方法，其中所述 PLD 抑制剂是选择性 PLD 抑制剂。

24、如权利要求 21 所述的方法，所述方法还包括：给患者施用以与 PLD 抑制剂不同机制起作用的止痛剂。

25、如权利要求 1 所述的方法，其中所述方法还包括施用选自下组的试剂：蛋白激酶 A(PKA)抑制剂、cAMP 抑制剂、非甾体类抗炎药、前列腺素合成抑制剂、局部麻醉剂、抗惊厥药、抗抑郁剂、阿片受体激动剂和镇静药。

26、药物组合物，包含：

(a) 选自下组的抑制剂：Epac 抑制剂、PLC ϵ 抑制剂和 PLD 抑制剂；和

(b) 通过不同于所述抑制剂的机制起作用的止痛剂。

27、药物组合物，包含：

(a) 选自下组的抑制剂：Epac 抑制剂、PLC ϵ 抑制剂和 PLD 抑制剂；和

(b) 选自下组的试剂：蛋白激酶 A(PKA)抑制剂、cAMP 抑制剂、非甾体类抗炎药、前列腺素合成抑制剂、局部麻醉剂、抗惊厥药、抗抑郁剂、阿片受体激动剂和镇静药。

28、如权利要求 25 或 26 所述的药物组合物，其中所述抑制剂是 Epac 抑制剂。

29、如权利要求 25 或 26 所述的药物组合物，其中所述抑制剂是 PLC ϵ 抑制剂。

30、如权利要求 25 或 26 所述的药物组合物，其中所述抑制剂是 PLD 抑制剂。

31、预筛选能减轻患者疼痛的试剂的方法，该方法包括：

- (a) 将待测试剂与选自下组的多肽接触：Epac、PLC ϵ 和 PLD；
- (b) 确定该待测试剂是否特异性结合该多肽；和
- (c) 如果该待测试剂特异性结合该多肽，则选择该待测试剂作为潜在止痛剂。

32、预筛选能减轻患者疼痛的试剂的方法，该方法包括：

- (a) 将待测试剂与编码选自下组的多肽的多核苷酸接触：Epac、PLC ϵ 和 PLD；
- (b) 确定该待测试剂是否特异性结合该多核苷酸；和
- (c) 如果该待测试剂特异性结合该多核苷酸，则选择该待测试剂作为潜在止痛剂。

33、如权利要求 31 或 32 所述的预筛选方法，其中所述多肽包括 Epac。

34、如权利要求 31 或 32 所述的预筛选方法，其中所述多肽包括 PLC ϵ 。

35、如权利要求31或32所述的预筛选方法，其中所述多肽包括PLD。

36、如权利要求31或32所述的预筛选方法，其中所述方法还包括将特异性结合所述多肽或所述多核苷酸的任何待测试剂分别记录在候选止痛剂数据库中。

37、如权利要求31或32所述的预筛选方法，其中所述接触在体外。

38、筛选能减轻患者疼痛的试剂的方法，该方法包括：

- (a) 将待测试剂与选自下组的多肽接触：Epac、PLC ϵ 和PLD；
- (b) 确定该待测试剂是否抑制该多肽；和
- (c) 如果该待测试剂抑制该多肽，则选择该待测试剂作为潜在止痛剂。

39、如权利要求38所述的筛选方法，其中所述多肽包括Epac。

40、如权利要求38所述的筛选方法，其中所述多肽包括PLC ϵ 。

41、如权利要求38所述的筛选方法，其中所述多肽包括PLD。

42、如权利要求38所述的筛选方法，其中所述方法还包括将抑制所述多肽的任何待测试剂都记录在候选止痛剂数据库中。

43、如权利要求38所述的筛选方法，其中所述接触在体外。

44、如权利要求38所述的筛选方法，其中：

所述步骤(a)中的接触包括将待测试剂与在不存在该待测试剂的条件下表达所述多肽的细胞接触；或与该细胞的一部分接触；

所述步骤(b)中的确定包括确定所述多肽的水平或编码所述多肽的多核苷酸的水平；且

所述步骤(c)中的选择包括如果所述多肽的水平、或编码该多肽的多核苷酸水平降低，则选择该待测试剂作为潜在止痛剂。

45、如权利要求 38 所述的筛选方法，其中：

所述步骤(a)中的接触包括将待测试剂与在不存在该待测试剂的条件下表达所述多肽的细胞接触；或与该细胞的一部分接触；

所述步骤(b)中的确定包括确定所述多肽的作用水平；且

所述步骤(c)中的选择包括如果所述多肽作用的水平降低，则选择该待测试剂作为潜在止痛剂。

46、如权利要求 38 所述的筛选方法，还包括将所选定的待测试剂与药学上可接受的载体组合。

47、如权利要求 38 所述的筛选方法，还包括测量所选定的待测试剂在动物模型中减轻疼痛的能力。

48、筛选能减轻患者疼痛的试剂的方法，该方法包括：

(a) 从下组中选择一种抑制剂作为待测试剂：Epac 抑制剂、PLC ϵ 抑制剂和 PLD 抑制剂；和

(b) 测量所选定的待测试剂在动物模型中减轻疼痛的能力。

49、试剂盒，包含：

- (a) 在药学上可接受载体中的选自下组的抑制剂：Epac 抑制剂、PLC ϵ 抑制剂和 PLD 抑制剂；
- (b) 实施权利要求1所述方法的说明书。

为治疗疼痛对 EPAC、磷脂酶 C ϵ 和磷脂酶 D 的抑制

相关申请的交叉参考

本申请要求 2005 年 6 月 7 日提交的美国序列号 60/688,546 的优先权和权益，该申请全文引入本文以供各种目的参考。

关于在联邦政府赞助的研究和开发下产生的本发明的权利的声明

本发明是在政府拨款号 NIH DE 008973 的支持下完成的。在本发明中政府具有一定的权利。

发明的技术领域

本发明涉及在抑制 cAMP-活化的鸟嘌呤交换因子 Epac、磷脂酶 C- ϵ (PLC ϵ) 和/或磷脂酶 D(PLD)的基础上减轻疼痛的方法，和相关的药物组合物和筛选方法。

发明的背景技术

炎症的主要症状是对机械刺激(机械痛觉过敏或触痛)的敏感性增强。潜在的胞内信号通路以及参与的机械感受体不完整。然而，一种信号成分，即 PKC 的 ϵ 异构体已证实在由炎症(Khasar 等, 1999b; Numazaki 等, 2002; Sweitzer 等, 2004)、周围神经病如糖尿病(Joseph 和 Levine, 2003a)、慢性酒精中毒(Dina 等, 2000)和癌症化疗(Dina 等, 2001; Joseph 和 Levine, 2003b)以及急性痛转为慢性痛(Aley 等, 2000; Parada 等, 2003a; Parada 等, 2003b)引起的伤害感受体敏化中很重要。但是，引起 PKC ϵ 激活的信号通路仍然不清楚。

最新证据显示信号从 cAMP 传导至 PKC，这表明通过腺苷酸环化酶 (AC)/cAMP 的信号传导并不涉及 PKA，而是在 PKA 的上游出现分支而激活 PKC(Gold 等, 1998; Parada 等, 2005)。但对于在伤害性感受或其它功能性背景下从 cAMP 至 PKC 的信号机制还没有被建立。

在非神经元细胞系中，已经显示 cAMP 不仅能激活 PKA，还能激活鸟嘌呤交换因子，即 Epac(de Rooij 等, 1998; Kawasaki 等, 1998)。Epac 进而能激活新鉴定的磷脂酶，即 PLC ϵ (Schmidt 等, 2001)，且通过磷脂酶产生的甘油二酯(DAG)，可因此潜在地激活新型 PKCs，如 PKC ϵ (Parelch 等, 2000)。虽然，Epac 对 MAP-激酶的作用正处于深入研究中(Enserink 等, 2002; Keiper 等, 2004)，但还并不知道 Epac 会介导 PKCs 的活化。

利用肾上腺素诱导的 PKC ϵ -介导的痛觉过敏模型(Khasar 等, 1999b; Parada 等, 2003b)，目前的研究证明 cAMP 在 PKC ϵ 上游，且 Epac 通过磷脂酶介导 cAMP-PKC 相互作用，导致 PKC ϵ 的移位和激活以及炎性痛的产生。

发明概述

在一实施方式中，本发明提供了一种减轻疼痛的方法。该方法包括给有需要的患者施用有效量的抑制剂，该抑制剂是 Epac 抑制剂、磷脂酶 C- ϵ (PLC ϵ) 抑制剂和/或磷脂酶 D(PLD)抑制剂。在具体实施方式中，施用该抑制剂会使患者的痛觉过敏减轻，优选不会显著影响伤害感受。

在某些实施方式中，所述患者患有炎性痛，可以是急性或慢性的。该炎性痛可能是由于如：晒伤、关节炎、结肠炎、心肌炎、皮炎、肌炎、神经炎、粘膜炎症、尿道炎、膀胱炎、胃炎、肺炎和/或胶原血管病引起。

或者或另外，患者可能患有神经性痛，可以是急性或慢性的。该神经性痛可能是由于比如：灼痛、糖尿病、胶原血管病、三叉神经痛、脊髓损伤、

脑干损伤、丘脑疼痛综合症、I型复杂区域疼痛综合症/反射性交感神经营养不良症、Fabry's综合症、小纤维神经病、癌症、癌症化疗、慢性酒精中毒、中风、脓肿、脱髓鞘疾病、病毒性感染、抗病毒治疗、艾滋病和/或艾滋病治疗引起的。可以按照本发明的方法来治疗的神经性痛包括选自外伤、手术、截肢、毒素和化疗中的试剂而引起的疼痛。

本发明的方法还可用于治疗患有全身疼痛症如纤维肌痛、过敏性肠综合症和颞下颌关节紊乱症的患者。

用于减轻疼痛的 Epac 抑制剂，可以但非必须直接对 Epac 起作用。在具体实施方式中，所述方法包括给患者施用 Epac 抑制剂，并额外施用以不同于 Epac 抑制剂的机理起作用的止痛剂。

用于减轻疼痛的 PLC ϵ 抑制剂，可以但非必须直接对 PLC ϵ 起作用。在具体实施方式中，所述方法包括给患者施用 PLC ϵ 抑制剂，并额外施用以不同于 PLC ϵ 抑制剂的机理起作用的止痛剂。

用于减轻疼痛的 PLD 抑制剂，可以但非必须直接对 PLD 起作用。在优选的实施方式中，该 PLD 抑制剂是选择性的 PLD 抑制剂。在具体实施方式中，所述方法包括给患者施用 PLD 抑制剂，并额外施用以不同于 PLD 抑制剂的机理起作用的止痛剂。

用于本发明方法中的任何抑制剂也可以与下述制剂共同给药：蛋白激酶 A(PKA)抑制剂、cAMP 抑制剂、非甾体类抗炎药、前列腺素合成抑制剂、局部麻醉剂、抗惊厥药、抗抑郁剂、阿片受体激动剂和/或镇静药。

本发明的另一方面是药物组合物。该药物组合物可包括：(a)Epac 抑制剂，PLC ϵ 抑制剂和/或 PLD 抑制剂；和(b)以不同于所述抑制剂的机理起作用的止痛剂。在另一实施方式中，该药物组合物包括：(a)Epac 抑制剂、PLC ϵ 抑制剂和/或 PLD 抑制剂；和(b)一种或多种下述制剂：蛋白激酶 A(PKA)抑制剂、cAMP

抑制剂、非甾体类抗炎药、前列腺素合成抑制剂、局部麻醉剂、抗惊厥药、抗抑郁剂、阿片受体激动剂和镇静药。

本发明还提供了预筛选和筛选能减轻患者疼痛的试剂的方法。以多肽结合为基础的预筛选方法包括：(a)将待测试剂与下述多肽的一种结合：Epac、PLC ϵ 和 PLD；(b)确定该待测试剂是否特异性结合所述多肽；和(c)如果该待测试剂特异性结合所述多肽，则选定该待测试剂作为潜在的止痛剂。以多核苷酸结合为基础的预筛选方法包括：(a)将待测试剂与编码下述多肽的一种的多核苷酸接触：Epac、PLC ϵ 和 PLD；(b)确定该待测试剂是否特异性结合所述多核苷酸；和(c)如果该待测试剂特异性结合所述多核苷酸，则选定该待测试剂作为潜在的止痛剂。这两种预筛选方法都还可以额外地包括，分别将特异性结合所述多肽或所述多核苷酸的任何待测试剂记录在候选止痛剂数据库中。在优选的实施方式中，所述预筛选方法在体外进行。

本发明的筛选方法包括：(a)将待测试剂与下述多肽的一种接触：Epac、PLC ϵ 和 PLD；(b)确定该待测试剂是否抑制所述多肽；和(c)如果该待测试剂抑制所述多肽，则选定该待测试剂作为潜在的止痛剂。该筛选方法还可以包括，将抑制所述多肽的任何待测试剂记录在候选止痛剂数据库中。在具体实施方式中，该筛选方法在体外进行。在该筛选方法的一种变体中，(a)将待测试剂与在不存在该待测试剂的条件下表达所述多肽的细胞接触，或与该细胞的一部分接触；(b)对于该待测试剂是否抑制该多肽的确定包括确定该多肽或编码该多肽的多核苷酸的水平；和(c)如果该多肽，或编码该多肽的多核苷酸的水平降低，则选定该待测试剂为潜在的止痛剂。在该筛选方法的另一种变体中，(a)将待测试剂与在不存在该待测试剂的条件下表达所述多肽的细胞接触，或与该细胞的一部分接触；(b)对于该待测试剂是否抑制该多肽的确定包括确定该多肽的活性水平；和(c)如果多肽的活性水平降低，则选定该待测试

剂为潜在的止痛剂。

在具体实施方式中，本发明的筛选方法可以包括将选定的待测试剂与药学上可接受的载体组合和/或在动物模型中，测定所选定的待测试剂减轻疼痛的能力。

本发明的体内筛选方法包括：(a)选择下述抑制剂的一种作为待测试剂：Epac 抑制剂、PLC ϵ 抑制剂和 PLD 抑制剂；和(b)在动物模型中，测定所选定的待测试剂减轻疼痛的能力。

本发明的另一方面是试剂盒，其包括：(a)在药学上可接受载体中的下述抑制剂的一种：Epac 抑制剂、PLC ϵ 抑制剂和 PLD 抑制剂；和(b)进行本发明方法来减轻患者疼痛的说明书。

附图简要说明

图 1：在培养的 DRG-神经元中， β 2-肾上腺素能受体(β 2-AR)激动剂诱导的 PKC ϵ 移位。A)典型的未处理的 DRG-神经元(左)与异丙基肾上腺素(1 μ M, 30 秒)处理的 DRG-神经元(右)的共聚焦图象。将处理后的培养物固定，用亲和纯化的 PKC ϵ -特异性抗血清 SN 134(1: 1000)进行培养，并用 FITC-偶合的驴抗兔 IgG 血清(1: 200)来进行检测。小图显示放大的白框标识的区域。在用异丙基肾上腺素处理后，可以看到部分 PKC ϵ 会移位至细胞膜。白色刻度条等于 20 μ m。B)30 秒后呈现对指定浓度异丙基肾上腺素产生应答的至细胞膜的 PKC ϵ 移位的神经元的百分比。C)在指定时间点呈现用异丙基肾上腺素(1 μ M)刺激的 PKC ϵ 移位的神经元的百分比。实心柱状图表示用 1 μ M 异丙基肾上腺素处理的培养物。点状柱状图表示的培养物在用 1 μ M 异丙基肾上腺素刺激之前，先用 β 2-AR 特异性抑制剂 ICI 118,551(50 μ M)预处理 15 分钟。**表示 $p < 0.01$ 。

图 2: G-蛋白 α_s 、腺苷酸环化酶、和 Epac 但非 PKA 参与 PKC ϵ 移位。

A)在用 1 μ M 异丙基肾上腺素刺激 30 秒之前,先用指定浓度(1 $\times$ 、10 $\times$ 、100 $\times$ 、1000 $\times$ CMIQ-IC₅₀(0.03-30 μ M))的 PKA-特异性抑制剂 4-氟基-3-甲基异喹啉(CMIQ)预处理 DRG 培养物 15 分钟(Lu 等, 1996)。没用 CMIQ 或异丙基肾上腺素进行处理的培养物作为阴性对照。B)在大鼠爪皮内注射 PKA 抑制剂 CMIQ(2.5 μ g/2.5 μ l)并不会改变机械性缩爪阈值。通过注射其催化亚基(PKAcs, 25 单位/2.5 μ l)激活 PKA 会引起强烈的机械性痛觉过敏。在注射 PKAcs 之前 15 分钟预注射 CMIQ 会完全封闭 PKA 诱导的体内痛觉过敏。C)用 G-蛋白 α_s 的活化剂(霍乱毒素(1 μ g/ml)、佛司可林(forskolin, 5 μ M)和 Epac(CPTOMe 10 μ M)刺激培养物指定长的时间。未刺激细胞作用阴性对照,异丙基肾上腺素(1 μ M, 30 秒)处理的细胞作为阳性对照。*表示 $P<0.05$, **表示 $p<0.01$ 。

图 3: β_2 -AR-诱导的 Epac-介导的 PKC ϵ 移位需要 PI-PLC 和 PLD 活性。

A)在用异丙基肾上腺素刺激后(Iso, 1 μ M, 30 秒),呈现至细胞膜的 PKC ϵ 移位的神经元的百分比。培养物用如下指定的抑制剂预处理 15 分钟: PC-PLC 抑制剂, D-609(30 μ M); PI-PLC 抑制剂, U73122(10 μ M); U73122 的无活性同系物, U73343(10 μ M); PLD 抑制剂, 1-丁醇(50 mM); 1-丁醇的无活性同系物, 2-丁醇(50 mM); PKC 激酶抑制剂, 双苄咪马来酰亚胺 I(BIM, 100 nM)。所用浓度约为报道的 IC₅₀ 值的 10 倍。B)在用 Epac 特异性活化剂 CPTOMe(10 μ M, 90 秒)刺激后,呈现至细胞膜的 PKC ϵ 移位的神经元的百分比。使用与 A)中相同的抑制剂。**表示 $p<0.01$ 。

图 4: 在体内 Epac 通过 PI-PLC、PLD 和 PKC ϵ 来介导肾上腺素-诱导性痛觉过敏。A)注射肾上腺素(2.5 μ l 中的 0.1 μ g)和 CTPOMe(2.5 μ l 中的 6.3 μ g)会产生相似量级的痛觉过敏,但盐水载体注射就无效。在用 CPTOMe 刺激之前

30 分钟, 预注射特异性 PKC ϵ 抑制性肽 ϵ VI-2(2.5 μ l 中 1 μ g)可以完全封闭 CPTOMe-诱导性敏化, 这说明 Epac 在体内同样通过激活 PKC ϵ 诱导机械性痛觉过敏。B)肾上腺素-诱导性(实体柱状图)和 CPTOMe-诱导性(点状柱状图)机械性痛觉过敏可以通过在肾上腺素/CPTOMe 刺激前 30 分钟预注射 PI-PLC 抑制剂 U73122(2.5 μ l, 1 μ g/ μ l)而非其无活性对照, U73343(2.5 μ l, 1 μ g/ μ l)而完全封闭。同样, 体外数据类似, 注射 PLD 抑制剂, 1-丁醇(2.5 μ l, 10.9 M)而非其无活性对照, 2-丁醇, 能完全抑制注射肾上腺素/CPTOMe 的敏化作用。这些抑制剂对于盐水对照注射没有任何作用或者作用很小(开放柱状图)。因此, 这两种磷脂酶是体内介导 β_2 -AR-刺激的/Epac/PKC ϵ -介导的机械性痛觉过敏所必需的。**表示 $p<0.01$ 。

图 5: PKC ϵ 移位和 IB4 双染色。双染色细胞的表面荧光图象用于检测 PKC ϵ (图 A 和 C, 1: 1000 稀释)和 IB4(图 B 和 D, 1: 100 稀释)。当上排的细胞将 PKC ϵ 移位至细胞膜(A)上时, 也显示出清楚的 IB4 表位的质膜染色(C)。相反, (C)中的细胞就没有发生 PKC ϵ 移位, 而且 IB4 表位也非阳性(D)。小图显示了放大的白框标识的区域。白色线条等于 20 μ m。

图 6: β_2 -AR 激动剂通过 Epac、PI-PLC 和 PLD 将信号传至 PKC ϵ , 而产生机械痛觉过敏。图示性的 β_2 -AR 激动剂-诱导性机械痛觉过敏的拟定第二信使信号级联包括 G-蛋白 α_s , 其导致在第一传入伤害感受体的外周末端的 AC 和 Epac 的活化。PKA 并不参与 β_2 -AR-诱导性/PKC ϵ -介导的敏化。Epac 导致 PI-PLC 和 PLD 激活, 这两者的活性都是体外 PKC ϵ 移位和体内 Epac/PKC ϵ -介导的痛觉过敏发生所必需的。如前面所显示的, PKC ϵ 活化会导致 TTX-R 钠电流增大(Khasar 等, 1999b), 其在痛觉过敏中起重要作用。在示意图右侧标明了以其各自活性水平来使用的活化剂/抑制剂。

发明的详细说明

本发明涉及发现 Epac、PLC ϵ 和 PLD 是疼痛,尤其是炎性和神经性疼痛的介质。因此,本发明提供了在抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的基础上减轻疼痛的方法和相关的药物组合物。另外,该方法提供了在筛选结合和/或抑制 Epac、PLC ϵ 或 PLD 多肽或多核苷酸的试剂的基础上筛选出减轻患者疼痛的新型试剂的方法。

定义

除非特别指出,权利要求和说明书中的术语定义如下。

下述术语包括 Genebank 中已鉴定为下述名称的多肽,以及与 Genebank 中下述名称的已鉴定多肽有至少约 70% 同一性的多肽: cAMP-活化的 Rap1 鸟嘌呤交换因子的家族中的任何多肽(包括 Epac1 和 Epac2),磷脂酶 C- ϵ (PLC ϵ)(包括剪切变体 PLC ϵ 1a 和 PLC ϵ 1b),和磷脂酶 D(包括 PLD1 和 PLD2)。在另一个具体实施方式中,这些术语包括 Genebank 中已鉴定为上述名称且具有至少约 80、90、95、96、97、98 或 99% 同一性的多肽。

多肽的“调节剂”是多肽的作用或功能的抑制剂或增强剂。

多肽(如 PLD)的“非选择性”调节剂是在调控特定多肽的典型浓度下调控多肽同一家族其它成员(如其它磷脂酶)的制剂。

多肽的“选择性”调节剂在一浓度下显著调控特定多肽,在该浓度下多肽同一家族的其它成员不会显著受调控。这样,调节剂对于如 PLD 和 PLC 来说是有选择性的。

当调节剂通过直接与多肽相互作用来发挥其作用时,该调节剂“直接作用于”该多肽。

当调节剂通过与不是该多肽的其它分子相互作用来发挥其作用,而该相

互作用导致了对该多肽的作用或功能的调节时，该调节剂“间接作用于”该多肽。

多肽的“抑制剂”或“拮抗剂”是指与不存在(或存在少量)该制剂的观察相比，采用任何机理削弱多肽的任一作用或功能的制剂。多肽抑制剂可以影响：(1)多肽的表达、mRNA 稳定性、蛋白运输、修饰(如磷酸化)、或降解，或(2)多肽的一种或多种正常作用或功能。多肽抑制剂可以是非选择性或选择性的。优选的抑制剂(拮抗剂)一般是直接作用于靶蛋白且对靶蛋白有选择性的小分子。

“增强剂”或“活化剂”是指与不存在(或存在少量)该制剂的观察相比，采用任何机理增强任一多肽的作用或功能的制剂。多肽增强剂可以影响：(1)多肽的表达、mRNA 稳定性、蛋白运输、修饰(如磷酸化)、或降解，或(2)多肽的一种或多种正常作用或功能。多肽增强剂可以是非选择性或选择性的。优选的增强剂(活化剂)一般是直接作用于靶蛋白且对靶蛋白有选择性的小分子。

术语“多肽”和“蛋白质”在此可互换使用，其指氨基酸，除非特别限定，包括与天然存在的氨基酸以相似方式行使功能的非典型氨基酸，的聚合物。

术语“氨基酸”或“氨基酸残基”除非另外特别说明，包括天然存在的 L-氨基酸或残基。在此处应用通常所用的一个或三个字母的氨基酸缩写(Lehninger, A.L.(1975)Biochemistry, 第 2 版, pp.71-92, Worth Publishers, N.Y.)。术语“氨基酸”和“氨基酸残基”包括 D-氨基酸以及化学修饰的氨基酸如氨基酸类似物，天然存在的不常组成蛋白质的氨基酸，以及具有氨基酸特性的化学合成的化合物(统称为“非典型”氨基酸)。例如，和天然 Phe 或 Pro 一样对所述肽化合物具有相同的构象限制的苯丙氨酸或脯氨酸的类似物或模拟物，也包括在“氨基酸”的定义内。

代表性的非典型氨基酸包括，如在国际公开号 WO 90/01940 中描述的氨

氨酸, 以及可代替 Glu 和 Asp 的 2-氨基己二酸(Aad); 可代替 Glu 和 Asp 的 2-氨基庚二酸(Apm); 可代替 Met、Leu 和其它脂肪族氨基酸的 2-氨基丁酸(Abu); 可代替 Met、Leu 和其它脂肪族氨基酸的 2-氨基庚酸(Ahe); 可代替 Gly 的 2-氨基异丁酸(Aib); 可代替 Val、Leu 和 Ile 的环己基丙氨酸(Cha); 可代替 Arg 和 Lys 的高精氨酸(Har); 可代替 Lys、Arg 和 His 的 2,3-二氨基丙酸(Dpr); 可代替 Gly、Pro 和 Ala 的 N-乙基甘氨酸(EtGly)); 可代替 Asn 和 Gln 的 N-乙基天冬酰胺酸(EtAsn); 可代替 Lys 的羟基赖氨酸(Hyl); 可代替 Lys 的别羟基赖氨酸(Ahyl); 可代替 Pro、Ser 和 Thr 的 3-(和 4-)羟基脯氨酸(3Hyp, 4Hyp); 可代替 Ile、Leu 和 Val 的别-异亮氨酸(Aile); 可代替 Ala 的脒基苯丙氨酸(amidinophenylalanine); 可代替 Gly、Pro 和 Ala 的 N-甲基甘氨酸(MeGly, 肌氨酸); 可代替 Ile 的 N-甲基异亮氨酸(MeIle); 可代替 Met 和其它脂肪族氨基酸的正缬氨酸(Nva); 可代替 Met 和其它脂肪族氨基酸的正亮氨酸(Nle); 可代替 Lys、Arg 和 His 的鸟氨酸(Orn); 可代替 Thr、Asn 和 Gln 的瓜氨酸(Cit)和甲硫氨酸亚砷(MSO); 可代替 Phe 的 N-甲基苯丙氨酸(MePhe)、三甲基苯丙氨酸、卤代(F、Cl、Br 和 I)苯丙氨酸和三氟苯丙氨酸。

就两个或多个氨基酸或核苷酸序列而言使用的术语“同一的”或“百分比同一性”是指在应用下述一种序列比较算法测量或用眼观察中, 在比较或比对最大对应性时, 两个或多个序列或亚序列相同, 或具有特定百分比的相同氨基酸残基或相同核苷酸。

为了进行序列比较, 典型地把一个序列作为参考序列, 而用待测序列与它比较。当使用序列比较算法时, 把待测和参考序列输入到电脑中, 如果需要, 随后指定亚序列坐标, 并设定序列算法程序参数。然后, 根据设定的程序参数, 用序列比较算法计算出待测序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

利用下列方法可以对比较的序列进行优化比对, 例如, 利用 Smith 和 Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482(1981)中的局部同源性算法, 利用 Needleman 和 Wunsch *J. Mol. Biol.* 48: 443(1970)中的同源性对比算法, 利用 Pearson 和 Lipman(1988)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 中的相似性搜索方法, 用计算机执行这些算法(Wisconsin Genetics 软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 或者利用目测检查(一般性的描述参见上述 Ausubel 等)。

有用算法的一个实例是 PILEUP。PILEUP 用递进、逐对比对法从一组相关序列中产生多序列对比来表明相互关系以及百分比序列同一性。它也可以绘制成一种树或树形图, 显示用于创建该算法的簇关系。PILEUP 使用的是 Feng 和 Doolittle(1987)*J. Mol. Evol.* 35:351-360 中的递进对比方法的简化形式。所使用的这种方法与 Higgins 和 Sharp(1989)*CABIOS* 5: 151-153 中描述的方法类似。这种程序能够对比多达 300 个序列, 其中每个序列的最大长度可达 5000 个核苷酸或氨基酸。多个序列对比方法从两个最相似的序列的逐对对比开始, 产生一个由两对比序列组成的簇。然后, 把这个簇与下一个最相关的序列或对比序列簇进行对比。利用两个单个序列逐对对比的简单延伸, 就可以对两簇序列进行对比。通过一系列递进、逐对对比实现最终序列对比。通过指定特定序列以及序列比较区域的氨基酸或核苷酸坐标以及指定程序参数, 可以运行该程序。例如, 可以用一个参考序列与其它待测序列进行比较, 用下列参数来测定百分比序列同一性关系: 默认间隙权重(3.00), 默认间隙长度权重(0.10)和加权的末端间隙。

适合于测定序列同一性百分比和序列相似性的算法的另一实例是 BLAST 算法, 该算法描述见 Altschul 等(1990)*J. Mol. Biol.* 215: 403-410。用于进行 BLAST 分析的软件可以从国家生物技术信息中心 ([http: //www.](http://www.)

Ncbi.nlm.nih.gov/)公开获得。这种算法包括首先通过查出查询序列中长度 W 的短序列单元来鉴定高分值序列对(HSP), 这些序列单元在与数据库序列中的等长序列单元对比时应符合或满足正值的阈值 T 。 T 是相邻序列单元分值阈(Altschul 等, 见上)。把这些起始相邻序列单元样作为种序列, 来启动发现含有它们的较长 HSP 的搜索。只要积累的比对分值能够不断增大, 就可以将序列单元样沿每个序列向两个方向扩展。对于核苷酸序列来说, 累记得分用 M (匹配残基对的奖赏得分; 总是 >0)和 N (错配残基罚分; 总是 <0)来进行计算。对于氨基酸序列来说, 使用记分矩阵来计算累计得分。当发生下列情况时这些序列单元样各方向上的扩展会终止: 积累的比对分值从所能实现的最大分值降低数量 X 后; 由于一个或多个负分值的残基对比的积累, 所述积累分值达到 0 或 0 以下; 或者其中一个序列的末端已经到达。BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 决定比对的敏感度和速度。BLASTN 程序(对于核苷酸序列)把字长(W)11, 期望值(E)10, $M=5$, $N=-4$, 和双链比较作为默认值。对于氨基酸序列来说, BLASTP 程序把字长(W)3, 期望值(E)10, 和 BLOSUM62 分值矩阵作为默认值(参见 Henikoff 和 Henikoff(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915)。

除计算序列同一性的百分比外, BLAST 算法还进行了两序列之间相似性的统计学分析(参见, 如 Karlin 和 Altschul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5787)。BLAST 算法提供的一个相似性测量值为最小加和概率(smallest sum probability)($P(N)$), 这个值指示两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生配对的概率。例如, 如果当待测核酸与参考核酸比较时最小加和概率的值小于约 0.1, 就认为该核酸与参考序列相似, 更优选最小加和概率的值小于约 0.01, 最优选小于 0.001。

术语“特异性结合”在此定义为结合伴侣与另一结合伴侣(如, 两个多肽,

一个多肽和核酸分子,或两个核酸分子)在特定位点的优先结合。术语“特异地结合”指对于靶分子/序列的结合优先性(即亲和性)至少为非特异性靶分子(即缺少特异性识别位点的随机产生的分子)的 2 倍,更优选至少为 5 倍,最优选至少为 10 倍或 20 倍。

如在此应用的,“抗体”指由基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的一个或多个多肽组成的蛋白质。被鉴定的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 Δ 、 ε 和 μ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 Δ 或 ε ,它们随后分别定义免疫球蛋白种类 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

已知典型的免疫球蛋白(抗体)结构单元包括四聚体。每一个四聚体由两组相同的多肽链对组成,每一对具有一个“轻”链(约 25 kD)和一个“重”链(约 50-70 kD)。每个链的 N 末端是一个主要用于抗原识别的大约 100-110 或更多氨基酸的可变区。术语“可变轻链(VL)”和“可变重链(VH)”就是分别指这些轻链和重链。

抗体作为完整的免疫球蛋白或作为由各种肽酶消化产生的已被充分表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶消化抗体铰链区下方的二硫键从而产生 Fab 的二聚体 $F(ab)'_2$, Fab 自身是一个通过二硫键连接到 VH-CH1 的轻链。 $F(ab)'_2$ 在温和条件下可以被还原以破坏铰链区内的二硫键,从而将 $F(ab)'_2$ 二聚体转化成 Fab' 单体。Fab' 单体主要是带有部分铰链区的 Fab(对于其它抗体片段的具体说明,参见 Fundamental Immunology, W. E. Paul, 编, Raven Press, N.Y.(1993))。尽管是从一个完整抗体消化方面来定义各种抗体片段的,但技术人员应该认识到这些 Fab' 片段也可以在体外通过化学或重组 DNA 方法来重新合成。因此,本文所用术语抗体也包括通过修饰完整的抗体或利用重组 DNA 方法重新合成产生的抗体片段。优选的抗体包括单链抗体(以单多肽链存在的

抗体), 更优选单链 Fv 抗体(sFv 或 scFv), 其中可变重链和可变轻链连接在一起(直接或通过肽接头)形成连续的多肽。单链 Fv 抗体是共价键连接的 VH-VL 异源二聚体, 其可以表达自包括 VH-和 VL-编码序列的核酸, 这些核酸直接或通过编码肽的接头连接。Huston 等(1988)Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883。虽然 VH 和 VL 相互连接形成一个单多肽链, 但 VH 和 VL 结构域以非共价键结合。本领域技术人员熟知 scFv 抗体和许多其它结构, 它们可以将自然聚集但化学分离的抗体 V 区域的 F 轻多肽链和重多肽链转化成能够折叠成三维结构的分子, 这些结构与抗原结合位点的结构基本上类似。(参见如美国专利号 5,091,513、5,132,405 和 4,956,778)。

术语“多核苷酸”是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合体, 除非特别限定, 其包括已知的与天然存在的核苷酸有类似功能的天然核苷酸的类似物。术语“多核苷酸”是指任何形式的 DNA 或 RNA, 包括如, 基因组 DNA; 互补 DNA(cDNA), 其为 mRNA 的 DNA 形式, 通常通过信使 RNA(mRNA)的逆转录或扩增获得; 由合成或扩增产生的 DNA 分子; 和 mRNA。术语“多核苷酸”包括双链核酸分子以及单链分子。在双链多核苷酸中, 多核苷酸链不需要共同可延伸(即双链多核苷酸不需要沿着双链的全长都是双链)。

本文所用术语“互补”是指在两个核苷酸间精确配对能力。即如果一个核酸分子的指定位置的核苷可以通过氢键与另一个核酸分子的核苷结合, 则认为这两个核酸分子在此位点相互互补。术语“基本上互补”是指序列彼此间足够互补而在严格的杂交条件下可以实现特异性杂交。

短语“严格的杂交条件”通常是指在限定的离子强度和 pH 下, 对于特定序列温度比融熔温度(T_m)低约 5°C 。可以实现大多数序列的特异性杂交的代表性严格条件是温度至少为约 60°C , 盐浓度为约 0.2 mol, pH 7.0。

“特异性杂交”是指在限定的严格条件下核酸分子与靶核苷酸序列结合, 而

基本上不与杂交混合物中的其它核苷酸序列结合。本领域技术人员知道放宽杂交条件会使得序列错配被接受。

短语“有效量”和“足以……的量”是指产生期望的生物活性的生物活性剂的量。

当用于指施用 Epac 和/或 PLD 抑制剂和其它止痛剂时，术语“共给药”是指所述抑制剂的给药能在患者体内让这些抑制剂的生理学活性至少在时间先后顺序上有部分的重叠。因此，可以同时和/或顺序施用 Epac 和/或 PLD 抑制剂和另一种止痛剂，在顺序给药时，在施用第二种制剂前，甚至还可以有些延迟(如几分钟或甚至几小时或几天)，只要当服用第二种给药制剂或第二种给药制剂在该患者体内起作用时，第一种给药制剂仍对生物体保持某些生理作用。

本文所用术语“减轻疼痛”是指使患者感觉的疼痛水平相对于不进行干预的患者感觉的疼痛水平降低。当所述患者是人时，患者感觉的疼痛水平可以通过让他或她描述疼痛或其它痛性经历相比来进行测定。或者，疼痛水平可以通过测量患者对疼痛的物理反应来进行测定，如压力相关因子的释放或外周神经系统或 CNS 中的疼痛转换神经的活性。还可以通过测量无疼痛存在的报告人或要终止正具疼痛症状的患者所需要的已知止痛剂的量来进行测定。疼痛减轻还可以通过阈值的增加来进行测量，在该阈值患者在给定刺激下感受到疼痛。在某些实施方式中，疼痛减轻是通过降低“痛觉过敏”来实现的，“痛觉过敏”是对伤害性刺激的增高敏感性，而且发生这种抑制并不会损害伤害感受性，即患者对“伤害性刺激”的正常敏感性。

对于疼痛减轻来说，“有需要的患者”是指料想近期会经历疼痛的动物或人，优选人。所述动物或人可能正处于疼痛状态下，而且很可能将继续引发疼痛。或者，所述动物或人已经、正在或将遭受通常具有疼痛后果的过程或

事件。慢性疼痛症诸如糖尿病神经性痛觉过敏和胶原血管病是第一种类型的实例；牙科行为，特别是伴有炎症或神经损伤、和毒素接触(包括接触化疗制剂)的行为是后一种类型的实例。

“炎性痛”是指由炎症引起的疼痛。炎性痛经常会表现为对机械刺激提高的敏感性(机械性痛觉过敏或敏感)。

“神经性痛”是指由神经损伤所致病症或事件而引起的疼痛。“神经病”是指一种导致神经损害的疾病。“灼痛”是指神经受损后的慢性疼痛状态。“痛觉超敏(Allodynia)”是指个人对常规非痛性刺激诸如温柔接触到疼痛的状态。

如本文所用，术语“全身性疼痛症”是指一些先天性疼痛综合症(如纤维肌痛、过敏性肠综合症、和颞下颌关节紊乱症)，目前其致病机理还未知，特征是扩散的或全身性疼痛，且确诊排除了炎症或神经病是其直接的疼痛病因。

“止痛剂”是指一种导致疼痛减轻的分子或分子组合。当止痛剂的作用机理并不涉及直接(通过静电或化学相互作用)与 Epac、PLC ϵ 或 PLD 或任何 Epac/PLC ϵ /PLD 通道内的胞内分子相互作用，和减弱 Epac、PLC ϵ 或 PLD 或任何 Epac/PLC ϵ /PLD 通道内的胞内分子的作用或功能时，止痛剂会采用非抑制 Epac、PLC ϵ 或 PLD 的作用机理。

“镇静药”是指一类用于治疗精神病症的镇静药物，其调节中枢神经系统中的神经递质活性并通过调节乙酰胆碱、多巴胺、去甲肾上腺素、五羟色胺或 γ 氨基丁酸(GABA)传导来起作用。

“急性”和“慢性”疼痛之间的区别在于时间：急性疼痛是在引发所述疼痛的事件发生(如炎症或神经损伤)后，很快(如通常在约 48 小时内，更典型地是约 24 小时内，最典型地是约 12 小时内)就经历。相反，在经历慢性疼痛和引发所述疼痛的事故之间有很明显的时间延迟。这个时间延迟通常是所述事件后至少约 48 小时，更典型地是所述事件后至少约 96 小时，最典型地是所

述事件后至少约1周。

“待测试剂”是任何能在本发明的预筛选或筛选分析中被筛选的试剂。所述待测试剂可以是任何适合的组合物，包括小分子、肽或多肽。

减轻疼痛的方法

A. 一般描述

本发明提供了一种减轻疼痛的方法。该方法包括给有需要的患者施用有效量的 Epac、磷脂酶 C- ϵ (PLC ϵ)和/或磷脂酶 D(PLD)的抑制剂。

本发明的患者可以是任何能表达 Epac、磷脂酶 C- ϵ (PLC ϵ)和/或 PLD 且具有可检测的疼痛反应的个体。适合的患者实例包括研究动物，比如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猫、狗、以及猴和其它灵长类和人。在一特别有用的实施方式中，所述患者遭受痛觉过敏，施用了本发明的抑制剂减轻了痛觉过敏，优选不会影响伤害感受。在该例中，用所述抑制剂治疗的患者将会使过度的疼痛减轻，比如由无伤害性刺激引起的疼痛，但同时还能正常地感觉对伤害性刺激的疼痛。

在一实施方式中，所述患者患有炎性痛，其可以是急性的或慢性的。可通过抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的治疗得到缓解的炎性痛实例包括由于晒伤、关节炎、结肠炎、心肌炎、皮炎、肌炎、神经炎、粘膜炎、尿道炎、膀胱炎、胃炎、肺炎和胶原血管病引起的疼痛。

在另一实施方式中，所述患者患有神经性痛，其也可以是急性的或慢性的。可通过抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的治疗得到缓解的神经性痛实例包括由于病症如灼痛、糖尿病、胶原血管病、三叉神经痛、脊髓损伤、脑干损伤、丘脑疼痛综合症、I 型复杂区域疼痛综合症/反射性交感神经营养不良症、Fabry's 综合症、小纤维神经病、癌症、癌症化疗、慢性酒精中毒、中风、脓

肿、脱髓鞘疾病、病毒性感染、抗病毒治疗、艾滋病和艾滋病治疗引起的疼痛。由于如外伤、手术、截肢、毒素和/或化疗引起的炎性痛也可以用本发明的抑制剂来进行治疗。

在特定具体实施方式中，所述患者患有全身性疼痛症，比如纤维肌痛、过敏性肠综合症和/或颞下颌关节紊乱症。

本发明的方法包括将 Epac, PLC ϵ , 和/或 PLD 抑制到足以降低患者疼痛体验的程度。在不同实施方式中，Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 被抑制至少约 10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 95%，这可以通过任何适合的 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 抑制测量法(如本文所描述的任何分析法)来测定。

1. 对 Epac 的抑制

患者能耐受的 Any 类型的 Epac 抑制剂都可在本发明的方法中使用。因此，所述抑制剂可以是多肽(比如抗 Epac 抗体)、多核苷酸(比如，编码抑制性多肽的抑制性 RNA 或多核苷酸)或小分子。在具体实施方式中，当该抑制剂是多核苷酸编码的抑制性多肽时，将所述多核苷酸导入患者细胞内，在该细胞内此编码多肽能以足以抑制 Epac 的量表达。

Epac 抑制可通过任何可用方式获得，如(1)抑制 Epac 的表达、mRNA 稳定性、蛋白运输、或修饰；(2)刺激 Epac 降解；或(3)抑制 Epac 的一种或多种正常功能，比如鸟嘌呤交换。在优选实施方式中，Epac 抑制剂直接对 Epac 起作用。

在一实施方式中，Epac 抑制是通过降低任意靶组织中的 Epac 多肽水平来获得的，在所述靶组织中 Epac/PLC ϵ /PLD 通道有活性。该通道在如中枢神经系统神经元中，尤其是背根神经节神经元中，更尤其是同工凝集素 B4-阳性 (IB4(+))伤害感受体中是有活性的。可以使用如反义或 RNA 干扰(RNA_i)技术

来使 Epac 水平降低。

在其它具体实施方式中，Epac 抑制剂可以通过如下所述的本发明筛选方法鉴定的肽或小分子。

2. 对 PLC ϵ 的抑制

可以按照本发明的方法，利用患者能耐受的任何类型的 PLC ϵ 抑制剂来对 PLC ϵ 进行抑制。因此，所述抑制剂可以是多肽(比如抗 PLC ϵ 抗体)、多核苷酸(比如编码抑制性多肽的抑制性 RNA 或多核苷酸)或小分子。在具体实施方式中，当该抑制剂是多核苷酸编码的抑制性多肽时，将所述多核苷酸导入患者细胞内，在该细胞内此编码多肽能以足以抑制 PLD 的量表达。

PLC ϵ 抑制可通过任何可用方式获得，如(1)抑制 PLC ϵ 的表达、mRNA 稳定性、蛋白运输、或修饰；(2)刺激 PLC ϵ 降解；或(3)抑制 PLC ϵ 的一种或多种正常功能，比如磷脂(主要是磷脂酰肌醇)水解生成三磷酸肌醇以及甘油二酯(DAG)。在优选实施方式中，PLC ϵ 抑制剂直接对 PLC ϵ 起作用。

在一实施方式中，PLC ϵ 抑制是通过降低任意靶组织中的 PLC ϵ 水平而获得的，在所述靶组织中 Epac/PLC ϵ /PLD 通道是有活性的，比如在中枢神经系统神经元中，尤其是背根神经节神经元中，更尤其是同工凝集素 B4-阳性(IB4(+))伤害感受体中是有活性的。可以使用如反义或 RNA 干扰(RNA_i)技术来使 PLC ϵ 水平降低。

在优选的实施方式中，PLC ϵ 抑制剂可以是如肽或小分子。对一些 PLC 肽或小分子抑制剂已有描述，包括 PI-PLC 抑制剂 U-73122(可从 Sigma 购得)、ET-18OCH₃(Siese, A.等, Scand J Immunol. 1999 年 2 月, 49(2): 139-48)和新霉素。适合具体应用的 PLC ϵ 抑制剂的选择是在本领域技术人员水平之内的。

PLC ϵ 抑制剂对 PLC ϵ 可以是非选择性的或选择性的。优选的实施方式使

用选择性 PLC ϵ 抑制剂。

3. 对 PLD 的抑制

可以按照本发明的方法, 利用患者能耐受的任何类型的 PLD 抑制剂来对 PLD 进行抑制。因此, 所述抑制剂可以是多肽(比如抗 PLD 抗体)、多核苷酸(比如编码抑制性多肽的抑制性 RNA 或多核苷酸)或小分子。在具体实施方式中, 当该抑制剂是多核苷酸编码的抑制性多肽时, 将所述多核苷酸导入患者细胞内, 在该细胞内此编码多肽能以足以抑制 PLD 的量表达。

PLD 抑制可通过任何可用方式获得, 如(1)抑制 PLD 的表达、mRNA 稳定性、蛋白运输、或修饰; (2)刺激 PLD 降解; 或(3)抑制 PLD 的一种或多种正常功能, 比如磷脂(主要是卵磷脂)水解生成磷脂酸, 磷脂酸转换成甘油二酯(DAG)。在优选的实施方式中, PLD 抑制剂直接对 PLD 起作用。

在一实施方式中, PLD 抑制是通过降低任意靶组织中的 PLD 水平而获得的, 在所述靶组织中 Epac/PLC ϵ /PLD 通道是有活性的, 比如在中枢神经系统神经元中, 尤其是背根神经节神经元中, 更尤其是同工凝集素 B4-阳性(IB4(+))伤害感受体中有活性。可以使用如反义或 RNA 干扰(RNA_i)技术来使 PLD 水平降低。

在优选实施方式中, PLD 抑制剂可以是比如肽或小分子。对一些分子 PLD 抑制剂都已有描述, 包括乙二胺四乙酸三钾盐脱水物(Sigma)、乙二醇-二(2-氨基乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸(Sigma)、C(2)-神经酰胺(Nishimaru, K., 等, J. Pharmacol. Sci.(2003)92: 196-202)和 1-丁醇(Jackson, T.C., 等, J. Pharm. Exp. Therapeutics Fast Forward(2004)DOI: 10.1124/jpet.103.063081)。适合具体应用的 PLD 抑制剂的选择是在本领域技术人员水平之内的。

PLD 抑制剂对 PLD 可以是非选择性的或选择性的。优选的具体实施方式

使用选择性 PLD 抑制剂。

4. 抑制 Epac, PLC ϵ , 和/或 PLD 的方法

能抑制任意感兴趣基因或蛋白的各种技术都是可用的。它们都可在本发明的方法中使用, 包括下面描述的 5 种示例性技术。

a. 反义法

可以利用反义分子来降低 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 基因表达或完全阻断其表达。“反义序列或反义多核苷酸”是与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 编码 mRNA 序列或其子序列互补的多核苷酸。反义分子与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA 的结合会干扰该编码多肽的正常翻译。

因此, 在具体实施方式中, 本发明提供了用于抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的反义分子。适合的反义分子包括能与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA 杂交的寡核苷酸和寡核苷酸类似物。所述寡核苷酸和寡核苷酸类似物能够抑制 RNA 的功能, 抑制其翻译成蛋白, 移位至细胞质, 或抑制对整个生物功能来说所必需的任何其它活性。mRNA 无法实现其全部或部分正常功能会部分或完全抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多肽的表达。

可用于本发明的反义方法中的寡核苷酸包括通过天然磷酸二酯键连接从天然存在的碱基和/或环呋喃糖基形成的寡核苷酸。术语“寡核苷酸”包括与寡核苷酸功能类似但具有非天然存在部分的实体。因此, 寡核苷酸可以包括变化的糖部分或糖内键。这其中的实例是硫代磷酸酯和本领域所熟知的其它含硫物。按照某些优选的实施方式, 寡核苷酸中的至少一个磷酸二酯键已经被一结构取代, 该结构的作用是能够提高组合物渗入到活性会受到调控的 RNA 所在的细胞区域内的能力。优选地, 所述取代包括硫代磷酸酯键、甲基磷酸酯键、或短链烷基或环烷基结构。按照其它优选实施方式, 用基本同时是非

离子性和非手性的结构，或用手性和对映异构特异性的结构取代磷酸二酯键。本领域的常规技术人员应该能够选出适合用于本发明操作的其它键。

在代表性的实施方式中，核苷酸间磷酸二酯键被肽键取代。这样的肽多核苷酸显示了提高的稳定性，更容易渗入细胞，而且显示对其靶标的亲和性增强。制备肽多核苷酸的方法是本领域技术人员所熟知的(参见如美国专利号：6,015,887、6,015,710、5,986,053、5,977,296、5,902,786、5,864,010、5,786,461、5,773,571、5,766,855、5,736,336、5,719,262 和 5,714,331)。

可用于本发明反义法中的寡核苷酸还包括一种或多种修饰的碱基形式。因此，可以使用除了常在自然界中出现的嘌呤和嘧啶之外的嘌呤和嘧啶。类似地，只要坚持本发明的基本原则，还可以对核苷酸亚单位的呋喃糖部分进行修饰。这种修饰实例是 2'-O-烷基-和 2'-卤素-取代的核苷酸。可用于本发明的糖部分 2'位上的某些特定修饰实例是：OH、SH、SCH₃、F、OCH₃、OCN、O(CH₂)[n]NH₂ 或 O(CH₂)[n]CH₃，其中 n 是从 1 至约 10，以及其它具有相似性质的取代基。

所有这些类似物均可在本发明的反义法中使用，只要该类似物具有能有效地与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA 杂交并且抑制此 RNA 功能的功能。

本发明的反义寡核苷酸优选包括约 3 至约 50 个亚基(即非修饰性多核苷酸中的碱基)。优选，所述寡核苷酸和类似物包括约 8 至约 25 个亚基，而且更优选含有约 12 至约 20 个亚基。本发明所用的寡核苷酸可利用熟知的固相合成技术来便利且常规地制备而成。有一些卖方销售此种合成设备(如 Applied Biosystems)。

可以根据常规惯例，合成、配制本发明的反义寡核苷酸，并施用给细胞、组织或生物体。下面将讨论关于给药和剂量的常规考虑。对于含有 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多核苷酸抑制剂的组合物，下面讨论了含至少一种能促进多核苷酸

进入细胞内的成分的配方。本领域的技术人员将很容易理解,这样的讨论也同样适用于RNAi中使用的反义寡核苷酸,催化性RNA和DNA,和双链RNA。类似地,本领域的技术人员可以理解,如下面所述的多核苷酸抑制剂一样,反义寡核苷酸一般也能被导入到宿主细胞中。

b. 催化性 RNA 和 DNA

(1)核酶

在另一方法中,可利用核酶来抑制Epac、PLC ϵ 和/或PLD表达。如本文所用,“核酶”包括具有用于特异性识别的反义序列和RNA-酶切活性的RNA分子。所述催化链优选以高于化学计量浓度切割靶(Epac、PLC ϵ 和/或PLD)RNA中的特异性位点。本发明的核酶典型地由RNA组成,但该核酶也可以由含嵌合多核苷酸序列(如DNA/RNA序列)的多核苷酸分子和/或多核苷酸类似物(如硫代磷酸酯)组成。

因此,本发明的一方面包括具有抑制Epac、PLC ϵ 和/或PLD表达能力的核酶。所述核酶可以是比如“锤头(hammerhead)”型(如Forster和Symons (1987) Cell 48: 211-220; Haseloff和Gerlach (1988) Nature 328: 596-600; Walbot和Bruening (1988) Nature 334: 196; Haseloff和Gerlach (1988) Nature 334: 585所述); Rossi等, (1991) Pharmac. Ther. 50: 245-254)或“发夹”型(参见如,美国专利5,254,678和Hampel等,欧洲专利申请号0 360 257,1990年3月26日公开; Hampel等, (1990) Nucl. Acids Res. 18: 299-304),并且具有特异性靶定和切割Epac、PLC ϵ 和/或PLD多核苷酸的能力。

发夹核酶所需序列是由NNNBN*GUCNNNNNN序列组成的任意RNA序列(其中N*G是切割位点, B是G、C或U, N是G、U、C或A)(SEQ ID NO: 1)。适合发夹核酶的Epac、PLC ϵ 和/或PLD识别或靶序列可以很容易地从Epac、

PLC ϵ 和/或 PLD 序列确定。

锤头核酶切割位点所需序列是由 NUX 组成的任意 RNA 序列(其中 N 是 G、U、C 或 A, X 代表 C、U 或 A)。因此,发夹前导序列中的同一靶标 GUC,可用于锤头核酶。锤头核酶或发夹核酶的其它核苷酸是根据靶序列两侧的核苷酸和锤头共有序列确定的(参见 Ruffner 等, (1990) *Biochemistry* 29: 10695-10702)。

Cech 等(美国专利 4,987,071)已经公开了某些具有核糖核酸内切酶活性的合成核酶的制备和应用。这些核酶是以四膜虫核糖体 RNA 自剪接反应为基础,需要 8 个碱基对的靶位点。据报道,核糖核酸内切酶活性的最适宜温度是 50°C。切割产生的片段包括 5'磷酸脂和 3'羟基和连接在被切割的 RNA 5'端的游离鸟嘌呤核苷。本发明优选的核酶能在生理学温度下有效地与靶序列杂交,从而使其尤其适合体内使用。

可用本领域熟知的适合多核苷酸分子合成的方法化学合成核酶,以及编码这些核酶的 DNA,和其它适合的多核苷酸分子。或者, Promega, Madison, Wis., USA 提供了一系列适合制备 RNA 分子比如核酶的规程。核酶还可以从与 RNA 聚合酶启动子,如 T7 RNA 聚合酶或 SP6 RNA 聚合酶的启动子可操作地连接的 DNA 分子或其它多核苷酸分子(其通过转录产生 RNA 分子)制备而成(如提供起始位点和转录模版的载体)。因此,本发明还提供了编码本发明核酶的多核苷酸分子,如 DNA 或 cDNA。当所述载体还包括与所述多核苷酸分子可操作连接的 RNA 聚合酶启动子时,可以通过将 RNA 聚合酶和适合的核苷酸一起放置,从而在体外制备产生所述核酶。在独立实施方式中,可将 DNA 插入到表达框内(参见如, Gotten 和 Birnstiel (1989) *EMBO J* 8(12): 3861-3866; Hempel 等 (1989) *Biochem.* 28: 4929-4933,等)。

在合成之后,将具有稳定核酶能力的 DNA 分子与核酶连接来进行修饰,

从而使其对 RNase 有抗性。或者, 可将核酶修饰成在脂质体传递体系中使用
的相应的硫代磷酸类似物。这种修饰还可以使核酶具有对核酸内切酶活性的
抗性。

可以根据常规惯例, 合成、配制核酶或其编码多核苷酸(如 DNA 载体),
并施用给细胞、组织或生物体。下面将讨论关于给药和剂量的常规考虑。关
于含有 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多核苷酸抑制剂的组合物, 下面讨论了含至少
一种能促进多核苷酸进入细胞内的成分的配方。本领域的技术人员应很容易
理解, 如下面所述的多核苷酸抑制剂一样, 核酶或其编码多核苷酸一般也能
被导入到宿主细胞中。

当载体含有与 RNA 转录启动子相连的编码核酶时, 当宿主细胞在利于该
载体转录的适合条件下生长时, RNA 可以在该宿主细胞中产生。所述载体可
以是, 但不限于: 质粒、病毒、逆转录转座子和粘粒。所述载体的实例已在
美国专利号 5,166,320 中公开。其它代表性的载体包括但不限于腺病毒载体(如
WO 94/26914, WO 93/9191; KoIIIs 等 (1994) PNAS 91(1): 215-219; Kass-Eisler
等, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 90(24): 11498-502, Guzman 等(1993)
Circulation 88(6): 2838-48, 1993; Guzman 等 (1993) Cir. Res. 73(6): 1202-1207,
1993; Zabner 等 (1993) Cell 75(2): 207-216; Li 等 (1993) Hum Gene Ther. 4(4):
403-409; Caillaud 等 (1993) Eur. J Neurosci. 5(10): 1287-1291), 腺相关 1 型
病毒载体(“AAV-1”)或腺相关 2 型病毒载体(“AAV-2”)(参见 WO 95/13365; Flotte
等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 90(22): 10613-10617), 逆转录病毒载
体(如 EP 0 415 731、WO 90/07936、WO 91/02805、WO 94/03622、WO 93/25698、
WO 93/25234、美国专利号 5,219,740、WO 93/11230、WO 93/10218)和疱疹病
毒载体(如美国专利号 5,288,641)。在基因治疗中利用这些载体的方法是本领
域所熟知的, 参见如 Larrick 和 Burck (1991) Gene Therapy: Application of

Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, New York, 和 Kreigler (1990) Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York。

为了在体内利用这些载体来制备核酶, 编码核酶的核苷酸序列优选地可操作地与强启动子比如 lac、SV40 晚期、SV40 早期或 λ 启动子连接。

(2)催化性 DNA

以类似于核酶的方式, DNA 分子也具有催化(如核酸酶)活性。举例来说, 高催化性物种已经通过定向进化和选择而得以发展。从含 50 个随机核苷酸的 10^{14} DNA 群开始, 进行连续轮的选择性扩增, 富集得到大量最能促进对位于其它全-DNA 序列中的靶核糖核苷 3'-O-P 键的 Pb^{2+} -依赖性切割的个体。到第五次循环时, 该 DNA 群的整体反应速度是 0.2 min^{-1} 。在从该 DNA 群分离的 20 个单独序列的基础上, 分子间运作的催化性结构域的简化形式转换率为 1 min^{-1} (参见如, Breaker 和 Joyce (1994) Chem Biol 4: 223-229)。

在后面的工作中, 利用相似策略, 在模拟的生理条件下, 制备能切割几乎任何靶 RNA 底物的 DNA 酶。该酶由 15 个脱氧核苷酸的催化结构域组成, 两侧是均由 7-8 个脱氧核苷酸组成的两个底物识别结构域。该 RNA 底物通过 Watson-Crick 碱基配对连接, 在位于未配对嘌呤和配对嘧啶残基之间特定的磷酸二酯处被切开。尽管 DNA 酶的大小较小, 但在多个转换条件下, DNA 酶的催化效力(k_{cat}/K_m)为约 $10^9 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$, 超过了任何其它已知的多核苷酸酶。通过改变底物识别结构域的序列, 可让 DNA 酶靶定不同的 RNA 底物(Santoro 和 Joyce (1997) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 94(9): 4262-4266)。修饰合适的靶序列(如 Santoro 和 Joyce 所述, 见上)可以很容易地让 DNA 酶重新靶定 Epac、 $PLC\epsilon$ 、和/或 PLD mRNA, 而且可以如上述 Epac、 $PLC\epsilon$ 和/或 PLD 核酶基本

相同的方式来使用。

c. RNAi 法

转录后基因沉默(PTGS)或 RNA 干扰(RNAi)是指当注入,或以其它方式导入细胞时,双链(有义链)RNA(dsRNA)特异性阻断其同源基因表达的机制。该方法是基于观察到将反义或有义 RNA 链注射入线虫(*C. elegans*)细胞会导致基因特异性失活而形成的(Guo 和 Kempheus (1995) Cell 81: 611-620)。虽然由反义链引起的基因失活是可预期的,但由有义链引起的基因沉默就是无法预料的。令人吃惊的是,确定基因特异性失活实际上是由于痕量的污染 dsRNA(Fire 等, (1998) Nature 391: 806-811)。

自此以后,已经在许多种生物体中证明存在此种模式的转录后基因沉默:植物、苍蝇、锥体虫、涡虫、水螅、斑马和小鼠(Zamore 等 (2000) Cell 101: 25-33; Gura (2000) Nature 404: 804- 808)。RNAi 活性与完全不同于转座子-沉默、抗病毒防御机制和基因调节的功能(1999) Cell 96: 303- 306)有关。

通过将 dsRNA 注入组织,不仅可以使特异性基因在这些组织中失活,而且可以在各种发育阶段中失活。这与组织-特异性敲除或组织-特异性显性失活(dominant-negative)基因表达相反,其不会在发育过程的各种阶段中让基因沉默(Gura (2000) Nature 404: 804-808)。

可以根据常规惯例,配制 dsRNA,并将它施用给细胞、组织或生物体。下面将讨论关于给药和剂量的常规考虑以及含有至少一种能促进多核苷酸进入细胞内的成分的配方(下面讨论的是关于含有 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多核苷酸抑制剂的组合物)。本领域的技术人员将很容易理解,如下面描述的多核苷酸抑制剂一样,dsRNA 一般也能被导入到宿主细胞中。另外,可以用一种或多种载体来合成 dsRNA,所述载体设计用于转录两个杂交形成 dsRNA 的互补

RNA 链(参见以上关于核酶的方法讨论)。利用本文所述的或适合此目的的本领域已知的任何技术,可将它们导入宿主细胞。

在导入细胞后,显示 dsRNA 被切成 21-23-核苷酸片段。这些片段随后靶定其相应 mRNA 的同源区域,杂交并产生适合核酸酶的双链底物,该核酸酶将双链底物降解成相同大小的片段(Hammond 等 (2000) Nature 404: 293-298; Zamore 等 (2000) Cell 101: 25-33)。

d. “敲除”法

在另一种方法中,可以仅通过分别“敲除”Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 基因来抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD。通常,这是通过破坏 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 基因,破坏调节基因的启动子或破坏启动子和基因间的序列来实现的。这种破坏可以通过同源重组来特异性针对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 进行,其中“敲除构建体”包括与该构建体要靶定的结构域互补的侧翼序列。敲除构建体插入(比如插入 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 基因中)会破坏该基因。短语“基因的破坏”和“基因破坏”是指将核苷酸序列插入到天然 DNA 序列的一区域(通常是一种或多种外显子)和/或基因启动子区域内,从而与野生型或天然存在的基因序列相比,减少或防止该基因在细胞中的表达。通过实例的方式,可将核酸构建体制备成含有编码抗生素抗性基因的 DNA 序列,将其插入互补于需要破坏的 DNA 序列(启动子和/或编码区)的 DNA 序列中。当随后将该核酸构建体转染入细胞后,该构建体会整合入基因组 DNA。这样,由于该基因现在被抗生素抗性基因破坏,因此该细胞和其后代将不再表达该基因或将以衰退水平表达。

可以用本领域技术人员已知的常规技术来制备敲除构建体。敲除构建体可以是化学合成的或组装的,比如利用重组 DNA 法。用选择来剪切一个或多个位点的特定限制性内切酶将用于制备所述敲除构建体的基因组 DNA 序列

消化，从而使新的编码如标记基因的 DNA 序列可以被插入到该 DNA 序列的该合适位点内。合适的标记基因插入位点是用于防止天然基因表达的位点；该位点取决于各种因素，如要进行切割的序列的限制性酶切位点，以及是否会阻断外显子序列或启动子序列，或这两者(即抑制启动子功能或抑制天然外显子合成所必需的精确的插入位点)。优选地，选择用于切断 DNA 的酶将会产生一长臂和一短臂，其中短臂有至少约 300 个碱基对(bp)。在某些情况下，期望能实际上去除掉部分或甚至全部的要抑制的基因的一或多个外显子，以便当标记基因插入到敲除构建体内时，保持敲除构建体的长度能够和原始的基因组序列相当。在此种情况下，用合适的限制性核酸内切酶切割基因组 DNA，这样就可以去除合适大小的片段。

标记基因可以是任何可测量和/或可分析的核酸序列；但通常是抗生素抗性基因或其它基因，该基因在基因组中的表达或存在可被很容易地检测到。标记基因通常可操作地与其自己的启动子连接或与来自任何来源的另一种强启动子连接，该启动子在其要导入的细胞中有活性或容易被激活；但标记基因并不必须与其自己的启动子相连接，因为它可以利用将被抑制的基因启动子来转录。另外，标记基因通常包含与基因的 3'端相连的 polyA 序列；该序列用作终止基因转录。优选的标记基因是任何抗生素抗性基因，包括但不限于 neo(新霉素抗性基因)和 β -gal(β -半乳糖苷酶)。

在用合适的限制性内切酶消化基因组 DNA 序列之后，用本领域技术人员熟知的方法将标记基因序列连接到基因组 DNA 序列内(参见如 Berger 和 Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, 第 152 卷, Academic Press, Inc. San Diego, CA; Sambrook 等 (1989) Molecular Cloning-A Laboratory Manual(第二版) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; 和 Current Protocols in Molecular Biology, F.M.

Ausubel 等编, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc., (1994)增刊)。

可以利用基因治疗运载工具(如逆转录病毒、脂质体、脂质、树状聚合物(dendrimers)等)将所得敲除构建体运载至体内细胞。敲除基因的方法在文献中进行了详述,为本领域技术人员所熟知(参见如 Thomas 等 (1986) Cell 44(3): 419-428; Thomas 等 (1987) Cell 51(3): 503-512; Jasin 和 Berg (1988) Genes & Development 2: 1353-1363; Mansour 等 (1988) Nature 336: 348-352; Brinster 等 (1989) Proc Natl Acad Sci 86: 7087-7091; Capecchi (1989) Trends in Genetics 5(3): 70-76; Frohman 和 Martin (1989) Cell 56: 145-147; Hasty 等 (1991) Mol Cell Bio 11(11): 5586-5591; Jeannotte 等 (1991) Mol Cell Biol. 11(11): 5578-5585; 和 Mortensen 等 (1992) Mol Cell Biol. 12(5): 2391-2395。

利用同源重组来改变外源基因表达还在美国专利 5,272,071、WO 91/09955、WO 93/09222、WO 96/29411、WO 95/31560 和 WO 91/12650 中有详述。

虽然胚胎干(ES)细胞可用于制备敲除动物,但 ES 细胞并不是必需的。在不同实施方式中,可利用体细胞核移植法来获得敲除动物。在优选的实施方式中,利用这种方法,从待敲除 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 基因的物种中获得体细胞。用构建体转染该细胞,所述构建体在 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 基因中产生破坏(如通过同源重组)。比如通过对用于破坏天然基因的标记基因所编码的标记物的表达进行筛选,选出含有被敲除 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 基因的细胞。然后,将含有该敲除的细胞核置于未受精的去核卵子内(如已通过显微外科手术去除掉其中的天然胞核的卵子)。一旦完成转移,受体卵子就会正如它已接受了精子受精一样含有一套完整的基因。然后,在移植到宿主哺乳动物(与提供卵子的是同一物种)之前,将该卵子培养一段时间,使该宿主哺乳动物怀孕,

生出包括核酸构建体的转基因动物，该核酸构建体含有一或多个被破坏的 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 基因。

据报道，在对培养的体细胞进行核转移后获得可育克隆哺乳动物可适用于各种物种，包括但不限于：青蛙(McKinnell (1962) J. Hered. 53, 199-207)、小牛(Kato 等 (1998) Science 262: 2095-2098)、羊(Campbell 等 (1996) Nature 380: 64-66)、小鼠(Wakayama 和 Yanagimachi (1999) Nat. Genet. 22: 127-128)、山羊(Baguisi 等 (1999) Nat. Biotechnol. 17: 456-461)、猴(Meng 等 (1997) Biol. Reprod. 57: 454-159)和猪(Bishop 等 (2000) Nature Biotechnology 18: 1055-1059)。已用核转移法获得了转基因动物克隆。因此，例如，已有报道通过体细胞核转移获得了含有人抗凝血酶(antithrobin)III 基因的转基因山羊(Baguisi 等 (1999) Nature Biotechnology 17: 456-461)。

通过利用能无性地繁殖的已分化的细胞源，体细胞核转移简化了转基因步骤。这就不需要保持细胞处于未分化状态，这样，基因修饰，随机整合和基因靶定，都会很容易实现。而且，通过将核转移和能在体外对这些细胞进行修饰和选择的能力相组合，该方法比先前的转基因胚胎技术更有效。

核转移技术或核移植在文献中是已知的。参见，特别是，Campbell 等 (1995) Theriogenology, 43: 181; Collas 等 (1994) Mol. Report Dev., 38: 264-267; Keefer 等 (1994) Biol. Reprod., 50: 935-939; Sims 等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 90: 6143-6147; WO 94/26884; WO 94/24274, WO 90/03432, 美国专利 5,945,577、4,944,384、5,057,420 等等。

e. 胞内抗体(Intrabodies)

在另一个实施方式中，可以通过导入核酸构建体来抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 表达/活性，所述构建体将在靶细胞内表达胞内抗体。胞内抗体是一种

细胞内抗体, 在本例下, 能够识别和结合 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多肽。胞内抗体用“抗体框”表达, 该框包含: (1)足量的编码能结合靶标(Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多肽)的抗体部分的核苷酸, 该核苷酸可操作地连接到(2)能让该抗体在感兴趣的细胞内表达的启动子。将编码该胞内抗体的构建体运送至细胞内, 在该细胞内该抗体胞内表达, 并与靶标 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 结合, 从而阻断靶标形成其正常活性。

在优选实施方式中, 抗体框的“胞内抗体基因”包括编码抗体重链可变(V_H)和轻链可变(V_L)结构域的 cDNA, 其能在 DNA 水平利用合适的寡核苷酸接头而连接, 在翻译时, 形成能结合靶标如 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 蛋白的单个肽(称作单链可变片段"sFv")。优选地, 胞内抗体基因并不编码可操作的分泌序列, 这样表达的抗体保留在细胞内。

适合在本发明方法中作为胞内抗体使用/表达的抗-Epac、PLC ϵ 、和/或 PLD 抗体可以很容易地采用各种方法制备。这些方法包括但不限于: 产生多克隆抗体的常规方法, 可对该方法进行改进而形成单链抗体; 或筛选比如噬菌体展示文库以选出对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 显示高特异性和/或亲和力的抗体的常规方法。

采用适合将多核苷酸导入细胞的任何方法, 将抗体框运送至细胞内。优选的运送系统在美国专利 6,004,940 中有说明。制备和利用胞内抗体的方法详述于美国专利 6,072,036、6,004,940 和 5,965,371 中。

5. 抑制剂与其它试剂的共给药

在本方法的具体实施方式中, 将 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 抑制剂与止痛剂一起共给药, 所述止痛剂通过与所述抑制剂不同的机制来起作用。在该实施方式的一种变形中, 止痛剂是通过调节不同的信号通道, 比如蛋白激酶 A 通

道来起作用的。这些试剂的实例包括一氧化氮, MAPK(ERK1/2、JNK)、神经酰胺(ceramide)、 Ca^{2+} 、Nav1.8、TRPV1。该实施方式可用于比如从效力和/或效力持续时间来说获得更全面的疼痛减轻, 用于拓宽通过该方法治疗的疼痛的不同类型谱, 和/或用于降低抑制剂和/或止痛剂达到预期效果所需的剂量。在该实施方式中, 当与选定的 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 抑制剂共给药时, 施用的止痛剂量足以使患者的痛觉消失。

患者能耐受的任何类型的止痛剂都可以用于本发明的方法中。实例包括蛋白激酶 A(PKA)抑制剂、cAMP 抑制剂、非甾体类抗炎药物(如对乙酰氨基酚)、前列腺素合成抑制剂、局部麻醉剂和阿片受体激动剂。

不是止痛剂但能用于治疗伴有明显疼痛的病症的其它试剂包括抗惊厥药、抗抑郁药和镇静药。

可以通过同时给药或顺序给药将 Epac、PLC ϵ 和/或 PLC 抑制剂与止痛剂或其它试剂一起共给药。在顺序给药时, 首先给药的试剂必须在施用第二个给药试剂时或在第二给药试剂在生物体内产生活性时能对生物体发挥生理作用。

B. 组合物

为了便于研究和治疗性应用, 通常对 Epac、PLC ϵ 或 PLD 抑制剂进行配制, 从而以足以在靶位点抑制 Epac、PLC ϵ 或 PLD 的量将抑制剂运送到靶位点。在抑制剂组合物中可以任选地包括止痛剂或其它试剂, 以便将有效的量运送至其靶位点。

在所述方法特定实施方式中, 将 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 抑制剂与止痛剂配制在一起, 所述止痛剂通过不同于所述抑制剂的机制来起作用。在该实施方式的一种变形中, 止痛剂是通过调节不同的信号通道, 比如蛋白激酶 A 通

道来起作用的。这些试剂的实例包括一氧化氮、MAPK(ERK1/2, JNK)、神经酰胺、 Ca^{2+} 、 NaV1.8 、TRPV1。

患者能耐受的任何类型的止痛剂都可以用于本发明的方法中。如上所述, 实例包括蛋白激酶 A(PKA)抑制剂、cAMP 抑制剂、非甾体类抗炎药物、前列腺素合成抑制剂、局部麻醉剂和阿片受体激动剂。

如上所述, 不是止痛剂但能用于治疗伴有明显疼痛的病症的其它试剂包括抗惊厥药、抗抑郁药和镇静药。因此, 这些试剂还可任选地包括在本发明的组合物中。

本发明的抑制剂组合物任选地包括其它组分, 包括如储存液, 比如合适的缓冲液如生理缓冲液。在优选的实施方式中, 所述组合物是药学组合物, 而且另一组分是药学上可接受的载体, 如 Remington's Pharmaceutical Sciences(1980), 第 6 版, Osol 编, 1980 中所描述的。

适合用于本发明的药学上可接受的载体在所施用的剂量下对细胞、组织、或患者是无毒的, 可以包括缓冲液(如磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液和由其它有机酸制成的缓冲液)、抗氧化剂(如抗坏血酸)、低分子量(小于约 10 个残基)肽、多肽(如血清白蛋白、明胶和免疫球蛋白)、亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮)、氨基酸(如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸和/或赖氨酸)、单糖、二糖和/或其它碳水化合物(包括葡萄糖、甘露糖和糊精)、螯合剂(如乙二胺四乙酸[EDTA])、糖醇(如甘露醇和山梨醇)、成盐平衡离子(如钠)和/或阴离子表面活性剂(如 Tween™、Pluronic™和 PEG)。在一实施方式中, 药学上可接受的载体是含水 pH-缓冲溶液。

特定具体实施方式包括缓释药学组合物。示例性的缓释组合物包括与抑制剂结合或包裹抑制剂的固态疏水聚合物的半透性基质。适合的聚合物的实例包括聚酯、水凝胶、聚交酯、L-谷氨酸和 T-乙基-L-谷氨酸酶共聚物、不可

降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物、和聚 D-(-)-3-羟基丁酸。这些基质通常以一定的形状存在，如薄膜或微胶囊。

当抑制剂是多肽时，示例性的缓释组合物包括典型地通过 ϵ -氨基与聚亚烷基乙二醇(如聚乙二醇[PEG])结合的多肽。PEG 与多肽结合是熟知的降低致免疫原性和延长体内半衰期的方法(参见如，Abuchowski, J.,等 (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 3582-86)。只要“聚乙二醇化”蛋白保持所需功能，任何常规的“聚乙二醇化”法都可以使用。

在另一个具体实施方式中，缓释组合物包括脂质体包裹的抑制剂。脂质体是由不同类型脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊泡。这些组分通常以类似于生物膜脂质排列的双层形式排列。采用已知方法制备包含本发明所述抑制剂的脂质体，如 Epstein 等 (1985) *PNAS USA* 82: 3688-92; 和 Hwang 等 (1980) *PNAS USA*, 77: 4030-34)中所述的方法。通常，这些制剂中的脂质体是小的(约 200-800 埃)单层类型，其脂质含量大于约 30 mol %胆固醇，该特定百分比是经调节能提供最佳治疗的百分比。可以利用脂质制剂包括如卵磷脂、胆固醇、和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)采用反相蒸发法制备可用的脂质体。如果需要，可以用特定孔径的滤器过滤脂质体来获得特定直径的脂质体。

本发明的药学组合物可以以任何常规形式储存，包括如水溶液或冻干的块状物。通常，当给患者施用这些组合物是无菌的。通过无菌过滤膜的过滤可以很容易地实现水溶液的灭菌。如果组合物是以冻干形式保存的话，可在冻干和重配之前或之后对组合物进行过滤。

在一具体实施方式中，本发明的方法使用包含 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的多核苷酸抑制剂或编码该多肽抑制剂的多核苷酸的药学组合物。这些组合物任选地包括其它成分，比如存储液，如合适的缓冲液如生理缓冲液。在优选

的实施方式中，该组合物是药学组合物，且另一组分是如上所述的药学上可接受的载体。

优选地，用于本发明的含有多核苷酸的组合物还包含能促进多核苷酸进入细胞的组分。能促进多核苷酸细胞内运输的组分是已知的，包括如脂质、脂质体、水油乳剂、聚乙烯亚胺和树状聚合物，它们中的任何一种都可在本文所述的组合物中使用。脂质是其中使用最广泛的组分，而且任何可用的脂质或脂质配方都可用于本发明的多核苷酸。通常，优选阳离子脂质。优选的阳离子脂质包括 N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)和/或二油酰基卵磷脂(DOPC)。

在另一实施方式中，多核苷酸与树状聚合物络合，树状聚合物可用于将多核苷酸导入细胞。树状聚合物聚阳离子是高度有序的三维寡聚物和/或聚合物，通常通过反复的反应序列在核心分子或指定的起始物上形成，这些反应序列添加寡聚物和/或聚合物并提供一阳性变化的外表面。适合的树状聚合物包括，但不限于：“星放射状(starburst)”树状聚合物和各种树状聚合物聚阳离子。制备和利用树状聚合物将多核苷酸在体内导入细胞的方法是本领域技术人员所熟知的，并详述于如 PCT/US83/02052 和美国专利号 4,507,466、4,558,120、4,568,737、4,587,329、4,631,337、4,694,064、4,713,975、4,737,550、4,871,779、4,857,599 和 5,661,025 中。

为了治疗用途，将可用于本发明的多核苷酸以适合特定适应症的方式来配制。美国专利号 6,001,651，Bennett 等描述了一些适和用于寡核苷酸治疗剂的药学组合物和制剂，以及这些寡核苷酸的给药方法。

C. 给药

通常，本发明的药学组合物是按照熟知的施用小分子药物，以及治疗性

多肽、肽和多核苷酸的方法来进行给药的。适合的给药路径包括，比如局部、静脉内、腹腔内、脑内、脑室、肌肉内、眼内、动脉内或病灶内路径。本发明药物组合物的给药可以通过输注、弹丸注射，或者如果组合物是缓释制剂，就通过适合特定制剂的方法来连续进行。

在某些实施方式中，所述组合物是利用传统的经皮药物传递系统，即经皮“贴剂”通过皮肤来运送的，其中该组合物通常是包含在作为药物传递工具来与皮肤贴合的层状结构中。在所述结构中，药物组合物通常是包含在上面支持层之下的一层或“储库”中。应理解，本文中的术语“储库”是指一些最终可用于运送到皮肤表面的选定组合物。因此，举例来说，储库可包括贴剂支持层上胶粘剂中的组合物，或本领域技术人员已知的任一种不同的基质配方。贴剂可以包括单一储库，或可以包括多种储库。

在一实施方式中，所述储库包括药学上可接受的接触粘附材料的聚合基质，该基质在药物传送过程中让系统与皮肤粘合。适合的皮肤接触粘附材料实例包括，但不限于：聚乙烯、聚硅氧烷、聚异丁烯、聚丙烯酸酯、聚氨酯等。或者，该储库及皮肤接触胶粘剂是以独立和不同层存在的，胶粘剂在储库下层，在此情况下，储库既可以是如上所述的聚合物基质或液体或水凝胶储库，或也可以是其它的一些形式。这些层叠品中作为装置上表面的支持层，优选作为贴剂的主要结构元件使用，并能让该装置具有良好的弹性。优选地，选作支持层的材料能基本不会让存在的选定组合物和其它材料透过。

本发明所述的经皮贴剂可以包括限速贴剂膜。选定的贴剂大小和/或限速膜应可以传递所需的经皮流速。还可以用释放衬垫，比如聚酯释放衬垫，如本领域的常规一样在给皮肤用贴剂之前，盖住粘合层。该贴剂套件可以包装在铝箔或其它合适的袋子中，同样其是本领域常规的。

在其它实施方式中，将本发明的组合物以可移植的储库型制剂(depot

formulation)给药。设计储库型制剂使其实现活性剂的持续释放的各种方法都是已知的,而且适合在本发明中使用。通常,这种制剂的组分是生物相容的且生物可降解的。生物相容的聚合材料已被广泛应用于治疗药物传递和医学移植应用中,从而可以实现定位和持续释放。参见 Leong 等, "Polymeric Controlled Drug Delivery", *Advanced Drug Delivery Rev.*, 1: 199-233(1987); Langer, "New Methods of Drug Delivery", *Science*, 249: 1527-33(1990); Chien 等, *Novel Drug Delivery Systems*(1982)。这些运输系统具有提高治疗效力和全面降低毒性的潜力。

如果移植物是意欲作为药物传递或其它控释系统使用,那么利用生物降解性聚合载体就是一种局部地并以受控方式传输治疗剂的有效手段,参见 Langer 等, "Chemical and Physical Structures of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents", *J. Macro. Science, Rev. Macro. Chem. Phys.*, C23(1), 61-126(1983)。这样,需要的药物总量会少些,而且还能将毒副作用最小化。已经研究了的可能作为固体生物降解性材料的合成聚合物类型实例包括聚酯(Pitt 等, "Biodegradable Drug Delivery Systems Based on Aliphatic Polyesters: Applications to Contraceptives and Narcotic Antagonists", *Controlled Release of Bioactive Materials*, 19-44(Richard Baker 编辑, 1980); 聚(氨基酸)和伪聚(氨基酸)(Pulapura 等 "Trends in the Development of Bioresorbable Polymers for Medical Applications", *J. Biomaterials Appl.*, 6: 1, 216-50(1992); 聚氨酯(Bruin 等, "Biodegradable Lysine Diisocyanate-based Poly(Glycolide-co- ϵ -Caprolactone)-Urethane Network in Artificial Skin", *Biomaterials*, 11: 4, 291-95(1990); 聚原酸酯(Heller 等, "Release of Norethindrone from Poly(Ortho Esters)", *Polymer Engineering ScL*, 21: 11, 727-31(1981); 和聚酐(Leong 等, "Polyanhydrides for Controlled Release of Bioactive Agents",

Biomaterials 7: 5, 364-71(1986)。

因此, 可将如 Epac、PLC ϵ 或 PLD 抑制剂组合物掺入到生物相容性聚合组合物中, 形成需要的外部形状。然后, 通常通过切口将这种固体移植物插入患者体内。或者, 可将由这些聚合组合物组成的小离散颗粒注入体内, 如利用注射器。在示例性实施方式中, 可将抑制剂组合物包埋在聚(D,L-乳酸)聚合物微球内, 该微球体用悬浮在水、甘露醇、羧甲基纤维素和聚山梨醇酯 80 稀释液中。聚乳酸聚合物通常逐步地代谢成二氧化碳和水, 让抑制剂释放到系统内。

在另一实施方式中, 储库型制剂可通过注射器以液态聚合组合物形式注入。可用作生物降解控释药物传递体系的液态聚合组合物在如美国专利号 4,938,763、5,702,716、5,744,153、5,990,194、和 5,324,519 中说明。在以液体状态, 或作为溶液注射之后, 该组合物凝结成固体。

适合用于本申请的一类聚合组合物包括溶解在体液分散剂中的惰性热塑性聚合物或共聚物。将该聚合物溶液放置于体内, 在体内一旦溶剂分散或扩散入周围身体组织, 聚合物就会凝结或沉淀和固化。参见如 Dunn 等, 美国专利号 5,278,201、5,278,202、和 5,340,849(公开了一种热塑性药物传递体系, 其中固态、线性链、生物降解性聚合物或共聚物溶解在溶剂中而形成液态溶液)。

还可将 Epac、PLC ϵ 或 PLD 抑制剂组合物吸附在可被移植的膜比如硅橡胶膜上, 如国际公开号 WO 91/04014 中所述。

D. 剂量

抑制剂的剂量要足以抑制靶标(即 Epac、PLC ϵ 或 PLD), 优选没有显著毒性。在具体的体内实施方式中, 抑制剂的量足以减轻患者疼痛。在此实施方式的变形中, 在这些变形中将止痛剂或其它制剂(如抗惊厥药、抗抑郁药和/

或镇静药)与抑制剂一起共给药,该止痛剂或其它制剂的量足以在患者内产生有益效果(即在止痛剂情况下是止痛效力)。为了在体内施用,抑制剂和任意其它可选制剂的剂量由比如治疗对象、给药路径和患者状况决定。因此,需要临床医生根据需要来测定剂量并改善给药路径以便获得最佳的治疗效力。通常,临床医生是从低剂量开始,并增加剂量直到获得所需的治疗效力。可以从体外数据来推断给定抑制剂的起始剂量。

减轻疼痛试剂的筛选方法

Epac、PLC ϵ 和 PLD 在介导疼痛中的作用让这些分子成为降低疼痛试剂的有吸引力的靶标。因此,本发明就提供了目的在于鉴定这些试剂的预筛选和筛选方法。例如,可以根据试剂与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 或编码这些多肽任一的多核苷酸的结合,对待测试剂进行预筛选。本发明的筛选方法可以通过下述步骤来进行:将待测试剂与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 接触;确定待测试剂是否分别抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD;假如是的话,就选择该待测试剂作为潜在止痛剂。例如,可以就待测试剂对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 或编码它们的多核苷酸(如 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA)的水平的影响或对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 功能的影响进行筛选。

通常,虽然非必须,本发明的预筛选/筛选方法是在体外进行的。因此,一般筛选实验是例如利用细胞裂解物或其部分中经纯化或部分纯化的组分,在培养细胞中,或在生物样品如组织或其部分中进行的。

A. 基于与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的结合的预筛选

本发明提供了基于分析待测试剂与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的特异性结合的预筛选方法。特异性结合 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的试剂具备调节功能从而

调节疼痛的潜力。

因此，在一实施方式中，本发明的预筛选方法包括将待测试剂与 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 接触。然后，确定待测试剂与被接触的多肽的特异性结合。如果检测到了特异性结合，则选定该试剂作为潜在止痛剂。

通常，这样的预筛选方法是利用简单的样品体外结合实验而最便利地实现的。待测试剂与多肽的特异性结合的分析手段是本领域技术人员所熟知的。在优选的结合实验中，将多肽固定，并暴露于待测试剂(其可被标记)，或者，将待测试剂固定并暴露于多肽(其可被标记)。然后，洗涤该固定物，除去所有的未结合材料并检测已结合的材料。为了对大量待测试剂进行预筛选，通常优选高通量实验。以下对各种实验模式进行更加详细的描述。

B. 基于与编码 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的多核苷酸的结合的预筛选

本发明还提供了基于筛选待测试剂与编码 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多核苷酸的特异性结合的预筛选方法。特异性结合这些多核苷酸的试剂具备调节被编码多肽的表达，从而调节疼痛的潜力。

因此，在一实施方式中，本发明的预筛选方法包括将待测试剂与编码 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的多核苷酸接触。然后，确定待测试剂与多核苷酸的结合。如果检测到了特异性结合，则选定该试剂作为潜在止痛剂。

通常，所述预筛选是利用简单的样品体外结合实验而最便利地实现的，该实验方法是本领域技术人员所熟知的。在优选的结合实验中，将多核苷酸固定并暴露于待测试剂(其可被标记)，或者，将待测试剂固定并暴露于多核苷酸(其可被标记)。然后，洗涤该固定物，除去所有的未结合材料并检测已结合的材料。为了对大量待测试剂进行预筛选，通常优选高通量实验。以下对各种实验模式进行更加详细的描述。

C. 基于 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 水平或 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多核苷酸水平的筛选

还可对待测试剂, 包括比如那些在本发明预筛选法中鉴别出的试剂, 进行筛选, 从而确定待测试剂是否会影响 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的水平或编码这些多肽任一的多核苷酸的水平(如 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA)。能够使这些水平降低的试剂能够潜在地降低疼痛。

因此, 本发明提供了筛选能降低疼痛的试剂的方法, 其中将待测试剂与细胞接触, 这些细胞在不存在待测试剂时表达 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD。优选, 采用体外实验来进行该方法。在这些实验中, 可将待测试剂与培养基中的或存在于组织中的细胞接触。或者, 可将待测试剂与细胞裂解物或其部分接触。在存在和缺失(或存在少量)待测试剂的条件下, 确定 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多肽或多核苷酸(如 mRNA)的水平, 从而鉴定出能改变该水平的任何待测试剂。如果水平降低, 则选定该待测试剂作为潜在止痛剂。

可用于该筛选方法的细胞或组织包括来自上文所述的与减轻疼痛方法有关的任意物种的细胞或组织。通常, 虽然非必要, 天然表达 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的细胞可用于本筛选方法。实例包括但不限于, 如实施例 1 所述的培养的背根神经中枢细胞。可用于对通过 Epac 来起作用的试剂进行筛选的细胞实例包括小胶质细胞、胰腺 β -细胞、视网膜神经元、干细胞和白细胞。对通过 PLC ϵ 来起作用的试剂的筛选可以在例如 NIE115 成神经细胞瘤细胞、HEK293 细胞和角膜上皮细胞中进行。可用于对通过 PLD 来起作用的试剂进行筛选的细胞实例包括 PC12 细胞、神经干细胞、肌细胞、C6 神经胶质瘤细胞、Ewing 肉瘤细胞、肾上皮细胞和小脑粒细胞。或者, 本方法中可以使用已被设计来表达 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的细胞。

1. 样本

如上所述,一般,筛选实验是在体外进行的,如在培养细胞中,在生物样本(如脑)或其部分中进行。为了简化描述,细胞培养物、生物样本和部分在下文中称为“样本”。一般,样本衍生自动物(如任意的前述研究动物),优选衍生自哺乳动物,更优选衍生自人。

如果需要,可以根据需要通过在合适的缓冲液中稀释或浓缩来对样本进行预处理。可以使用任意的生理 pH 的标准含水缓冲液,这些缓冲液使用一种或多种缓冲物质如磷酸盐、Tris 等。

2. 基于多肽的实验

可采用本领域技术人员熟知的若干方法中的任意一种来对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 进行检测和量化。适合检测这些多肽的分析性生物化学法的实例包括电泳、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层层析(TLC)、超扩散(hyperdiffusion)层析等,或各种免疫学方法如液态或凝胶沉淀反应、免疫扩散(单向或多向)、免疫组织化学、亲和层析、免疫电泳、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附实验(ELISA)、荧光免疫分析、Western 印迹等。

在一实施方式中,采用结合实验来对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 进行检测/量化。简要地说,将来自表达感兴趣多肽的组织的样本与合适的结合伴侣(例如抗体)在一定条件下一同放置,该条件经设计能在放置期间提供饱和浓度的结合伴侣。在用结合伴侣处理后,对该样本的结合进行分析。任何能结合感兴趣多肽的结合伴侣都可以在本实验中使用,虽然如果该多肽是大量异构体中的一种,那么能特异性结合正在分析的特定异构体的结合伴侣是优选的。除抗体之外,可对任何能直接结合 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的 Epac、PLC ϵ 和/

或 PLD 抑制剂进行例如标记,并在该实验中使用。Epac 和 PLD 的示例性结合伴侣在实施例 1 中进行了描述,即来自 Santa Cruz Biotechnology 的多克隆兔抗-Epac1 血清和 PLD 抑制剂 1-丁醇。

在另一实施方式中,在电泳多肽分离(如 1 或 2 维电泳)中对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 进行检测/量化。利用电泳技术来检测多肽的方法是本领域技术人员所熟知的(通常参见 R. Scopes(1982)Polypeptide Purification, Springer-Verlag, N. Y.; Deutscher, (1990)Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Polypeptide Purification, Academic Press, Inc., N. Y.)。

该实施方式的一种变形使用 Western 印迹(免疫印迹)分析来检测和量化 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 在样本中的存在。一般地,此技术包括通过凝胶电泳基于分子量分离样本多肽,将分离的多肽转移到合适的固体支持物(如硝化纤维素滤纸、尼龙滤纸或衍生化尼龙滤纸)上,将该支持物与特异性结合靶多肽的抗体一起放置。可将特异性结合靶多肽的抗体直接标记,或者可以随后用特异性结合一抗结构域的标记抗体(如标记的羊抗鼠抗体)来进行检测。

在优选的实施方式中,利用任何熟知的免疫测定法在生物样本中对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 进行检测和/或量化(参见如美国专利 4,366,241、4,376,110、4,517,288、和 4,837,168)。免疫分析法的综述还可参见 Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Asai 编, Academic Press, Inc. New York(1993); Basic 和 Clinical Immunology, 第 7 版, Stites & Terr 编(1991)。

常规的免疫测定法经常会利用“捕获剂”来特异性地结合和固定待分析物(此时是 Epac、PLC ϵ 或 PLD)。在优选的具体实施方式中,该捕获剂是抗体。

典型地,免疫测定法还使用标记试剂来特异性地结合和标记由捕获剂和靶多肽形成的结合复合物。该标记试剂本身就可以是构成抗体/靶多肽复合物的一部分。因此,标记试剂可以是特异性地识别已结合靶的多肽的经标记的

多肽或经标记的抗体。或者，标记试剂可以是第三部分，如特异性结合捕获剂/靶多肽复合物的另一种抗体。能特异性结合免疫球蛋白恒定区的其它多肽，如多肽 A 或多肽 G 也可以用作标记试剂。这些多肽是链球菌细胞壁的常规组分。它们具有来自不同物种的免疫球蛋白恒定区表现出很强的非免疫原反应性(一般参见 Kronval 等(1973) *J. Immunol.*, 111:1401-1406, 和 Akerstrom(1985) *J. Immunol.*, 135: 2589-2542)。

用于检测靶多肽的优选免疫分析是竞争性的或非竞争性的免疫分析。非竞争性的免疫分析是直接对捕获的靶多肽量进行测量的分析。在竞争性分析中，样品中的靶多肽将外加(外源)多肽从捕获剂上置换(竞争)下来，通过测定这些外加多肽的量间接地测定样品中靶多肽的量。在一种竞争性分析中，将已知量的，此时是标记的 Epac、PLC ϵ 或 PLD 添加到样本中，然后让该样本与捕获剂接触。与抗体结合的标记 Epac、PLC ϵ 或 PLD 的量与存在于样本中的多肽浓度成反比。

适合用于本发明的可测标记包括采用分光镜、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学方法可测的任何部分或组合物。实例包括用于用标记的链霉素共轭体染色的生物素、磁珠(如 Dynabeads™)、荧光染料(如荧光素、德州红(texas red)、罗丹明、香豆素、噁嗪、绿色荧光蛋白等，参见如 Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)，放射性标记物(如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、或 ^{32}P)、酶(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其它 ELISA 的常用酶)和比色标记比如胶体金(如直径大小范围 40-80nm，高效散射绿光的金粒子)或有色玻璃或塑料(如聚苯乙烯，聚丙烯，乳胶等)珠子。指导使用这些标记物的专利包括美国专利号 3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149、和 4,366,241。

本发明的实验根据本领域技术人员所熟知的常规方法来进行记分(以靶多

肽阳性或阴性或数量)。具体的记分方法由实验形式和标记物的选择来决定。例如,可通过肉眼观察由酶标记物产生的有色产物对 Western 印迹分析进行记分。将在正确分子量处的清晰可见的着色条带或斑点记分为阳性,而缺乏清晰可见斑点或条带则记分为阴性。条带或斑点强度可以提供对靶多肽浓度的定量测量。

在具体实施方式中,采用微电机系统(MEMS)进行本发明的免疫测定法。MEMS 是整合到硅上的精微结构,其将机械、光学和流控元件与电学组合起来,从而可以方便地检测到感兴趣的待分析物。适用于本发明的示例性 MEMS 设备是 Protiveris' 多悬臂阵列。该阵列以特别设计的硅微悬臂化学-机械驱动和随后的微悬臂偏转的光学检测为基础。当一边用蛋白、抗体、抗原、或 DNA 片段包被时,在暴露于含互补分子的溶液中时,微悬臂就会弯曲。这种弯曲是由于发生结合而使表面能变化所致。弯曲(偏转)程度的光学检测可以对结合到微悬臂的互补分子的量进行测量。

可用于这些免疫测定法的抗体包括多克隆和单克隆抗体。

3. 基于多核苷酸的分析

Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 表达水平的变化可以通过测量 mRNA 和/或衍生自该 mRNA 的多核苷酸(如反转录 cDNA 等)的水平的变化来进行检测。

多核苷酸可以按照本领域技术人员所熟知的任何方法从样本制得。分离和纯化多核苷酸的常规方法在 Tijssen 编辑, (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation* 的第三章, Elsevier, N. Y. 和 Tijssen 编辑中有详细说明。

i. 基于扩增的实验

在一实施方式中, 可用基于扩增的实验来检测和任选地量化编码 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的多核苷酸。在示例性的基于扩增的实验中, 样本中的 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA 作为扩增反应的模板, 该扩增反应用含有可检测标记物或标记系统成分的核酸引物进行。适合的扩增方法包括, 但不限于, 聚合酶链反应(PCR)、反转录 PCR(RT-PCR)、连接酶链反应(LCR)(参见 Wu 和 Wallace(1989)Genomics 4: 560, Landegren 等(1988)Science 241: 1077, 和 Barringer 等(1990)Gene 89: 117)、转录扩增(Kwoh 等(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173), 自主序列复制(Guatelli 等(1990)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 1874)、定点 PCR、和连接接头 PCR 等。

为了确定 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA 的水平, 可以使用本领域所熟知的任何“定量”扩增法。通常, 定量 PCR 包括利用相同的引物对已知量的对照序列同时进行共扩增。其可以作为内标, 用于校准 PCR 反应。在 PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis 等, Academic Press, Inc. N. Y., (1990) 中提供了定量 PCR 的详细规程。

ii. 基于杂交的实验

核酸杂交只包括将核酸探针与样本多核苷酸在一定条件下接触, 在该条件下, 探针能与其互补靶核苷酸序列通过互补碱基配对形成稳定杂交双链。然后, 洗去那些不能形成杂交双链的核酸, 留下待检测的杂交核酸, 一般通过检测结合的可测标记物或标记系统组分对杂交核酸进行检测。利用核酸杂交技术来检测和/或定量多核苷酸的方法是本领域技术人员所熟知的(参见 Sambrook 等, 见上)。杂交技术通常描述于 Hames 和 Higgins(1985)Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press; Gall 和 Pardue(1969)Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 63: 378-383; 和 John 等(1969)Nature 223: 582-587 中。优化杂交条件的方法描述在如 Tijssen(1993)Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Elsevier, N. Y. 中。

本文用于检测 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA 的核酸探针可以是全长或小于全长的这些多核苷酸。通常, 根据经验用短探针检测特异性。优选核酸探针是至少约 15 个碱基, 更优选约 20 个碱基或更长长度(关于对用于核酸杂交的核酸探针序列的选择方法参见 Sambrook 等)。杂交探针的可视化可以定量测定 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA 的存在或缺失, 可用标准方法(比如当对核酸探针进行了放射性标记时, 使用密度测定法)来量化 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD mRNA 的水平。

许多其它的核酸杂交形式都是本领域技术人员所熟知的。标准形式包括三明治实验和竞争或置换实验。三明治实验是商业上可用的检测或分离多核苷酸的杂交实验。这些实验使用一种共价固定到固体支持物上的“捕获”核酸, 和一种溶液中的标记“信号”核酸。样本提供靶多核苷酸。捕获的核酸和信号核酸分别与靶多核苷酸杂交从而形成“三明治”杂交复合体。

在一具体实施方式中, 本发明的方法可在基于阵列的杂交形式中使用。在阵列形式下, 大量的不同杂交反应可以基本“平行地”运行。这就在单个实验中对大量杂交进行了快速、基本同时的评价。在阵列形式下进行杂交反应的方法是本领域技术人员所熟知的(参见如 Pastinen(1997)Genome Res. 7: 606-614; Jackson(1996)Nature Biotechnology 14: 1685; Chee(1995)Science 21 A: 610; WO 96/17958, Pinkel 等(1998)Nature Genetics 20: 207-211)。

可以按照本领域技术人员所熟知的各种方法来制备阵列, 尤其是核酸阵列。例如, 在一个简单的具体实施方式中, 通过在固体支持物(如玻璃表面,

膜等)的不同位点上点样(使用移液管手动地)不同核酸就能简便地制备“低密度”阵列。这种简单的点样方法已被自动化而制备出高密度点样微阵列。例如,美国专利号 5,807,522 描述了自动化系统的应用,其在表面上轻敲微毛细管让小体积的生物样本沉积。重复该步骤获得高密度阵列。还可以利用寡核苷酸合成技术来制备阵列。因此,例如,美国专利号 5,143,854 和 PCT 专利公开号 WO 90/15070 和 92/10092 教导了高密度寡核苷酸微阵列的光引导组合合成的应用。在美国专利 5,744,305、5,800,992、和 5,445,934 中也描述了高密度阵列的合成。

在优选的实施方式中,本发明使用的阵列包括“探针”核酸。然后,这些探针分别与来自生物样本的多核苷酸中存在的它们的“靶”核苷酸序列杂交。或者,可将该形式颠倒,由此将来自不同样本的多核苷酸形成阵列,然后用可被差别性标记的一种或多种探针对其进行探测。

用于在不同固体表面上固定核酸的许多方法都是本领域所已知的。各种有机或无机聚合物,以及其它材料,天然的或合成的,都可以用做固体表面材料。说明性的固体表面包括,如硝酸纤维素、尼龙、玻璃、石英、重氮膜(纸或尼龙)、硅氧烷、聚甲醛、纤维素和醋酸纤维素。此外,可以使用塑料如聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等。可用的其它材料包括纸、陶瓷、金属、非金属、半导体材料等。此外,可以使用形成凝胶的物质。这类材料包括,如蛋白质(如明胶)、脂多糖、硅酸盐、琼脂糖和聚丙烯酰胺。当固体表面多孔时,根据系统的性质,可使用不同的孔径大小。

在制备表面时,可以使用大量的不同的材料,尤其是作为层制品的材料,从而获得各种性质。例如,可以使用蛋白(例如牛血清白蛋白)或大分子混合物(如 Denhardt's 溶液),从而避免非特异性结合,简化共价偶联,和/或增强信号检测。如果需要化合物和表面之间形成共价键,那么表面一般就是多官能团

的或能被多官能化的。存在于表面上且可用于连接的官能团可以包括羧酸、醛、氨基、氰基、烯基、羟基、巯基等。各种化合物与各种表面的连接方式是众所周知的，且在文献中充分阐释。

阵列可以由范围在从约直径 1 mm 到小至约 1 μm 的各种尺寸的靶元件组成。已经描述了能够对 1 cm^2 区域定量荧光成像的相对简单的方法，这些方法实现了从单幅图象中对大量靶元件中的数据的采集(参见如 Wittrup(1994)Cytometry 16: 206-213, Pinkel 等(1998)Nature Genetics 20: 207-211)。

还可以采用微电机系统(MEMS)，如 Protiveris' 多悬臂阵列进行本发明的杂交实验。

iii. 多核苷酸检测

通过可检测标记物，可在上述的基于多核苷酸的实验中对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多核苷酸进行检测。本发明的以多核苷酸为基础的实验可以使用上述讨论的任何标记物。在进行杂交或扩增之前或之后，可将这些标记添加到探针或引物或样本多核苷酸上。所谓的“直接标记物”是在进行实验前，直接结合或引入至标记的多核苷酸的可检测标记物。相反，所谓的“间接标记物”是在杂交后，与杂交双链结合。在间接标记中，杂交双链中的一个多核苷酸会携带能与可检测标记结合的组分。这样，例如，可以在杂交之前将探针或引物生物素化。在杂交之后，可以让抗生物素蛋白-共轭荧光团与含生物素的杂交双链结合，提供了易于检测的标记物。关于标记和检测多核苷酸的具体综述，参见 Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Nucleic Acid Probes, P. Tijssen 编, Elsevier, N. Y., (1993))。

可以通过利用多核苷酸扩增系统来提高杂交实验的灵敏度,该系统成倍增加被检测的靶核苷酸。这类系统的实例包括聚合酶链反应(PCR)系统和连接酶链反应(LCR)系统。本领域描述的其它方法是以核酸序列为基础的扩增(NASBAO, Cangene, Mississauga, Ontario)和 Q β 复制酶系统。

在优选的实施方式中,适用于本发明的基于扩增的实验的引物包含两种荧光染料,一个“报告因子染料”和一个“淬灭染料”。当完整时,由于淬灭染料的作用,引物会产生非常低水平的荧光。当引物切开或降解(如通过聚合酶的核酸外切酶活性,见下文)后,报告因子染料就会发出荧光,并被合适的荧光检测系统检测到。利用同时具备聚合酶和核酸外切酶活性的合适的 DNA 聚合酶(如 Taq DNA 聚合酶),采用一些技术(PCR、RT-PCR、RCA 或其它扩增方法)来进行扩增。该聚合酶合成新的 DNA 链,并在过程中,降解标记的引物,造成荧光的增强。商业上可获得的这种类型的荧光检测系统包括 Applied Biosystems 的 ABI Prism®系统 7000、7700 或 7900(TaqMan®)或 Roche 的 Light Cycler®系统。

D. 基于 Epac、PLC ϵ 、或 PLD 的作用的筛选

本发明还提供了基于确定待测试剂对 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 作用的影响(如果存在的话)的筛选方法。Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的作用可以通过测定 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的任一活性,或由 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 介导的应答来进行测定。降低 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 作用的试剂能够潜在地减轻疼痛。

因此,本发明提供了筛选减轻疼痛的试剂的方法,该方法将待测试剂与细胞接触,这些细胞在不存在待测试剂的条件下能表达 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD,或其片段。优选地,采用体外实验进行该方法。当待测试剂可与细胞接触时,细胞可以在培养基中或存在于组织中。在存在和不存在(或存在少量)待测试剂

的条件下确定 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的作用水平，从而鉴定出任何能改变该水平的待测试剂。如果 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 作用被削弱，选定该待测试剂作潜在止痛剂。

可用于基于 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 作用的筛选的细胞或组织包括那些上述与基于 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 水平或编码这些多肽任一的多核苷酸水平的筛选有关的任何细胞或组织。

Epac 的作用可以采用任何用于分析 Epac 活性或 Epac-介导应答的实验来进行测定。适合的实验实例包括测定：Epac-cAMP 结合、Epac-介导的 GTP 酶 Rap1 的活化、Epac-介导的 MAP 激酶的活化。

PLC ϵ 的作用可以采用任何用于分析 PLC ϵ 活性或 PLC ϵ -介导应答的实验来进行测定。例如，该筛选方法可以分析待测试剂对 PLC ϵ -介导的磷脂酰肌醇水解成三磷酸肌醇和甘油二酯(DAG)的影响。

PLD 的作用可以采用任何用于分析 PLD 活性或 PLD-介导应答的实验来进行测定。例如，该筛选方法可以分析待测试剂对 PLD-介导的磷脂底物(如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、溶血磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂、磷脂酰甘油、或 N-酰基磷脂酰乙醇胺)水解成磷脂酸的影响。参见如，Petersen, G. 等(2000)J Lipid Res. 41: 1532。

E. 待测试剂数据库

在优选的实施方式中，通常涉及筛选大量待测试剂的筛选方法包括将在任何上述预筛选或筛选方法中选出的任何待测试剂记录在候选止痛剂数据库中。

术语“数据库”是指用于记录和提取信息的工具。在优选的实施方式中，数据库还提供了对存储信息进行分类和/或搜索的工具。数据库可以利用任何便

利介质,包括但不限于纸质系统、卡片系统、机械系统、电子系统、光学系统、磁系统或其组合。优选的数据库包括电子(如基于计算机的)数据库。用于储存和操作数据库的计算机系统是本领域技术人员所熟知的,包括但不限于“个人电脑系统”,大型机系统,在互联网或局域网的分布节点,存储在专门硬件(如微型芯片)中的数据或数据库等。

F. 通过筛选鉴定出的待测试剂

当发现待测试剂能够改变 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的水平;编码 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的多核苷酸的水平;或 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 的作用水平时,本发明的优选筛选方法进一步包括将待测试剂与载体组合,优选药学上可接受的载体,如上文所述。通常,当将组合物与细胞接触时,待测试剂的浓度足以改变 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 或其相应多核苷酸或其作用的水平。该浓度的变化将根据具体的待测试剂和组合物所要进行的具体应用有所变化。本领域的技术人员应可以理解,影响待测试剂与载体配制的具体因素通常与上述的减轻疼痛的方法中的因素相一致。

在优选的具体实施方式中,将待测试剂对动物给药,以便测量所选待测试剂降低患者疼痛的能力,如下所详述。

G. 以减轻体内疼痛为基础的筛选

本发明还提供了在体内筛选能减轻患者疼痛的试剂的方法。该方法包括选择 Epac 抑制剂、PLC ϵ 抑制剂或 PLD 抑制剂作为待测试剂,测量选定的待测试剂减轻患者疼痛的能力。本方法可施用任何能抑制 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 且能对患者给药的试剂。因此,通过本发明的任何预筛选或筛选方法选定的待测试剂都可以在体内进行检测。或者,可以使用已知的 Epac、PLC ϵ 和/或

PLD 抑制剂。

如上述 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 抑制剂一样，可以将待测试剂进行配制来给患者给药。

本方法的对象可以是含有 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 且其疼痛症状可被测量的任何个体。合适的对象实例包括研究动物，如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猫、狗、以及猴子和其它灵长类动物和人。在优选的具体实施方式中，使用为研究疼痛应答建立的动物模型。例如，动物模型可以是如实施例 1 所述的测试伤害感受弯曲反射的动物模型。

通常，在施加疼痛性刺激之前，将待测试剂对患者给药，并检测或观察该患者，确定该待测试剂是否能降低对刺激的具体应答。即测量应答，并与不存在待测试剂和/或存在少量待测试剂的情况下，所观察的结果相比较。如上所述 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 抑制剂一样，可以采用任何合适的路径来施用待测试剂。通常，待测试剂的浓度能足以改变体内的 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 多肽、多核苷酸或作用的水平。

试剂盒

本发明还提供了可用于实施本发明方法的试剂盒。在一实施方式中，本发明的试剂盒包括在合适容器内的 Epac、PLC ϵ 和/或 PLD 抑制剂。在该实施方式的变形中，将抑制剂配制在药学上可接受的载体中。优选的试剂盒包括给患者施用抑制剂以便减轻疼痛的说明。

可将包括在本发明试剂盒中的说明贴在包装材料上，或插入包装中。虽然说明书一般是书面或印刷材料，但并不限于此。任何能储存这些说明并能将其传达给终端用户的介质都在本发明的范围内。所述介质包括但不限于，电子储存介质(如磁盘、录像带、磁带、芯片)、光学介质(如 CD ROM)等。在

此所用术语“说明”可以包括提供该说明的互联网网址。

实施例

下述实施例是用于说明，而并非限制所要求保护的发明。

实施例 1

Epac 介导炎性痛中从 cAMP 至 PKC 的信号传递：IB4(+)-神经元特异性机制

摘要

PKC 的 ϵ 异构体(PKC ϵ)在神经性(糖尿病、酒精中毒、癌症治疗)以及急性和慢性炎性痛模型中已经成为对机械性刺激致敏化的关键的第二信使。导致 PKC ϵ 激活的信号传导通道还未知。最近的研究结果表明了从 cAMP 至 PKC 的信号传递。连接两个普遍存在的，通常被认为是独立通路的 cAMP 和 PKC 的机制仍然令人困惑。目前的工作表明，在培养的后根神经节(DRG)神经元中，从 cAMP 至 PKC ϵ 的信号传导并不是通过蛋白激酶 A(PKA)介导，而是通过最近鉴定的 cAMP-激活的鸟嘌呤交换因子 Epac 介导。Epac 在磷脂酶 C(PLC)和磷脂酶 D(PLD)上游，它们两个都是 PKC ϵ 移位和激活所必需的。该信号通路对同工凝集素 B4-阳性(IB4(+))疼痛感受体具有特异性。另外，在行为模型中，cAMP 通过 Epac、PLC/PLD 和 PKC ϵ 产生机械性痛觉过敏(触痛)。通过描绘该信号通路，这项工作提供了 cAMP 至 PKC 信号传导机制，为促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路激活蛋白 Epac 也刺激 PKC 的原理提供了证据，描述了 IB4(+)感觉神经元亚群特有的第一生理机能，并且发现了 G-蛋白耦合受体不仅通过 G-蛋白 α_q 和 $\beta\gamma$ 而且通过 α_s 激活 PKC 的机理的证据。

方法

抗体

用于本研究的抗体和外源凝集素是：来自 BD Transduction Laboratories 的 PKC ϵ -特异性单克隆小鼠抗体；来自 Santa Cruz Biotechnology 的 β_2 -肾上腺素受体(β_2 -AR)-特异性多克隆兔抗血清，多克隆兔抗-Epac1 血清；来自 Chemicon 的单克隆小鼠 NeuN-特异性抗体；来自 Molecular Probes 的 IB4-Alexa Fluor-568；来自 Jackson ImmunoResearch 的驴兔特异性 FITC 偶联，驴鼠特异性罗丹明偶联的二抗；和 UCSF 的 Robert Messing 博士提供的 PKC ϵ -特异性兔血清(SN134)。

药物

1-丁醇、烯丙洛尔、D-609、肾上腺素、佛司可林(forskolin)、(-)-异丙肾上腺素和 U-73343 购自 Sigma；获自 Fluka 的 2-丁醇；来自 Calbiochem 的双吡啶马来酰亚胺(bisindolylmaleimide)I、霍乱毒素、 ϵ VI-2、U-73122、4-氰基-3-甲基异喹林、8-CPT-2'-O-Me-cAMP、8-CPT；来自 Abbott Laboratories 的戊巴比妥；来自 Tocris Cookson 的 ICI 118,551 和来自 New England BioLabs 的 PKA 催化亚基。

化合物

用于本研究的化合物是：来自 Worthington Biochemical 公司的胰蛋白酶；来自 Boehringer Mannheim 的胶原酶；来自 Invitrogen 的 Neurobasal A(w/o 酚红)、B27；来自 UCSF Cell Culture Facility 的谷氨酰胺、MEM-培养基、Hanks-培养基、青霉素/抗生物素蛋白链菌素溶液；来自 Sigma 的 BSA、DMSO、谷氨酸、多聚甲醛、TritonX-100；和来自 Vector Laboratories 的正常山羊血清、Vectashield。

动物

在雄性 Sprague-Dawley 大鼠(200-300 g, Charles River, Hollister, CA, USA)上进行行为实验。在 12 小时光照/黑暗循环下,在 San Francisco 的 University of California 的 Animal Care Facility 的对照环境下饲养动物。食物和水可随意得到。遵照 NIH 指导照料和使用动物。UCSF 动物研究委员会批准了实验方案。尽最大努力将所用的动物数量最小化。

DRG-培养物

按照此前描述的方法(Khasar 等, 1999b)从雄性 Sprague-Dawley 大鼠(200-300 g, Charles River, Hollister, CA, USA)获得解离的背根神经节培养物。用过量的 Nembutal(每只动物 50 mg, s.c)麻醉大鼠。将 L1-L6 DRG 移除,去鞘(desheathed),汇集,并与胶原酶(终浓度(f.c.)0.125%, 1 h, 37°C)共同放置,然后用胰蛋白酶消化(f.c. 0.25%, 7 min, 37°C)。用火处理过的巴氏移液管通过研磨将细胞分开。通过过滤(40 μ m 网)将轴突残端和死细胞除去,然后离心(3 min, 500 g)。细胞用 12 ml Neurobasal A/B27-培养基重悬浮,并将每个培育物 0.5 ml(=0.5 DRG 等同物)分盘至聚鸟氨酸/层粘蛋白预包被的玻璃盖片(12 mm 直径)上,于 37°C, 5% CO₂ 在 24 孔板上培养过夜。通过添加多达 1 μ M 的乙醇(按照 Invitrogen 的技术支持,培育基中的乙醇浓度少于 2.5%)来抵消由于 Neurobasal A 培养基和其 B27 添加物在不同批次间的差异造成的在刺激后不同的 PKC ϵ 移位。

刺激

在培养 15-20 小时后,细胞就与盖片附着,对细胞进行刺激。为了确保刺

激能均一扩散, 将 500 μl 培养基中的 250 μl 移出来, 充分与各自的活化剂/抑制剂混合, 并加回到原来的培养基中。在刺激进行了 15 分钟之后, 加入浓度为 10 倍 IC_{50} -值的抑制剂。根据文献报道, 在确定时间以一定浓度添加活化剂。为所有的止痛剂都建立了时程(有些数据未显示)。以同样的方式处理阴性对照(未刺激细胞), 除了不添加任何药物制剂。虽然在体内实验中使用了生理学刺激物肾上腺素, 但在体外使用 β -AR 止痛剂异丙基肾上腺素对 β -AR 亚型进行鉴定。在处理之后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)将细胞洗涤一次, 并用多聚甲醛(PFA)将细胞固定(4%, 10 min, 室温(RT))。

免疫细胞化学

用 0.1% Triton X-100(10 min, RT)将 PFA-固定的细胞透性化, 然后用 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)/PBS(5 min, RT)洗涤三次。在对非特异性结合位点进行封闭(5% BSA/10%正常山羊血清/PBS, 1 h, RT)后, 在 1% BSA/PBS(过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$)中用各自的一抗对培养物进行探测, 洗涤三次(1% BSA/PBS, 5min, RT), 并与二抗荧光团-偶联抗血清(终浓度(f.c.)1: 200, 1 h, RT)共同放置。在最后三次洗涤(PBS, 5 min, RT)之后, 将培养物用 Vectashield 封在显微镜玻片上, 并用指甲油(nail polish)密封。

评价 PKC ϵ 移位

细胞用 Nikon Microphot FXA 显微镜, 50 $\times$ 油镜进行评价。对每种培养物的 50 个随机挑选细胞进行评价。基于所评价的培养物数量, 以每种评价培养物的移位细胞平均百分数/ $\pm$ 标准平均误差(SEM)对数据进行绘图。全部计数通过同一观测者以盲法方式(blind fashion)完成。所有处理都在至少 2 个不同的日子里, 用不同大鼠的 DRG-神经元重复进行。采用连到 MRC 1000 共聚焦显

显微镜(Bio-Rad)的 Zeiss Axiovert 100 显微镜(Carl Zeiss Inc。), 100×油浸物镜获取共聚焦图象。用 Zeiss Axiovert 100 显微镜, 63×油浸物镜获取表面荧光图象。

对机械伤害感受阈值的检测

利用 Randall-Selitto 爪压设备(Analgesymeter®, Stoetling)对伤害感受弯曲反射进行量化, 该设备给大鼠后爪背部施加线性增加的机械力。伤害感受性机械阈值定义为让大鼠缩爪的以克为单位的力。以前已经描述了该方法规程(Taiwo 和 Levine, 1989; Dina 等, 2003)。基线缩爪阈值定义为注射待测试剂之前的六个读数的平均值。每只爪都独立测量, 并对各组大鼠各自进行实验。仅用一种止痛剂和/或拮抗剂对各组大鼠进行处理, 通过皮内途径进行外周注射。在施用痛觉过敏介质 30 分钟后, 进行伤害感受阈值的测量。全部行为实验都在 10.00 和 16.00 小时间完成。如先前所述注射阻断剂(Khasar 等, 1995; Khasar 等, 1999a)。因为膜透性较低, 注射 PKC ϵ 抑制剂(ϵ VI-2)(Johnson 等, 1996)和 PKA 催化亚基(Slice 和 Taylor, 1989)之前通常先用相同注射器施用 2.5 μ L 蒸馏水, 水被小气泡隔开, 产生低渗休克, 从而提高细胞膜对药物的透性(Khasar 等, 1995; Khasar 等, 1999a)。在反映细胞结果后 2 分钟后发生统计学上显著地机械痛觉过敏(Khasar 等, 1999a), 在注射各刺激物之后 30 分钟检测机械性阈值, 该时间点是平台期最大反应的时间点。

统计学分析

所有的统计比较都是按照单向 ANOVA 进行, 随后进行 Dunnet's 多重比较结果实验, 其 p 值已经确定。

结果

β_2 -肾上腺素受体的活化使得 PKC ϵ 在 DRG 神经元中移位

为了研究 PKC ϵ 第二信使信号通路上游,在解离的背根神经节神经元中对 PKC ϵ 移位进行了评价,这是激活 PKCs 的重要步骤(Dorn 和 Mochly-Rosen, 2002)和已确定的 PKC 活化替代测量(Cesare 等, 1999)。如通过用舒缓激肽和佛波醇酯(Cesare 等, 1999)进行刺激而观测到的, β -肾上腺素受体(β -AR)激动剂异丙基肾上腺素也会诱导 PKC ϵ 移位至 DRG 神经元细胞膜(图 1A)。由于强烈的胞质 PKC ϵ 信号,未对向其它胞内靶标的潜在移位进行评价。

剂量应答曲线证实 1 μ M 异丙基肾上腺素会使最大量细胞产生移位(评价的培养物 n=8, 21.3% $\pm$ 2.8% PKC ϵ 移位细胞,图 1B)。PKC ϵ 的移位是暂时的,在大约 30 秒峰化,衰退 90 秒,5 分钟后返回至基线(图 1C)。由异丙基肾上腺素诱导的移位是由 β_2 -AR 介导的,因其会被 β_2 -AR 特异性拮抗剂 ICI 118,551(n=8, 3.0% $\pm$ 1.1% PKC ϵ 移位细胞,图 1C)抑制。将 ICI 118,551 描述为一种反向激动剂,不仅能阻断受体活化而且能降低其基线活性(Bond 等, 1995),表现为 PKC ϵ 移位基线的下降。

PKC ϵ 移位由 α_s 和 AC 而非 PKA 介导

为了确定 β_2 -AR 是通过 cAMP 将信号传导至 PKC,将描述充分的 α_s 激活剂霍乱毒素施用给细胞培养物,一般会导致胞内 cAMP 升高。在处理 30 秒后,观察到 PKC ϵ 向细胞膜的移位,90 秒峰化(n=6, 分别有 15.2 $\pm$ 3.0%和 24.0 $\pm$ 1.9% 的神经元显示出 PKC ϵ 移位(图 2B))。

由于 α_s 激活 AC(Neves 等, 2002),用已知的 AC 激活剂佛司可林(forskolin)来检测 AC 在导致 PKC ϵ 移位的信号级联反应中的参与。最大应答时间为 30 秒,佛司可林(forskolin)也会诱导 PKC ϵ 向细胞膜的移位(n=6, 22.3 $\pm$ 4.2% PKC ϵ

移位细胞(图 2B))。

由于 cAMP 激活 PKA, 对 PKA 在异丙基肾上腺素诱导的 PKC ϵ 活化中的参与度进行检查。由于常用的 PKA 抑制剂 H89 也会抑制与 β_2 -AR 的配体结合 (Penn 等, 1999), 而且无活性的 cAMP 类似物比如 Rp-cAMP 也有抑制其它 cAMP 效应因子的风险, 所以使用 PKA 特异性膜可透性抑制剂 4-氟基-3-甲基异喹啉(CMIQ)。该抑制剂封闭 PKA 的 ATP 结合位点(Lu 等, 1996)。用 CMIQ 预培养 15 分钟, 完全消除了由于注射 PKA 催化亚基导致的体内的痛觉过敏 (Slice 和 Taylor, 1989)(图 2B)。因此, 在用异丙基肾上腺素刺激之前, 用浓度高至其 IC₅₀ 值 1000-倍的 CMIQ 预培养 DRG 培养物 15 分钟。有趣的是, 在存在 CMIQ 时, PKC ϵ 像对照条件一样仍会移位至细胞膜(n=6, 图 2A)。因此, 尽管 α_s 和 AC 参与信号从 β_2 -AR 至 PKC ϵ 的信号传导, 而 PKA 并不参与。

Epac 介导 PKC ϵ 移位

由于 cAMP 不是通过 PKA 发出信号来诱导 PKC ϵ 活性的, 对 cAMP 激活 Epac 而导致在解离的 DRG 神经元中 PKC ϵ 移位的可能性进行了检查。已经开发了一种 Epac 特异性活化剂, 即 cAMP 类似物 8-CPT-2'-O-Me-cAMP(CPTOMe), 用于区分 PKA 和 Epac 的介导效应(Enserink 等, 2002; Rehmann 等, 2003)。用该化合物刺激神经元会导致 PKC ϵ 强烈移位至细胞膜, 如用 β_2 -AR、 α_s 和 AC 活化剂所观察到的一样, 确证了之前的观察, 即抑制 PKA 并不会改变 PKC ϵ 移位程度(图 2B), 而且第一次将 Epac 置于 PKC 的上游。

由于在 90 秒时 CPTOMe 导致最大量的细胞含有移位 PKC ϵ (n=6, 用 CPTOMe-刺激 30 秒和 90 秒后, 分别有 $20.3 \pm 2.6\%$ 和 $23.5 \pm 3.7\%$ 移位神经元), 在后续对 Epac 的 CPTOMe 刺激的下游事件的研究中将使用该时间点。

PKC ϵ 移位是 PLC 和 PLD 依赖性的

DAG, PLC-家族成员产物, 可以激活新型 PKCs, 比如 PKC ϵ 。因此, 对磷脂酰胆酯(PC)和磷脂酰肌醇(PI)水解 PLCs 以及磷脂酶 D 在 Epac-诱导的 PKC ϵ 移位中的参与进行检测。

为了检查 PI-PLC 的参与性, 其中 PLC ϵ 是一员(Schmidt 等, 2001), 在用异丙基肾上腺素刺激 30 秒之前, 将培养物用 PI-PLC 抑制剂 U73122 预培养 15 分钟。PKC ϵ 的移位完全被该抑制剂封闭。相反, U73122 的无活性类似物, U73343, 仅能稍微降低移位($n=8$, 在 U73122 与 U73343 预处理培养物中, 有 $0.3\pm0.3\%$ 和 $15.3\pm1.9\%$ PKC ϵ 移位细胞; 在异丙基肾上腺素对照中, $19.0\pm3.0\%$ PKC ϵ 移位细胞(图 3A))。

虽然 PI-PLC 抑制剂 U73122 和其阴性对照 U73343 溶解在 DMSO 中, 如本文使用最高浓度所示例的, DMSO 本身在较大浓度范围内不会显示任何抑制性作用(稀释度 1: 200, $n=8$, $21.3\pm2.9\%$ PKC ϵ 移位细胞, 图 3A)。

另外, DAG 不能直接由 PLD 产生, 其先生成磷脂酸(PA), 然后 PA 代谢为 DAG(Rizzo 和 Romero, 2002)。而且, PLD 生成的 PA 在 RBL-2H3 细胞中已经显示能直接对 PKC ϵ 起作用(Jose Lopez-Andreo 等, 2003)。因此, 用竞争性 PLD 抑制剂 1-丁醇或其非干扰对照 2-丁醇对培养物进行 15 分钟预处理, 然后用 1 μ M 异丙基肾上腺素刺激 30 秒。使用 1-丁醇而非 2-丁醇导致 PKC ϵ 移位细胞数量减少至基线水平($n=8$, 1-丁醇预处理培养物中 $5.5\pm1.1\%$ PKC ϵ 移位细胞 vs 2-丁醇预处理培养物中 $16.0\pm2.4\%$ PKC ϵ 移位细胞, 图 3A)。

化合物 D-609 显示能够阻断 PC 水解 PLC(PC-PLC), 并保持 PI-PLC 和其它 PLC 活性不变(Schutze 等, 1992)。在用异丙基肾上腺素刺激 30 秒之前, 用 D-609 将 DRG 神经元培养物预培养 15 分钟, 不会改变异丙基肾上腺素-诱

导的 PKC ϵ 移位($n=8$, $20.8\pm2.9\%$ (D-609 预处理)PKC ϵ 移位细胞, 对比在异丙基肾上腺素对照中 $19.0\pm3.0\%$, 图 3A), 表明 PC-PLC 并不参与 PKC ϵ 的激活。因此, PI-PLC 和 PLD, 而非 PC-PLC, 对于 PKC ϵ 的异丙基肾上腺素诱导性移位是必需的。

为了排除 PLC 和 PLD 活性会导致与 PKC ϵ 不同的 PKC 亚型的活化, 其随后会促发 PKC ϵ 的激活, 对 PKC 抑制剂双唛马来酰亚胺 I(BIM)的作用进行了研究。BIM 通过封闭 ATP-结合位点来抑制 PKC 活性, 但在活化过程中并不会抑制 PKCs 移位(Toullec 等, 1991)。同样的, 在用异丙基肾上腺素进行刺激之前, 用该抑制剂预处理培养物 15 分钟。没有出现 PKC ϵ 移位细胞的减少($n=8$, 在 BIM 处理的异丙基肾上腺素刺激细胞中, PKC ϵ 移位 $19.8\pm1.3\%$, 与在未处理的异丙基肾上腺素刺激化细胞中 $19.0\pm3.0\%$, 图 3A)。因此, PI-PLC 和 PLD 并不是通过不同的 PKC 亚型起作用的而是对 PKC ϵ 直接起作用。

PLC 和 PLD 在 Epac 下游

为了研究 PI-PLC 和 PLD 是否在早期实验描绘的 α_s /AC/cAMP/Epac 信号通路的下游, 而非可能的平行信号级联下游(如导致脂肪酶激活的受体酪氨酸激酶的反式活化(Luttrell 等, 1997; Lee 和 Chao, 2001), 在用 CPTOMe 直接激活 Epac 后, 对 U73122 和 U73343 或 1-和 2-丁醇对 PKC ϵ 移位的作用进行评价。同样地, 在添加 Epac 活化剂 CPTOMe 并刺激 90 秒之前, 用相应的抑制剂或其无活性对照化合物预处理培养物 15 分钟。如图 3B 所示, 两种磷脂酶的活性都是应答 Epac 的直接激活发生的 PKC ϵ 移位所必需($n=6$, PKC ϵ 移位 $2.0\pm0.9\%$ 在 U73122, $23.7\pm3.6\%$ 在 U73343, $8.7\pm1.5\%$ 在 1-丁醇, $21.8\pm2.7\%$ 在 2-丁醇预处理和 CPTOMe 刺激化细胞中, 在 CPTOMe 刺激细胞中 $23.5\pm3.7\%$, 图 3B)。

发生在 IB4+神经元中的 β_2 -肾上腺素受体-诱导的 PKC ϵ 移位

虽然几乎所有神经元都表达 PKC ϵ 和 β_2 -AR(分别 $94.9\% \pm 1.8\%$ ($n=409$) 和 $99.8\% \pm 0.2\%$ ($n=407$) 神经元), 仅在 20-35% 神经元中检测到了 PKC ϵ 移位。由于使用的培养物体系包括促进不同功能的感受神经元混合体, 用非肽能感受伤害神经元标记物 IB4 进行双重染色鉴定出发生移位的神经元亚群。大量 PKC ϵ 移位的神经元在 β_2 -AR 刺激之后, 显示出很强的 IB4 细胞膜荧光信号(图 5, $88.6 \pm 2.4\%$ 的 PKC ϵ 移位细胞显示 IB4 染色(评价的培养物: $n=4$, IB4 阳性/PKC ϵ 移位细胞%: 88.9% 、 92.9% 、 81.8% 、 90.9% , PKC ϵ 移位细胞总数: 45))。

Epac 激活 PKC ϵ 从而诱导痛觉过敏

为了确定在培养的感受伤害神经元中的 PKC ϵ 信号通路上游是否也适用于体内的伤害感受体致敏/痛觉过敏的 PKC ϵ 信号传导, 进行了行为实验。使用与确定 PKC ϵ 在 β -AR 激动剂-诱导痛觉过敏中的作用所使用的相同的模型(Khasar 等, 1999b)。结果显示在体内用 CPTOMe 直接激活 Epac 会强烈地诱导机械性痛觉过敏(缩爪阈值降低了 $37.7 \pm 1.9\%$ (用肾上腺素后 ($n=6$)), $34.6 \pm 1.6\%$ (用 CPTOMe 后 ($n=12$)), 盐水注射后 ($n=6$) 阈值增高了 0.4 ± 1.8 , 图 4A)。

接下来, 对 Epac 是否通过激活 PKC ϵ 来介导痛觉过敏的问题进行研究, 该研究通过在注射特异性 PKC ϵ 抑制剂 ϵ VI-2 后, 用 CPTOMe 来刺激痛觉过敏发生来进行。如图 4A 所示, ϵ VI-2 抑制由 CPTOMe 诱导的痛觉过敏(用 CPTOMe 后 ($n=12$) 缩爪阈值降低 $34.6 \pm 1.6\%$, 用 ϵ VI-2 后 ($n=6$) 增加 $1.6 \pm 2.7\%$, CPTOMe 进入 ϵ VI-2 预处理的爪中后 ($n=6$) 增加 $3.9 \pm 2.1\%$)。因此, 体内 Epac 活化也导致 PKC ϵ 活化, 其进而会导致机械性痛觉过敏。

最后,为了确定 PI-PLC 和 PLD 作为 β_2 -AR 和 Epac-诱导性痛觉过敏介质的作用,在用肾上腺素或 CPTOMe 进行刺激之前,先用各自的抑制剂和其无活性对照, U73122/U73343(PI-PLC)和 1-丁醇/2-丁醇(PLD),对爪进行预注射。不进行刺激时,所有抑制剂都不会影响大鼠的基线敏感性($n=6$, U73122 $-4.4\%\pm 1.3\%$, U73343 $2.8\%\pm 1.9\%$, 1-丁醇 $-0.0\%\pm 1.8\%$, 2-丁醇 $-8\%\pm 1.7\%$, 图 4B)。但如体外所显示的, U73122 以及 1-丁醇会抑制 CPTOMe-诱导性痛觉过敏发生(CPTOMe $31.7\%\pm 0.8\%$ ($n=12$), U73122/CPTOMe $-2.5\%\pm 2.0\%$ ($n=6$), 1-丁醇/CPTOMe $-0.5\%\pm 1.8\%$ ($n=6$)),而各自的阴性对照, U73343 和 2-丁醇,就不会 (U73343/CPTOMe $30.9\%\pm 1.9\%$ ($n=6$), 2-丁醇/CPTOMe $33.4\%\pm 1.7\%$ ($n=6$))。因此,在体内, PI-PLC 以及 PLD 都能作为机械痛觉过敏的主要介质。

讨论

Epac 调节 $G\alpha_s$ /cAMP 至 $PKC\epsilon$ 的相互对话

对 GPCR 信号传导的大量研究已经识别了会导致 PKC 活化的不同通路。已经显示 G-蛋白 α_q 和 $\beta\gamma$ (Gudermann 等, 1997), 或生长因子受体的反式活化(Luttrell 等, 1997; Lee 和 Chao, 2001), 但非 G-蛋白 α_s 能导致磷脂酶激活, 从而激活 PKCs。近来,用佛司可林(forskolin)激活 AC 的伤害感受体致敏的研究表明 G-蛋白 α_s 可能会激活 PKC(Gold 等, 1998; Parada 等, 2005)。利用已知的 α_s 活化剂霍乱毒素, AC 活化剂佛司可林(forskolin)和 cAMP 类似物 CPTOMe 的工作为下述原理提供了证据,即事实上, G-蛋白 α_s 也介导激活 $PKC\epsilon$ 的 GPCR 信号传导。

还没有阐明关联 cAMP 和 PKC 信号通路的机理。具体地说,封闭 PKA 的 ATP 结合位点(Lu 等, 1996)的 PKA 抑制剂 CMIQ 并不会消除 DRG 神经元

中的 β_2 -AR-诱导性 PKC ϵ 移位, 这说明在激活 PKC ϵ 之前, α_s /cAMP 第二信使信号通路在 PKA 上游发生分支。本项工作验证了下述假说, 即最近鉴定的 cAMP, Epac 的下游介质(de Rooij 等, 1998; Kawasaki 等, 1998)可以介导此相互对话。虽然已知 Epac 能激活 MAPKs, 但并不知道它能激活 PKCs。使用 Epac-特异性 cAMP 类似物 CPTOMe 显示激活 Epac 会诱导 PKC ϵ 移位, 从而在 DRG 神经元中介导 cAMP/PKC 相互对话。

Epac 通过 PI-PLC 和 PLD 激活 PKC ϵ

由磷脂酶产生的 DAG 能够激活新型 PKC, 如 PKC ϵ 。显示 β_2 -AR 在 HEK293 细胞中会导致 PLC ϵ 激活(Schmidt 等, 2001)。利用抑制剂 U73122 所得的结果表明参与 PKC ϵ 活化的磷脂酶与 PLC ϵ 属于同一类型, 也就是说 PI-PLC 证明了其在 β_2 -AR/Epac-诱导的 PKC ϵ 活化中的主要作用。

虽然 PLC 经常会在 DAG 生成中形成首次增加, PLD 也可以通过产生磷脂酸(PA)而促使 DAG 的增加, 磷脂酸可随后转变成 DAG(Nishizuka, 1992; Claphani 和 Neer, 1993)。但令人吃惊的是, 发现不仅 PLD 参与 PKC ϵ 移位, 而且是 PKC ϵ 移位所必需的。在此方面重要的是, 最近在 RBL-2H3 细胞中显示 DAG 以及 PA 会在两个不同位点结合 PKC ϵ , 而且都会促使 PKC ϵ 至细胞膜的粘附并活化(Jose Lopez-Andreo 等, 2003)。本项工作显示 PLD 是 PKC ϵ 在伤害感受体内移位的必要组成成分。

Epac 介导 PKC ϵ -依赖性机械性痛觉过敏

本工作研究了 Epac 的激活是否会在体内通过 PI-PLC 和 PLD 导致 PKC ϵ -依赖性机械性痛觉过敏。已显示 PKC ϵ 依赖性痛觉过敏需要在感受伤害性神经元中的 PKC ϵ 活性, 从而调节 TTX-R 钠通道, 该通道是疼痛中一个重要的效

应因子组分(Khasar 等, 1999b; Parada 等, 2003b)。已证明将 PKC ϵ 调节剂注射入大鼠后爪中是一种在感受伤害性神经元中调节 PKC ϵ 活性从而调节 PKC ϵ -依赖性痛觉过敏的合适方式(Khasar 等, 1999b; Parada 等, 2003b)。注射 Epac 活化剂 CPTOMe 与 β_2 -AR 作用性肾上腺素以同样的程度诱导机械性痛觉过敏。Epac 活化还会在体内导致 PKC ϵ 激活, 由于使用 PKC ϵ 特异性抑制剂 ϵ VI-2 会完全削弱 Epac 活化剂-诱导的机械性痛觉过敏, 从而确认了体外描绘的信号通路。

确认了磷脂酶 PI-PLC 和 PLD 于体内在 Epac/PKC ϵ -诱导性痛觉过敏中的主要作用。用 U73122 抑制 PI-PLC 或抑制剂 1-丁醇抑制 PLD 都能够完全地破坏 Epac-介导的机械性痛觉过敏, 而各自的抑制剂对照, U73343 和 2-丁醇, 就显示不起作用。因此, 加入 PI-PLC 和 PLD 活性作为 β_2 -AR-诱导性/PKC ϵ -介导机械性痛觉过敏的新的基本组成成分。

Epac 在 IB4+伤害感受体中激活 PKC ϵ

发现 IB4-表位位于 GDNF-依赖性、小直径、感受伤害神经元上, 并且标记了约 30%的 DRG-神经元(Molliver 和 Snider, 1997; Hunt 和 Mantyh, 2001)。这些神经元组成了约 70%的分布于表皮的神元(Lu 等, 2001), 投射到脊髓层 Ili, 而且可能参与神经性痛(Molliver 等, 1997; Bennett 等, 1998; Boucher 等, 2000)。虽然 IB4 已经在疼痛模型中广泛用于蛋白表达变化的描述性的研究, 但对于这些神经元的功能和机械重要性还了解不足。仅在 20-35%的培养 DRG 神经元中观察到了 PKC ϵ 移位。即使 β_2 -AR、Epac(数据未显示)和 PKC ϵ 几乎在所有的 DRG 神经元中都有表达, 但 PKC ϵ 移位还是与 IB4-表位的表达高度相关。还不清楚此种特异性的分子基础, 而且很可能是基于其它目前还未鉴定的信号组分的差异表达, 或者信号组分的差异调节。本观察证实 IB4(+)

神经元是伤害感受体, 而且说明了 IB4-阳性和 IB4-阴性/肽能伤害感受体之间的功能差异。由于 TTX-R 钠电流是通过 $\text{PKC}\epsilon$ 和其它机制来调节的(Khasar 等, 1999b), 因此我们对研究该其它机制是否还存在于 IB4(+)神经元中感兴趣。尽管参与感受伤害的其它分子如 TRPV1 会在 DRG 神经元的不同亚群中表达(Guo 等, 1999; Zwick 等, 2002), 这项工作第一次表明该细胞机制局限在感受伤害性神经元的 IB4(+)亚型。

调节痛觉过敏的 Epac 和其它信号通路

总之, 通过描述导致体外和体内 $\text{PKC}\epsilon$ 激活的信号通路, 本工作对疼痛中的感觉神经元中的胞内信号通路进行了详细分析。因此, 该结果阐明了一种新型的信号传导机制, 两种普遍存在的信号通路 cAMP 和 PKC 之间的相互对话, 这两种信号通路在各种系统比如神经元可塑性中使用。证据表明 Epac 是这种相互对话中的一个重要元素。重要的是, DRG-神经元中的此种信号通路仅限于 IB4(+)伤害感受体, 从而确立了第一个特异性针对这种伤害感受体亚群的机制。描绘导致 $\text{PKC}\epsilon$ 激活的级联工作引入了三种用来治疗疼痛的新靶标, Epac、PI-PKC(如 $\text{PLC}\epsilon$)和 PLD。另外, 该工作提供证据证明不仅 G-蛋白 α_q 和 $\beta\gamma$ 而且 α_s 都能激活 PKC。

该结果提供了一个强有力的切入点, 以进一步研究由其它炎性介质诱导的痛觉过敏中的胞内信号通路。有趣的是, Epac 和其下游靶标 Rap1 的文献暗示了与伤害感受体功能中的其它重要通路比如 PKA 和 MAPK(Khasar 等, 1999b; Aley 等, 2001; Stork 和 Schmitt, 2002), 整合素(Bos 等, 2003; Rangarajan 等, 2003; Dina 等, 2004), 和生长因子受体(Boucher 等, 2000)的进一步的相互对话。

参考文献

Aley KO , Messing RO , Mochly-Rosen D , Levine JD(2000)Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. JNeurosci 20: 4680-4685。

Aley KO , Martin A , McMahon T , Mok J , Levine JD , Messing RO(2001)Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. JNeurosci 21: 6933-6939。

Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB, Priestley JV(1998)A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. J Neurosci 18: 3059-3072。

Bond RA, Leff P, Johnson TD, Milano CA, Rockman HA, McMinn TR, Apparsundaram S, Hyek MF, Kenakin TP, Allen LF, et al.(1995)Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2- adrenoceptor. Nature 374: 272-276。

Bos JL, de Bruyn K, Enserink J, Kuiperij B, Rangarajan S, Rehmann H, Riedl J, de Rooij J, van Mansfeld F, Zwartkruis F(2003)The role of Rap1 in integrin- mediated cell adhesion. Biochem Soc Trans 31: 83-86。

Boucher TJ, Okuse K, Bennett DL, Munson JB, Wood JN, McMahon SB(2000)Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. Science 290: 124-127。

Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA(1999)Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. Neuron 23: 617-624。

Clapham DE, Neer EJ(1993)New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365: 403-406.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL(1998)Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396: 474-477。

Dina OA, Chen X, Reichling D, Levine JD(2001)Role of protein kinase Cepsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 108: 507-515。

Dina OA, McCarter GC, de Coupade C, Levine JD(2003)Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signaling for inflammatory pain. *Neuron* 39: 613-624。

Dina OA, Parada CA, Yeh J, Chen X, McCarter GC, Levine JD(2004)Integrin signaling in inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Eur J Neurosci* 19: 634-642。

Dina OA, Barietta J, Chen X, Mutero A, Martin A, Messing RO, Levine JD(2000)Key role for the epsilon isoform of protein kinase C in painful alcoholic neuropathy in the rat. *J Neurosci* 20: 8614-8619。

Dorn GW, 2nd, Mochly-Rosen D(2002)Intracellular transport mechanisms of signal transducers. *Annu Rev Physiol* 64: 407-429。

Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL(2002)A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol* 4: 901-906。

Gold MS, Levine JD, Correa AM(1998)Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in

vitro. J Neurosci 18: 10345-10355。

Gudermann T, Schoneberg T, Schultz G(1997)Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. Annu Rev Neurosci 20: 399-427。

Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R(1999)Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1(VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. Eur J Neurosci 11: 946-958.

Hunt SP, Mantyh PW(2001)The molecular dynamics of pain control. NatRevNeurosci 2: 83-91。

Johnson JA, Gray MO, Chen CH, Mochly-Rosen D(1996)A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. J Biol Chem 271: 24962-24966。

Jose Lopez-Andreo M, Gomez-Fernandez JC, Corbalan-Garcia S(2003)The simultaneous production of phosphatide acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase Cepsilon to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. Mol Biol Cell 14: 4885-4895。

Joseph EK, Levine JD(2003 a)Sexual dimorphism in the contribution of protein kinase C isoforms to nociception in the streptozotocin diabetic rat. Neuroscience 120: 907-913。

Joseph EK, Levine JD(2003b)Sexual dimorphism for protein kinase c epsilon signaling in a rat model of vincristine-induced painful peripheral neuropathy. Neuroscience 119: 831-838。

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM(1998)A family of cAMP-binding proteins that directly

activate Rap1. Science 282: 2275-2279。

Keiper M, Stope MB, Szatkowski D, Bohm A, Tysack K, Vom Dorp F, Saur O, Oude Weernink PA, Evellin S, Jakobs KH, Schmidt M(2004)Epac- and Ca^{2+} - controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors. Involvement of Rap2B -activated phospholipase C-epsilon. J Biol Chem。

Khasar SG, McCarter G, Levine JD(1999a)Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. J Neurophysiol 81: 1104-1112。

Khasar SG, Ouseph AK, Chou B, Ho T, Green PG, Levine JD(1995)Is there more than one prostaglandin E receptor subtype mediating hyperalgesia in the rat hindpaw? Neuroscience 64: 1161-1165。

Khasar SG, Lin YH, Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, Hundle B, Aley KO, Isenberg W, McCarter G, Green PG, Hodge CW, Levine JD, Messing RO(1999b)A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. Neuron 24: 253-260。

Lee FS, Chao MV(2001)Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 3555-3560。

Lu J, Zhou XF, Rush RA(2001)Small primary sensory neurons innervating epidermis and viscera display differential phenotype in the adult rat. Neurosci Res 41: 355- 363。

Lu ZX, Quazi NH, Deady LW, Polya GM(1996)Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by isoquinoline derivatives. Biol Chem Hoppe Seyler 377: 373-384。

Luttrell LM, Delia Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ(1997)Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. J Biol Chem 272: 4637-4644。

Molliver DC, Snider WD(1997)Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons. J Comp Neurol 381: 428-438。

Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD(1997)IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. Neuron 19: 849-861。

Nishizuka Y(1992)Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258: 607-614。

Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M(2002)Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. J Biol Chem 277: 13375-13378。

Parada CA, Reichling DB, Levine JD(2005)Chronic hyperalgesia priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCvarepsilon second messenger pathways. Pain 113: 185-190。

Parada CA, Yeh JJ, Joseph EK, Levine JD(2003 a)Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. Eur J Neurosci 17: 1847-1852。

Parada CA, Yeh JJ, Reichling DB, Levine JD(2003b)Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesia state in the rat. Neuroscience 120: 219-226。

Parekh DB , Ziegler W, Parker PJ(2000)Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *Embo J* 19: 496-503。

Penn RB , Parent JL , Pronin AN , Panettieri RA , Jr 。 , Benovic JL(1999)Pharmacological inhibition of protein kinases in intact cells: antagonism of beta adrenergic receptor ligand binding by H-89 reveals limitations of usefulness. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 428-437。

Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij UB, de Rooij J, Price LS, Schwede F, Bos JL(2003)Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol* 160: 487-493。

Rehmann H , Schwede F , Doskeland SO , Wittinghofer A , Bos JL(2003)Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem* 278: 38548-38556。

Rizzo M, Romero G(2002)Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol Ther* 94: 35-50。

Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, von Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW , Jakobs KH(2001)A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol* 3: 1020-1024.

Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Kronke M(1992)TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C- induced“acidic”sphingomyelin breakdown. *Cell* 71: 765-776。

Slice LW, Taylor SS(1989)Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264: 20940-20946。

Stork PJ, Schmitt JM(2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. Trends Cell Biol 12: 258-266。

Sweitzer SM, Wong SM, Peters MC, Mochly-Rosen D, Yeomans DC, Kendig JJ(2004) Protein kinase C ϵ and γ : Involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. J Pharmacol Exp Ther。

Taiwo YO, Levine JD(1989) Contribution of guanine nucleotide regulatory proteins to prostaglandin hyperalgesia in the rat. Brain Res 492: 400-403。

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al。(1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. J Biol Chem 266: 15771-15781。

Zwick M, Davis BM, Woodbury CJ, Burkett JN, Koerber HR, Simpson JF, Albers KM(2002) Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B4-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. J Neurosci 22: 4057-4065。

应理解，本文描述的实施例和具体实施方式仅是示意性的目的，本领域技术人员可以对其进行各种修改和改变，而且都包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的保护范围之内。本文所引用的所有公开出版物、专利和专利申请以其整体引入本文以供一切目的的参考。

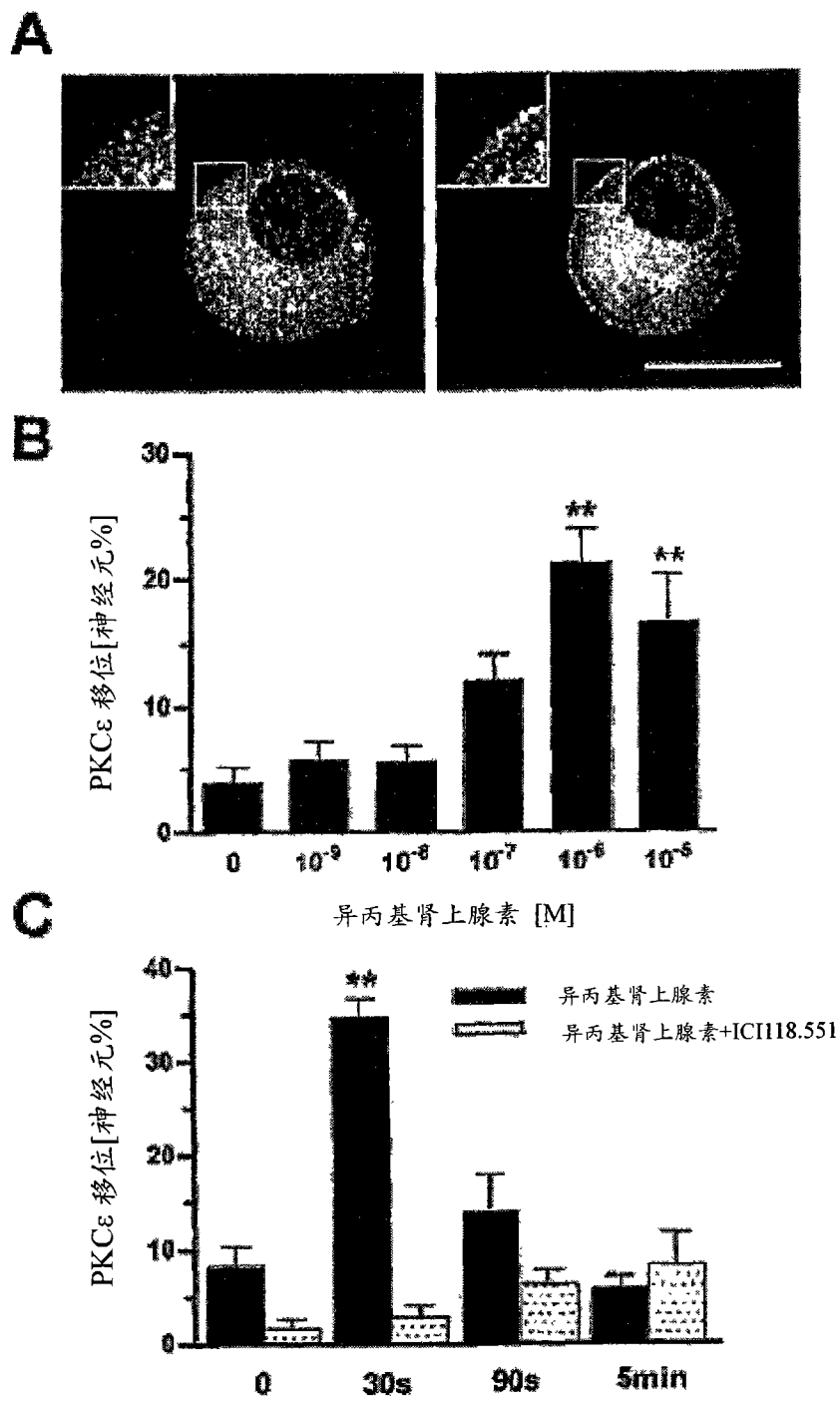


图 1

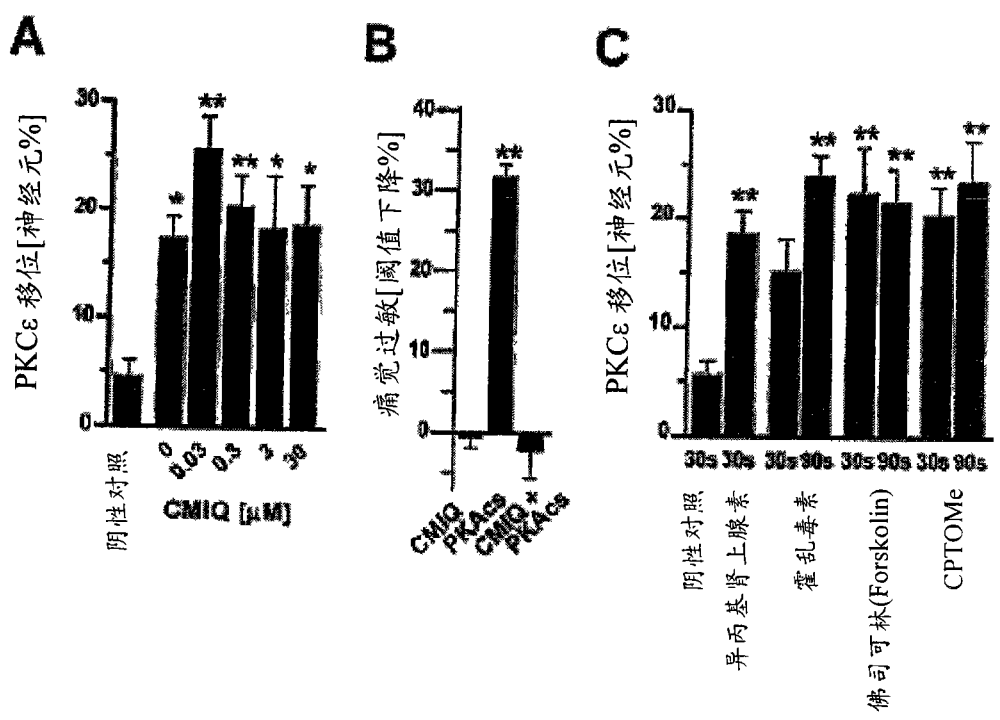


图 2

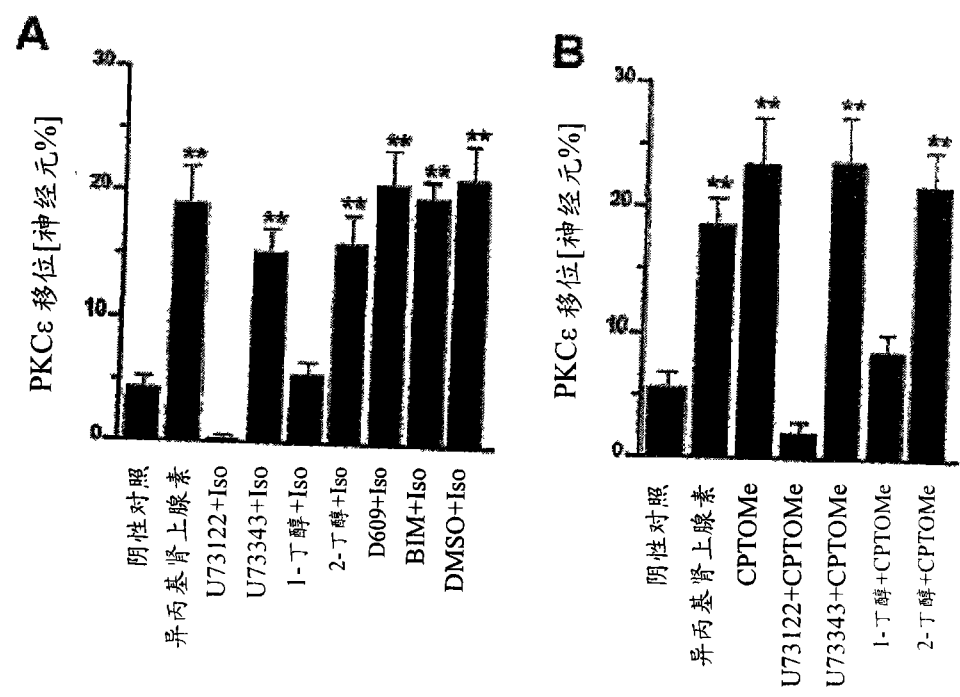


图 3

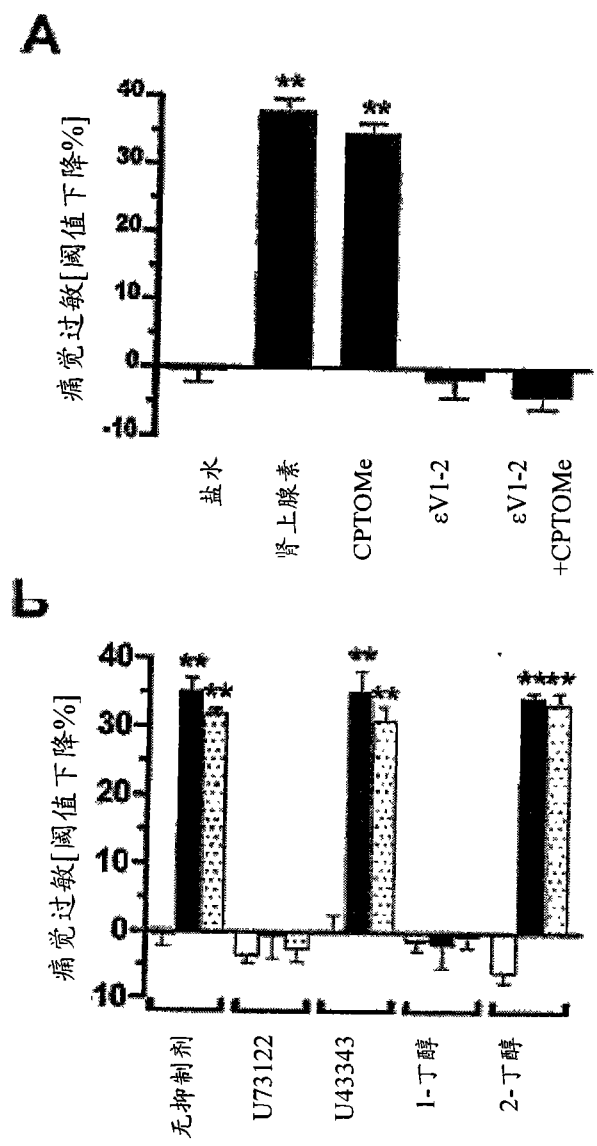


图 4

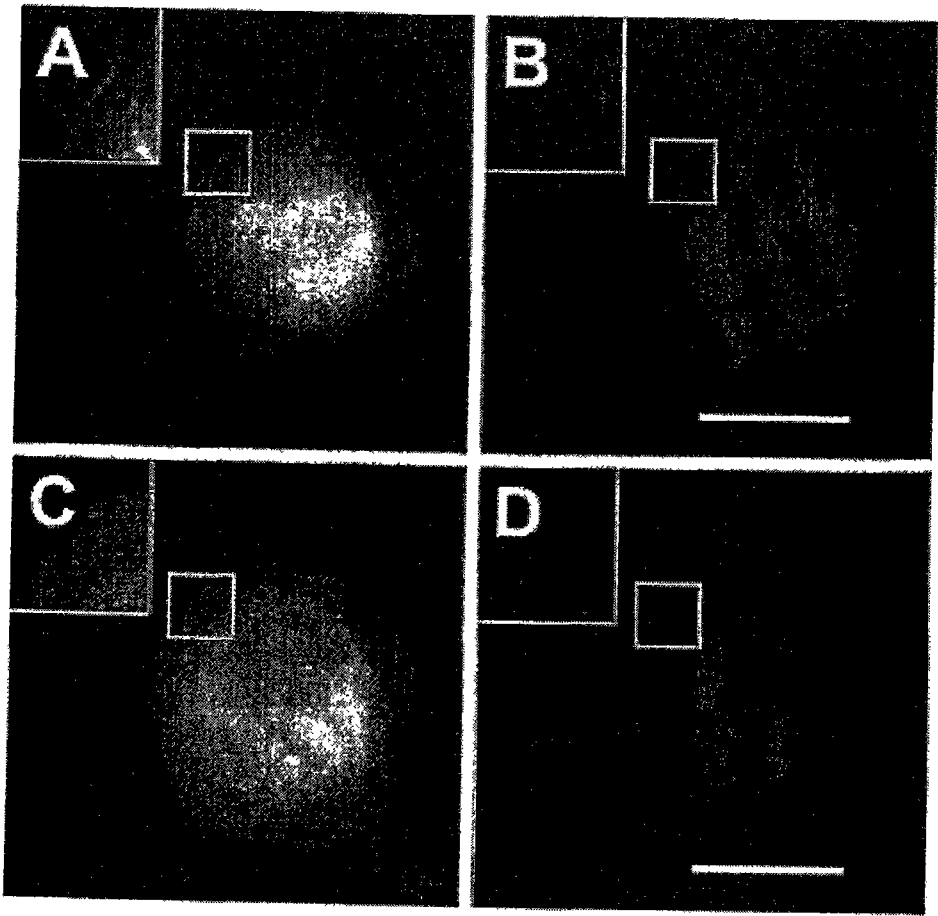


图 5

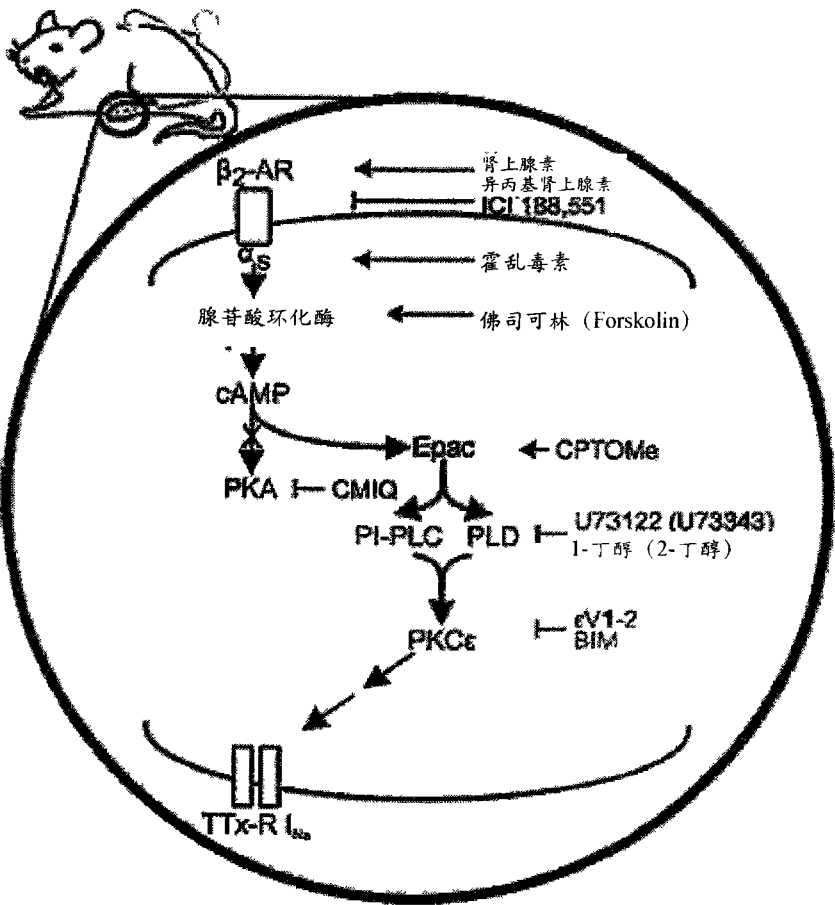


图 6