

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/47

C07D473/04 A61K 38/17

A61K 31/52



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95197439.4

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1133650C

[22] 申请日 1995. 11. 6 [21] 申请号 95197439. 4
[30] 优先权
[32] 1994. 11. 22 [33] US [31] 08/343,714
[86] 国际申请 PCT/US95/14345 1995. 11. 6
[87] 国际公布 WO96/16084 英 1996. 5. 30
[85] 进入国家阶段日期 1997. 7. 22
[71] 专利权人 美国政府卫生与公众服务部
地址 美国马里兰州
[72] 发明人 H · B · 波兰德 K · A · 雅各布森
审查员 沈志红

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 吴玉和 温宠艳

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 11 页

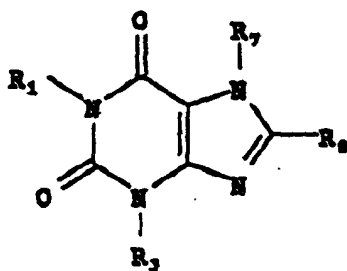
[54] 发明名称 一种鉴定用于在动物细胞中激活氯传导的结合 CFTR 的化合物的方法

[57] 摘要

本发明提供一种方法, 该方法可以鉴定用于治疗尖端氯传导降低的细胞(例如囊状纤维变性细胞)的结合 CFTR 的化合物。本鉴定方法用到 CFTR 蛋白的组成部分 -I α 多肽。本发明还提供一种治疗囊状纤维变性细胞的方法, 该方法是通过将尖端氯传导降低的细胞与医疗有效量的用本发明的鉴定方法筛选到的化合物相接触而完成的。用于这种治疗的优选化合物对腺苷细胞受体亲和性很小或无亲合性。本发明提供用于实施本发明方法的新型化合物, 以及含有这些化合物的药物组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种多肽，它选自由 SEQ ID NO: 1 表征的多肽 I α 、由 SEQ ID NO: 3 表征的多肽 I β 和由 SEQ ID NO: 4 表征的多肽 I α 。
- 5 2. 权利要求 1 的多肽，其中所述多肽与亲和层析基质共价连接。
3. 权利要求 2 的多肽，其中所述亲和层析基质是 Sepharose、琼脂糖、聚丙烯酰胺或纤维素。
4. 一种鉴定结合 CFTR 的化合物的方法，其包括将假定的结合 CFTR 的化合物与由 SEQ ID NO: 1 表征的多肽 I α 在足以使该假定的结合
- 10 CFTR 的化合物与多肽 I α 结合的条件下相接触，并确定是否发生这种结合，若有结合迹象则说明该假定的结合 CFTR 的化合物是结合 CFTR 的化合物。
5. 权利要求 4 的方法，其中结合 CFTR 的化合物对由 SEQ ID NO: 3 表征的多肽 I β 和由 SEQ ID NO: 4 表征的多肽 I α 有中等的或负的
- 15 亲和性。
6. 权利要求 4 的方法，其中结合 CFTR 的化合物在加入到含脂质体的组合物中时会造成脂质体聚集。
7. 权利要求 4 的方法，其中结合 CFTR 的化合物在加入到含嗜铬颗粒的组合物中时会造成嗜铬颗粒聚集。
- 20 8. 权利要求 7 的方法，其中该组合物基本上由溶于 1mM CaCl₂ 的嗜铬颗粒组成。
9. 下式的化合物：



25

其中(a) R₁和R₃为甲基，R₇是环丙基甲基和R₈是环己基，或(b) R₁和R₃

为烯丙基、 R_7 为氢和 R_8 是环己基。

10. 权利要求 9 的化合物，其中所述化合物是 1,3-二烯丙基-8-环己基黄嘌呤。

11. 一种药物组合物，含有可药用载体和权利要求 9 的化合物。

5 12. 一种药物组合物，含有可药用载体和权利要求 10 的化合物。

13. 权利要求 9 的化合物在制备治疗哺乳动物囊状纤维变性的药物中的用途。

14. 权例要求 13 的用途，其中所述哺乳动物是人类。

10 15. 权利要求 13 的用途，其中所述药物是作用于哺乳动物肺部的药物。

16. 权利要求 13 的用途，其中所述药物是水性药物组合物，其中含有约 0.001-约 0.01%重量/重量的所述化合物。

17. 权利要求 13 的用途，其中 K_i 至少为 0.05。

15 18. 一种选自由 SEQ ID NO: 2 表征的多聚核苷酸 I α 、由 SEQ ID NO: 5 表征的多聚核苷酸 I β 和由 SEQ ID NO: 6 表征的多聚核苷酸 I γ 的多聚核苷酸。

一种鉴定用于在动物细胞中激活氯传导的结合 CFTR 的化合物的方法

5

发明领域

本发明涉及一种方法，该方法可以鉴定用于治疗尖端（apical）氯传导降低的细胞（如囊状纤维变性细胞）的结合 CFTR 的化合物。本发明进一步涉及用于治疗此类细胞的化合物及其组合物。

10

发明背景

健康的动物细胞除需要其它条件和物质之外，还需要维持各种无机离子的跨细胞膜运动，使正常的离子平衡提供必要的跨细胞膜电位和促进生命活动的胞内离子强度。例如，动物中 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 和 Ca^{++} 的跨膜运动使得 K^+ 和 Ca^{++} 在不同细胞的不同发育阶段在胞内进行程度不同的聚积，而 Na^+ 大部分排斥于胞外。这些离子的跨膜运动由位于适当的离子通道位点的，与膜相连的依赖 Na^+/K^+ 和依赖 Ca^{++} 的 ATP 酶介导。据认为，氯离子以被动方式透过动物细胞，使胞外液与胞内液之间达到浓度平衡，从而由于整体的负胞内变化而导致胞内 Cl^- 浓度偏低（underrepresentation）。但也有文献表明氯传导也被 Cl^- 通道主动介导（见 Edwards, 神经科学（Neuroscience），7, 1335 - 1366（1982））。

针对囊状纤维变性（“CF”）病理的研究结果为细胞水平离子传导缺损对人的健康的不同水平的致病作用提供了资料。CF 有遗传基础，因为其在白种美国人中的发病率（在 1/1600 至 1/2000 活婴之间）与在黑种美国人中的发病率（约 1/17,000 活婴）不同。实际上，过去十年的研究表明一种可遗传的特定基因突变与 CF 的临床症状相关，所述症状包括外分泌腺和肺功能失常。

更具体地说，CF 是由囊状纤维变性跨膜调节物（CFTR）基因突变造成的，最普通的突变是 508 位的苯丙氨酸残基（ Phe^{508} ，图 1 为 CFTR 蛋白的物理图谱）缺失。该突变的 CFTR 蛋白被称为 ΔF508 ，其位点位于第一个核苷酸结合折叠（NBF - 1）中。Schoumacher 等，美国国家科学院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci.）87, 4012 - 4016（1990）；

Riordan 等, 科学 (Science) 245 , 1066 - 1073 (1979)。更具体地说, 该突变位于一段较长的 NBF - 1 内部片段中, N 末端侧连着 Walker A 序列 (458 - 471 位氨基酸; 又称 “ CFTR[458 - 471]”), C 末端侧连着相邻的 C 结构域 (548 - 560 位氨基酸; 又称 “ CFTR[548 - 560]”) 和 Walker B 结构域 (561 - 573 位氨基酸; 又称 “ CFTR[561 - 573]”)。位于 CFTR[471]和 CFTR[561]之间的中间序列的生理作用尚不清楚, 该中间序列包括 I α 、I β 和 I γ 多肽序列 (见图 1)。

CFTR 基因的某些突变, 例如造成 $\Delta F508$ 的突变, 导致跨 CF 上皮的电势差异常。该异常是由于细胞尖端氯 (Cl^-) 传导降低。因而, 例如 CF 患者的跨上皮细胞膜的氯和钠的运输均异常。还已知携带 $\Delta F508$ 突变的细胞有比正常水平高的结合内质网 (此后被称为 “ ER ”) 的 CFTR 蛋白质, 虽然野生型细胞在其 ER 中也保留并降解相当量的 CFTR 蛋白, 但比 $\Delta F508$ 突变体的少得多。Ward 等, 遗传生理学杂志 (J. Gen. Physiol.), 104 , 33a (1994)。

该 CFTR 突变很明显是造成呼吸系统病理生理变化的原因之一。该病的几乎所有患者都患有慢性进行性呼吸系统疾病。大多数情况下出现胰功能失调, 肝胆和生殖泌尿系统疾病也较频繁。

虽然近年来囊状纤维变性患者的存活率有改善, 但即使开发并广泛应用了支持及预防措施后平均存活年龄仍仅有 28 岁。目前治疗该病的努力集中于能够激活突变体 CFTR 基因产物或用其它方法造成患病细胞 Cl^- 分泌增加的药物上。基因疗法是另一活跃的研究领域, 可通过引入重组野生型 CFTR 基因, 即没有导致功能异常的突变的 CFTR 基因, 来修复阴离子传导缺损。

近来有报道, 用含氯吡咪 (Knowles 等, 新英格兰医学杂志 (N. Engl. J. Med.), 322 , 1189 - 1194 (1990)) 或 ATP 和 UTP 的混合物 (Knowles 等, 新英格兰医学杂志, 325 , 533 - 538 (1991)) 的气溶胶来减缓气管上皮中 Cl^- 的聚集, 临床结果令人鼓舞。

其它可用于治疗 CF 的药物亦见于报道。例如美国专利 4, 866, 072 号描述用 9 - 乙基 - 6, 9 - 二氢 - 4, 6 - 二氧 - 10 - 丙基 - 4H - 吡喃 (3, 2-g) 喹啉 - 2, 8 - 二羧酸或其药用衍生物来治疗 CF。美国专利 4, 548, 818 号描述用 3 - 烷基黄嘌呤治疗慢性阻塞性肺病 (COPD)。美

国专利 5,032,593 描述用 1,3 - 烷基取代的 8 - 苯基黄嘌呤或其药用盐治疗支气管缩小。美国专利 5,096,916 描述咪唑啉 α - 肾上腺素能阻遏剂和血管舒张剂如苄唑啉治疗 COPD, 包括囊状纤维变性, 慢性支气管炎和气肿, 或与气喘有关的 COPD。

- 5 过去曾用茶碱对哮喘和 CF 患者给药来增强肺功能。这种肺功能增强主要由支气管扩张造成, 这是由于茶碱对平滑肌及炎症的作用。茶碱不仅抑制磷酸二酯酶, 还拮抗腺苷受体。相应地, 由于茶碱作用于多个位点, 它明显地缺乏特异性, 因而降低了治疗 CF 的效用。考虑到是对 A₁ 腺苷受体的拮抗而非对磷酸二酯酶的抑制刺激了 CF 细胞的氯外流, 这种
- 10 特异性的缺乏会导致不利的副作用, 如对心脏、肾和/或中枢神经系统组织有害。另外, 必须施用大剂量茶碱才能取得良好效果, 因而增加了该化合物的高毒性副作用的危险。

- 已检测了其它基本结构与茶碱类似的化合物, 但未发现能激发 CF 细胞的氯外流, 因而用于治疗囊状纤维变性的潜力不大。例如 3 - 异丁
- 15 基甲基黄嘌呤 (IBMX) 的结构与茶碱相似, 其活性无特异性, 毒性高, 因而不能用于治疗 CF。化合物 2 - 硫代 - 8 - 环戊基 - 1,3 - 二丙基黄嘌呤 (2 - 硫代 - CPX), 1,3 - 二丙基 - 8 - 新金刚烷基黄嘌呤 (KW - 3902) 和 1,3 - 二甲基 - 8 - 环戊基黄嘌呤 (CPT) (见美国专利 5,366,977 号) 也不能有效刺激氯外流。类似地, 用单碳基团取代 CPX (1,
- 20 3 - 二丙基 - 8 - 环戊基黄嘌呤) 的 1 或 3 位的丙基得到的化合物不能有效地刺激 CF 细胞的氯外流。很明显, 微小的结构差别对一给定化合物能否有效地用于治疗 CF 的影响即使不是根本性的也是很显著的。相应地, 若有一种方法能对化合物促进患病细胞氯离子传导的能力进行筛选, 选出用于治疗囊状纤维变性患者的药剂候选物, 这将会特别有用。

- 25 上面引用的 '977 号专利和 Eidelman 等, 美国国家科学院院刊, 89, 5562 - 5566 (1992) 公开了 CPX 是强力 A₁ 腺苷拮抗物, 能促进一种人类上皮细胞系 (CFPAC - 1) 的氯外流。CFPAC - 1 细胞系表达上述 CFTR $\Delta F508$ 突变, 可视为 CF 活性化合物的第一代筛选材料, 进一步描述见实施例 6。虽然 '977 号专利公开的 CPX 及其相关的黄嘌呤氨基
- 30 同类物相对无毒, 因而可用于 CF 治疗, 但这些化合物对 A₁ 腺苷受体的拮抗作用表明这种治疗可能对动物有与 CF 疾患无关的附加影响。因而优

选地避免应用这些化合物，或是任何有多重活性靶的化合物，因为应用这些化合物至少可能有害。

强力、低毒、对腺苷受体特异性很少或没有的药物将是很理想的药剂，用于治疗尖端 Cl^- 传导降低的细胞，如囊状纤维变性细胞。这样一种
5 药物不仅用于治疗囊状纤维变性本身，还可用于治疗一般的 COPD。

本发明的一个目的是提供一种鉴定能激活受损的氯传导通道的化合物的方法。本发明的另一目的是提供一种修正氯传导受损的细胞中氯传导降低的方法。本发明的另一目的是提供一种治疗囊状纤维变性细胞的方法。本发明的另一目的是提供一种方法，用于治疗在囊状纤维变性跨
10 膜调节物的 508 位氨基酸苯丙氨酸缺失的囊状纤维变性细胞。本发明的另一目的是提供用于这些方法的化合物，特别是新的黄嘌呤衍生物，它对腺苷受体的亲合性很小或没有，但仍能通过激发 Cl^- 外流改善 CF 细胞的 Cl^- 不平衡。

本发明的这些及其它目的和优点，以及其它发明特征，在本文提供的发明描述中是显而易见的。
15

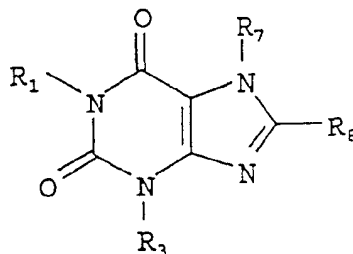
发明简述

本发明提供某些 CFTR 多肽，如 $\text{I}\alpha$ [SEQ ID NO: 1]，它们能特异性地结合那些在 ΔF508 突变体细胞中激活与 CFTR 相关联的氯离子外流的化合物，但不结合那些不能激活与 CFTR 相关联的氯离子外流的化合物。此外，本发明提供一种方法，用于鉴定其它能激活与 CFTR 相关联的氯离子外流的化合物。该方法包括应用前述 CFTR 多肽作离子外流激活化合物的选择性结合剂。作为对该鉴定方法的进一步改进，还公开了具有与 $\text{I}\alpha$ 位置相邻或重叠区域的氨基酸序列的其它 CFTR 多肽，如
20 $\text{I}\beta$ [SEQ ID NO: 3]或 $\text{I}\gamma$ [SEQ ID NO: 4]，虽然它们与 $\text{I}\alpha$ 位置相近或有重叠，但其对激活离子外流的化合物有中等的或负的亲合性。

前述鉴定法可用于鉴定能在离子外流缺陷的细胞如 CF 细胞，特别是带有 ΔF508 突变的细胞中激活离子外流的化合物。而且这些化合物在本发明的范围中进一步被筛选，得到对 A_1 腺苷细胞受体或 A_2 腺苷受体很少有或没有亲和性的化合物。这些化合物可相应地用于治疗尖端 Cl^- 传导降低的细胞，如 CF 细胞。具体地说，本发明方法涉及将尖端 Cl^- 传导
30

降低的细胞与治疗有效量的对 A₁、A₂ 或 A₃ 腺苷细胞受体很少有或没有亲和性的化合物相接触。本发明的化合物与 CF 细胞的接触导致这些细胞中 Cl⁻ 外流。

具体地说，本发明的方法涉及将细胞接触下式化合物：



其中 R₁ 和 R₃ 相同，是 C₁ - C₆ 烷基或 C₁ - C₆ 链烯基，R₇ 是 C₁ - C₆ 烷基或氢，R₈ 是 C₄ - C₈ 环烷基。这种化合物可进一步选自 1,3 - 二丙基 - 7 - 甲基 - 8 - 环戊基黄嘌呤、1,3 - 二丙基 - 7 - 甲基 - 8 - 环己基黄嘌呤、环己基咖啡因、1,3 - 二烯丙基 - 8 - 环己基黄嘌呤及其药用衍生物。

用于本发明方法的化合物在基本结构上类似于茶碱，但在 R₁、R₃ 和 R₈ 位的取代基差别很大。由于类似茶碱的化合物的微小结构差别使化合物在 CF 治疗上无效或因其它原因失去效用，发现上述化合物可以有效激活 CF 细胞的氯外流是令人惊奇的。由于本发明的化合物的表观作用模式不涉及任何一种腺苷受体，因而这一发现特别出乎意料。

附图简述

图 1 是 CFTR 蛋白质的物理图谱，显示下列序列的位置：Walker A（氨基酸 458 - 471）；Iα（氨基酸 477 至 508）；Iβ（氨基酸 509 至 539）；Iγ（氨基酸 550 至 530）；C（氨基酸 548 至 560）；Walker B（氨基酸 561 - 573）。

图 2 描绘某些浓度为 20 μg/ml（5.2 μM），pH 6.0 的 CFTR 多肽和 1mM Ca⁺⁺ 造成的嗜铬颗粒聚集。x 轴单位为分钟，y 轴单位为浊度变化（Δ540nm）。

图 3A 描绘不同浓度 Iα 多肽存在时嗜铬颗粒的聚集。x 轴单位是 Iα 多肽浓度（μg/ml），y 轴单位是浊度变化（Δ540nm）。进行反应以获

取图 2 的数据, 计算每种浓度 $I\alpha$ 的初始速率。

图 3B 是图 3A 中显示的数据的 Hill 图。 $V_{\max \text{ app}}$ 由数据的 Lineweaver - Burk 图 ($\log(V_i/V_m - V_i)$ 对 $\log[I\alpha]$) 的线性外推估算, 并计算各条件的速率比。斜率 (2.6) 是 Hill 系数 (n_H)。

- 5 图 4A 描绘不同 pH 值 (x 轴) 下 $I\alpha$ 造成的磷脂酰丝氨酸脂质体聚集 (y 轴是 ΔA_{350} /分钟)。 $I\alpha$ 浓度是 $2\mu\text{g/ml}$ (0.6mM)。

图 4B 描绘随时间 (x 轴, 单位为分钟) 测量的低浓度 $I\alpha$ 多肽造成的磷脂酰丝氨酸脂质体聚集 (y 轴是 ΔA_{350} /分钟)。

- 10 图 5 描绘 CPX (x 轴, 单位为 min) 对 $I\alpha$ 多肽驱动的磷脂酰丝氨酸脂质体聚集 (y 轴是 ΔA_{350}) 的影响。嵌入图描绘在 20 分钟时 CPX 活化的浓度依赖性, 其中 y 轴是 ΔA_{350} /20 分钟, x 轴是 CPX 浓度, 单位为 nM。

- 15 图 6 描绘咖啡因 (x 轴为浓度, 单位为 min) 对 $I\alpha$ 多肽驱动的磷脂酰丝氨酸脂质体聚集 (在 y 轴上测量, 单位是 ΔA_{350}) 的影响。嵌入图描绘在 20 分钟时 CPX 活化的浓度依赖性, 其中 y 轴是 ΔA_{350} /20 分钟, x 轴是咖啡因浓度, 单位为 nM。

图 7 描绘 DAX 浓度 (x 轴, 单位为 min) 对 $I\alpha$ 多肽驱动的磷脂酰丝氨酸脂质体聚集 (y 轴, ΔA_{350}) 的影响。嵌入图描绘在 20 分钟时 DAX 活化的浓度依赖性, 其中 x 轴是 DAX 浓度, 单位为 nM, y 轴单位为 ΔA_{350} /20 分钟。

- 20 图 8 描绘 $I\alpha$ 多肽驱动的磷脂酰丝氨酸脂质体聚集的 CPX 与 DAX 活化的对比。x 轴上 CPX 或 DAX 的浓度单位为 nM, y 轴单位为 ΔA_{350} /20 分钟。

- 25 图 9 描绘 CFPAC 细胞接触化合物 1 (茶碱) 的 $[^{36}\text{Cl}]^-$ 外流的研究结果。x 轴代表化合物 1 的 nM 浓度, y 轴代表氯外流速率, 它是对照的百分数。

图 10 描绘 CFPAC 细胞接触化合物 5 (CPX) 的 $[^{36}\text{Cl}]^-$ 外流的研究结果。x 轴代表化合物 5 的 nM 浓度, y 轴代表氯外流速率, 它是对照的百分数。

- 30 图 11 描绘 CFPAC 细胞接触化合物 22 (8-环己基甲基咖啡因) 的 $[^{36}\text{Cl}]^-$ 外流的研究结果。x 轴代表化合物 22 的 nM 浓度, y 轴代表氯外流速率, 它是对照的百分数。

图 12 描绘 CFPAC 细胞接触化合物 17 (1,3 - 二烯丙基 - 8 - 环己基黄嘌呤)的 $[^{36}\text{Cl}]^-$ 外流的研究结果。x 轴代表化合物 17 的 nM 浓度, y 轴代表氯外流速率, 它是对照的百分数。

图 13 描绘在检测茶碱衍生物不同大小的 8 - 环烷基取代基 (x 轴) 对 K_i 值的影响 (μM , y 轴) 时, 对氯外流的研究结果。给出了大鼠皮层 A_1 - 腺苷受体 (●) 和大鼠纹状 (striated) A_{2a} - 腺苷受体 (Δ) 上 8 - 环烷基茶碱衍生物的亲和性。

图 14 描绘在检测咖啡因衍生物不同大小的 8 - 环烷基取代基 (x 轴) 对 K_i 值的影响 (μM , y 轴) 时, 对氯外流的研究结果。给出了大鼠皮层 A_1 - 腺苷受体 (●) 和大鼠纹状 A_{2a} - 腺苷受体 (Δ) 上 8 - 环烷基咖啡因衍生物的亲和性。

优选实施方案详述

本发明提供对激活 CFTR 突变细胞中氯离子外流的化合物有正亲和性的多肽。本发明的多肽是 CFTR 蛋白的一部分, 即图 1 中标记为 $I\alpha$ 的片段, 或是其功能差别不大的衍生物, 如下所述。 $I\alpha$ 被定义为跨 477 位至 508 位氨基酸的多肽, 具有下列序列:

NH_2 - PSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENEEF - COOH

[SEQ ID NO: 1]

其中 NH_2 和 COOH 基团之间的大写字母是各氨基酸的通用单字母符号, 这种关于蛋白质的术语也用于下述 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 中。

多肽 $I\alpha$ [SEQ ID NO: 1]的制备可通过 (1) 用本领域熟知的方法作分析性或制备性多肽合成 (见例如 Atherton 等, 《固相多肽合成实用方法》(牛津大学出版社, 1989)), (2) 用本领域熟知的遗传工程方法通过适当地温育含有合适的 DNA 或 RNA 序列的微生物来表达 $I\alpha$ 多肽 (见例如 Sambrook 等, 《分子克隆实验指南》(第 2 版, 1989)), 或 (3) 其它合适的方法。在本发明范围内还考虑到保守氨基酸变化, 如本领域已知, 这些变化不会造成多肽的电荷或构型变化, 这构成本发明的其它实施方案。例如, 据认为将异亮氨酸换成亮氨酸对 $I\alpha$ 多肽的功能影响很小或没有。还考虑到 $I\alpha$ 片段可能也有功能, 因此这些片段限定了本发明的其它实施方案。

用于构建克隆以合成 $I\alpha$ 的合适 DNA 和/或 RNA 序列可利用遗传密

码通过I α 氨基酸序列[SEQ ID NO: 1]的逆向翻译和转录推得。DNA的“有义”和“反义”链中的一条或两条可用于遗传工程构建质粒以合成I α 。相似地，RNA序列也可构成“有义”或“反义”链。相应地，本发明也可以被认为是通过本文提到的RNA或DNA序列来实施的。

5 可用任何合适的方法生成具有任一下列序列的RNA分子：

CCN UCN GAR GGN AAR AUH AAR CAY UCN GGN
CGN AUH UCN UUY UGY UCN CAR UUY UCN UGG
AUH AUG CCN GGN ACN AUH AAR GAR AAY GAR
GAR UUY [SEQ ID NO: 2]

10 其中A是腺嘌呤，G是鸟嘌呤，U是尿嘧啶，C是胞嘧啶，W是A或U，Y是C或U，R是A或G，H是A、C或U，N是G、A、C或U，各符号排成三联体以反映在生物体中翻译的密码子。这种与RNA相关的术语也被用于下面的SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6。

本文也考虑那些通过翻译得到相同的多肽序列或其功能等价物的其它RNA序列。例如三联体UCN可被三联体AGY取代并且三联体CGN
15 可被三联体AGR取代，得到的多肽序列没有改变。除了在RNA水平鉴定到的中性序列差异，上述使得到的氨基酸序列发生保守变化的核苷酸改变也在考虑之列，因此例如编码异亮氨酸的三联体AUH可被编码同分异构体亮氨酸的三联体CUN替换，而对所述的多肽的功能无明显影响。
20 任一这种序列可连接入合适的核酸载体，用本领域熟知的方法在合适的细胞或病毒宿主中增殖表达。

上述RNA分子的遗传互补物，即反义RNA，以及有义和反义RNA分子的DNA对应物也考虑作为本发明的实施方案。生成上述序列，其互补物或其DNA对应物以及下述序列的合适方法包括人工或自动的体外
25 多聚核苷酸合成。这样的序列一旦被构建出来，可以将其连接到其它确定转录或翻译信号的核苷酸序列上，或其它可用作在细菌、病毒或动物细胞中增殖和/或表达的载体的核苷酸序列上。制备这样的核酸结构的方法在本领域已知。见Sambrook等，同上。

多肽或其适当部分可单独使用或同另一化合物结合，该化合物可以是能共价连成另一多肽的一个或多个氨基酸、蛋白多糖、蛋白脂质、碳水化合物或其它合适的大分子。本发明的多肽与另一大分子的结合可通
30

过共价键、氢键、吸附、吸收、金属键、范德华力、离子键或其它适当的分子间和分子内键或力或其任意组合来稳定。本发明的多肽的优选形式包括将多肽共价连接到适当的亲和层析基质（如纤维素）上，包括间氨基苯甲氧甲基纤维素、溴乙基纤维素、羧甲基纤维酰肼和纤维素环碳酸酯；6-氨基己酸；sepharose，包括sepharose 4B、sepharose 6MB、sepharose 6B和巯基-sepharose 4B；含有亲水丙烯酸、聚丙烯酰胺和琼脂糖的小珠；以及线性聚丙烯酰胺。

适当的反应基元如酰肼、碳酸酯等和适当的激活物如溴化氰、羰基二咪唑、氯甲酸酯等，可以用本领域已知的方法和材料，如Sigma化学
10 品公司1993年目录1612-1618页或其它来源提供的材料，应用到上述亲和层析基质上。

I α 多肽的性质包括：（1）当约1mM CaCl₂存在时起始或造成牛嗜铬颗粒聚集，表观k_{1/2}为22.2 μ g/ml或6.3 μ M（见图3A和3B）；（2）在约5.5至约7.5的pH范围内有活性，其中当pH约6.75时有50%活性
15 （见图4A）；（3）与激活有 Δ F508突变的细胞中氯离子外流的化合物合用时在起始或造成脂质体聚集上有协同效应，所述化合物包括CPX、咖啡因和N,N-二烯丙基环己基黄嘌呤（DAX）（分别见图5、6和7）；（4）与不激活有 Δ F508突变的细胞中氯离子外流的化合物合用时不起始或造成脂质体的聚集，所述化合物包括2-硫代-CPX和异丁基
20 甲基黄嘌呤（IBMX）等；（5）与腺苷有双相反应，其中在70至100mM的低腺苷浓度时，上述I α 多肽驱动的脂质体聚集有少量增加，腺苷浓度再高时未见这种活性增加，大于等于1 μ M时聚集活性受抑制；（6）对CPX表观K_D为69 $\pm$ 27nM，CPX是激活 Δ F508细胞的氯离子外流的黄嘌呤衍生物。

25 本发明还提供某些CFTR多肽，它们与I α 多肽相邻，但其特征明显不同。I β 多肽是包含于CFTR 509位至539位的一个氨基酸序列，它具有下列序列：

NH₂ - GVSYDEYRYRSVIKACQLEEDISKFAEKDNI - COOH

[SEQ ID NO: 3]

30 I α 多肽是包含于CFTR蛋白500位至530位的另一个氨基酸序列，它具有下列序列：

NH₂ - GTIKENEEFGVSYDEYRYSVIKACQLEEDIS - COOH

[SEQ ID NO: 4]

5 这些多肽与 I α 多肽相邻或与之部分重叠, 但均不驱动嗜铬颗粒或合成性脂质体的聚集, 对本文公开的 I α 多肽或激活氯离子外流的黄嘌呤衍生物的活性也没有影响。与上述关于 I α 的保守氨基酸变化的讨论类似, 也考虑将含有这种保守变化的多肽作为本发明的其它实施方案。

如上述对 I α 多肽的讨论, I β 和 I γ 多肽可作为游离多肽, 其片段, 或其它大分子相结合的多肽来制备并使用。I β 和 I γ 可用于亲和层析, 并用作 I α 多肽的阴性对照。

10 如同上面对 I α 多肽的讨论, 对应 I β 和 I γ 的适当 RNA 和/或 DNA 序列可利用遗传密码, 通过相应多肽蛋白质序列的逆向翻译/转录来鉴定。相应地可用任何适当的方法生成含有下列序列的 RNA 分子:

I β :

GGN GUN UCN UAY GAY GAR UAY CGN UAY CGN
15 UCN GUN AUH AAR GCN UGY CAR UUR GAR GAR
GAY AUH UCN AAR UUY GCN GAR AAR GAY AAY
AUH [SEQ ID NO: 5]

I γ :

GGN ACN AUH AAR GAR AAY GAR GAR UUY GGN
20 GUN UCN UAY GAY GAR UAY CGN UAY CGN UCN
GUN AUH AAR GCN UGY CAR UUR GAR GAR GAY
AUH UCN [SEQ ID NO: 6]

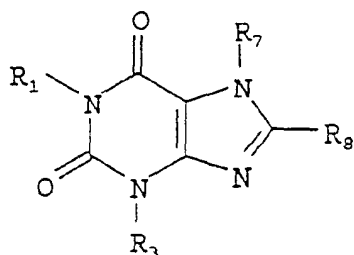
与 I α 序列类似, 编码与 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 相同或功能上等价的序列的其它序列也在考虑之列。例如三联体 UCN、
25 GCN 和 UUR 可分别由 AGY、AGR 和 CUN 替换, 而不造成任何氨基酸序列上的不同。另外如上面对 I α 序列讨论的, 造成不确定氨基酸变化的核苷酸序列也被考虑作为本发明的其它实施方案。而且如 I α 序列一样, SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的 RNA 互补物以及由此预测的 DNA 对应物序列, 也包括在本发明的实施方案中, 并可由普通技术人员
30 根据通用遗传密码来确定。

上述 I α 、I β 和 I γ 多肽或其功能等价物可用于一种方法, 鉴定结合

CFTR 的化合物。该方法包括使假定的结合 CFTR 的化合物与 I α 多肽在足以使二者结合的条件下相互接触，用适当方法确定这种结合是否发生，如发生则表明该假定的结合 CFTR 的化合物确实是结合 CFTR 的化合物。对于结合 CFTR 的化合物，希望用本方法鉴定的这些化合物与细胞的 CFTR 相互作用，优选的是突变的 CFTR 如 $\Delta F508$ ，来使 CFTR 介导的氯离子外流增大，或有可能恢复正常。结合 CFTR 的化合物与 CFTR 蛋白的这种相互作用可由离子键、疏水作用和范德华力的任一适宜组合提供，并且是 CFTR 氨基酸序列和结合 CFTR 的化合物的物化特性的函数。为了鉴定这些结合 CFTR 的化合物，优选地是检验用作针对 CF 的药剂的候选物，检验其与 I α 多肽亲和性的正效应，以及与 I β 和/或 I γ 不结合的中等或负效应是有用的。用于鉴定结合 CFTR 的化合物的亲和性检测的条件可用本领域已知的常规技术最优化。该方法可能鉴定任一选择性结合（例如）I α 或不结合（例如）I β 的适当化合物，该化合物是碳氢化合物，包括但不限于蛋白质、脂、核酸或其任一组合。

结合 CFTR 的化合物的作用中令人感兴趣的有：（1）当加入合成的多糖脂质体制备物中（即包括该脂质体的组合物）起始或造成脂质体的聚集（描述见实施例 1）；（2）加入嗜铬颗粒的制剂（即包括该嗜铬颗粒的组合物）中起始或造成该嗜铬颗粒的聚集（描述见实施例 1）；（3）当 $\Delta F508$ 细胞氯离子外流的激活剂加入上述脂质体中时起始或造成其聚集的速率变大（见图 5-7）。本发明范围内有用的氯离子外流激活剂包括 CPX、咖啡因、N, N-二烯丙基环己基黄嘌呤，以及其它合适的化合物。氯离子外流激活物与 I α 结合在一起检测时与 I α 单独使用时的效应相比，促进脂质体聚集的速率全都增大。

本发明进一步提供一种方法，用于治疗尖端 Cl^- 传导降低的细胞，如囊性纤维变性细胞，并提供用于本发明方法范围内的新的化合物及其药物组合物。具体地说，治疗方法涉及将尖端 Cl^- 传导降低的细胞接触治疗有效量的一种化合物，该化合物对腺苷细胞受体，尤其是 A $_1$ -腺苷细胞受体或 A $_2$ -腺苷细胞受体亲和力很小或没有，但仍激活 Cl^- 外流。特别地，本方法涉及将细胞接触下式化合物：



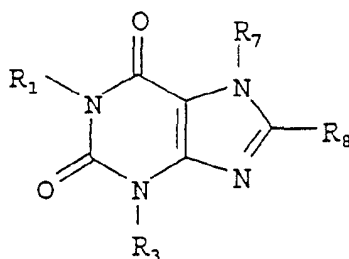
5

其中 R_1 与 R_3 相同, 为 $C_1 - C_6$ 烷基或 $C_1 - C_6$ 链烯基, R_7 是 $C_1 - C_6$ 烷基或氢, R_8 是 $C_4 - C_8$ 环烷基或其药用衍生物。这些化合物可依据其分别对一种腺苷受体 (如 A_1 或 A_2 腺苷受体) 的亲合力来表征。特别地, 10 这些化合物的亲和性可以以 K_i 值表示, 例如 K_i 值大于等于 0.01。优选化合物的 K_i 值小于 0.05。这种优选化合物包括 R_1 和 R_3 是甲基、丙基或烯丙基, R_7 是甲基或氢, R_8 是环戊基或环己基, 具体地说是 1,3 - 二丙基 - 7 - 甲基 - 8 - 环己基黄嘌呤, 1,3 - 二丙基 - 7 - 甲基 - 8 - 环戊基黄嘌呤, 1,3 - 二烯丙基 - 8 - 环己基黄嘌呤和 8 - 环己基咖啡因 15 之一。

本发明的方法对治疗囊状纤维变性细胞特别有用。该方法特别优选治疗囊状纤维变性跨膜调节物 508 位苯丙氨酸缺失的囊状纤维细胞的治疗, 尤其是发现于哺乳动物如人类患者中的囊状纤维变性细胞。

用于本发明方法的化合物优选地不具有磷酸二酯酶活性。优选治疗 20 有效量的该化合物无毒。最优选化合物本身无毒, 即使有毒也利大于弊。更优选本发明的化合物对任何腺苷受体 (如上面提到并由下面举例说明的 A_1 或 A_2 - 腺苷受体) 的亲和性水平低 (例如 K_i 大于等于 0.01mM)。对于 A_3 - 腺苷受体, 本发明的化合物不可能与之有足够大的亲和性, 因为大多数黄嘌呤不能置于 A_3 - 腺苷受体结合位点中。van Galen 等, 25 医学研究综述 (Medicinal Res. Rev.), 12, 423 - 471 (1992)。特别优选用于本发明方法的化合物是 1,3 - 二丙基 - 7 - 甲基环戊基黄嘌呤 (DP - CPX), 1,3 - 二烯丙基 - 8 - 环己基黄嘌呤 (DCHX) 和环己基咖啡因 (CHC); 最优选的化合物是 DCHX。

以前未曾公开的这些化合物和含有这些化合物的药物组合物本身即 30 本发明的实施方案。具体地说, 本发明首次公开的化合物具有下式:



5

其中 (a) R_1 和 R_3 相同, 是甲基或烯丙基, R_7 是乙基, 环丙基甲基或氢, R_8 是环己基, 条件是当 R_7 是氢时 R_1 是烯丙基, 当 R_7 是乙基或环丙基甲基时 R_1 是甲基, 或 (b) R_1 和 R_3 均为甲基, R_7 是氢或甲基, R_8 是环己基甲基或环庚基。根据上述结构的优选化合物是化合物 17, 即 1, 3 - 二烯丙基 - 8 - 环己基黄嘌呤 (DCHX)。

可选地, 或另外, 例如 DP - CPX、CHC 或 DCHX 的药用衍生物或其组合物作为进一步的实施例, 可用于本发明方法, 该方法为本发明提供另一个实施方案。最好这样的衍生物在本发明的治疗方法中有等价的治疗效用。

用于本发明方法的化合物可通过任何合适的方式给药。本领域技术人员应当理解, 本发明的化合物对动物 (尤其是人) 给药时有许多合适的方法, 虽然某种具体药物的给药途径不止一种, 但某一具体给药途径比其它途径反应更直接更有效。

化合物优选地直接施用至患者肺部。优选地, 化合物作为药用水溶液施用。更优选地, 所施用化合物的水溶液含约 0.001 至约 0.01 % 重量比的化合物, 药用气溶胶是另一优选给药方式。气溶胶优选地含约 0.001 至约 0.01 % 重量比的化合物。

化合物亦可口服。这种情况下化合物给药量通常是每天约 0.1 至 1mg/kg 体重。用于口服的本发明化合物优选量是每天约 0.1mg/kg 体重, 也可采用其它给药途径, 如静脉内和腹腔内给药。

施用化合物应使治疗有效浓度的化合物与体内患病细胞接触。本发明对动物, 尤其是人的给药剂量应足以在一段合理的时间范围内于动物体内产生疗效。药量应根据选定化合物的强度、动物的情况及受治疗的动物的体重来确定。药剂大小也应根据对特定患者伴随特定的化合物给药及特定给药途径可能存在的毒副作用是否存在及其习性和范围来确定。通常本发明的化合物在低剂量时可以有效治疗。有效剂量范围是血

液中药 30nM 至约 100nM。相应地，化合物通常以相对低的剂量给药。

化合物可以在药用载体中给药。本发明包括含有本发明化合物和药用载体的药物组合物。药用载体为本领域技术人员熟知。可部分地由特定化合物以及给药的特定方法选择载体。相应地，本发明的药物组合物有许多适当的制剂。

适于口服的制剂包括：（a）溶液，例如有效量的化合物溶于稀释剂如水或盐水中，（b）胶囊，香粉剂或片剂，各含预定量的活性成分如固体或颗粒，（c）于适当液体中的悬液，（d）适当的乳剂。片剂形式可包括下列的一种或多种：乳糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、纤维素微晶、阿拉伯树胶、明胶、胶体二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸和其它赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、增湿剂、防腐剂、香味剂和医药相容载体。锭剂形式可包含香味剂中的活性成分，通常香味剂为蔗糖和阿拉伯树胶或黄蓍胶；锭剂可含有惰性基质中的活性成分，如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯树胶乳剂，凝胶；其他给药形式除含活性成分外，还含本领域已知的此种载体。

适于吸入给药的制剂包括气溶胶制剂，它被置于加压的可接受推进剂中，如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。活性剂可用适当赋形剂气溶胶化。

适于静脉内和腹腔内给药的制剂例如包括水相或非水相的等渗无菌注射液，可含抗氧剂、缓冲液、细菌抑制剂、以及使制剂与接受者血液等渗的溶剂，或是含有悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水相或非水相无菌悬浊液。制剂可包装于单剂量或多剂量密封容器，如安瓿和小瓶中并存于冷冻干燥条件下，使用前仅需加入无菌液相载体（如水）用于注射。对上述无菌粉末、颗粒和片剂可临时配制注射溶液和悬浊液。

诱导细胞 Cl^- 外流的最适程度依赖于受治疗的具体疾病或状态，以及病人的稳定性与可能的副作用。使用适当的剂量和施用化合物方法，本发明提供对氯离子外流速率广泛范围的活化，例如从活化很小到基本上完全活化。

本发明估计能有效治疗所有的其特征在于细胞尖端 Cl^- 传导降低的病症，包括各种疾病。具体地说，预计本发明能治疗慢性阻塞性肺病，

尤其是囊状纤维变性。

下列实施例被用于进一步阐明本发明，而不是用于限制本发明的范围。

5

实施例 1

本实施例描述用于评价某些 CFTR 多肽针对膜的活性的方法及其结果。

脂质体聚集试验 (assay): 将磷脂酰丝氨酸 (“ PS ”, 得自 Avanti) 溶于氯仿, 用已知的挤迫法 (extrusion process) 制备小的单层膜脂质体。用 Lipex 仪器在含 10mM Na - HEPES, pH 7.2 和 1mM EDTA 的缓冲液中挤迫 PS。脂质体稀释至终光密度于 540nm 为 0.01, 并与不同浓度的不同多肽和/或氯离子外流激活化合物温育。

嗜铬颗粒聚集试验: 从当地屠宰场购得肾上腺, 在宰杀后二小时内置于冰上运至实验室。如 Brocklehurst 等在《多肽激素实用方法》(牛津大学出版社, K. Siddle 和 J. Hutton 编, 1990) 237 - 255 页的描述处理组织。在阶段梯度的甲泛影酰胺中用标准方法纯化嗜铬颗粒。重悬浮后根据描述 (Brocklehurst 等, 同上) 进行颗粒聚集试验。并从 540nm 光密度的初始增加估计会联蛋白 (synexin) 活性。简而言之, 反应于室温进行, 1ml 石英杯中含有嗜铬颗粒, 悬浮于 0.3mol/l 蔗糖的颗粒, 40 mmol/l 组氨酸缓冲液 pH 6.0, 会联蛋白和可变量的氯化钙。

制备 CFTR 多肽: 在耶鲁大学分子生物学和生物物理系用标准固相法合成多肽。用反相 HPLC 纯化多肽, 用本领域的熟知的标准方法直接化学测序, 用氨基酸分析和质谱确证序列。具体的多肽是 I α [SEQ ID NO: 1], I β [SEQ ID NO: 3] 和 I γ [SEQ ID NO: 4]。

I α [SEQ ID NO: 1] 驱动的嗜铬颗粒和脂质体聚集: 如图 2 所示, 发现 I α 多肽在 1mM CaCl₂ 存在时驱动牛嗜铬颗粒聚集。相反, 相邻的 I β 多肽 [SEQ ID NO: 3] 在嗜铬颗粒聚集试验中基本无效。相似地, 重叠的 I γ 多肽 [SEQ ID NO: 4] 也无效。因此这些数据似乎表明 I α 的活性为 I α 序列特异性的。

图 3A 给出的 I α 活性滴定曲线显示 $k_{1/2, app}$ 是 22.2 μ g/ml 或 6.3 μ M。这些数据的 Hill 图 (见图 3B) 显示 Hill 系数 (n_H) 是 2.6。用磷脂酰

丝氨酸脂质体作聚集靶观察到相似的数据, pH 5.5 至 7.5 范围的详细滴定曲线显示 50 % 活性时的 pH 为约 6.75 (见图 4A)。

低浓度 $I\alpha$ 驱动 PS 脂质体聚集: 如图 2 所示高多肽浓度下聚集反应被迅速起始, 并遵循表观一级过程, 5 - 10 分钟内有效地到达平台。 $I\alpha$ 驱动的聚集反应的协同性可由 Hill 系数定量看出 (见图 3A), 该图显示在低多肽浓度, 聚集的起始速率很快变小。不过在更长的时间段里可看到仍发生相当多的聚集, 虽然其动力学复杂。如图 4B 所示, 动力学涉及初始停滞期约 8 - 10 分钟, 然后是上升期与平台。 $I\alpha$ 多肽小于 $2\mu\text{M}$ 时由表观一级过程转化成更复杂的过程, 在 0.4 和 $2\mu\text{M}$ 之间该复杂过程明显显示剂量依赖性。

相应地, $I\alpha$ 驱动上述膜聚集现象, 而相邻的 ($I\beta$) 或部分重叠的 ($I\gamma$) 多肽序列对于 CFTR 不驱动这种聚集。有效的内部负调控明确显示 CFTR 在 $I\alpha$ 位点存在特殊的功能特性, 该特性明显涉及膜。

15 实施例 2

本实施例描述某些氯离子外流激活化合物与 $I\alpha$ 的特异性结合以及某些不激活氯离子外流的化合物不能结合 $I\alpha$ 。

CPX 用作能激活 $\Delta F508$ 突变体细胞氯离子外流的代表性化合物。在 DMSO 中制备 mM 浓度范围的 CPX 贮液。 $I\alpha$ 多肽 (100nM 终多肽浓度) 溶于 100 μl 的含 50mM Tris (pH 7.0), 300mM 蔗糖和 10mM 谷胱甘肽的缓冲液。 37 °C 温育 1 小时后, 加入 1 - 100nM ^3H - CPX (ICN, 比活 = 109 Ci/mol), 进一步温育 15 分钟。作为置换研究, 将未标记的 CPX 或其它黄嘌呤拮抗剂和核苷酸加入温育混合液中, 再加放射性探针。混合液用标准点印迹仪滤过硝酸纤维素膜 (NC) (Schleicher & Schuell)。用 0.3 % 聚乙烯亚胺 (PEI) 封闭滤膜可降低 ^3H - CPX 对 NC 滤膜的非特异性结合。然后用 200 μl Tris 缓冲液 - NaCl 溶液 (50mM Tris pH = 7.0, 150mM NaCl) 洗点印迹 5 次, 切掉放射位点, 用液体闪烁计数确定总的放射性。用 10 μM 未标记的 CPX 预杂交作非特异性结合, 从总的结合中减去非特异性结合得到 ^3H - CPX 对 $I\alpha$ 的特异性结合。

^3H - CPX 对 $I\alpha$ 的结合是 CPX 浓度的可饱和函数。将数据拟合成

Scatchard 图, 显示 $K_{D,app}$ 为 $69 \pm 27\text{nM}$ ($n = 4$)。由 Scatchard 图截距估计的 B_{max} 值表明结合的 $I\alpha$ 多肽的摩尔比小于 1/2000。CPX、咖啡因、DAX 和所有已知的氯离子外流激活物均能置换结合, 但不激活氯离子外流的 IBMX 或 2 - 硫代 - CPX 不置换结合。

- 5 这些数据表明氯离子外流激活物特异性结合 $I\alpha$, CPX 激活带有 $\Delta F508$ 突变的细胞的机制是通过与 CFTR 分子本身相互作用。而且由于氯离子外流激活物结合 $I\alpha$ 而非氯离子外流激活物不结合 $I\alpha$ 这种特异性, 这种方法可用于鉴定其它的 CFTR 结合蛋白, 这些蛋白可能对 CF 细胞有疗效。

10

实施例 3

本实施例描述 CPX 对 $I\alpha$ 驱动的 PS 脂质体聚集的影响。

- 研究 CPX 对 $I\alpha$ 驱动的 PS 脂质体聚集的影响。研究的 CPX 浓度介于 1 和 30nM (观察到对含 $\Delta F508$ 细胞的激活), 介于 30 和 100nM (观察到对上述细胞的最大激活), 直到 1000nM (观察到对上述细胞激活的抑制)。

- 如图 5 所示, 仅有 $0.5\mu\text{g/ml}$ ($0.18\mu\text{M}$) $I\alpha$ 驱动的脂质体聚集很弱。但随着 CPX 浓度的增大, 在停滞约 5 分钟后聚集反应被持续地激活。在 100nM CPX 时观察到最大激活速率和程度, 此后随 CPX 浓度增大到 20 300nM, 激活又下降。图 5 的嵌入图显示每隔 20 分钟的反应程度。

相应地, 这些数据显示 CPX 对 (1) 含 $\Delta F508$ 细胞与 (2) $I\alpha$ 聚集的作用的浓度依赖性相平行。

实施例 4

- 25 本实施例描述其它黄嘌呤对 $I\alpha$ 驱动的 PS 脂质体聚集的影响。本研究包括某些能激活 $\Delta F508$ 中氯离子外流的黄嘌呤衍生物 (如咖啡因和 N, N - 二烯丙基环己基黄嘌呤 (DAX) 或不激活这种氯离子外流的黄嘌呤衍生物 (例如 2 - 硫代 - CPX 和异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX))。

- 图 6 给出 PS 脂质体聚集试验的结果。从图可看出, 咖啡因激活 $I\alpha$ 30 聚集的能力较低, 似乎在高浓度不激活 $I\alpha$ 聚集。图 6 的嵌入图显示每隔 20 分钟的反应程度, 在检测的咖啡因浓度范围内, 聚集根本不趋于水平。

对于 DAX，其强度与 CPX 范围相同，但浓度高达 300nM 亦未见失活（见图 7）。图 7 的嵌入图显示每隔 20 分钟的反应程度。从这个角度，我们可以在同一图上（图 8）比较 CPX 和 DAX，可见 DAX 比 CPX 强度低至少半个数量级。不过对于氯离子外流，DAX 和 CPX 的效力几乎相同。由于溶解度限制，DAX 浓度不能很高。

脂质体聚集试验包括了不能激活携带 $\Delta F508$ 突变的细胞的氯离子外流的化合物 2 - 氯 - CPX 和 IBMX，可见这些化合物在分别高至 1 和 15 μ M 的浓度范围内完全不能促进 I_{α} 驱动的脂质体聚集。

相应地， I_{α} 驱动的 PS 脂质体聚集试验给出的结果与能够以及不能激活氯离子外流的黄嘌呤衍生物的结果平行。

实施例 5

本实施例描述腺苷对 I_{α} 驱动的 PS 脂质体聚集的影响。

在 PS 脂质体聚集试验中包括有腺苷。腺苷对 I_{α} 驱动的脂质体聚集反应有小而明显的双相作用。在 70 - 100nM 的低浓度时，腺苷温和地激活聚集反应。不过在高浓度就失去了激活作用。腺苷浓度大于等于 1 μ M 时，聚集反应已被抑制得低于已经很低的对照水平。这些数据因此显示黄嘌呤、CPX 和 DAX 明显与 I_{α} 多肽上亲和腺苷的位点相互作用。

实施例 6

本实施例描述本发明以及以前公开的新的黄嘌呤衍生物的合成与化学分析。

由黄嘌呤衍生物的 N - 7 位置的烷基化得到化合物 13、17、21 和 23，实验方法描述见 Jacobson 等，医学化学杂志（J. Med. Chem.），36，2639 - 2644（1993）和 Daly 等，医学化学杂志，29，1305 - 1308（1986）。关于化合物 8 - 12、14、18、19、20 和 25 合成的描述见 Jacobson 等（生化医药学（Biochem. Pharmacol.）37，3653 - 3661（1988））；Shimada 等（医学化学杂志，35，924 - 930（1992））；和 Shamim 等（医学化学杂志，32，1231 - 1237（1989））；化合物 7、14、18 和 19 由 Mullet 等（医学化学杂志，36，3341 - 3349（1993））和 Shamin 等（医学化学杂志，35，924 - 930（1989））

公开。化合物 1 - 5 和 26，以及 2 - 氯腺苷购自 Research Biochemicals International (Natick, 麻省)。化合物 27 由 Thompson 等 (医学化学杂志, 34, 2877 - 2882 (1991)) 公开。

表 1

化合物	$R_1, R_3 =$	$R_7 =$	$R_8 =$	$K_i, \mu M(A_1)$	$K_i, \mu M(A_2)$	最大 浓度 (nM)	%对照 百分比	阈值 (nM)	%对照 百分比
<u>8 - 未取代</u>									
1 ^a	Me	H	H	8.5	25	100	150±30	1	130±20
2	Me	Me	H	29	48	10	170±20	1	120±30
3 ^b	Me, iBu ^c	H	H	7	16	> > 10 ⁴	---	---	---
<u>8 - 环戊基</u>									
4 ^d	Me	H	环戊基	0.011	1.4	> > 10 ⁴	---	---	---
5 ^e	Pr	H	环戊基	0.00046	0.34	30	200±10	1	130±10
6	Pr	Me	环戊基	2.3	11.4±1.4	1000	180±40	30	125±30
7	Pr, H ^f	H	环戊基	0.014	0.58	30	160±40	1	130±20
8 ^g	Pr	H	环戊基	0.00066	0.31	> > 10 ⁴	---	---	---
9	Pr	H	3 - 氟环戊基	0.042	---	> > 300	---	---	---
10	Pr	H	3 - 碘环戊基	0.058	---	> > 300	---	---	---
11	Pr	H	环戊 - 3 - 基	0.045	0.640±0.061	> > 300	---	---	---
12	Pr	H	新金刚烷基	0.0013	0.38	10	170±20	1	120±5
<u>8 - 环己基</u>									
13	Me	H	环己基	0.030±0.015	1.04±0.20	3	160±20	0.1	130±20
14	Me	Me	环己基	28	17.1	3	150±30	3	150±30
15	Me	Et	环己基	6.66±0.99	3.23±0.36	> > 10 ⁴	---	---	---

表 1

化合物	R ₁ , R ₃ =	R ₇ =	R ₈ =	K _i , μM(A ₁)	K _i , μM(A ₂)	最大 浓度 (nM)	%对照 百分比	阈值 (nM)	%对照 百分比
16	Me	环丙基甲基	环己基	8.23±1.62	4.53±1.37,	> 10 ⁴	---	---	---
17	allyl	II	环己基	0.0656±0.0189	4.94±0.68	10 ³	260±70	30	170±40
18	Pr	H	环己基	0.0015	0.423±0.055	> 10 ⁴	---	---	---
19	Pr	Me	环己基	2.7	9.24±0.37	5	170±50	5	170±50
20	Pr	H	环己-3-烯基	0.010	0.905±0.128	10 ⁴	150±30	10 ⁴	150±30
21	Me	H	环己基甲基	0.610±0.076	5.47±0.86	> 10 ⁴	---	---	---
22	Me	Me	环己基甲基	3.71±0.36	5.46±0.47	> 10 ⁴	---	---	---
<u>8-环庚基</u>									
23	Me	II	环庚基	0.0659±0.0145	1.05±0.19	> 10 ⁴	---	---	---
24	Me	Me	环庚基	19.5±2.5	3.27±0.98	> 10 ⁴	---	---	---
<u>8-stryryl 或 8-芳基</u>									
25 ⁱ	Me	Me	3-氯	28	0.054	30	160±30	30	160±30
26 ^j	Pr	II	p-φ-OCH ₂ CONH(CH ₂) ₂ NH ₂	0.0012	0.08	> 10 ⁴	---	---	---
<u>非黄嘌呤拮抗剂</u>									
27	9-乙基-6-环戊基腺嘌呤			0.44	17	> 10 ⁴	---	---	---

a, 茶碱; b, IBMX; c, 1-甲基-3-异丁基; d, CPT; e, CPX; f, 1-丙基-3-H-类似物 (Müller 等, 医学化学杂志, 36, 3341-3349 (1992)); g, 2-硫代而非氧化; h, KW-3902; i, CSC; j, XAC

烷基或环烷基羧酸与 5, 6 - 二氨基 - 1, 3 - 二甲基尿嘧啶反应得到相应胺, 包括 5 - (环庚酰基氨基) - 6 - 氨基 - 1, 3 - 甲基尿嘧啶和 5 - (环己基甲基羰基) - 6 - 氨基 - 1, 3 - 甲基尿嘧啶, 方法如下:

将酸 (1 当量) 溶于含 1, 3 - 二烷基 - 5, 6 - 二氨基尿嘧啶 (1.5 当量) 的最小体积的 N, N - 二甲基甲胺 (DMF) 中。加入 1 - (3 - 二甲基氨基 - 丙基) - 3 - 乙基羰二亚胺 : HCl (1 当量), 再加入催化量的 (0.05 当量) 4 - (N, N - 二甲基氨基) 吡啶和 0.05 当量的咪唑。将混合物在室温搅拌 3 小时, 加入饱和的氯化钠溶液 (对 1, 3 - 二丙基衍生物, 需要加水) 形成沉淀或不定形不溶部分。滤出不溶性残留物, 溶于含足量甲醇的 4N 氢氧化钠溶液, 得到澄清溶液。将混合物在 60 °C 下加热 2 小时或加热到起始物质完全看不见为止, 用 TLC (硅板, CHCl₃; CH₃OH; HOAc; 85 : 10 : 5 v/v) 来判断。混合物冷却后用 6N 盐酸水溶液调酸至 pH 1。沉淀用水清洗, 干燥, 用制备型硅板 (85 - 95 % CHCl₃; 5 - 15 % 甲醇; 1 - 5 % HOAc) 进一步纯化。

用 Varian GEMINI - 300 FT - NMR 仪 300MHz 质子核磁共振质谱确定新的化合物 (并指认共振峰)。除非另有声明, 化学位移被表示成四甲基硅烷低场的 ppm。用 VG 7070F 质谱仪 EL 模式或用质谱仪作化学电离质谱 (NH₃) 确定新化合物。化合物 15, 16, 22 和 24 的代表性谱数据是: ¹H NMR CDCl₃ δ 3.42 (s, 3H N₃CH₃); 3.63 (s, 3H N₃CH₃); 3.89 (s, 6H OCH₃); 5.06 (s, 2H, OCH₂); 6.8 (s, 2H); 6.78 (d, 1H, J=16Hz); 7.3 - 7.5 (m, 5H); 7.7 (D, 1H, J=16Hz); MS (CI) m/e 463 (MH⁺ 基线), 375, 357。

由 Aflantic Microlabs (Norcross, 佐治亚州) 进行碳氢和氮分析, ±0.4 % 容许误差。应用上述技术的定性研究的总结见表 2, 给出了化合物 15 - 17 和 21 - 24 的分子式和元素分析。

表 2

	化合物	产率 %	熔点 ($^{\circ}\text{C}$)	分子式	计算值			实测值		
					C	H	N	C	H	N
5	15	81	>170	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$	61.10	7.69	19.00	61.25	7.48	18.59
	16	91	>120	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$	63.63	7.70	17.46	63.62	7.57	17.16
	17	---	126-128	$\text{C}_{17}\text{H}_2\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$	63.38	7.08	17.28	63.14	7.17	17.32
	21	74	236-238	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$	60.85	7.30	20.27	60.77	7.32	20.22
	22	73	158-159	$\text{C}_{15}\text{H}_2\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 0.15\text{H}_2\text{O}$	61.48	7.67	19.12	61.76	7.83	18.72
	23	84	223-225	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$	60.85	7.30	20.27	60.67	7.31	20.22
10	24	89	199-201	$\text{C}_{15}\text{H}_2\text{N}_4\text{O}_2$	62.05	7.64	19.30	61.97	7.68	19.24

在生物实验前所有的黄嘌呤衍生物用薄层层析均判定为纯品。

实施例 7

15 本实施例描述在将 CFPAC 细胞接触本发明的黄嘌呤衍生物时对这些细胞氯外流的测量，包括培养细胞和对其进行实验的方法。

CFPAC 细胞是胰腺癌细胞，对最普通的 CFTR 突变，即 Phe⁵⁰⁸ 缺失 (Schoumacher 等, 美国国家科学院院刊, 87, 4012 - 4016 (1990)) 是纯合的。CFPAC 细胞和 CFTR 转染的 CFPAC 细胞 (CFPAC - 20 47CFTR) 得自 R. Frizzell, 阿拉巴马大学。破碎细胞以低密度接种于 24 孔 COSTAR 板上，培养基含有 Iscove 培养基，并添加了 10 % (v/v) 热失活的胎牛血清，100 单位/ml 青霉素，100mg/ml 链霉素，0.25mg/ml 两性霉素和 1 % (wt/vol) 谷氨酰胺，渗透压调至 310 mOsm。所有培养用物质均购自 Biofluids (Rockville, 马里兰州)。5 小时后移走培养 25 基，粘壁细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 在 5 % CO_2 /95 % 空气的气氛中生长 48 - 72 小时至汇合。

每次实验前，细胞如下载入 [³⁶Cl]。用实施例 6 给出的培养基洗汇合的细胞 4 次。然后在最后一次清洗液蒸发净后，每孔加入含约 1.4×10^8 cpm [³⁶Cl]⁻ (Amersham) 的 500 μl 培养基。细胞板在 5 % CO_2 /95 % 空 30 气的气氛下 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜，使 [³⁶Cl]⁻ 同位素达到平衡。起始外流实验时，将 CPX 和/或其它黄嘌呤衍生物的浓度加到细胞中，19 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 分钟。

温育后, 细胞用含 150mM 葡萄糖酸钠, 1.5mM 葡萄糖酸钾和 10mM Na - Hepes (pH 7.4) 的冰冷的清洗培养基等分试样连续洗 4 次。然后于 19 °C 加入 500 μ l 无碳酸氢盐的流动培养基, 每孔在 0、1、2、3、5、7 和 10 分钟时各取出 50 μ l 等分试样开始取样。流动培养基含 150mM 葡萄糖酸钠, 1.5mM 葡萄糖酸钾, 10mM Na - Hepes (pH 7.4), 100 μ M 丁苯氧酸以抑制协同转运蛋白造成的外流, 不同浓度的 CPX 和其它药物, 如 A₁ - 腺苷拮抗物和 cAMP 合成的激活物, 后面的实施例描述为何需要这些药物。渗透压是 310 mOsm。每次流动实验后, 加入 20 μ l 50 % 三氯乙酸至终浓度为 5 %, 测量残留放射性。样品与 1.5ml 细胞闪烁流体混合, 于 Beckman LS 9000 闪烁计数仪, 窗口置于最大波长, 检测 2 分钟。用渗透压计凝固点降低法测渗透压, 见 Eidelman 等, 同上, 1992。

用本发明的黄嘌呤衍生物重复氯外流实验至少 4 次, 得到的数据总结于表 1。另外每次重复实验的每个数据点由 4 个独立细胞的外流测量平均值计算得到。标有“最大波长 (nM)”的列表示黄嘌呤衍生物对氯外流影响最大时的浓度, 其右列代表氯外流受最大影响时相对对照的百分比。标有“阈值 (nM)”的列代表能检测到黄嘌呤衍生物对氯外流影响时衍生物浓度, 其右列代表最小检测时氯外流相对于对照的氯外流。由表 1 可见, 最大激发范围是从约 3nM (例如对化合物 14) 到超过 10⁴nM (例如对化合物 3)。最大激发浓度时相对对照的百分比增加从约 10 % (即无效化合物如化合物 2 和 12) 到约 260 % + / - 70 % (化合物 17)。氯外流阈值激发的黄嘌呤衍生物浓度约 10⁴nM (例如化合物 20)。阈值激发浓度时相对于对照的百分比从约 120 % (化合物 12) 至约 170 % (例如化合物 17)。

由这些数据, 并且由于对任何药物倾向用较低浓度来达到所需结果以使不需要的副作用降到最小, 可见化合物 6、7、13、14、17、19 和 25 由于其在 μ M 级或更低浓度激发氯外流的能力明显而成为优选化合物。

图 9 - 12 形象地给出流动研究数据, 化合物 1 即茶碱 (图 9); 化合物 5 即 CPX (图 10); 化合物 22 即 8 - 环己基甲基咖啡因 (图 11) 和化合物 17 即 1, 3 - 二烯丙基 - 8 - 环己基黄嘌呤 (图 12)。图 9 - 12 垂直轴代表放射性标记氯的 [³⁶Cl]⁻ 外流 (FA) 作为受试化合物浓度

(水平轴)的函数。用标准方法 $\log(FA)$ 作时间的函数, 线性回归计算得这些数据, 并作为相对同一板上对照孔的恒定速率的百分比给出。用 Quatro - Pro 4.0 程序处理数据。误差条代表 4 个实验的 S. E. M. 值 (即 $n = 4$)。

- 5 观察图 9 - 12 可明显看出化合物 1、5 和 22 具有与对照相比能诱导出 200 % 的外流速率的特性。化合物 17 也表现出比对照大于 100 % 的外流能力, 但与其它 3 种化合物比要小。图示给出结果的这四种化合物中, 化合物 1 和 22 对两种受试的腺苷受体亲和性均小, 化合物 17 对 A_1 受体的亲和性较小 ($K_i \cong 0.07$), 化合物 5 对 A_1 受体的亲和性极大 ($K_i \cong 0.005$)。尽管化合物 17 比例如化合物 5 对 A_1 受体的亲和性小得多, 10 但由表 1 可见, 其绝对的氟外流能力要有效得多 (化合物 17 最大值为对照的 260 %, 而化合物 5 为 200 %)。

实施例 8

- 15 本实施例描述检测腺苷受体结合的试验和这些试验的结果, 这些试验用来确定本发明的新型黄嘌呤衍生物的部分性质。

根据 Hide 等, 分子药理学 (Mol. Pharmacol.) 41, 352 - 359 (1992) 的方法制备大鼠脑片层膜和纹状膜, 于 37 °C 腺苷脱氨酶 (2U/ml) 处理 30 分钟后, - 70 °C 贮存。腺苷衍生物的固体样品溶于二甲亚砜 (DMSO), 用常规方法贮于 - 20 °C。贮液用 DMSO 稀释至浓度 ≤ 0.1 mM, 然后加入液体培养基中。DMSO 在检测培养基中的终浓度通常为 2 %。

- 根据 Schwabe 等, Naunyn - Schmiedeberg 医药丛刊 (Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.), 313, 179 - 187 (1980) 和 25 Jacobson 等, 医学化学杂志 36, 1333 - 1342 (1993a) 的描述测量大鼠脑片层膜中 1nM [3H]N6 - 苯基异丙基腺苷 (Dupont NEN, Boston, 麻省) 与 A_1 受体结合的抑制。37 °C 在总体积为 0.5ml 的 50mM Tris 盐酸, pH 7.4 温育膜 ($\sim 100\mu\text{g}$ 蛋白每管) 1.5 小时。受试药品溶于 DMSO, 加入 10 μl 等份试样中, 得到 DMSO 终浓度 2 %。加入 3ml 30 含 50mM Tris 盐酸 pH 7.4 的缓冲液于 5 °C 分开结合的和游离的放射性配体, 然后用 Brandel Cell Harvester (Brandel, Gaithersburg, 马里

兰州)和 Whatman GF/B 玻璃纤维滤膜真空过滤,再加共 9ml 缓冲液洗涤。用 $10\mu\text{M}$ 2-氯腺苷确定非特异性结合。

根据 Jarvis 等,药物实验疗法杂志(J. Pharmacol. Exp. Therap.) 251, 888-893 (1989) 的报道做 5nM [^3H] CGS 21680 (2-[4-[(2-羧乙基)-5-苯基]乙基氨基]-5'-N-乙基羧氨基腺苷)(Dupont NEN, Boston, 麻省)与 A_{2a} 受体结合的抑制。 25°C 在总体积为 0.5ml 的含 50mM Tris 盐酸 pH 7.4 和 10mM MgCl_2 的缓冲液温育膜($\sim 80\mu\text{g}$ 蛋白每管)1 小时。受试药品溶于 DMSO,加入 $10\mu\text{l}$ 小份中,得到 DMSO 终浓度 2%。用 $20\mu\text{M}$ 2-氯腺苷确定非特异性结合。用上述 Brandel Cell Harvester 10 过滤,用上述 Tris·HCl/ MgCl_2 缓冲液作洗涤缓冲液。

根据每种化合物的 IC_{50} 适当调整,用至少跨越 3 个数量级的 6 种不同浓度。 IC_{50} 值用 GraphPAD 程序(Institute for Scientific Information, 科学信息研究所)非线性回归法计算机生成,用 Cheng 等的方法(生化医药学(Biochem. Pharmacol.), 22, 3099-3108 (1973)和 K_D 值 15 (Jacobson 等,同上,1993a; Ukena 等,FEBS 快报,209, 122-128 (1986))对 [^3H] PIA 和 [^3H] CGS 21680 结合分别转换成 K_i 值 1.0 和 14nM 。

对所有黄嘌呤衍生物在表 1 的“ $K_i, \mu\text{M} (A_1)$ ”和“ $K_i, \mu\text{M} (A_2)$ ”列给出腺苷受体结合研究的结果。对某个特定受体亲和性高的受体拮抗物 20 特征在于 K_i 值非常低,这可用上述对 A_1 和 A_2 受体的试验来确定。相应地,可见化合物与对 A_1 受体亲和性高,而化合物 6 对受试的两种受体亲和性都低。

图 13-14 也描述了上述受体研究得到的数据,重点在于确证改变 8-环烷基取代物环大小对结合腺苷受体的影响。图中给出大鼠皮层 A_1 -受体(实心圆,●)和大鼠纹状 A_{2a} -受体(空心三角,△)的数据。给出 25 8-环烷基茶碱衍生物(图 13)和 8-环烷基咖啡因衍生物(图 14)对 A_1 -和 A_2 -受体的亲和性。给出的数值是三次重复中二次或三次重复的平均值($\pm$ S. E. M.)。8-环丁基衍生物的数据来自 Jacobson 等,医药化学杂志,36, 2639-2644 (1993b)。

30 图 13 和 14 显示在茶碱(1,3-二甲基黄嘌呤)衍生物中,环戊基类似物化合物 4 对 A_1 亲和性最高。咖啡因(1,3,7-三甲基黄嘌呤)衍

生物中，环庚基类似物化合物 24 对 A_{2a} 有些亲和性（6 倍），而小环（4 - 6）亲和性小或没有（Jacobson 等，同上，1993b）。这些结构活性关系与同亲这些化合物激发 Cl⁻ 外流的观察结果相差很大。

5 整体考虑上述结果得出，化合物 6、14、17 和 19 在低浓度范围有足够的氯外流活性且对腺苷受体无活性。

10 这些实施例的结果显示有可能：（1）用体外脂质体和/或 CFTR 结合实验鉴定激活细胞氯离子外流的化合物；（2）用对 A₁ 或 A₂ 腺苷受体亲和性很小或没有的化合物，如化合物 6、14、17 或 19 激活 CF 细胞的氯外流。检验到最有效的化合物是化合物 17。若一种药物能特异性激活 CF 细胞的氯外流，对腺苷受体的影响不大或没有，并且该药的作用不因其对其它组织的副作用而受损害，则该药具有大的医疗优点。

所有本文引用的文献，包括专利、专利申请和出版物，均完整地在此引入作为参考。

15 尽管本发明着重针对优选实施方案来描述，但本领域的普通技术人员应明显看出可以采用优选方法、化合物和组合物的变化形式，并且本发明可与本文具体描述的不同地实施。相应地，本发明包括在本发明精神实质与范围内由下面的权利要求限定的所有改进方案。

序列表

(1) 一般资料:

(i) 申请人: THE UNITED STATES OF AMERICA,
5 REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT
OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

(ii) 发明题目: 一种鉴定用于在动物细胞中激活氯传导的结合
CFTR 的化合物的方法。

(iii) 序列数: 6

10 (iv) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容型

(C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

15 (v) 当前申请资料:

(A) 申请号 WO

(B) 提交日期: 1995 年 11 月 6 日

(C) 分类:

(vi) 在先申请资料:

20 (A) 申请号: US 343714

(B) 提交日期: 1994 年 11 月 22 日

(2) SEQ ID NO: 1 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 32 个氨基酸

25 (B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

30 Pro Ser Glu Gly Lys Ile Lys His Ser Gly Arg Ile Ser Phe Cys Ser
1 5 10 15
Gln Phe Ser Trp Ile Met Pro Gly Thr Ile Lys Glu Asn Glu Glu Phe
20 25 30

(2) SEQ ID NO: 2 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 96 个碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: mRNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

10 CCNUCNGARG GNAARAUHAA RCAYUCNGGN CGNAUHUCNU UYUGYUCNCA RUUYUCNUGG 60
AUHAUGCCNG GNACNAUHAA RGARAAYGAR GARUUY 96

(2) SEQ ID NO: 3 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 31 个氨基酸

15 (B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

20 Gly Val Ser Tyr Asp Glu Tyr Arg Tyr Arg Ser Val Ile Lys Ala Cys
1 5 10 15
Gln Leu Glu Glu Asp Ile Ser Lys Phe Ala Glu Lys Asp Asn Ile
20 25 30

(2) SEQ ID NO: 4 的资料:

25 (i) 序列特征:

(A) 长度: 32 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

30 (ii) 分子类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

Gly Thr Ile Lys Glu Asn Glu Glu Phe Gly Val Ser Tyr Asp Glu Tyr
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Ser Val Ile Lys Ala Cys Gln Leu Glu Glu Asp Ile Ser
20 25 30

5

(2) SEQ ID NO: 5 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 93 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

15

GGNGUNUCNU AYGAYGARUA YCGNUAYCGN UCNGUNAUHA ARGCNUGYCA RUURGARGAR 60

GAYAUHUCNA ARUUYGCNGA RAARGAYAAY AUH 93

(2) SEQ ID NO: 6 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 96 个碱基对

20

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

GGNACNAUHA ARGARAA YGA RGARUUYGGN GUNUCNUAYG AYGARUAYCG NUAYCGNUCN 60

GUNAUHAARG CNUGYCARUU RGARGARGAY AUHUCN 96

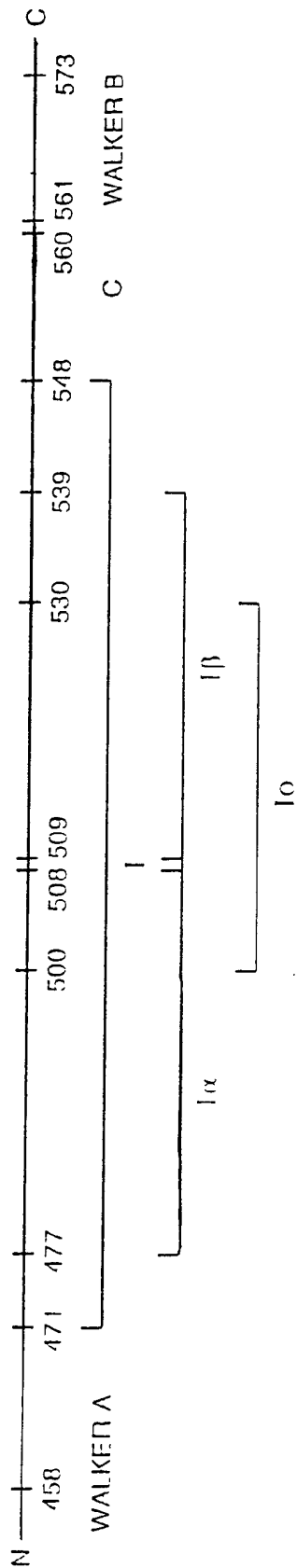


图 1

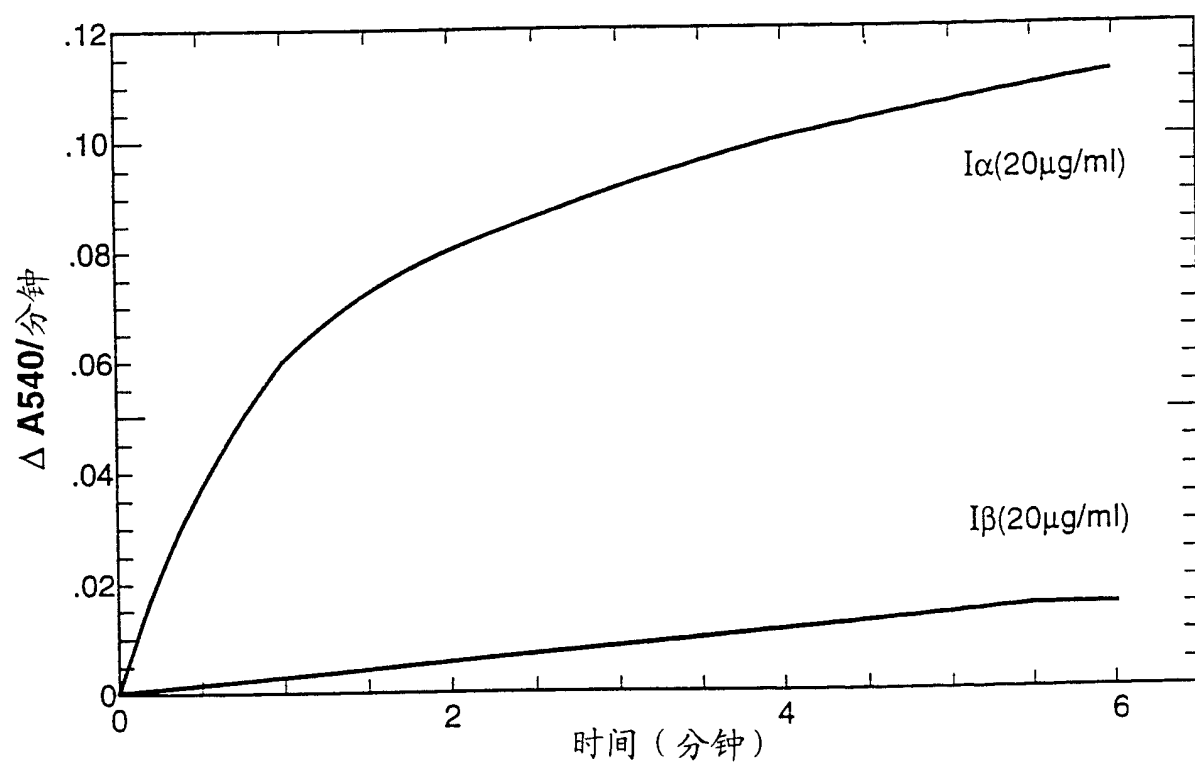


图 2

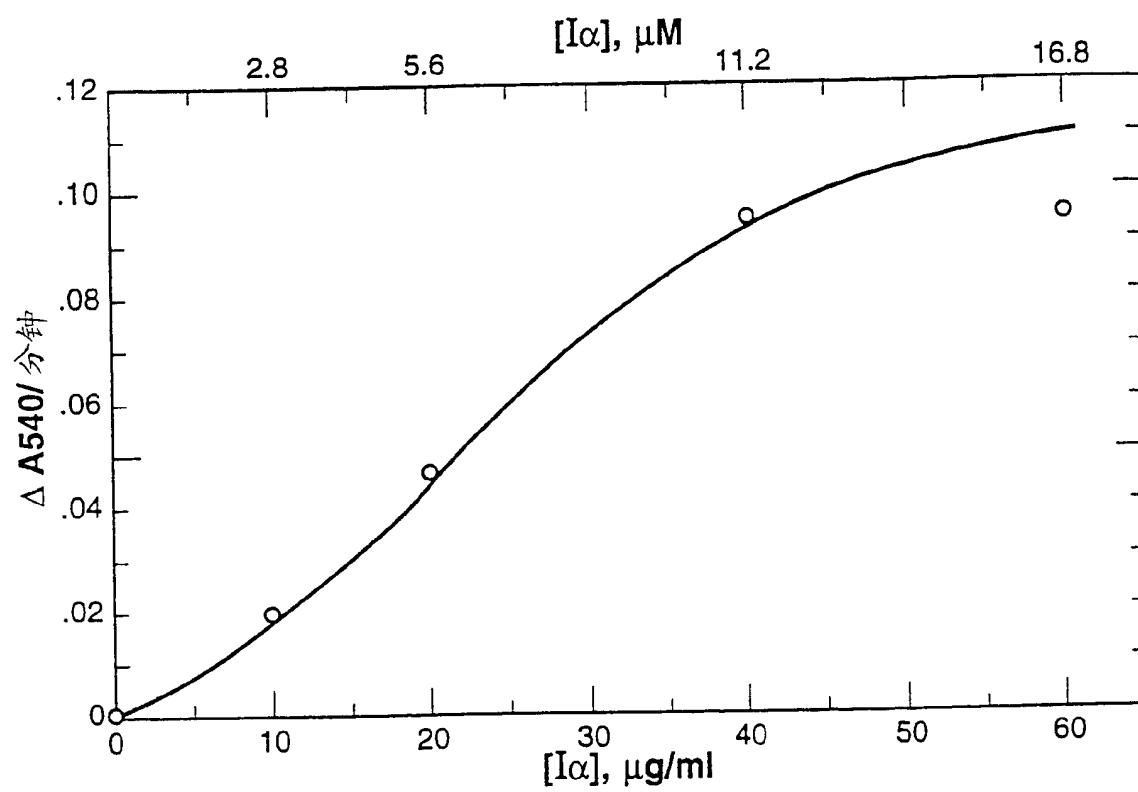


图 3 A

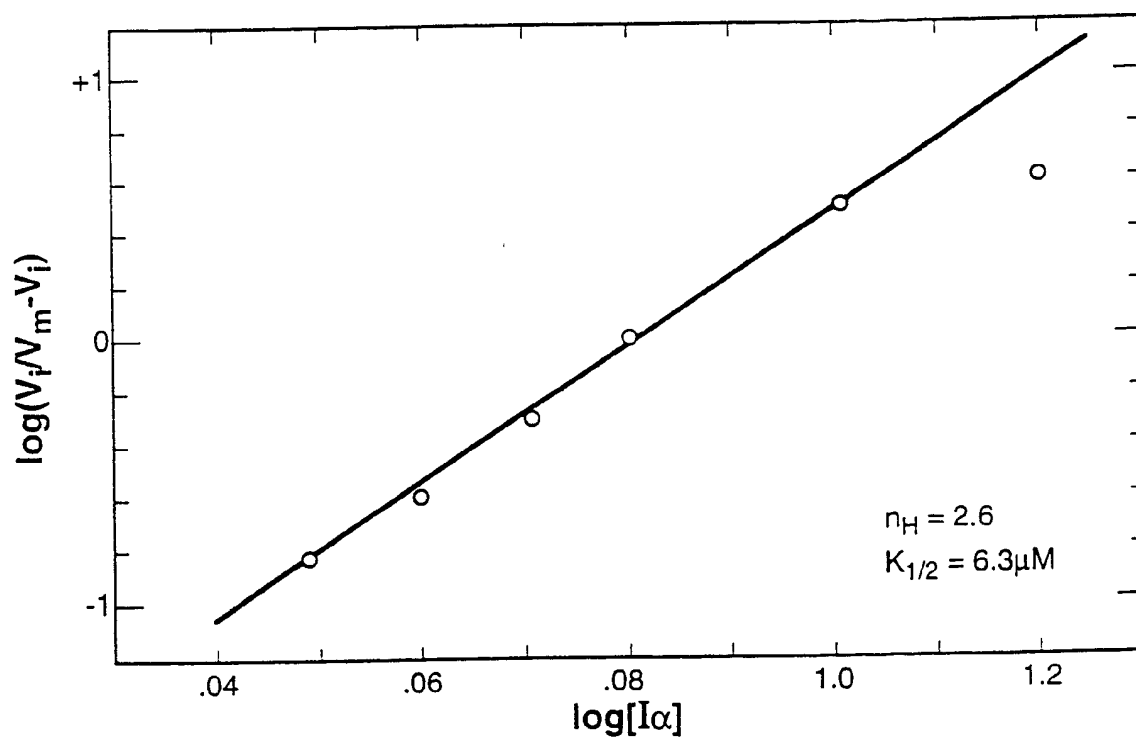


图 3 B

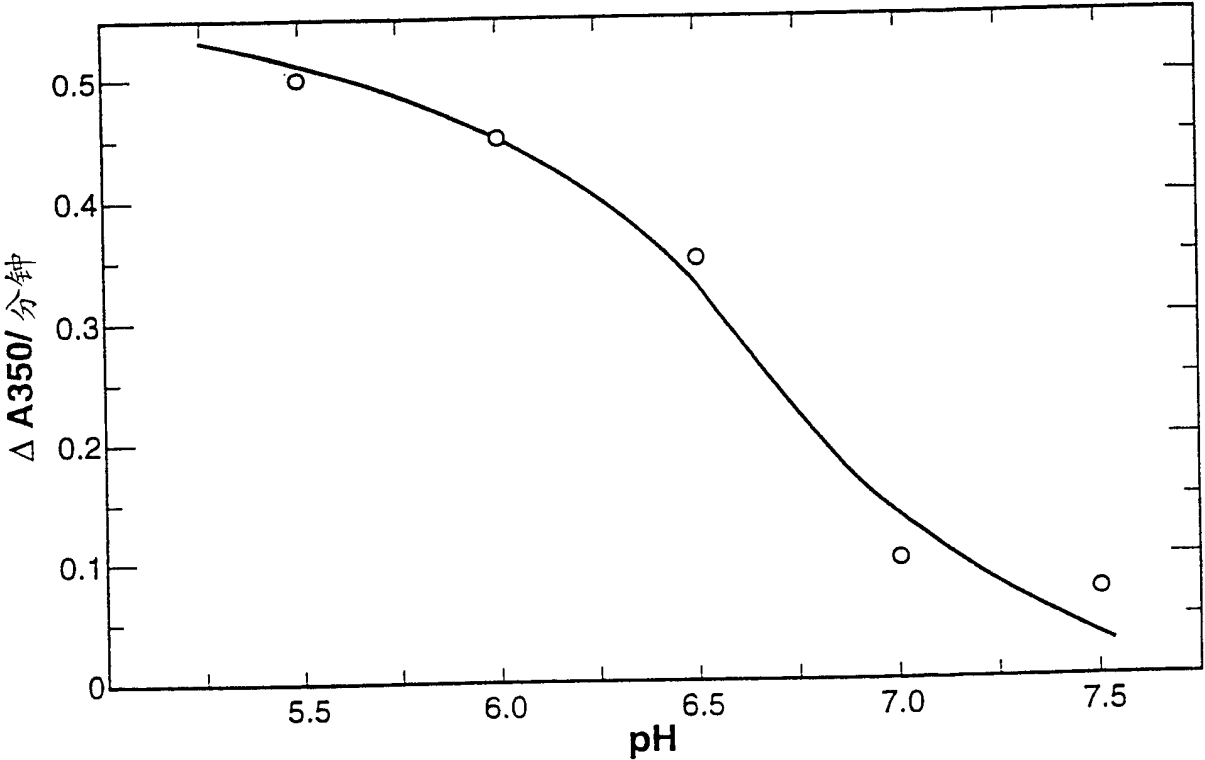


图 4 A

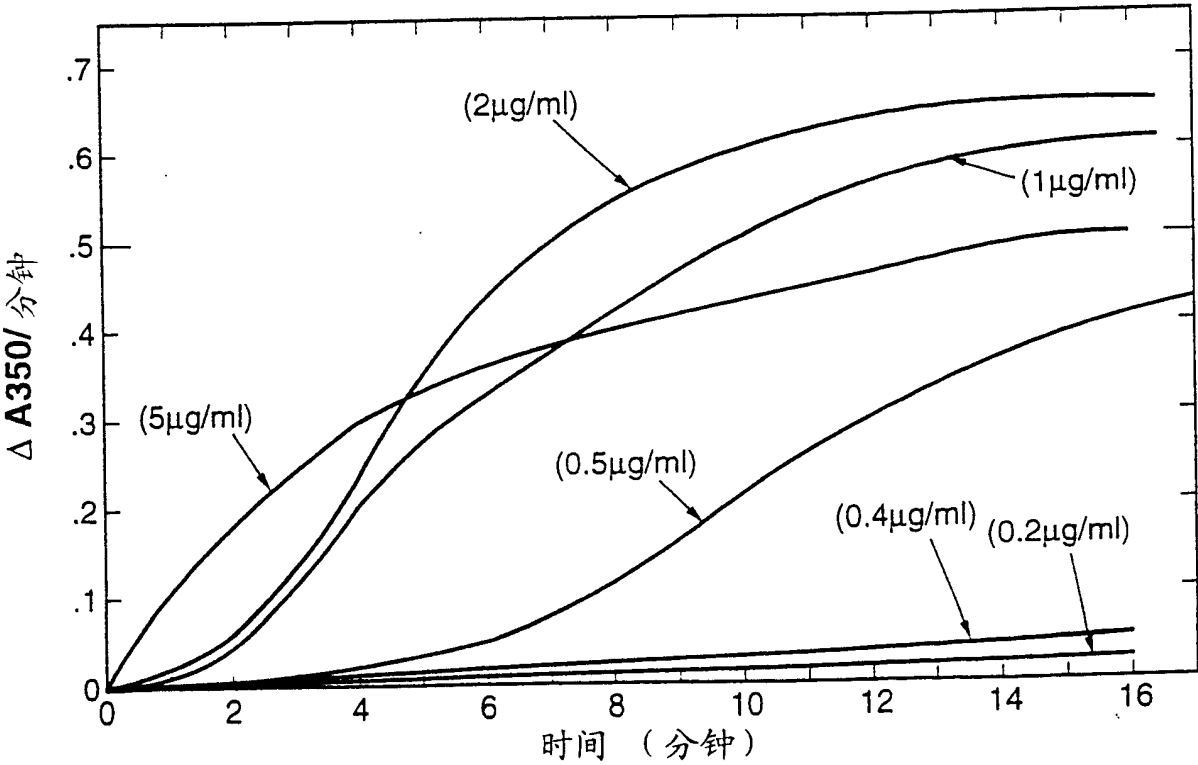


图 4 B

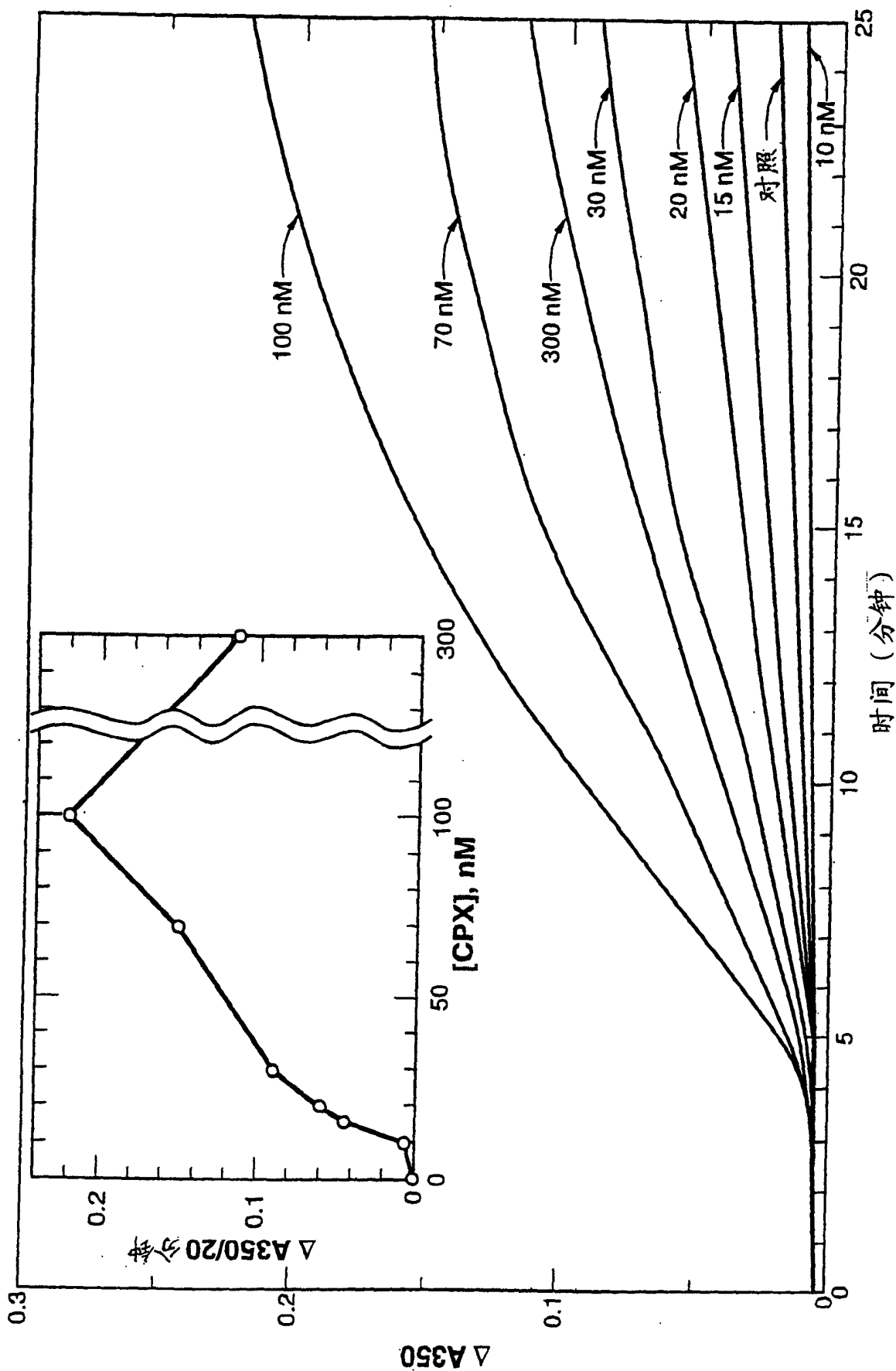


图 5

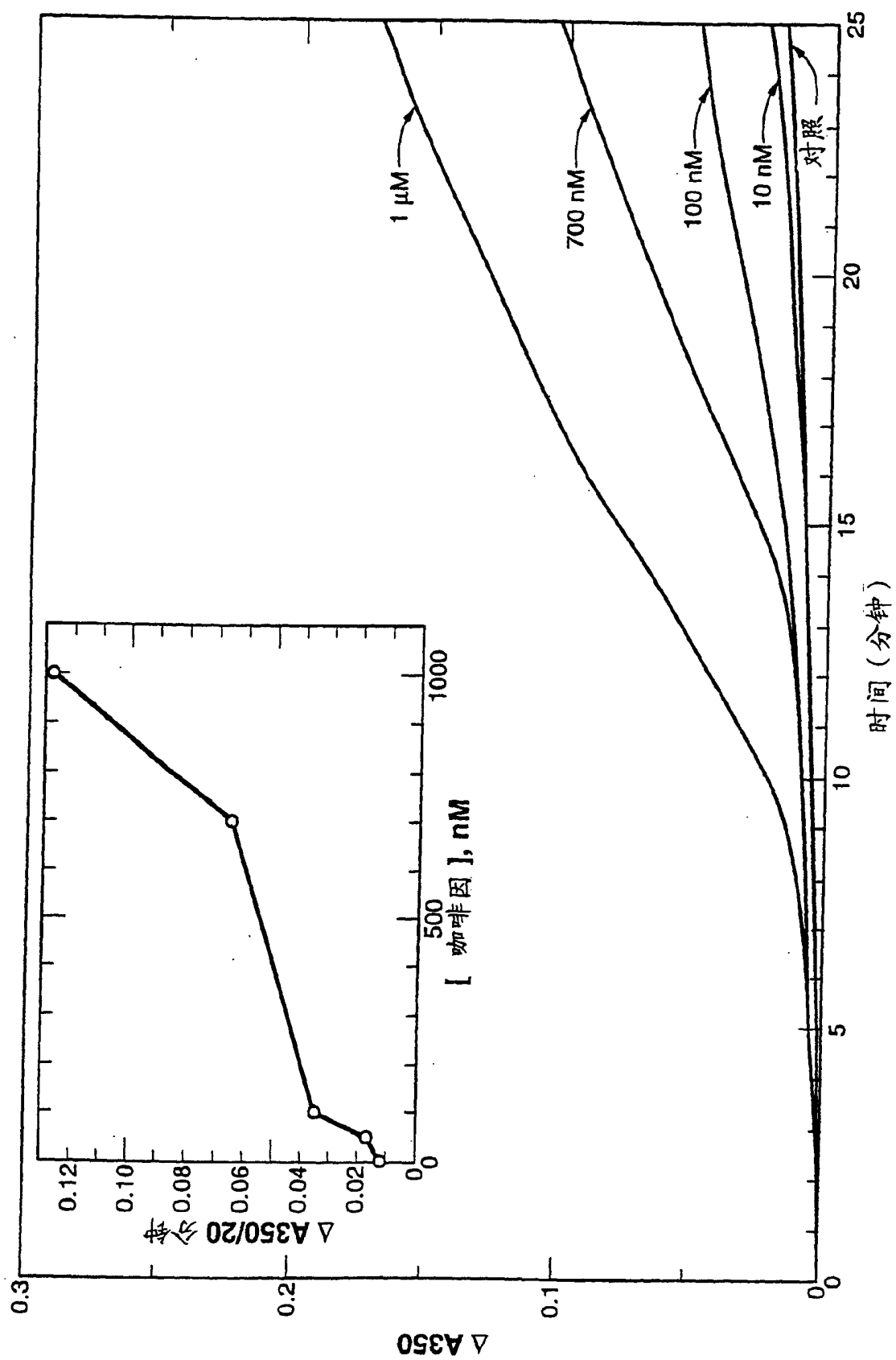


图 6

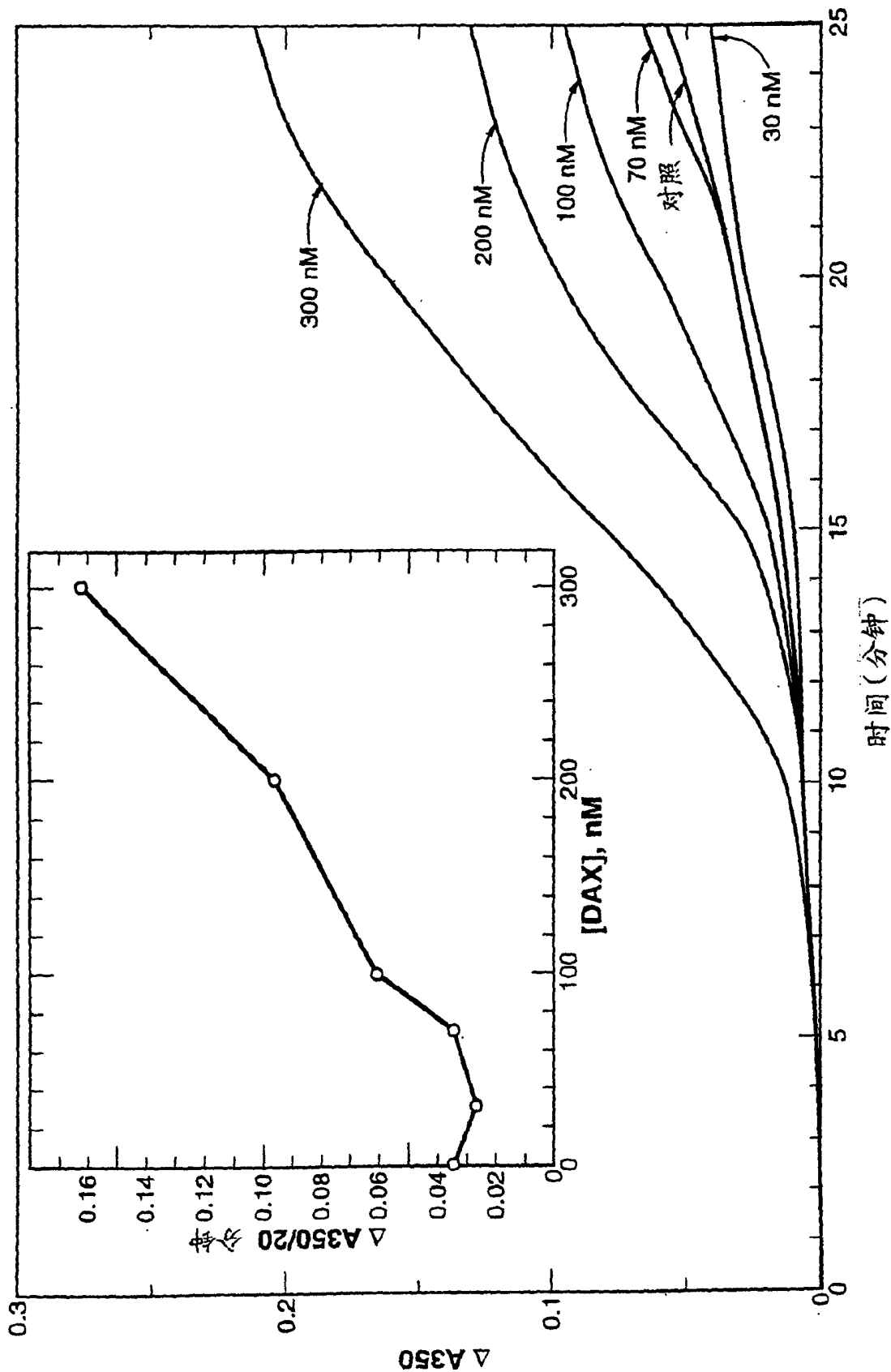


图 7

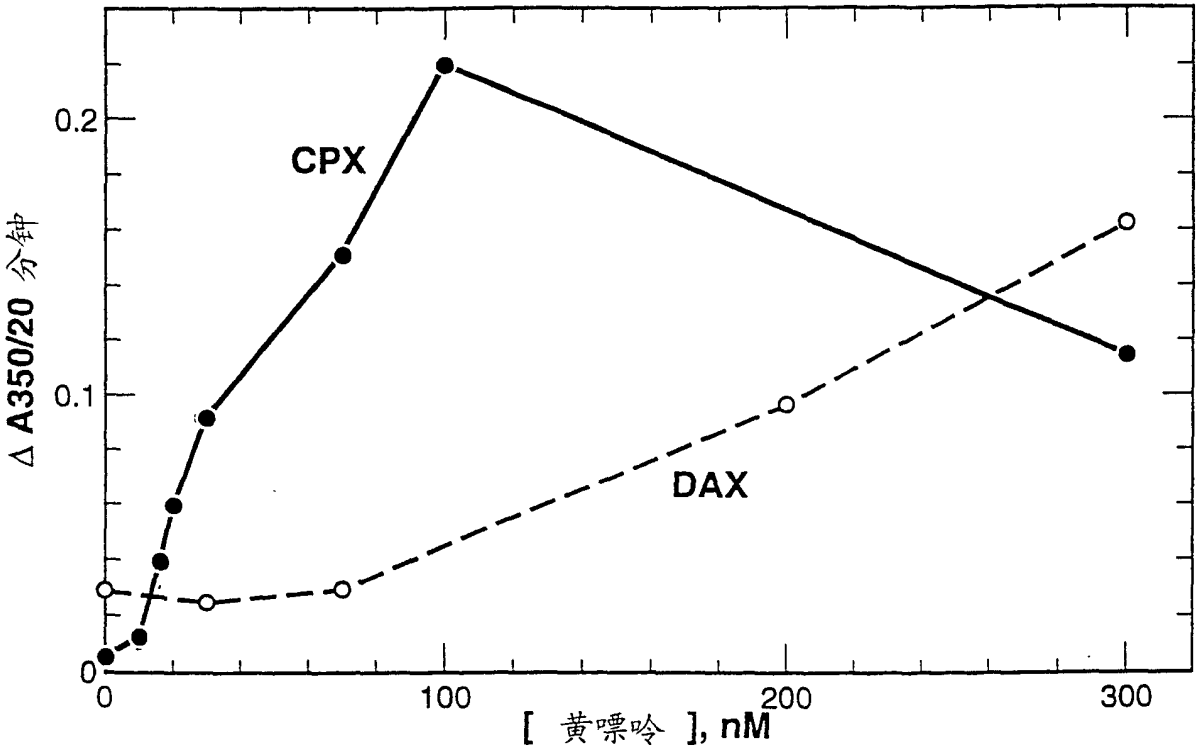


图 8

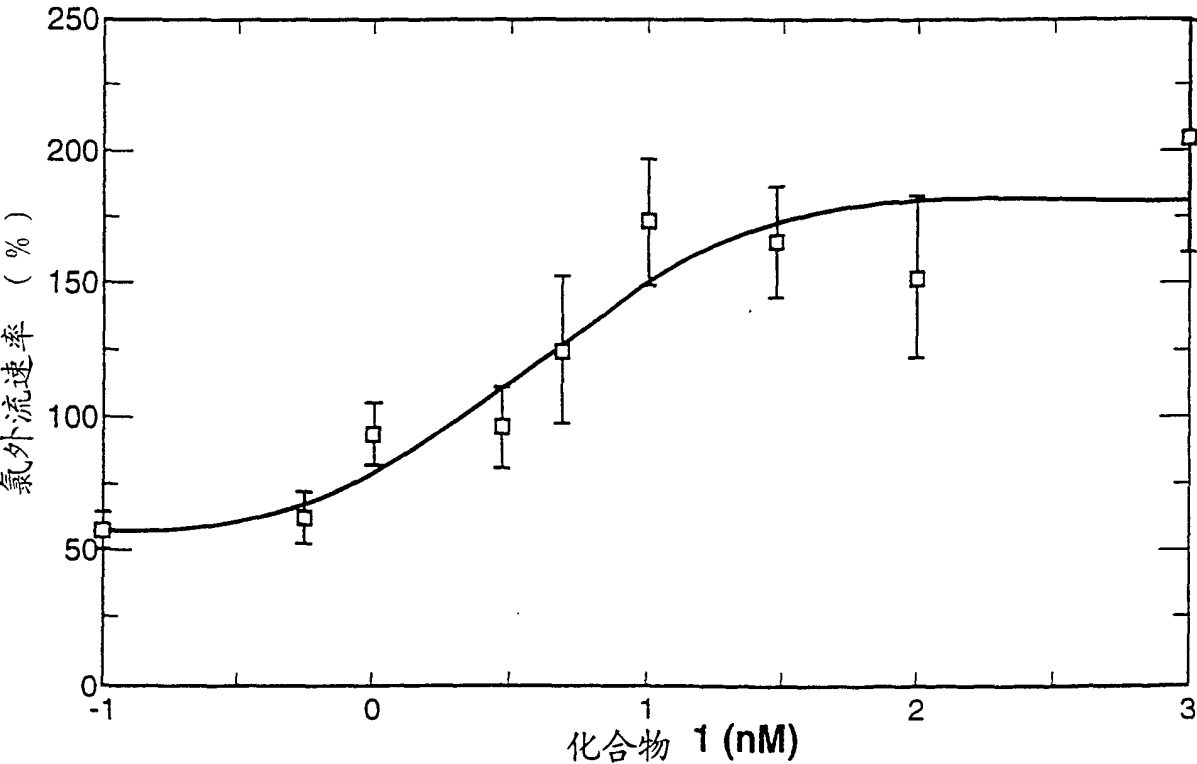


图 9

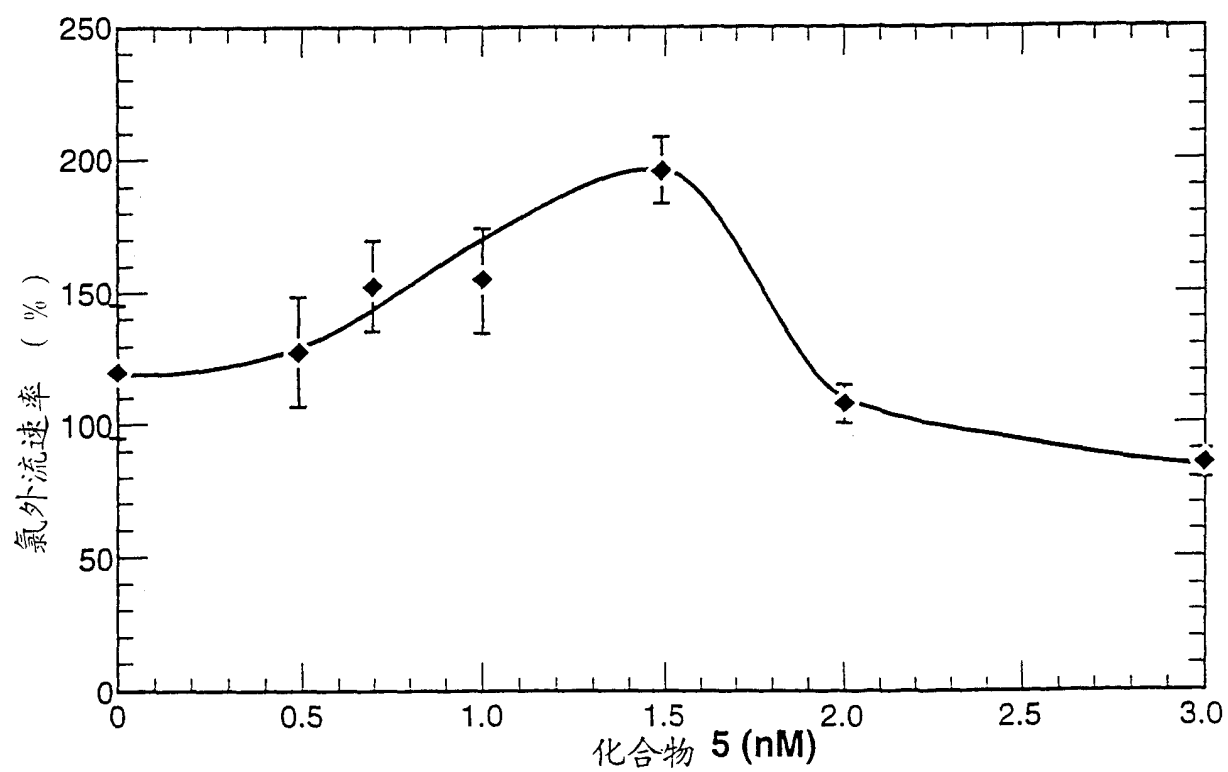


图 10

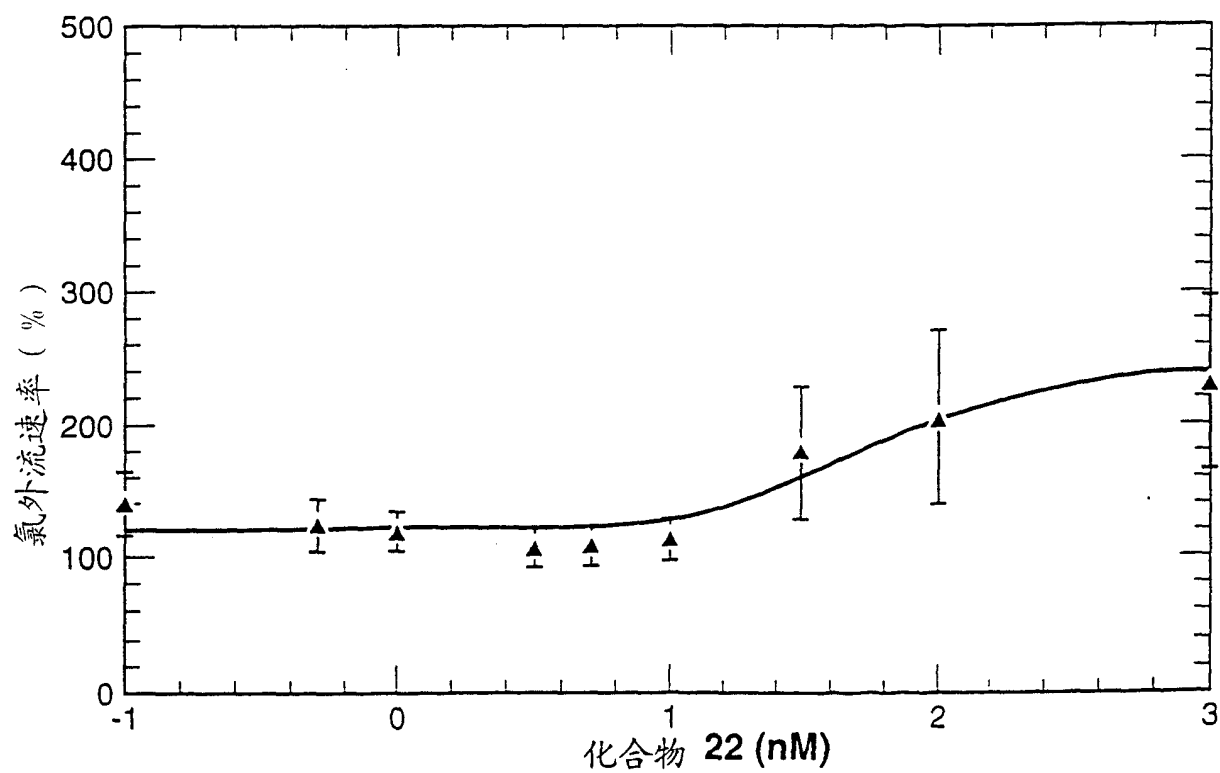


图 11

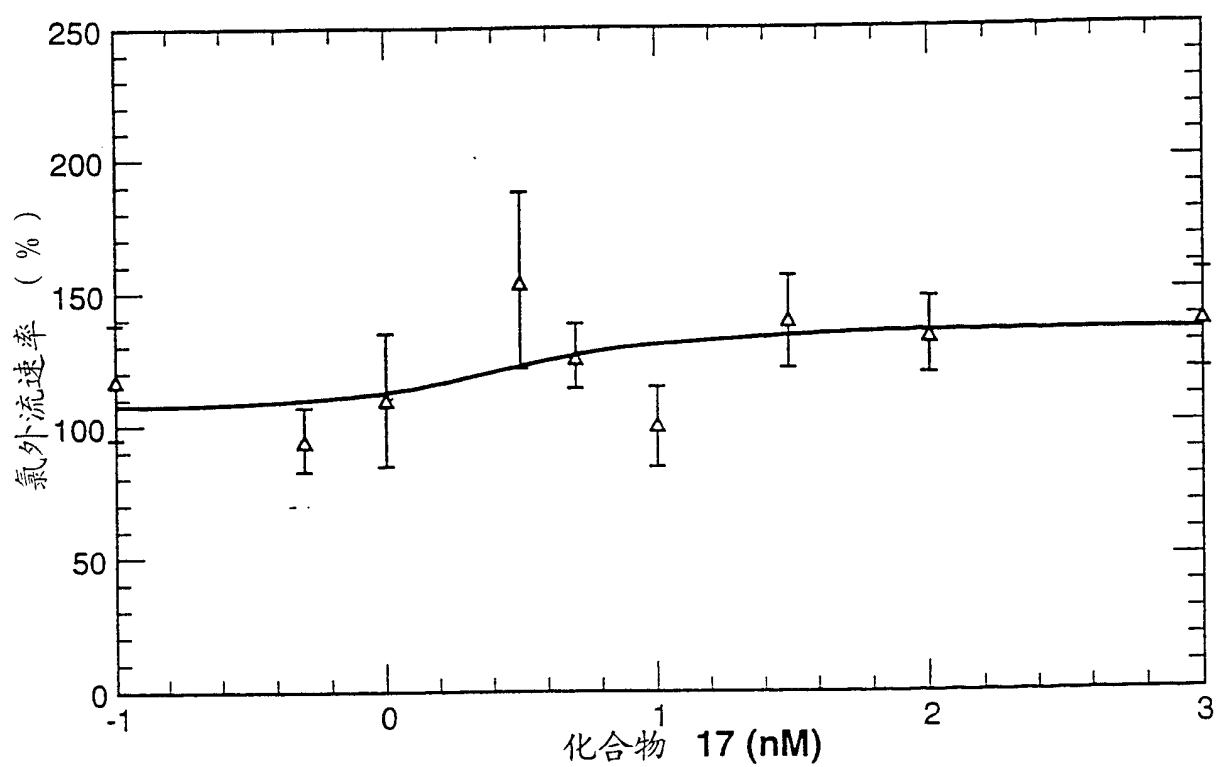


图 12

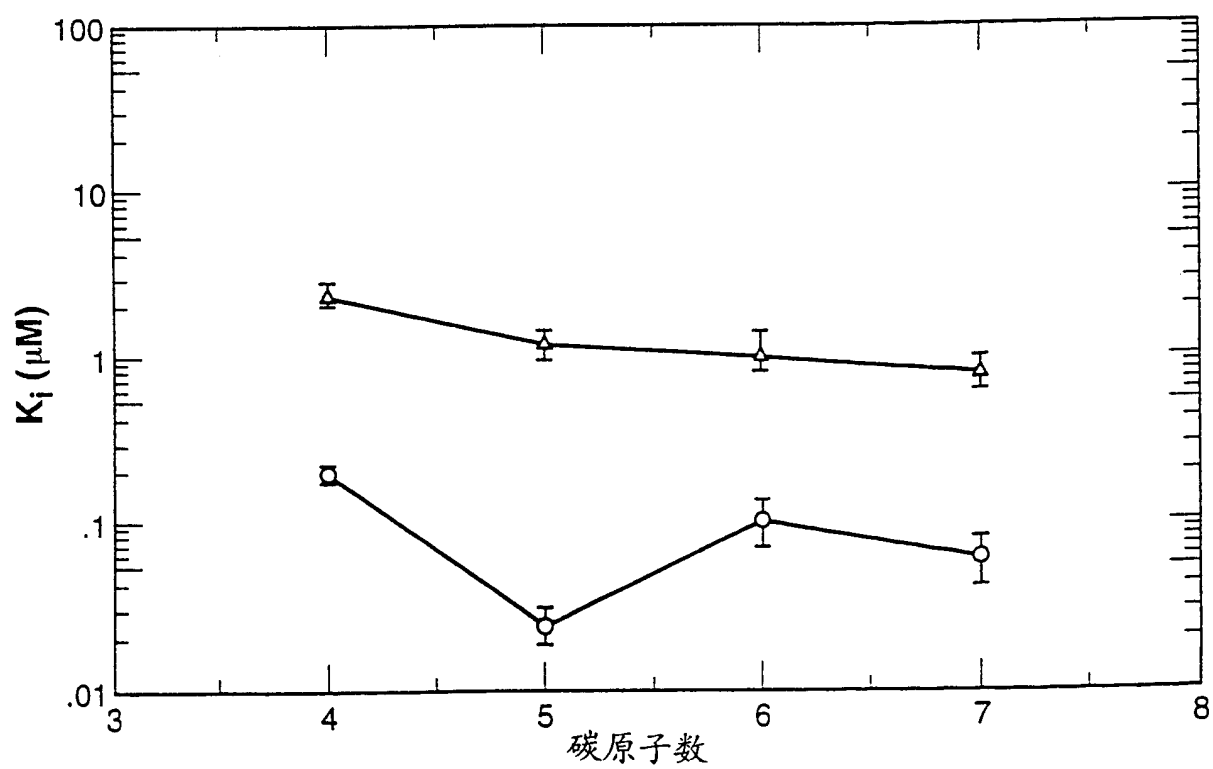


图 13

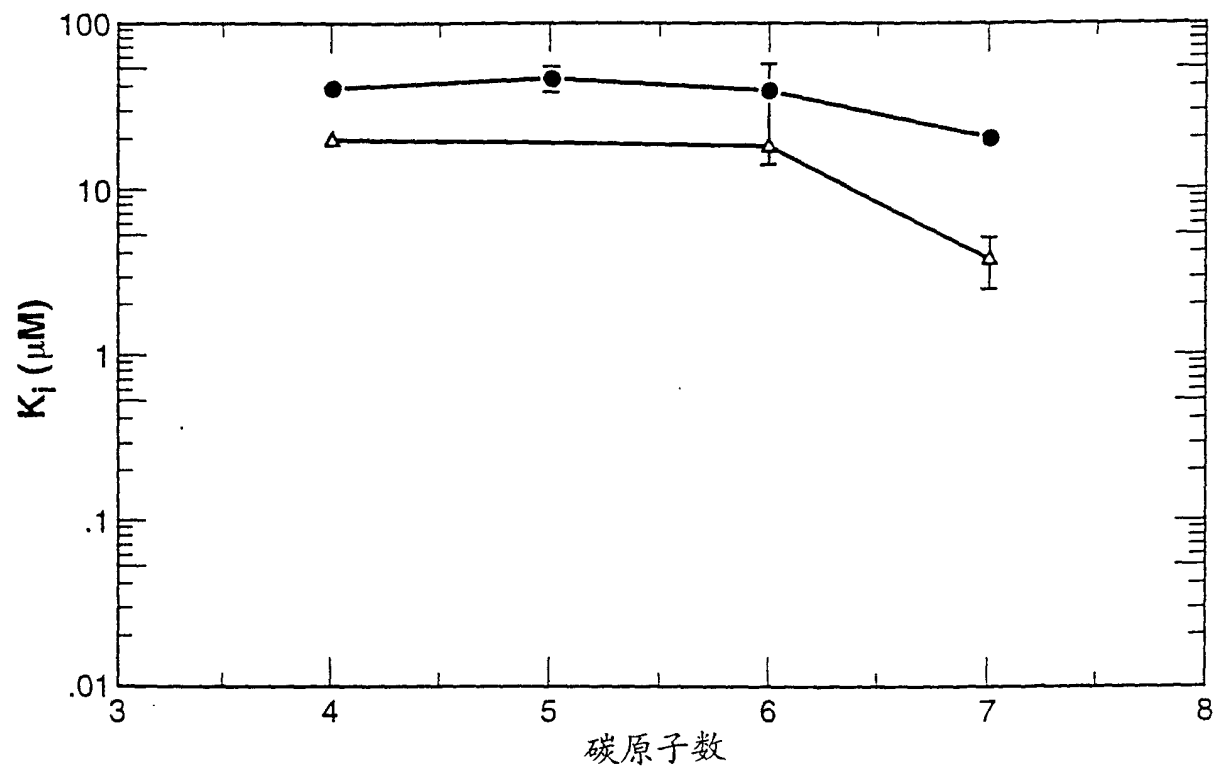


图 14