

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480016630.2

[51] Int. Cl.

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 23/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

[43] 公开日 2006年7月19日

[11] 公开号 CN 1805769A

[22] 申请日 2004.5.14

[21] 申请号 200480016630.2

[30] 优先权

[32] 2003.5.16 [33] US [31] 60/470,885

[86] 国际申请 PCT/CA2004/000726 2004.5.14

[87] 国际公布 WO2004/101072 英 2004.11.25

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.14

[71] 申请人 拉瓦勒大学

地址 加拿大魁北克

[72] 发明人 Y·德科宁克 P·德科宁克

J·A·M·库尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

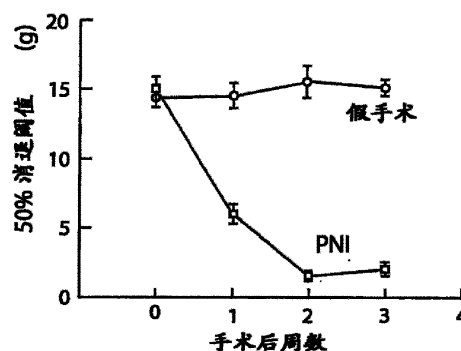
权利要求书 7 页 说明书 42 页 序列表 41 页
附图 25 页

[54] 发明名称

CNS 氯化物调节及其用途

[57] 摘要

描述了用于减弱或治疗疼痛和减轻伤害感受的方法和产品。所述方法和产品是以 CNS 细胞内氯化物水平的调节为基础的。所述方法和产品还涉及诸如 KCC2 氯化钾协同转运蛋白等氯化物转运蛋白的活性和/或表达的调节。本文还描述了以所述调节为基础的商业包装及其用途。本文还描述了用于鉴定或表征治疗疼痛的化合物、减轻伤害感受以及诊断和预测疼痛的有关方法。



- 1.治疗或预防受试者中疼痛的方法，所述方法包括降低所述受试者中枢神经系统（CNS）神经细胞中的细胞内氯化物水平。
- 2.权利要求1的方法，其中所述方法包括调节所述CNS细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达，从而降低所述氯化物水平。
- 3.权利要求2的方法，其中所述氯化物转运蛋白是KCC2。
- 4.权利要求3的方法，所述方法还包括增加所述KCC2的活性或表达。
- 5.权利要求1的方法，其中所述CNS神经细胞是脊髓神经细胞。
- 6.权利要求1的方法，其中所述疼痛信号发源于外周神经系统（PNS）细胞或所述CNS神经细胞跨突触的感觉纤维。
- 7.权利要求1的方法，其中所述疼痛是神经性疼痛。
- 8.权利要求7的方法，其中所述神经性疼痛与神经或神经束损伤有关。
- 9.权利要求7的方法，其中所述神经性疼痛选自躯体疼痛和内脏疼痛。
- 10.权利要求1的方法，其中所述疼痛选自慢性炎症疼痛、与关节炎相关的疼痛、纤维肌痛、背痛、癌症相关疼痛、消化系统疾病相关疼痛、克罗恩氏病相关疼痛、自身免疫病相关疼痛、内分泌病相关疼痛、糖尿病性神经病相关疼痛、幻肢疼痛、自发性疼痛、慢性术后疼痛、慢性颞下颌疼痛、灼痛、疱疹后神经痛、艾滋病相关疼痛、I型和II型复合性区域疼痛综合症、三叉神经痛、慢性背痛、与脊髓损伤相关的疼痛以及周期性急性痛。
- 11.权利要求1的方法，其中所述方法包括对所述受试者施用能降低所述CNS细胞中所述细胞内氯化物水平的化合物。
- 12.权利要求11的方法，其中所述化合物能调节所述CNS细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达。
- 13.权利要求12的方法，其中所述氯化物转运蛋白是KCC2。
- 14.权利要求13的方法，其中所述化合物能增加所述KCC2的活性或表达。

- 15.权利要求 14 的方法, 其中所述化合物是 TrkB 的抑制剂。
- 16.权利要求 15 的方法, 其中所述抑制剂选自 K-252a 和抗-TrkB 抗体。
- 17.权利要求 13 的方法, 其中所述化合物是依赖 cAMP 的激酶(PKA)的抑制剂。
- 18.权利要求 17 的方法, 其中所述抑制剂是 H-89。
- 19.权利要求 13 的方法, 其中所述化合物是钙调蛋白依赖性激酶(CAM 激酶)的抑制剂。
- 20.权利要求 19 的方法, 其中所述抑制剂是 KN-93。
- 21.权利要求 3 的方法, 其中所述 KCC2 包含与选自 SEQ ID NO :2、4、6 及其片段的序列基本上相同的氨基酸序列。
- 22.用于治疗或预防受试者中疼痛的组合物, 所述组合物包含:
 - (a) 能降低 CNS 神经细胞中细胞内氯化物水平的化合物; 和
 - (b) 药学可接受的载体。
- 23.权利要求 22 的组合物, 其中所述化合物能调节所述 CNS 神经细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达。
- 24.权利要求 23 的组合物, 其中所述氯化物转运蛋白是 KCC2。
- 25.权利要求 24 的组合物, 其中所述化合物能增加所述 KCC2 的活性或表达。
- 26.商业包装, 其包含权利要求 22 的组合物以及其用于治疗或预防疼痛的说明书。
- 27.商业包装, 其包含能降低 CNS 神经细胞中细胞内氯化物水平的化合物以及其用于治疗或预防疼痛的说明书。
- 28.权利要求 27 的商业包装, 其中所述化合物能调节所述 CNS 神经细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达。
- 29.权利要求 28 的商业包装, 其中所述氯化物转运蛋白是 KCC2。
- 30.权利要求 29 的商业包装, 其中所述化合物能增加所述 KCC2 活性或表达。
- 31.权利要求 22 的组合物的用途, 用于治疗或预防疼痛。

32.权利要求 22 的组合物的用途, 用于制备治疗或预防疼痛的药物。

33.能降低 CNS 神经细胞中细胞内氯化物水平的化合物的用途, 用于治疗或预防疼痛。

34.能降低 CNS 神经细胞中细胞内氯化物水平的化合物的用途, 用于制备治疗或预防疼痛的药物。

35.权利要求 33 的用途, 其中所述化合物能调节所述 CNS 细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达。

36.权利要求 35 的用途, 其中所述氯化物转运蛋白是 KCC2。

37.权利要求 36 的用途, 其中所述化合物能增加所述 KCC2 活性或表达。

38.权利要求 37 的用途, 其中所述化合物是 TrkB 的抑制剂。

39.权利要求 38 的用途, 其中所述抑制剂选自 K-252a 和抗-TrkB 抗体。

40.权利要求 37 的用途, 其中所述化合物是依赖 cAMP 的激酶(PKA)的抑制剂。

41.权利要求 40 的用途, 其中所述抑制剂是 H-89。

42.权利要求 37 的用途, 其中所述化合物是钙调蛋白依赖性激酶的抑制剂。

43.权利要求 42 的用途, 其中所述抑制剂是 KN-93。

44.鉴定或表征用于治疗或预防疼痛的化合物的方法, 所述方法包括:

(a) 将受试化合物接触 CNS 来源的细胞; 和

(b) 测定在所述受试化合物存在下所述细胞内氯化物水平是否降低; 其中所述降低表明所述受试化合物可用于治疗或预防疼痛。

45.鉴定或表征用于治疗或预防疼痛的化合物的方法, 所述方法包括:

(c) 将受试化合物接触表达氯化物转运蛋白的 CNS 来源的细胞; 和

(d) 测定在所述受试化合物存在下所述氯化物转运蛋白的活性或表达是否以使得细胞内氯化物水平降低的方式受到调节;

其中所述调节表明所述受试化合物可用于治疗或预防疼痛。

46.权利要求 45 的方法, 其中所述氯化物转运蛋白是 KCC2。

47.权利要求 46 的方法，其中所述方法包含确定在受试化合物存在下所述 KCC2 表达或活性是否增加和所述调节是否为增加。

48.权利要求 47 的方法，其中通过测量选自钾转运、氯化物转运、细胞内氯化物水平和阴离子逆转电位的参数确定所述 KCC2 活性。

49.权利要求 44 的方法，其中所述疼痛选自：慢性炎症疼痛、与关节炎相关的疼痛、纤维肌痛、背痛、癌症相关疼痛、消化系统疾病相关疼痛、克罗恩氏病相关疼痛、自身免疫病相关疼痛、内分泌病相关疼痛、糖尿病性神经病相关疼痛、幻肢疼痛、自发性疼痛、慢性术后疼痛、慢性颞下颌疼痛、灼痛、疱疹后神经痛、艾滋病相关疼痛、I 型和 II 型复合性区域疼痛综合症、三叉神经痛、慢性背痛、与脊髓损伤相关的疼痛以及周期性急性痛。

50.鉴定或表征用于治疗或预防疼痛的化合物的方法，所述方法包括：

- (a) 将受试化合物接触包含第一种核酸的 CNS 来源的细胞，所述第一种核酸包含通常与氯化物转运蛋白基因结合的转录调节元件，所述氯化物转运蛋白基因有效连接包含能编码报道蛋白的报道基因的第二种核酸；和
- (b) 在所述受试化合物存在下测定报道基因表达或报道蛋白活性是否被调节；

其中报道基因表达或报道蛋白活性的所述调节表明所述受试化合物可用于治疗或预防疼痛。

51.权利要求 50 的方法，其中所述氯化物转运蛋白是 KCC2。

52.权利要求 51 的方法，其中在所述受试化合物存在下所述报道基因表达或报道蛋白活性增加。

53.减轻受试者中伤害感受的方法，所述方法包括减少所述受试者中细胞内氯化物。

54.权利要求 53 的方法，其中所述方法包含调节所述 CNS 神经细胞中氯化物转运蛋白活性或表达。

55.权利要求 54 的方法，其中所述氯化物转运蛋白是 KCC2。

56.权利要求 55 的方法，所述方法还包括增加所述 KCC2 活性或表达。

57.权利要求 55 的方法，其中所述方法还包括将所述 CNS 神经细胞接触能增加 KCC2 活性或表达的化合物。

58.权利要求 57 的方法，其中所述化合物是 TrkB 的抑制剂。

59.权利要求 58 的方法，其中所述抑制剂选自 K-252a 和抗-TrkB 抗体。

60.权利要求 57 的方法，其中所述化合物是依赖 cAMP 的激酶(PKA)的抑制剂。

61.权利要求 60 的方法，其中所述抑制剂是 H-89。

62.权利要求 57 的方法，其中所述化合物是钙调蛋白依赖性激酶的抑制剂。

63.权利要求 62 的方法，其中所述抑制剂是 KN-93。

64.权利要求 55 的方法，其中所述 KCC2 包含与选自 SEQ ID NO :2、4、6 及其片段的序列基本上相同的氨基酸序列。

65.诊断或预测经受疼痛的受试者中与 CNS 功能异常相关的疼痛的方法，所述方法包括确定相对于相应的对照氯化物水平，受试 CNS 细胞内氯化物水平是否提高；其中所述提高表明该受试者正经受与 CNS 功能异常相关的疼痛。

66.权利要求 65 的方法，所述方法还包括确定相对于对照转运蛋白活性或表达，CNS 氯化物转运蛋白活性或表达是否受到调节。

67.权利要求 66 的方法，其中所述氯化物转运蛋白是 KCC2。

68.权利要求 67 的方法，所述方法还包括确定相对于所述对照活性或表达，所述 KCC2 活性或表达是否降低。

69.权利要求 65 的方法，其中所述对照细胞内氯化物水平选自：

(a)已建立的标准；

(b)较早时候在所述受试者中测定的相应细胞内氯化物水平；

(c)当所述受试者所经受的疼痛较轻或基本上无疼痛时测定的所述受试者中相应细胞内氯化物水平；和

(d)在经受疼痛较轻或基本上无疼痛的对照受试者中测定的相应细胞内氯化物水平。

70.权利要求 68 的方法，其中所述对照活性或表达选自：

(a) KCC2 活性或表达的已建立的标准；

(b)较早时候在所述受试者中测定的 KCC2 活性或表达的相应水平；

(c)当所述受试者所经受的疼痛较轻或基本上无疼痛时测定的所述受试者中 KCC2 活性或表达的相应水平；和

(d)在经受疼痛较轻或基本上无疼痛的对照受试者中测定的 KCC2 活性或表达的相应水平。

71.权利要求 67 的方法，其中通过测量选自钾转运、氯化物转运、细胞内氯化物水平和阴离子逆转电位的参数确定所述 KCC2 活性。

72.权利要求 65 的方法，其中通过：

(a)对所述受试者施用指示细胞内氯化物水平的指示剂化合物从而该化合物接触所述受试者的 CNS 神经细胞；

(b)评估与所述指示剂化合物相关的体内信号；

来测定所述细胞内氯化物水平。

73.权利要求 65 的方法，其中所述与 CNS 功能异常相关的疼痛是神经性疼痛。

74.权利要求 73 的方法，其中所述指示剂化合物是放射性核素。

75.权利要求 75 的方法，其中放射性核素选自 ^{201}Tl 、 $^{99\text{Tcm}}$ -tetrofosmin、 $^{99\text{Tcm}}$ -MIBI、 $^{99\text{Tcm}}$ -HMPAO 和 ^{36}Cl 。

76.权利要求 73 的方法，其中通过成像技术评估所述体内信号。

77.权利要求 72 的方法，其中所述体内信号是所述指示剂化合物的滞留指数。

78.权利要求 76 的方法，其中所述成像技术选自单光子发射计算机层析 X 射线照相术、正电子发射层析 X 射线照相术和磁共振成像。

79.权利要求 73 的方法，其中所述指示剂化合物指示 KCC2 表达。

80.权利要求 79 的方法，其中所述指示剂化合物是针对 KCC2 的抗体。

81.治疗受试者中与 CNS 功能异常相关的疼痛的方法，所述方法包括：

(a)根据权利要求 65 的方法，诊断或预测所述受试者中与 CNS 功能异

常相关的疼痛;

(b)降低所述受试者的 CNS 细胞中细胞内氯化物水平。

CNS 氯化物调节及其用途

相关的申请的交互参考

根据 35 U.S.C.119 (e), 本申请要求保护 2003 年 5 月 16 日提交的美国临时专利申请系列号 60/470,885, 该临时申请在此全文引用作为参考。

发明领域

本发明涉及中枢神经系统 (CNS) 神经细胞中的阴离子水平调节, 尤其是涉及 CNS 细胞内氯化物水平的调节及其在治疗、预防、诊断和预测疼痛中的用途。

发明背景

针对疼痛治疗的新的改良方法和活性剂的需求是目前医学上的一个重要的焦点。急性疼痛, 例如, 与受伤或疾病有关的疼痛, 可能是严重的且对患者的康复有关键的影响。而更多的关注是慢性疼痛, 它影响着相当大比例的人群, 不仅引起显著的不适, 还导致了自卑、沮丧、愤怒, 还干扰了或完全妨碍了患者一般的日常活动。

尽管在此领域内已进行了许多研究, 但对伤害感受觉中涉及的许多机制和途径仍然了解甚微。正如在多种刺激的感觉的情况中, 痛觉与神经元兴奋性的改变相关。

在某些情况中, 离子协同运输被认为在某些刺激的处理中发挥了作用。例如, Howard 等(28)已证实了通过定向缺失编码 KCC3 输出子 (exporter) 的 Slc12a6 基因而产生的小鼠展示出胼胝体发育不全, 包括运动缺陷、外周神经病以及感觉运动门控缺陷。据 Sung 等(29)报道, 与野生型和杂合的 (NKCC1^{+/+}) 小鼠相比, 编码 NKCC1 协同转运蛋白的 Slc12a2 基因被破坏的

小鼠对热刺激的敏感性大大降低。

目前仍需要更好的解释痛觉中所涉及的机制，从而提供有关这方面治疗性干预的新方法。

发明概述

本发明涉及疼痛以及治疗、预防、诊断和预测所述疼痛的方法。本发明还涉及与神经疼痛和 CNS 功能异常相关的疼痛。本发明另外还涉及降低中枢神经系统 (CNS) 神经细胞细胞内氯化物水平的方法。

一方面，本发明提供了在受试者中治疗或预防疼痛的方法，该方法包括降低该受试者中枢神经系统 (CNS) 神经细胞的细胞内氯化物水平。在一个实施方案中，所述方法包括调节 CNS 细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达，从而降低氯化物水平。在另一实施方案中，氯化物转运蛋白是 KCC2，所述方法包括提高 KCC2 的活性或表达。在又一实施方案中，CNS 神经细胞是脊髓神经细胞。在另一实施方案中，疼痛的信号源于外周神经系统 (PNS) 细胞或 CNS 神经细胞跨突触的感觉纤维。在另一实施方案中，疼痛是神经性疼痛 (neuropathic pain)，而在进一步的实施方案中，所述神经性疼痛是与神经或神经束损伤相关的疼痛或选自躯体和内脏疼痛。在另一实施方案中，疼痛选自慢性炎症疼痛、与关节炎相关的疼痛、纤维肌痛 (fibromyalgia)、背痛、癌症相关疼痛、消化类疾病相关性疼痛、克罗恩氏病相关疼痛、自身免疫病相关疼痛、内分泌病相关疼痛、糖尿病性神经病相关疼痛、幻肢疼痛、自发性疼痛、慢性术后疼痛、慢性颞下颌疼痛、灼痛、疱疹后神经痛、艾滋病相关疼痛、I 型和 II 型复合性区域疼痛综合症 (complex regional pain syndrome type I and II)、三叉神经痛、慢性背痛、与脊髓损伤相关的疼痛以及周期性急性痛。

在一个实施方案中，所述方法包括对受试者施用能降低 CNS 细胞内氯化物水平的化合物。在另一实施方案中，所述化合物能调节 CNS 细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达。在另一实施方案中，所述氯化物转运蛋白是 KCC2，在再一个实施方案中，所述化合物能提高 KCC2 的活性或表达。

在另一实施方案中,所述化合物是 TrkB 的抑制剂,诸如 K-252a 或抗 TrkB 抗体。在另一实施方案中,所述化合物是依赖 AMP 的激酶(PKA)的抑制物(如 H-89)。在另一实施方案中,所述化合物是钙调蛋白依赖性激酶(CAM 激酶)的抑制物,更具体而言,是 KN-93。在一个实施方案中, KCC2 包含与选自 SEQ ID NO:2、4、6 及其片段的序列基本上相同的氨基酸序列。

本发明的另一方面提供了用于治疗或预防受试者疼痛的组合物,所述组合物包括能降低 CNS 神经细胞内氯化物水平的化合物和可药用载体。在一个实施方案中,所述化合物能调节 CNS 神经细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达。在另一实施方案中,所述氯化物转运蛋白是 KCC2,更进一步的是,所述化合物能提高 KCC2 的活性或表达。

本发明的另一方面还提供了商业包装,其包括本文所述组合物及其用于治疗或预防疼痛的用法说明书。

本发明的另一方面提供了商业包装,其含有能降低 CNS 神经细胞中细胞内氯化物水平的化合物及其用于治疗或预防疼痛的用法说明书。在一个实施方案中,所述化合物能调节所述 CNS 神经细胞中的氯化物转运蛋白的活性或表达。在另一实施方案中,该氯化物转运蛋白是 KCC2,且更进一步的是,该化合物能提高所述 KCC2 的活性或表达。

本发明的另一方面提供了本文所述组合物在治疗或预防疼痛以及/或者制备用于治疗或预防疼痛的药物中的用途。

本发明的又一方面提供了将能降低 CNS 神经细胞细胞内氯化物水平的化合物用于治疗或预防疼痛以及/或者用于制备治疗或预防疼痛的药物的用途。在一个实施方案中,所述化合物能调节所述 CNS 细胞中氯化物转运蛋白的活性或表达。在另一实施方案中,所述氯化物转运蛋白是 KCC2,且更进一步的是,所述化合物能提高 KCC2 的活性或表达。在另一实施方案中,所述化合物是 TrkB 的抑制剂,且更进一步的是,它选自 K-252a 或抗 TrkB 抗体。在另一实施方案中,所述化合物是依赖 cAMP 的激酶(PKA)的抑制物,更具体而言,它是 H-89。在另一实施方案中,所述化合物是钙调蛋白依赖性激酶的抑制物,更具体而言,它是 KN-93。

本发明的另一方面提供了鉴定或表征用于治疗或预防疼痛的化合物的方法，该方法包括将受试化合物与 CNS 来源的细胞接触；测定在受试化合物存在的条件下细胞内氯化物水平是否下降；其中所述下降表明受试化合物可用于治疗或预防疼痛。

本发明的另一方面提供了鉴定或表征用于治疗或预防疼痛的化合物的方法，该方法包括将受试化合物与表达氯化物转运蛋白的 CNS 来源的细胞接触；测定在受试化合物存在的条件下该氯化物转运蛋白的活性或表达是否受到如此调节使得细胞内氯化物水平下降；其中所述调节表明受试化合物可用于治疗或预防疼痛。在一个实施方案中，氯化物转运蛋白是 KCC2，此外，该方法包括确定在所述受试化合物存在的条件下所述 KCC2 的表达或活性是否提高以及该调节是增强。在另一实施方案中，通过测量以下参数来确定 KCC2 的活性：钾转运、氯化物转运、细胞内氯化物水平和阴离子逆转电位。在另一实施方案中，疼痛包括慢性炎症疼痛、与关节炎相关的疼痛、纤维肌痛、背痛、癌症相关疼痛、消化系统疾病相关疼痛、克罗恩氏病相关疼痛、自身免疫病相关疼痛、内分泌病相关疼痛、糖尿病性神经病相关疼痛、幻肢疼痛、自发性疼痛、慢性术后疼痛、慢性颞下颌疼痛、灼痛、疱疹后神经痛、艾滋病相关疼痛、I 型和 II 型复合性区域疼痛综合症、三叉神经痛、慢性背痛、与脊髓损伤相关的疼痛以及周期性急性痛。

本发明的另一方面提供了鉴定或表征用于治疗或预防疼痛的化合物的方法，该方法包括将受试化合物与 CNS 来源的细胞接触，该细胞包含了具有通常与氯化物转运蛋白基因相关的转录调节元件的第一种核酸，它与含有能编码报道蛋白的报道基因的第二种核酸有效连接；确定在受试化合物存在的条件下报道基因是否表达或报道蛋白的活性是否被调节；其中报道基因表达或报道蛋白活性的调节表明受试化合物可用于治疗或预防疼痛。在另一实施方案中，所述氯化物转运蛋白是 KCC2，且在受试化合物存在的条件下所述报道基因表达或报道蛋白活性提高。

本发明的一方面提供了用于减轻受试者中伤害感受的方法，该方法包括减少受试者 CNS 神经细胞内的细胞内氯化物。在一个实施方案中，该方

法包括调节 CNS 神经细胞内的氯化物转运蛋白活性或表达。在另一实施方案中，所述氯化物转运蛋白是 KCC2，此外，该方法包括提高 KCC2 的活性或表达。在另一实施方案中，该方法进一步包括用能增加 KCC2 活性或表达的化合物接触 CNS 神经细胞。在另一实施方案中，所述化合物是 TrkB 的抑制物，而且更进一步的是，它选自 K-252a 和抗-TrkB 抗体。在另一实施方案中，该化合物是依赖 cAMP 的激酶 (PKA) 的抑制物，更进一步的说，是 H-89。在另一实施方案中，该化合物是钙调蛋白依赖性激酶抑制物，更进一步的说，是 KN-93。在另一实施方案中，KCC2 包含与选自 SEQ ID NO:2、4、6 及其片段的序列基本上相同的氨基酸序列。

本发明的另一方面提供了用于在经历疼痛的受试者中诊断或预测与 CNS 功能异常相关的疼痛的方法，该方法包括确定相对于相应的对照氯化物水平而言，被测试的 CNS 细胞内氯化物水平是否增加，其中增加表明该受试者正在经历与 CNS 功能异常相关的疼痛。在一个实施方案中，该方法进一步包括确定相对于对照转运蛋白活性或表达而言，CNS 氯化物转运蛋白的活性或表达是否被调节。在另一实施方案中，所述氯化物转运蛋白是 KCC2，而且，该方法包括确定 KCC2 的活性或表达相对于对照活性或表达而言是否降低了。在另一实施方案中，对照的细胞内氯化物水平选自已确定的标准、在较早时间测定的该受试者中相应细胞内氯化物水平、在该受试者伤害感受较轻或基本上无疼痛时测定的相应细胞内氯化物水平以及在伤害感受较轻或基本上无疼痛的对照受试者中测定的相应细胞内氯化物水平。在另一实施方案中，对照的活性或表达选自 KCC2 活性或表达的已确定的标准、在较早时间测定的该受试者中相应的 KCC2 活性或表达水平、当该受试者伤害感受较轻或基本上无疼痛时测定的相应 KCC2 活性或表达水平以及在伤害感受较轻或基本上无疼痛的对照受试者中测定的相应 KCC2 活性或表达水平。在另一实施方案中，通过测量以下参数确定 KCC2 的活性：钾转运、氯化物转运、细胞内氯化物水平和阴离子逆转电位。在另一实施方案中，通过对受试者施用指示氯化物水平的指示剂化合物使其与受试者的 CNS 神经细胞接触并评估与该指示剂化合物相关的体内信号

来确定细胞内的氯化物水平。在另一实施方案中，与 CNS 功能异常相关的疼痛是神经性疼痛。在另一实施方案中，指示剂化合物是放射性核素，更具体而言，可选自 ^{201}Tl 、 $^{99\text{Tcm}}$ -tetrofosmin、 $^{99\text{Tcm}}$ -MIBI、 $^{99\text{Tcm}}$ -HMPAO 和 ^{36}Cl 。在另一实施方案中，通过成像技术评估体内信号。在另一实施方案中，所述体内信号是指示剂化合物的滞留指标。在另一实施方案中，所述成像技术选自单光子发射计算机层析 X 射线照相术、正电子发射层析 X 射线照相术和磁共振成像。在另一实施方案中，指示剂化合物指示 KCC2 表达，更具体而言，指示剂化合物是针对 KCC2 的抗体。

本发明再一方面提供了处理受试者中与 CNS 功能异常相关的疼痛的方法，该方法包括依照本文所说方法诊断或预测受试者中与 CNS 功能异常相关的疼痛并降低受试者 CNS 细胞中的细胞内氯化物水平。

在一个实施方案中，上述受试者是哺乳动物，在更进一步的实施方案中，上述受试者是人。

附图简述

图 1: 外周神经损伤(PNI)诱导同侧表面背角 (SDH) 中片层 I(LI)神经元内 $\nabla_{\text{阴离子}}$ 剧降。a) 坐骨神经的慢性收缩损伤(n=23)，但不是假手术(n= 11)，造成对大鼠后爪机械刺激的伤害性消除的阈值 50% 显著下降($p < 0.01$)。b) 从首次用于实验的(Δ)和 PNI(\circ)大鼠 LI 神经元记录的 $E_{\text{阴离子}}$ 范围。实心符号=平均 $E_{\text{阴离子}} \pm \text{SEM}$ 。c) 显示出 $E_{\text{阴离子}}$ 对 PNI 响应偏移的所有类型 LI 神经元 (即具有时相性的(P)、单峰(SS)和强直性(T)峰的特性[19])。比例尺 (scale bar) 是 50 mV (y)、150 ms (x)。d) 响应各种 V_m 下所应用的 GABA 的首次用于实验的 (\blacktriangle) 和 PNI (\bullet) 大鼠 LI 神经元中测量到的平均峰电流。水平标准误差线代表记录移液器偏移量时神经元之间的差异。插图: 来自某一神经元的典型轨迹。比例尺是 0.6 nA(y)、1.0 s (x)。

图 2: 在 L1 神经元中经 PNI 后从仅 GlyR (受体) 转换成混合的 GABA_AR -和 GlyR-介导的微型突触后电流(mPSCs)。a) 来自首次用于实验的大鼠 LI

神经元的向外（左边）和向内（右边）微型突触后事件原始轨迹。所有向外的 mPSCs 均被马钱子碱所消除，而所有向内的 mPSCs（在马钱子碱和荷包牡丹碱的存在下记录）均被 GluR 拮抗物 CNQX 消除。HP-保持电压。比例尺是 20 pA (y), 300 ms (x)。b) 记录自 PNI 大鼠 LI 神经元的向内(左)和向外(右)微型突触后活动的原始轨迹。与在首次用于实验的大鼠中不同，同时需要有马钱子碱和荷包牡丹碱才能阻止所有向外的 mPSCs。向内的 mPSCs 仍然对 CNQX 非常敏感。比例尺是 20 pA (y)、300 ms (x)。c) 左图-记录自 PNI 大鼠 LI 神经元的叠加的单个 mPSCs。仅 GlyR 和仅 GABA_AR 以及混合 GABA_AR/Glyr-介导的类型可通过它们对马钱子碱和/或荷包牡丹碱的灵敏度而清楚地鉴别。右图-记录自 PNI 大鼠 LI 神经元的大于 100 的 GlyR-和 GABA_AR-介导 mPSCs 的平均值。比例尺是 15 pA (y), 20 ms (x)。d) 从首次用于实验的(N; 对于 GlyR 而言 n =10; 对于 GluR 而言 n=5)和 PNI (P;对于 GlyR 而言 n=9;对于 GluR 而言 n=8)LI 神经元记录的 mPSCs 平均峰电导。P(B) 显示了 0mV 时在荷包牡丹碱存在条件下记录的 PNI 大鼠神经元(n=12)中 GlyR 介导的 mPSC。e)首次用于实验的大鼠(n=6)中 GlyR 介导的 mPSC 携带的净电荷，PNI 大鼠[PNI(Bic);n=4]中用荷包牡丹碱分离的 GlyR 介导的 mPSC 所携带的净电荷，以及 PNI 大鼠 LI 神经元 (PNI;n= 12)中混合 GABA_AR/GlyR-介导 mPSCs 所携带的净电荷。f)描述首次用于实验的 LI 神经元中仅 GlyR mPSC 事件间间隔(I.E.I.)和 PNI 大鼠 LI 神经元[PNI (Bic)]中荷包牡丹碱分离的仅 GlyR mPSC 事件间间隔之间差异的累积概率图，均在 $E_{\text{阴离子}} = 0 \text{ mV}$ 的条件下记录。GABA_AR 介导的 mPSCs (PNI)的加入补偿了仅 GlyR mPSC 频率的减少。插图-PNI 对 GluR 介导的 mPSC 的频率无影响。

图 3: 与 PNI 同侧的 SDH 片层 I 神经元中 PNI-诱导的 KCC2 下调导致了 GlyR/GABA_AR-介导的兴奋。a) 短暂的 GABA 应用(每次加压 30 ms)引起来自 PNI 大鼠 fura-2-am(Ca²⁺指示剂)负荷切片的 LI 神经元中[Ca²⁺]_i 的河豚毒素(TTX)和荷包牡丹碱敏感性提高。b) 应用 KC1 但不应用 GABA (每

次最长施压 250 ms)不会引起首次用于实验的大鼠 LI 神经元内 $[Ca^{2+}]_i$ 的改变。在存在 KCC2 特异拮抗剂 DIOA 的情况下, GABA 的应用不会引起首次用于实验的大鼠 LI 神经元内 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高。比例尺为 0.02 (y)、10 s (x)。c) 展示出 GABA-引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的 LI 神经元的百分数。该比例该 PNI 大鼠中($x^2_{\text{矫正值}} = 3.91$)以及首次用于实验的大鼠中存在 DIOA 情况下 ($x^2_{\text{矫正值}} = 4.43$)显著较高。d) 证实外源 GABA 能在薄层 I 神经元内反复引起动作电位的代表性轨迹。上方的比例尺是 5 mV (y), 200 ms (x)。下方的比例尺是 30 mV (y), 4 s (x)。插图-响应去极化脉冲证实其为单峰值神经元(19)。比例尺为 20 mV (y), 300 ms (x)。e) 类似地, 主要刺激 (focal stimuli) (在存在谷氨酸盐受体阻断剂的情况下) 引起荷包牡丹碱敏感性单突触去极化突触后电位, 其会引起 PNI 大鼠片层 I 神经元中动作电位。比例尺是 5 mV (y), 250 ms (x)。插图-响应去极化脉冲证实其为相位神经元(19)。比例尺为 20 mV (y), 300 ms (x)。f) 左图-免疫印迹显示 KCC2 水平在腰部 SDH 平躺的 PNI 位点同侧(Ipsi)但不是对侧(Con)有所下降。右图-从如左图 (参照 Con 归一化 Ipsi) 的免疫印迹 ($n = 4$) 测量的 KCC2 蛋白 (对肌动蛋白归一化) 的平均强度 (\pm SEM)。

图 4: 选择性封闭或击倒 (knock down) SDH 中的突触后 KCC2 输出子显著降低了伤害感受阈值。a) 鞘内注射 DIOA ($n=5$)或载体($n=3$)后触觉伤害感受消退阈值作为时间的函数。b) 鞘内注射 DIOA ($n=3$)或载体($n=3$)后热伤害感受消退潜伏期作为时间的函数。消退时, 大鼠还经常舔它们的爪子, 表明有伤害感受。c) 在 DIOA 存在或缺失条件下用 CsCl (氯化铯) 移液器 (用于在 0mV 时夹住 $E_{\text{阴离子}}$) 记录的 LI 神经元内自发的 mPSC。比例尺是 20 pA (y), 300 ms (x)。d) 累积概率图($n=4$ 个神经元 X 50 mPSCs), 其证实 DIOA 既不会影响突触事件峰电导($p > 0.5$), 也不会影响 GABA 所引起的反应($n = 5; p > 0.5$, 插图)并因而不作用于 GlyR 也不作用于 $GABA_A R$ 。 $G_{\text{峰}} =$ 峰电导。e) 与接受合成的寡脱氧核苷酸的大鼠 ($n = 7$) 相比, 局部腰椎 (鞘内) 施用 KCC2 反义寡脱氧核苷酸 (各 12 小时) 导致首次用于实验

的大鼠 ($n = 8$) 中触觉伤害感受消退阈值的显著降低。插图, 经反义 (AS, 12 小时或 36 小时) 或合成的 (S, 36 小时) 寡脱氧核苷酸处理后脊髓 KCC2 蛋白质水平 (用免疫印迹测量) 下降。f) 与 SDH 相比, 在首次用于实验的大鼠背根神经节 (DRG) 中 KCC2 免疫反应性缺乏。g) 电子显微镜照片显示在 SDH 树突 (D) 而不在突触小结 (B) 中 KCC2 的选择性表达 (定量细节参阅图 6)。箭头指向突触。比例尺为 $0.2 \mu\text{m}$ 。

图 5: 体内突触状况的计算机模拟证实了片层 I 神经元的感受性以 $E_{\text{阴离子}}$ 偏移的函数发生。a) 左图-利用模型神经元 (参阅实施例) 进行的计算机模拟论证 GlyR-和 $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ 介导的 PSC [PNI(GlyR+ $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$)] 的 PNI 诱导的改变怎样以 GluR 介导的 PSC 频率的函数影响 LI 神经元输出发放频率的。此外还显示了在只考虑 GlyR-介导的 [PNI (仅 GlyR)] 或 $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ -介导的 [PNI (仅 $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$)] 突触事件的影响时 PNI 后 LI 神经元中的结果。右图-显示了与左图相同的数据, 按照发放频率比率表达, 计算为以特定数据集除以无抑制数据集 (即, 数据集的发放频率等价于无抑制)。尽管正常超极化 GlyR 介导的 PSCs (在首次用于实验的大鼠中平均 $E_{\text{阴离子}} = -72.8 \text{ mV}$) 对输出发放频率 (f_{out}) 具有净抑制作用, 但是去极化 GlyR-介导的 PSCs (在 PNI 大鼠中平均 $E_{\text{阴离子}} = -49.0 \text{ mV}$) 则与无抑制作用的预期结果相比 f_{out} 增加, 证明了净兴奋作用。由于 $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ -介导的 PSC 携带电荷增加而掺入 $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ 组分时, 此刺激作用更占优势。b) 左图-不同 $E_{\text{阴离子}}$ 值 (超出我们研究中所观察的范围) 对 PNI 后 LI 神经元发放频率的影响。右图-以发放频率比率表示的与左图同样的数据 (如上)。

图 6: KCC2 输出子的表达局限于背角神经元而非感觉纤维。尽管 KCC2 水平低于通过免疫印迹从 DRG 检测的水平 (图 4f), 但我们证实了 KCC2 是否会优先从细胞体穿梭至初级神经末端的中央末端。a) 电镜照片显示了在背角片层 I 的树突 (D) 上存在 KCC2。此外还显示了片层 I 神经元胞体 (S) 上的膜界定免疫金染色 (箭头)。相比, 在所检测的任一随机选择的

突触图(n=171)中均未观察到 KCC2 免疫染色。b)在明确相应于初级神经末端的中央末端(A-和 C-纤维[34,35])的片层 I 和 II(I 类: C_I, 左图; II 类: C_{II}, 右图; 箭头指示了兴奋突触; D: 树突)中突触神经纤维球的中心小结 (n = 42 个随机选定的中心小结)内也缺乏 KCC2 免疫反应性。比例尺: a: 2 μm; b:0.5 μm (左图), 0.2 μm (右图)。

图 7: 从首次用于实验的和 PNI 大鼠的片层 I 神经元记录的多种处理对阴离子 (碳酸氢盐和氯化物) 逆转电位 ($E_{阴离子}$) 的影响。

图 8: 鞘内施用受体酪氨酸激酶抑制剂 K-252a (6 nM) 导致触觉伤害感受消退阈值的提高。

图 9: 人 KCC2 的 DNA (SEQ ID NO :1)和多肽(SEQ ID NO :2)序列。

图 10: 小鼠 KCC2 的 DNA (SEQ ID NO :3)和(SEQ ID NO :4)序列。

图 11: 大鼠 KCC2 的 DNA (SEQ ID NO:5)和多肽(SEQ ID NO :6)序列。

图 12: 从采集自灌注了 BDNF、NGF 或常用的人造脑脊髓液的首次用于实验的大鼠的切片中从片层 I 神经元测量的阴离子 (氯化物和碳酸氢盐) 逆转电位 ($E_{阴离子}$) 的比较 (ACSF; 图中的“对照”)。PNI-外周神经损伤。

图 13: 含片层 I 神经元的切片中测量的 $E_{阴离子}$ 比较, 所述神经元采集自通过水浴应用 (bath application) 用针对 TrkB (P/TrkB IgG)、H-89 (P/H89)、K-252a (P/K252a) 和 KN-93 (P/KN93) 的抗体处理的 PNI 大鼠。 PNI-外周神经损伤。

图 14: 用转导 BDNF(■)的腺病毒处理的大鼠和用转导绿色荧光蛋白 (○)

的腺病毒处理的大鼠的触觉刺激的伤害感受阈值之间的比较。

图 15: 用人重组 NGF ($10 \mu\text{g}/\text{天} \times 6 \text{天}$)(■)和用盐水载体(O)处理的大鼠的触觉刺激的伤害感受阈值之间的比较。

图 16: 用中和性抗-TrkB 抗体(抗-TrkB-IgG $12 \mu\text{g}/2 \text{hrs} \times 3$)(■)处理的大鼠和只用载体处理的大鼠(O)的触觉刺激的伤害感受阈值之间的比较。

图 17: 用 PKA 抑制剂 H-89 (380 nmol)处理的大鼠(■)和只用载体处理的大鼠(O)的机械刺激的伤害感受阈值之间的比较。

发明详述

本文所述是外周神经损伤后去抑制的新机制。它涉及表面背角(SDH)片层(lamina) I 神经元中阴离子体内稳态的跨突触破坏,这是主要的脊髓伤害感受输出途径之一(7)。此处显示了由此产生的跨膜阴离子梯度变化通常导致抑制性阴离子突触电流兴奋,基本上升高了片层 I 神经元的净兴奋性。正如此处所显示的,外周神经损伤是通过信号跨突触传递导致中枢神经系统(CNS)神经元中细胞内氯化物水平升高而被感知。此外,此处所述研究证实了降低 CNS 神经氯化物水平可逆转此现象,正如通过完整大鼠中脊髓 KCC2 输出子的局部阻断或击倒显著降低了伤害感受阈值所显示的,证明已报道过的片层 I 神经元中阴离子体内稳态的破坏足以引起神经性疼痛。

因此,本文描述的实验通过研究外周神经损伤后的下游事件研究了伤害感受觉的机制。同样的,本文还证明了所述事件是跨突触传递的,例如,通过外周神经系统(PNS 细胞或感觉纤维)传递至中枢神经系统(CNS),在一个实施方案中,传递至脊髓神经元。此处进一步的研究证明了伤害感受信号的传递和疼痛的感觉最终受到 CNS 组织中细胞内氯化物水平调节的影响(例如,受诸如氯化钾协同转运蛋白 KCC2 的氯化物转运蛋白调节)。

KCC2(参阅综述(37))是已在大鼠、小鼠和人中鉴定的氯化钾协同转运蛋白(对于人 KCC 可参阅 2003 年 2 月 6 日公布的 Mount 等人的美国专利申请序号 20030027983)。小鼠中 KCC2 基因的纯合和杂合破坏的研究揭示癫痫发作表型,提示 KCC2 在癫痫症中的可能作用(38)。KCC2 在 CNS 功能中的准确作用尚未完全了解。

申请人在此证明了 CNS 细胞或组织中细胞内氯化物水平(如,根据诸如 KCC2 等氯化物转运蛋白的活性/表达)与伤害感受觉之间的相关性。正如以下实施例中所证明的,外周神经损伤(PNI)导致了 CNS 神经元(例如,脊髓,例如表面背角(SDH)片层 I(L1)神经元)的兴奋过度或敏化。这样的兴奋过度是跨突触发生的(即,在受损外周神经元的下游),这是在本文申请人的研究之前未描述的现象。这样的兴奋过度导致伤害感受阈值的降低。

正如此处所显示的,上文提及的兴奋过度与 SDH 中细胞内氯化物水平的提高相关(例如,氯化物转运蛋白[诸如 KCC2]的调节[例如,减少])。在这点上 KCC2 的作用通过将 KCC2 阻断剂 DIOA 或 KCC2 反义寡核苷酸施用于脊髓组织发现二者均导致疼痛灵敏度阈值迅速降低来证实。因此, KCC2 活性和/或表达的降低,如果导致了 CNS 神经元氯化物水平提高,就可能导致疼痛灵敏度阈值的降低,而且,相反的, KCC2 活性和/或表达的增加或诱导,如果导致 CNS 神经元氯化物减少,就可能导致疼痛灵敏度阈值提高,从而起到了预防和治疗疼痛的作用。另一方面,据报道,在某些病理生理条件下,例如,当 $[K^+]_o$ 升高时, KCC2 可能在神经元中积聚 Cl^- ,从而提高神经元的兴奋性(42)。在这样的情况下,可预想 KCC2 对 CNS 神经元氯化物具有相反作用,从而导致 CNS 神经元氯化物的增加并又降低了伤害感受阈值并提高了疼痛的敏感性。同样的, KCC2 的活性和/或表达的调节可能取决于氯化物离子流动的方向性,促进或减轻疼痛感受。

因此,第一方面,本发明涉及治疗疼痛的方法和材料,所述方法和材料基于 CNS 细胞内氯化物水平的调节以及氯化物转运蛋白(例如 KCC2 氯化钾协同转运蛋白)活性和/或表达的进一步调节。用于此处时,“氯化

物转运蛋白”被定义为细胞膜结合的多肽/蛋白质或它们的复合体，所述转运蛋白能实现氯化物阴离子穿过细胞膜。“输出（输出子）”指从细胞内向细胞外的净穿过，“输入（输入子）”指从细胞外向细胞内的净穿过。

因此，在一个实施方案中，本发明涉及通过降低例如 CNS 神经细胞等细胞的细胞内氯化物水平来治疗疼痛的方法。在另一实施方案中，氯化物转运蛋白（例如，KCC2）的调节剂可用于降低细胞内的氯化物水平。在一个实施方案中，本发明涉及以全身或局部应用降低 CNS 神经细胞中氯化物细胞内水平的化合物或药物作为减轻疼痛的方法。为了达到此效果，上述化合物或药物可调节 CNS 神经元中氯化物转运蛋白（如，KCC2 协同转运蛋白）的功能或表达。在另一实施方案中，所述化合物或药物可增加氯化物转运蛋白或 KCC2 的表达或活性。

在一个实施方案中，其中细胞内氯化物水平正被调节的 CNS 神经细胞可定位于表面背角或脊髓。此外，所述细胞还可是外围神经细胞或感觉纤维跨突触的，疼痛信号来源于所述外围神经细胞或感觉纤维。

在一个实施方案中，本发明还涉及急性和慢性疼痛的治疗，更具体而言涉及神经性疼痛的治疗。“神经性疼痛”（neuropathic pain）用于此处时指与神经损伤（例如，在神经挤压、横断或压缩后或疾病导致的神经衰退后）相关的慢性疼痛。在一个实施方案中，神经性疼痛是与神经或管道损伤相关的。在另一实施方案中，神经性疼痛是与内脏和/或躯体疼痛相关的。本发明还涉及降低 CNS 神经元氯化物的水平（例如，通过调节氯化物转运蛋白[诸如 KCC2]活性和/或表达）以减轻伤害感受。“伤害感受”用于此处指疼痛的感觉成分。疼痛可能是多种刺激的结果，所述刺激包括但不限于，压力、损伤、热刺激或化学（例如，离子的）刺激。在实施方案中，所述疼痛可能与许多疾病相关，诸如慢性炎症疼痛、与关节炎相关的疼痛、纤维肌痛、背痛、癌症相关疼痛、消化系统疾病相关疼痛、克罗恩氏病相关疼痛、自身免疫病相关疼痛、内分泌病相关疼痛、糖尿病性神经病相关疼痛、幻肢疼痛、自发性疼痛、慢性术后疼痛、慢性颞下颌疼痛、灼痛、疱疹后神经痛、艾滋病相关疼痛、I 型和 II 型复合性区域疼痛综合

症、三叉神经痛、慢性背痛、与脊髓损伤相关的疼痛和/或周期性急性痛。本发明还涉及用于评估与 CNS 功能异常相关性疼痛的诊断和预测方法。在一个实施方案中，所述诊断/预测可在本文所述治疗方法之前或在治疗方案期间进行，以便进一步表征疼痛的特性或其发展，从而提供信息，其可用于，例如，根据从此类诊断/预测得到的结果选择此类疼痛的治疗方案。用于此处时，“与 CNS 功能异常相关的疼痛”涉及 CNS 组织中离子（例如，阴离子）体内稳态改变所引起的伤害感受。在一个实施方案中，所述阴离子是氯离子。在另一实施方案中，所述改变是 CNS 细胞中细胞内氯化物水平的提高。在另一实施方案中，当受试者经受 CNS 功能异常相关性疼痛时，氯化物转运蛋白的活性或表达可被调节（例如，KCC2 活性或表达可被调节[例如，下降]）。

“KCC2”用于此处指表达于神经元的特定类型氯化钾协同转运蛋白。在实施方案中，KCC2 包含 SEQ ID NOs :2 (人 KCC2 ; 参阅图 9)、4 (小鼠 KCC2; 参阅图 10)或 6 (大鼠 KCC2; 还参阅图 11)的多肽的序列、它们的片段或基本上与它们相同的序列。在另一实施方案中，KCC2 由能编码 SEQ ID NO :2、4 或 6 的多肽或其片段的核酸序列或与它们基本上相同的序列或根据杂交标准相关的序列编码（见下文）。在另一实施方案中，此类核酸序列包含 SEQ ID NO :1 (人 KCC2 DNA; 参阅图 9)、3 (小鼠 KCC2 DNA; 参阅图 10) 或 5 (大鼠 KCC2 DNA; 参阅图 11)、其片段或基本上与其相同的序列或根据杂交标准相关的序列（见下文）。

“氯化物转运（蛋白）活性”用于此处指通过细胞膜转运氯化物。这样的转运活性可用本领域已知的多种方法通过直接或间接的方式测量，其例子在本文中描述。“KCC2 活性”用于此处指与 KCC2 相关的任何可检测表型。在一个实施方案中，KCC2 活性包括，但不局限于钾运输、氯化物运输，它们可用例如膜片钳方法、氯化物/钾敏感染料（参阅例如 Haugland, R.P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 第九版, 2002, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA）电极等使用例如，逆转电位测量评估出入细胞内和/或外的钾和/或氯化物水平（直接或间接）

来测定。此外，KCC2 活性还可影响神经细胞的阴离子逆转电位 ($E_{\text{阴离子}}$)。阴离子逆转电位可用，例如，短杆菌肽穿孔的膜片钳记录来测定。

“氯化物转运蛋白表达”（例如，KCC2 表达）涉及氯化物转运蛋白转录物（例如，KCC2 转录物）或氯化物转运蛋白多肽或蛋白质（例如，KCC2 多肽或蛋白质）的产生。因此，在实施方案中，氯化物转运蛋白的表达（例如，KCC2 的表达）可通过直接评估蛋白质水平（例如，通过免疫组织化学和/或蛋白质印迹分析）确定或利用例如逆转录酶聚合酶链式反应 [RT-PCR] 方法、基于微阵列的方法或 RNA 印迹分析等测定编码氯化物转运蛋白的核酸的水平（例如，氯化物转运蛋白编码核酸，如氯化物转运蛋白 mRNA 水平）。

能降低 CNS 神经细胞中细胞内氯化物水平的化合物可，例如，调节氯化物转运蛋白活性和表达（例如，KCC2 活性和表达）。在实施方案中，氯化物转运蛋白活性或表达（例如，KCC2 活性或表达）可增加。在一个实施方案中，这些化合物可以以使其接触 CNS 组织或 CNS 细胞的方式施用。可应用的化合物包括，但不局限于，直接或间接改变蛋白质活性的化合物以及调节所述蛋白质产量和/或稳定性（例如，在转录、翻译、成熟、翻译后修饰、磷酸化和降解水平）的化合物。

一类所述化合物是通过调节 KCC2 上一个或多个位点起作用的化合物。据报道，克隆 KCC2(20) 时，KCC2 不包含与 PKA 共有的磷酸化位点，但包含 5 个与 PKC 共有的磷酸化位点 (Thr³⁴、Ser⁷²⁸、Thr⁷⁸⁷、Ser⁹⁴⁰ 和 Ser¹⁰³⁴)。对酪氨酸蛋白磷酸化鉴定的一个共有位点 (Tyr¹⁰⁸¹) 在羧基末端。此酪氨酸激酶共有磷酸化作用位点不存在于 KCC1 或 KCC4 同种型中，但保留于 KCC3 蛋白质中 (21)。同样的，能上调或增加 KCC2 活性的化合物包括，但不局限于，蛋白质激酶抑制物（例如，N-乙基马来酰亚胺 (23-25)、星形胞菌素 (29) 和诸如 K-252a 的受体酪氨酸激酶抑制剂）；针对某些激酶或 KCC2 上激酶磷酸化位点产生的抗体或抗体片段；或者较直接（例如，能竞争 KCC2 上磷酸化位点的寡肽）或较不直接（例如，调节激酶活性和/或表达的化合物）干扰 KCC2 磷酸化的化合物。在一个实施方案中，所述

化合物可在介导磷酸化的信号途径水平发挥作用并最终影响 KCC2 的磷酸化。在另一实施方案中，可调节 TrkB 以影响 KCC2 磷酸化并最终调节 KCC2 活性。因而，在一个实施方案中，抑制 TrkB 活性的化合物可，例如，应用于这一方面。这样的化合物可包括，但不局限于，K-252a (可购自 Calbiochem) 或针对 TrkB 的中和抗体(抗-TrkB 抗体[例如 IgG]) (可购自 BD Transduction Laboratories)。另一实施方案中，依赖 cAMP 的激酶或 PKA 的调节，例如抑制可用于调节 KCC2 的磷酸化并最终用于治疗或预防疼痛。例如，PKA 抑制剂 H-89 (可购自 EMD Biosciences) 可用于这方面。在另一实施方案中，钙调蛋白依赖性激酶(CAM 激酶，例如 II 和 IV) 的调节，例如抑制可通过调节 KCC2 的活性(例如磷酸化)减轻或预防受试者的疼痛。能抑制所述激酶的化合物包括，但不局限于，KN-93 (可购自 EMD Biosciences)。在另一实施方案中，TrkB 途径的其它成员，例如磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 或磷脂酰胆碱特异的磷脂酶 C，例如，磷脂酶 C γ (PLC γ) 的调节剂，例如抑制剂，可用于降低 CNS 神经细胞中的细胞内氯化物水平。这样的化合物包括，但不局限于，三环癸-9-基-黄原酸、1-O-十八烷基-2-O-甲基-消旋-甘油基-3-磷酸胆碱、硫酸新霉素、四氢氯酸精胺、1-[6-((17 β -3-甲氧基雌-1,3,5(10)-三烯-17-基)氨基)己基]-1H-吡咯-2,5-二酮或 1-[6-((17 β -3-甲氧基雌-1,3,5(10)-三烯-17-基)氨基)己基]-2,5-吡咯烷二酮。

此外，KCC2 表达的调节还可起因于调节 KCC2 表达的转录因子的调节(例如，通过磷酸化介导的)。在另一方面，本发明提供了在受试者或动物中治疗疼痛或预防/减轻伤害感受的方法，其包括调节，在实施方案中减少或降低 CNS 神经元或组织中的细胞内氯化物水平。在一个实施方案中，细胞内氯化物水平的所述降低是通过调节，例如降低受试者 CNS 神经元或组织中氯化物转运蛋白(如，KCC2)的活性或表达来完成的。在另一实施方案中，受试者是脊椎动物。在又一实施方案中，受试者是哺乳动物，在更进一步的实施方案中，受试者是人。在一个实施方案中，CNS 组织是脊髓组织，神经细胞是脊髓神经细胞。

因此，本发明提供了治疗疼痛的方法，其包括对受试者施用能调节，在某些实施方案中，降低或减少 CNS 组织（如，CNS 神经细胞）中细胞内氯化物水平。在一个实施方案中，所述调节作用，例如氯化物转运蛋白（例如 KCC2）活性和/或表达的增加导致了受试者中细胞内氯化物水平的降低。在一个实施方案中，所述 CNS 组织是脊髓，而所述神经细胞是脊髓神经细胞。

在一个实施方案中，KCC2 包含与 SEQ ID NO :2、4、6 所提出序列或其片段基本上相同的氨基酸序列。在另一实施方案中，KCC2 可由与能够编码 SEQ ID NO :2、4、6 或其片段的核苷酸序列基本上相同的核酸，诸如与 SEQ ID NO :1、3、5 中提出的序列或其片段基本上相同的序列编码。

如上所提及的，保持活性的 KCC2 的同源物、变体和/或片段也可用于本发明的方法中。同源物包括与 KCC2 的氨基酸序列基本上相同、与 KCC2 共有显著的结构和功能同源性的蛋白质序列。变体包括，但不局限于，通过任何修饰以及/或者氨基酸替换、缺失或添加而与 KCC2 不同的蛋白质或肽。修饰可以在包括多肽主链（即氨基酸序列）、氨基酸侧链和氨基或羧基末端在内的任何部位发生。这样的替换、缺失或添加可能涉及一个或多个氨基酸。片段包括 KCC2 的片段或部分或者 KCC2 同源物或变体的片段或部分。

至于增加或上调细胞中 KCC2 的表达，可使用将编码 KCC2 的核酸引入细胞中的多种方法，其实例描述如下。诸如下文讨论的基因治疗等方法可用于这一方面。编码 KCC2 的核酸的例子包括能编码 SEQ ID NO :2、4 或 6 的多肽的核酸（例如 SEQ ID NO :1、3 和 5 的核酸）或与它们基本上相同的核酸。所述方法还可包括通过例如移植或引入包含所述 KCC2 编码核酸的神经细胞或其前体（例如，干细胞）对某一区域或神经组织（例如 CNS 组织）施用包含所述 KCC2 编码核酸的细胞。此外，所述方法可能需要对受试者施用能调节，例如上调或增加 KCC2 表达的化合物。这样的化合物可用例如下文所述筛选方法鉴别和表征。这种化合物可进一步作为含

所述化合物和药学可接受载体的组合物提供。在一个实施方案中，所述组合物被配制或改装以便施用于 CNS。这样的化合物或组合物可以配备使用说明书的商业包装提供。

“同源性”和“同源的”指两个肽或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可通过比较比对序列中各位置而确定。核酸之间或氨基酸序列之间的同源程度是在序列所共有位置处相同的或匹配的核苷酸或氨基酸数目的函数。当此术语用于此处时，如果两个序列基本上相同且序列的功能活性是保守的，则认为该核酸序列是与另一序列“同源的”（用于此处时，术语“同源的”并不意味着进化相关的）。当两个核酸序列进行最佳序列比对（允许缺口）时，如果它们共有至少大约 50% 的序列相似性或同一性，或者如果所述序列共有限定的功能基元，则认为这两个核酸序列是基本上相同的。在备选的实施方案中，最佳比对的基本上相同序列的序列相似性可以是至少 60%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95%。用于此处时，序列之间给定的同源性百分数指示了任选比对序列中的序列同一性程度。

“非相关”或“非同源的”序列与 SEQ ID NO :1 至 6 中任一个共有少于 40% 的同一性，尽管优选少于大约 25% 的同一性。

基本上互补的核酸是其中一分子的“互补物”基本上与另一分子相同的核酸。用于同一性序列比较的最适序列比对可用多种算法进行，所述算法为诸如局部同源性算法（Smith 和 Waterman, 1981, Adv.Appl Math 2:482）、同源性比对算法（Needleman 和 Wunsch, 1970, J.Mol.Biol.48:443）、相似性搜索方法（Pearson 和 Lipman, 1988, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444）和这些算法的计算机实现（诸如 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA，在 Wisconsin 遗传学软件包中，Genetics Computer Group, Madison, WI, U.S.A.）。序列同一性也可用 BLAST 算法确定，参阅 Altschul 等, 1990, J.Mol.Biol.215:403-10（用已公布的默认设置）。进行 BLAST 分析的软件可通过国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information）获得（通过互联网址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）。BLAST 算法包括首先通过识别查询序列中

与数据库序列中同样长度序列进行比对时匹配或满足某些正值阈值得分 T 的长度 W 的短字确定高得分序列对 (HSPs)。 T 指临近字得分阈值。最初的邻近字采样数作为起始搜寻的种子以发现更长的 HSPs。只要累积比对得分增加, 字采样数就沿着各序列的两个方向延伸。当遇到以下参数时, 字采集点在各方向的延伸暂停: 累积比对得分从其获得的最大值下降量 X ; 由于一个或多个负得分残基比对的积累, 累积比对得分达到 0 或之下; 或者到达了任一序列的末端。BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 确定了比对的灵敏度和速度。BLAST 程序可使用默认值: 序列长度 (W) 11、BLOSUM62 得分矩阵 (Henikoff 和 Henikoff, 1992, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-10919) 比对 (B) 50、期望值 (E) 10 (或 1 或 0.1 或 0.01 或 0.001 或 0.0001)、 $M=5$ 、 $N=4$ 以及两条链的比较。利用 BLAST 算法进行的两个序列之间统计学相似性的一个量度是最小总和概率 ($P(N)$), 它提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间会偶然存在匹配的可能性的指征。在本发明的备选实施方案中, 如果在被检测序列比较中最小总和概率小于大约 1, 优选小于大约 0.1, 更优选小于大约 0.01, 最优选小于大约 0.001, 则认为核苷酸或氨基酸序列基本上相同。

两个核酸序列基本上互补的另一指征是两序列在适度严格或优选严格的条件下相互杂交。在适度严格的条件下与滤膜结合序列的杂交可进行如下: 例如, 在 0.5 M NaHPO₄、7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、1 mM EDTA 中 65°C 进行杂交, 并在 0.2x SSC/0.1% SDS 中于 42°C 漂洗(参阅 Ausubel 等(编辑), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, Green Publishing Associates, Inc. 以及 John Wiley & Sons, Inc., New York, 2.10.3)。或者, 在严格条件下与滤膜结合序列的杂交可进行如下: 例如, 在 0.5 M NaHPO₄、7% SDS、1 mM EDTA 于 65°C 进行杂交, 并在 0.1x SSC/0.1% SDS 于 68°C 漂洗(参阅 Ausubel 等(编辑), 1989, 同上文)。杂交条件可依照已知方法根据目的序列而改变 (参阅 Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, 第一部分, 第二章, " Overview of principles of hybridization and

the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, 纽约)。通常，严格条件选定为，在限定的离子强度和 pH 条件下较热解链温度低约 5°C。

在另一方面，本发明还提供了减轻受试者中伤害感受的方法。在一个实施方案中，该方法包括调节，例如降低受试者细胞（例如，CNS 细胞）中的细胞内氯化物水平。在另一实施方案中，所述方法还包括调节，例如增加氯化物转运蛋白活性或表达，如，KCC2 活性或表达。在另一实施方案中，所述方法还包括使 CNS 神经细胞与能调节氯化物转运蛋白活性的化合物接触。所述化合物包括，但不局限于，TrkB 抑制剂（诸如 K-252a 或抗-TrkB 抗体）、PKA 抑制剂（诸如 H-89）或 CAM 激酶抑制剂（诸如 KN-93）。

本发明另外还提供了预防和/或治疗疼痛的组合物，其包含与药学可接受载体混合的能调节（例如，降低）细胞内氯化物水平的化合物。在一个实施方案中，这样的组合物可调节，例如增加或上调氯化物转运蛋白活性，例如，KCC2 活性和/或表达。在一个实施方案中，这样的组合物适合或适应施用于 CNS 神经细胞或组织，诸如脊髓组织或细胞。在另一实施方案中，这样的组合物可以是 KCC2 表达或活性的诱导剂。用于此处时，“诱导剂”是直接或间接上调或增强 KCC2 基因的表达、KCC2 mRNA 的稳定性、KCC2 mRNA 的翻译、KCC2 多肽的成熟、转运（例如，KCC2 多肽对细胞膜的再循环）或 KCC2 多肽的转运蛋白活性的化合物。在一个实施方案中，“诱导剂”也可以下调或抑制 KCC2 抑制剂。

本发明另外提供了能调节（例如，降低）细胞内氯化物水平以治疗或预防疼痛的上述组合物或上述化合物的用途。本发明还提供了能调节（例如，降低）细胞内氯化物水平的上述组合物或上述化合物的用途，用于制备治疗或预防疼痛的药物。在一个实施方案中，所述化合物或组合物调节，例如增加或上调氯化物转运蛋白（如，KCC2）活性和/或表达。在另一实施方案中，所述化合物或组合物可包括 TrkB 抑制剂（诸如 K-252a 或抗-TrkB 抗体）、PKA 抑制剂（诸如 H-89）或 CAM 激酶抑制剂（诸如 KN-93）。在另一实施方案中，所述药物可配制成施用于受试者的 CNS 组织，例如 CNS 细胞。此外，所述化合物可以是，例如，KCC2 表达或活性的诱导剂。

本发明还提供了商业包装，其含有能调节（例如，降低）细胞内氯化物水平的化合物或上述组合物以及用于治疗或预防疼痛的说明书。在一个实施方案中，所述化合物可调节（例如，增加或上调）氯化物转运蛋白或 KCC2 活性和/或表达。

在多个实施方案中，能调节（例如降低）CNS 细胞中细胞内氯化物水平的化合物可在治疗上用于治疗疼痛的制剂或药物中。所述化合物可，例如，调节（例如增加或上调）氯化物转运蛋白（例如，KCC2）的活性和/或表达。本发明还提供了相应的医学治疗方法，其中将能调节（在某些实施方案中降低）细胞内氯化物水平的化合物的治疗剂量以药学可接受的剂型施用。因此，本发明还提供了治疗组合物，其含有能调节（在某些实施方案中降低）细胞内氯化物水平的化合物以及药学可接受的赋形剂或载体。所述治疗组合物在生理上可接受的 pH 条件下可溶于水性溶液。

在一个实施方案中，施用本发明的化合物使其与 CNS 组织或 CNS 神经元接触。用于此处时，“中枢神经系统”或 CNS 是包括脑和脊髓（例如，在腰部区域）在内的神经系统的一部分。相反，“外周神经系统”或 PNS 是除了脑和脊髓之外的神经系统部分。在一个实施方案中，CNS 组织是表面背角，在更进一步的实施方案中，CNS 组织是片层 I 神经元。同样的，在实施方案中，可通过直接颅内或鞘内注射或注射入脑脊髓液中施用本发明的化合物以体内处理 CNS 细胞。或者，所述化合物可以以能穿越血脑屏障和进入 CNS 的形式全身（例如，静脉内或经口）施用。“神经的”和“神经元的”可互换用于此处，均涉及神经元和神经系统。

本发明还提供了药物组合物（药物），其含有能调节（在一个实施方案中降低）CNS 细胞中细胞内氯化物水平的化合物。在一个实施方案中，这样的组合物包含足以治疗或减轻疼痛的治疗或预防有效量化合物以及药学可接受载体。“治疗有效量”指实现预期治疗效果，诸如减轻疼痛必须的以剂量和时限有效的量。能调节（在某些实施方案中降低）CNS 细胞中细胞内氯化物水平的化合物的治疗有效量可根据以下因素而变化：诸如个体的疾病状态、年龄、性别、体重、和化合物在该个体中引起预期反应的

能力。可调节剂量方案以提供最佳的治疗反应。治疗有效量也是治疗有益效果超过该化合物的任何毒性或有害效果的量。“预防有效量”指实现诸如预防或抑制疼痛发作或疼痛严重程度增加等预期预防效果必须的以剂量和时限有效的量。预防有效量可按上述确定治疗有效量的方法确定。对于任何具体的受试者而言，可根据个体需要以及施用组合物或者监督组合物施用的人员的专业推断随时间调节特定剂量方案。

用于此处时，“药学可接受载体”或“赋形剂”包括生理上相容的任一和全部溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等等。在一个实施方案中，载体适于肠胃外施用。或者，载体可适于静脉内、腹膜内、肌内、颅内、鞘内、舌下或经口施用。药学可接受载体包括无菌水性溶液或分散剂和用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉剂。将所述介质和活性剂用于药学活性物质是本领域众所周知的。除非任一常规介质或活性剂与活性化合物不相容，否则它们均可预期用于本发明药物组合物中。辅助的活性化合物也可掺入所述组合物中。

治疗组合物通常必须在制备和贮存条件下是无菌和稳定的。所述组合物可配制成溶液剂、微乳液、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。所述载体可以是溶剂或分散介质，它们包含例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇，等等）及其合适的混合物。例如，通过使用诸如卵磷脂的包衣，对于分散剂和使用表面活性剂的情况下通过保持所需的颗粒大小可以保持适当的流动性。在许多情况下，组合物中优选包括等渗剂，例如，糖、多元醇，诸如甘露醇、山梨醇或氯化钠。通过在组合物中包含例如单硬脂酸盐和明胶等延迟吸收的活性剂可导致可注射组合物的吸收延长。此外，能调节（在一个实施方案中增加或上调）KCC2活性和/或表达的化合物可以以定时释放制剂的形式施用，例如，以包含缓释聚合物的组合物施用。活性化合物可与保护化合物免于快速释放的载体制备，诸如控释制剂，包括植入物和微胶囊化递送系统。可使用生物可降解的、生物相容的聚合物，诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸和聚乳酸、聚乙醇酸共聚物(PLG)。制备所述制剂的许多方

法是已受专利权保护或通常对于本领域技术人员而言是已知的。

通过将必需量活性化合物(例如,能调节,在一个实施方案中降低 CNS 细胞中细胞内氯化物水平的化合物)与上文列举的一种成分或多种成分的组合掺入适当溶剂中,然后无菌过滤制备无菌的可注射溶液。通常,通过将活性化合物掺入含有基本分散介质和上面列举的所需的其它组分的无菌赋形剂中制备分散物。在用于无菌可注射溶液制备的无菌粉剂的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冻干,它产生了活性成分粉末及其来自先前无菌过滤溶液的任何附加预期成分。依照本发明的另一方面,能调节(在一个实施方案中降低) CNS 细胞中细胞内氯化物水平的化合物可与一种或多种增强其溶解度的附加化合物配制在一起。

依照本发明的另一方面,包含能调节(在一个实施方案中降低) CNS 细胞中细胞内氯化物水平的化合物的本发明的治疗组合物可以以容器或商业包装的形式提供,所述容器或商业包装还包括所述治疗组合物用于治疗疼痛的说明书。

由于细胞中降低的细胞内氯化物水平与氯化物转运蛋白(KCC2)水平/活性的调节(例如增加)相关,且进一步与本文所述伤害感受减轻相关,所以本发明的另一方面是通过对受试者(例如,CNS 组织)施用编码 KCC2 的核酸分子或其保持 KCC2 活性的变体或片段来治疗疼痛。合适的施用方法包括基因治疗方法。

可用诸如直接注射 DNA、受体介导的 DNA 吸收、病毒介导的转染或非病毒转染和基于脂质的转染等方法在体内将本发明的核酸转运至细胞,所有这些方法都涉及基因治疗载体的使用。已利用直接注射将裸 DNA 在体内引入细胞中(参阅,例如 Acsadi 等(1991) *Nature* 332:815-818;Wolff 等(1990) *Science* 247:1465-1468)。可使用在体内将 DNA 注射入细胞中的递送装置(例如“基因枪”)。这样的装置可通过商业途径获得(例如,来自 BioRad)。裸 DNA 也可通过 DNA 与阳离子,诸如聚赖氨酸配合而被引入细胞中,所述阳离子可以偶联细胞表面受体的配体(参阅,例如 Wu, G. 和 Wu, C.H.(1988) *J.Biol.Chem.*263:14621;Wilson 等人(1992)

J.Biol.Chem.267:963-967;和美国专利申请 5,166, 320)。DNA-配体络合物与受体的结合可通过受体介导的胞吞作用促进 DNA 的摄取。与破坏核内体的腺病毒衣壳连接,从而将物质释放入胞质中的 DNA-配体络合物可用于避免络合物被细胞内容酶体所降解(参阅,例如 Curiel 等(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8850;.Cristiano 等 (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2122-2126)。

为了用作基因治疗载体,对缺陷型逆转录病毒进行了很好的表征(综述参阅 Miller, A.D.(1990) Blood 76:271)。用于产生重组逆转录病毒以及利用所述病毒在体外或体内感染细胞的方法可参阅文献: Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M.等(编辑) Greene Publishing Associates, (1989), 第 9、10-9、14 节, 以及其它标准的实验室手册。适当的逆转录病毒的例子包括本领域技术人员众所周知的 pLJ、pZIP、pWE 和 pEM。适当的包装病毒系的例子包括 .psi.Crip、.psi.Cre、.psi.2 和 .psi.Am。逆转录病毒已被用于在体外和/或体内将多种基因引入许多不同类型的细胞中,包括上皮细胞、内皮细胞、淋巴细胞、成肌细胞、肝细胞、骨髓细胞(参阅,例如 Eglitis 等(1985) Science 230:1395-1398; Danos 和 Mulligan (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6460-6464 ; Wilson 等 (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:3014-3018 ; Armentano 等 (1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:6141-6145 ; Huber 等 (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8039-8043 ; Ferry 等 (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8377-8381 ; Chowdhury 等 (1991) Science 254:1802-1805 ; van Beusechem 等 (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7640-7644; Kay 等(1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai 等(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10892-10895 ; Hwu 等 (1993) J.Immunol.150:4104-4115; 美国专利 4,868, 116; 美国专利 4,980, 286; 国际专利申请 WO89/07136; 国际专利申请 WO89/02468; 国际专利申请 WO 89/05345 和国际专利申请 WO 92/07573)。

为了用作基因治疗载体,可对腺病毒基因组进行处理使其编码和表达

本发明的多肽化合物，但在正常溶胞病毒生活周期中的复制能力失活。例子参阅 Berkner 等(1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld 等(1991) *Science* 252:431-434; 和 Rosenfeld 等(1992) *Cell* 68:143-155。来自腺病毒株 Ad type 5d1324 或其它腺病毒株(例如 Ad2, Ad3, Ad7 等)的适当腺病毒载体是本领域技术人员众所周知的。重组腺病毒的有利之处在于它们作为有效的基因转运载体不需要分裂细胞，且可用于感染多种的细胞类型，包括呼吸道上皮细胞(Rosenfeld 等(1992)见上文)、内皮细胞(Lemarchand 等(1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:6482-6486)、肝细胞(Herz 和 Gerard (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:2812-2816) 和肌细胞 (Quantin 等 (1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:2581- 2584)。

腺伴随病毒(AAV)可用作基因治疗载体转运 DNA 达到基因治疗的目的。AAV 是天然存在缺陷病毒，其需要另一病毒，诸如腺病毒或疱疹病毒作为辅助病毒用于有效复制和再生性生命周期(Muzyczka 等 *Curr.Topics in Micro.and Immunol.*(1992) 158:97-129)。AAV 可用于将 DNA 整合入非分裂细胞中(参阅例如 Flotte 等 (1992) *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.*7:349-356 ; Samulski 等 (1989) *J.Virol.*63:3822-3828; 和 McLaughlin 等(1989) *J.Virol.*62:1963-1973)。诸如 Tratschin 等(1985) *Mol.Cell.Biol.*5:3251-3260)所述 AAV 载体可用于将 DNA 引入细胞中(参阅，例如 Hermonat 等(1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:6466-6470; Tratschin 等(1985) *Mol.Cell.Biol.*4:2072-2081; Wondisford 等(1988) *Mol.Endocrinol.*2:32-39; Tratschin 等(1984) *J.Virol.*51:611-619; 和 Flotte 等(1993) *J.Biol.Chem.*268:3781-3790)。慢病毒 (Lentiviral) 基因治疗载体也适于用于本发明中。

基因治疗的通用方法是本领域所已知的。参阅，例如，Anderson 等人的美国专利 5,399, 346。用于递送遗传物质的生物相容的胶囊可参阅 Baetge 等人的国际专利申请 WO 95/05452。将基因转移入造血细胞的方法先前也有报道(参阅 Clapp, D.W.等, *Blood* 78:1132-1139 (1991); Anderson, *Science* 288:627-9 (2000); 和 Cavazzana-Calvo 等, *Science* 288:669-72 (2000))。本

发明还涉及移植方法，其用于在受试者中引入含有能编码 KCC2 的核酸的细胞，或在受试者中引入已在体外或先体外后体内用能降低细胞内氯化物水平的化合物处理过的细胞(例如，通过在含有所述化合物的适宜培养基在培养该细胞)。在一个实施方案中，这样的细胞是神经细胞或其前体，例如能发育/分化成神经细胞的干细胞(神经祖细胞)。涉及神经干细胞分离、增殖、表征和/或移植的方法参阅文献，例如，美国专利 5,851, 832;5,968, 829;5,411, 883;5,750, 376;6,040, 180;5,753, 506 和 6,001, 654。核酸可存在于如上所述载体中，该载体通过如上所述方法在体外被引入细胞中。在一个实施方案中，所述细胞是自体的且获自所述受试者。在某些实施方案中，所述细胞是异源或异种的。

由于 CNS 细胞中细胞内氯化物水平和疼痛之间具有相关性，所以能调节(例如降低) CNS 细胞中细胞内氯化物水平的化合物可用于预防和治疗疼痛。在一个实施方案中，可用调节(例如增加或上调)氯化物转运蛋白(例如 KCC2)活性/表达的化合物降低细胞内氯化物水平并最终预防或治疗疼痛。因此，本发明还涉及用于鉴定和表征能调节细胞内氯化物水平和/或氯化物转运蛋白活性和/或表达的筛选方法。因此，本发明还提供了确定候选化合物是否能调节细胞内氯化物水平并因此用于预防和治疗疼痛的方法。在一个实施方案中，所述方法包括将 CNS 来源的细胞接触所述候选化合物并测定在受试化合物存在的条件下细胞内氯化物水平是否下降。细胞内氯化物水平的下降表明受试化合物可用于治疗或预防疼痛。用于此处时，“CNS 来源的细胞”是分离或来自 CNS 组织的细胞，在实施方案中既包括初级神经元培养物，又包括永生的神经元细胞系，以及被接受的体外神经元模型系统(例如，在体外分化成神经元的细胞)。在一个实施方案中，上述细胞具有氯化物转运蛋白或 KCC2 活性。在另一实施方案中，所述细胞内源性表达氯化物转运蛋白(例如，KCC2)。在又一实施方案中，上述细胞已被基因工程化以表达氯化物转运蛋白基因或 KCC2 基因。在一个实施方案中，所述细胞可以是含有外来引入氯化物转运蛋白(诸如 KCC2)来源的适当宿主细胞。可通过将编码氯化物转运蛋白或 KCC2 的核酸序列

引入宿主细胞并提供所述核酸表达所需的条件来制备这种宿主细胞。在一个实施方案中，这样的核酸是 DNA。所述宿主细胞可以是真核的，诸如两栖动物或哺乳动物细胞。在一个实施方案中，这样的宿主细胞是人的细胞。

本发明还提供了用于鉴定或表征对治疗和预防疼痛有效的药物的另一种方法。在一个实施方案中，所述方法包括将 CNS 来源的细胞接触候选化合物并测定在受试化合物存在的条件下氯化物转运蛋白的活性是否被调节。氯化物转运蛋白活性的调节，例如增加表明受试化合物可用于治疗或预防疼痛。在一个实施方案中，该氯化物转运蛋白是 KCC2。KCC2 的活性可通过例如测量钾运输、氯化物运输、细胞内氯化物水平和阴离子逆转电位来确定。

对于一种受试化合物或数种受试化合物或受试化合物文库（例如，组合文库）而言都可应用上述方法。在后一种情况下，也可鉴定和表征化合物组合所产生的协同作用。上述化合物可用于预防和/或治疗疼痛，或可用作先导化合物用于开发和检测具有改良的特异性、功效和/或药理学（例如药物动力学）特性的其它化合物。在一个实施方案中，所述化合物可以是前体药物，其在例如 CNS 组织（例如，脊髓）等适当的作用位点转换成活性形式。在某些实施方案中，本发明的筛选/检测方法中的一个或多个步骤可以自动化。

如上所述，本发明还涉及用于鉴定和表征能调节（在某些实施方案中增加）氯化物转运蛋白（例如 KCC2）基因表达的化合物的方法。这样的方法可包括在受试化合物存在或缺失的条件下检测氯化物转运蛋白（例如 KCC2）的基因表达。这样的基因表达可通过检测相应的 RNA 或蛋白质，或者通过使用适报道构建体来检测，其中所述构建体含有通常与所述氯化物转运蛋白或 KCC2 基因结合的转录调节元件，所述基因有效连接报道基因。当第一种核酸序列与第二种核酸序列在功能上相关时，第一种核酸序列可以“有效连接”第二种核酸序列。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则启动子有效连接编码序列。通常，有效连接的 DNA 序列在读框中是相邻的，且在必要的情况下连接两个蛋白质编码区。不过，由

于例如增强子通常在与启动子间隔数千个碱基的情况下仍能发挥作用且内含子序列可能是不同长度的，所以某些多核苷酸元件可以有效连接但不是相邻的。“转录调节元件”是一个指诱导或调节与其有效连接的蛋白质编码序列转录的 DNA 序列的一般术语，诸如起始和终止信号、增强子和启动子、剪接信号、聚腺苷酸化信号。这种报道基因的表达可在转录或翻译水平上进行测量，例如，通过检测所产生的 RNA 或蛋白质的量。RNA 可通过例如 RNA 印迹或逆转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法分析(参阅，例如 Sambrook 等(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第二版), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA)。蛋白质水平可用亲和试剂(例如，抗体或其片段[方法参阅例如 Harlow, E.和 Lane, D (1988) *Antibodies : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]; 结合蛋白质的配体)或通过其它特性(例如在绿色荧光蛋白的情况下是荧光)直接检测，或者通过测量可能使其具有酶活性从而产生可检测产物(例如，具有改变的分光光度特性)或可检测表型(例如细胞生长的变化)的蛋白质活性进行测定。合适的报道基因包括，但不局限于，氯霉素乙酰转移酶、 β -D-半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色荧光蛋白。在一个实施方案中，候选化合物可进一步被检测以确定其是否能调节氯化物转运蛋白介导的过程(例如 KCC2 介导的过程)或氯化物转运蛋白活性(例如 KCC2 活性)。在一个实施方案中，这样的氯化物转运蛋白介导的过程是离子转运，例如钾或氯化物转运，通过例如评估钾和/或氯化物水平(例如细胞内的)或通过测量阴离子逆转电位(电生理学)、膜电位来测定，例如下文实施例中所描述的。

本发明还涉及疼痛的诊断和预测。在一个实施方案中，疼痛是由受试者神经系统(例如中枢神经系统)中离子(例如阴离子或氯化物)内稳态的变化所引起的。不被任何具体理论所束缚，从中枢神经系统(CNS)神经元输出钾和氯化物能力的降低可能导致持久的神经元超兴奋性和最终导致疼痛。

本发明由此提供了用于诊断或预测与 CNS 功能异常相关的疼痛的方法。用于此处时，“CNS 功能异常”是 CNS 中神经元离子内稳态的变化。在一个实施方案中，与所述 CNS 功能异常相关的疼痛是神经性疼痛。在一个实施方案中，所述方法包括测定 CNS 神经细胞中的细胞内氯化物水平并将该氯化物水平与相应的对照水平进行比较。在此具体方法中，检测水平相对于对照水平的增加表明受试者正经受 CNS 功能异常相关性疼痛。在一个实施方案中，所述方法可以包括确定 CNS 氯化物转运蛋白活性或表达（例如，KCC2 活性或表达）相对于对照活性或表达而言是否被调节，例如上调或增加。在另一实施方案中，对照氯化物水平可选自己建立的标准、较早时间测定的受试者中相应的氯化物水平、当受试者经受疼痛较轻（相对于上文提及的当前伤害感受而言）或基本上无疼痛时在所述受试者中测定的相应氯化物水平；或者当对照受试者经受疼痛较轻（相对于上文提及的测试组受试者中当前伤害感受而言）或基本上无疼痛时在对照受试者中测定的相应氯化物水平。在一个实施方案中，经受疼痛较轻或基本上无疼痛的受试者或对照受试者未呈现出明显的中枢或外周神经系统损伤（例如，神经性疼痛）或持续的疼痛。在另一实施方案中，对照活性或表达可选自己 KCC2 活性或表达的建立的标准、在较早时间测定的受试者中 KCC2 活性或表达的相应水平、当受试者伤害感受较轻（如上所述）或基本上无疼痛时测定的受试者中 KCC2 活性或表达的相应水平、或者在所经伤害感受较轻（如上所述）或基本上无疼痛的对照受试者中测定的 KCC2 活性或表达的相应水平。在一个实施方案中，KCC2 的活性可如上所述测定。

例如，通过对受试者施用能接触该受试者 CNS 神经细胞的指示剂化合物（诸如指示氯化物水平的化合物）可测定细胞内的氯化物水平。在施用指示剂化合物后，可进行与该指示剂化合物相关的体内信号评估。在一个实施方案中，可以使用指示剂化合物，诸如放射性核素（例如，铊-201 (^{201}Tl)、 $^{99\text{Tcm}}$ -tetrofosmin、 $^{99\text{Tcm}}$ -MIBI 或 $^{99\text{mTc}}$ -HMPAO 或它们的氯化物缀合物）或指示 KCC2 表达的化合物（诸如基于免疫检测的试剂（例如，针对 KCC2 多肽的抗体、单链抗体或 Fab 片段））。在另一实施方案中，指示

剂化合物通过静脉内注射时可穿过血脑屏障并积累于类似于钾的 CNS 神经元中，即反应钾水平。在另一实施方案中，所述放射性核素(例如 ^{201}Tl) 的剂量可以是大约 100 MBq (3mCi)。在另一实施方案中，放射性核素(例如 ^{201}Tl)可在进行 SPECT 成像之前 15-20 分钟注射。注射指示剂化合物后，可采用成像技术评估体内与指示剂化合物相关的信号。这样的成像技术包括，但不局限于，单光子发射计算机层析 X 射线照相术(SPECT)、正电子发射层析 X 射线照相术和/或磁共振成像。成像技术可评估指示剂化合物的体内信号，诸如神经钾梯度。图象可通过，例如，用装备有高分辨率(5-7 mm) 瞄准仪并连接了专用计算机系统的 γ 照相机获得。在一个实施方案中，可在 180° 弧获得连续投影图像。在另一实施方案中，神经元的放射性核素(例如 ^{201}Tl) 滞留可表示为滞留指数(RI)。“滞留指数”按本文所述定义为： $(\text{延时滞留}-\text{早期滞留}) \times 100 / \text{早期滞留}$ 。

在一个实施方案中，“滞留指数”的“滞留”在此定义为在某一时间内被特定组织保留的指示剂化合物(例如，示踪物或放射性核素)的量。在另一实施方案中，在延时滞留之前评估早期滞留。在又一实施方案中，测量 CNS 组织中滞留指数。

在一个实施方案中，上文提及的诊断/预测方法可与上文提及的治疗/预防方法联合进行，用于预防或治疗受试者中与 CNS 功能异常相关的疼痛。所述方法因此包括 CNS 功能异常相关疼痛的诊断或预测，且根据诊断/预测，降低受试者中 CNS 细胞的细胞内氯化物水平从而预防或治疗疼痛。

尽管本文描述了多种实施方案，但可依照本领域技术人员共有的常规知识在本发明范围内进行许多改变和修饰。这样的修饰包括为了以基本上相同的方式达到相同的效果针对本发明任一方面的已知等价方案的替代。数字范围包括定义该范围的数字。在权利要求中，单词“包含”被用作一个开放的术语，基本上等同于短语“包括，但不局限于”。以下实施例是对本发明各个方面的举例说明，而非限制本文所公开的本发明的广泛方面。在整篇申请中，引用了许多文献以便更完整的描述本发明所属的领域。这些参考文献的公开因此作为参考并入本公开。

实施例

实施例 1: 方法

神经损伤

简而言之,如文献所述(16)通过外科手术在成年雄性 Spague-Dawley 大鼠的坐骨神经周围植入聚乙烯套(长~2 mm, 内径 0.7 mm)。还有一组大鼠也接受假手术。只有显示出机械阈值(在 14-17 天中)逐渐降低至 2.0g 或更少的动物才用于进一步的实验。

行为检测

如文献所述(17)检测伤害感受消退反射的热和机械阈值。

切片制备

如文献所述(9)从成年(大于 50 天)雄性大鼠制备脊髓旁矢状面切片(300-350 μ m)。用含以下成分(mM)的人造脑脊髓液(ACSF)不断浇注切片(2-3ml/分钟): 126 NaCl, 2.6 NaHCO₃, 10 葡萄糖, 2.5 KCl, 2CaCl₂, 2 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 0.001 TTX (通入 95% O₂- 5% CO₂, pH~7.4); 当测量 GABA_A/GlyR-介导的电流时, 加入 10 μ M 6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮 (CNQX)和 40 μ M D2-氨基-5-磷酸基戊酸(APV)以阻断快速的谷氨酸能传递。

记录

为了进行穿孔膜片钳(perforated patch)记录, 在移液器头上吸满含以下成分的溶液(mM): 130 葡糖酸铯(CsGluc), 5 CsCl, 2 MgCl₂, 11 BAPTA 钙螯合剂(缓冲液), 1CaCl₂, 4 ATP, 0.4 GTP, 10 HEPES(pH~7.4)。移液器回吸补充了 25 μ g/ml 短杆菌肽 D(短杆菌肽贮存液是溶于 DMSO 中 10 mg/ml)的相同溶液。当接入电阻(access resistance)稳定在 25-45MQ 之间时选择此方式的记录。为了进行全细胞电压钳记录, 使移液器吸满无短杆菌肽 D 的上述溶液。类似的, 用吸了电压钳所用溶液的相同的细胞内溶液进行全细胞电流钳记录, 不同之处在于用甲基硫酸钾(KMeSOe)代替 CsGluc。为了在 0 mV 夹住 E_{阴离子}, 在细胞内溶液中用 110 mM CsCl 代替 CsGluc。

所有 $E_{\text{阴离子}}=0$ mV 时的全细胞记录都是在 $V_m = -60$ mV 且存在 GluR 阻断剂的条件下进行的。用板式微量移液器 (patch micropipette) 通过压力喷射局部应用 GABA 30- 250 ms。如文献所述(9)进行数据采集和 PSC 分析。若非特别指明, 所有的测量以平均值 \pm SEM 给出。用斯氏 t-检验比较平均值的统计学显著性、卡方检验检测相依表以及混合设计 ANOVAs(post-hoc-Tukey's HSD)检测重复测量的统计学显著性。

钙成像

如上文关于电生理分析从 PNI 和首次用于实验的大鼠制备切片。在 ACSF 中孵育 15 分钟后, 在切片装入溶于 HEPES 缓冲盐水(+10% DMSO) 的 $10 \mu\text{M}$ Fura-2-AM (荧光测定钙指示剂, AM=乙酰基甲基)1 小时。先用 ACSF 漂洗切片 ~ 15 分钟再固定于记录室中, 在记录室中继续对切片浇注 ACSF (2-3ml/分钟)。用装备了表面荧光光学系统的 Zeiss Axioscope 荧光检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。用与 CCD 照相机连接的 TILL Photonics 单色仪获取图像并在清楚的明显神经元细胞体中标出目的区域 (用于定量)。

免疫印迹

从 PNI 和首次用于实验的成年大鼠二者的腰膨大制备 SDH 水平切片 ($150 \mu\text{m}$)。通过用特氟隆研杵在含以下成分的缓冲液中匀浆制备组织提取物: 0.32 M 蔗糖, 0.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM 二乙胺四乙酸(EDTA), 2.5 mM β -巯基乙醇和蛋白酶抑制剂的混合物(Complete™, Roche Diagnostics)。收集 $3,000 \text{ g}$ (20 分钟)和 $10,000 \text{ g}$ (30 分钟)离心的上清液。将稀释于样品缓冲液中的等量蛋白质($20 \mu\text{g}$ /泳道)在 37°C 预热 30 分钟, 用 SDS-PAGE 解析, 并电印迹至硝酸纤维素膜上。将膜在溶于 TBST 缓冲液 (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05% Tween-20)的 5% 脱脂干奶中封闭 30 分钟并在 4°C 与兔抗 KCC2 抗体 (1:1000, Upstate Biotechnology) 孵育过夜。用 TBST 漂洗数次后, 将膜与过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体 (1:2000)一起在室温孵育 30 分钟。用 Super Signal Femto™ (Pierce Biotechnology)检测化学发光条带。用 VersaDoc™ 成像系统(BioRad)捕捉数码图像并用 QuantityOne™ 软件(BioRad)分析数据。

寡脱氧核糖核苷酸

如文献所述(18)设计在所有位置硫代磷酸酯化的 KCC2 反义和合成的寡脱氧核糖核苷酸: 反义 5'-TCTCCTTGGGATTGCCGTCA-3' (SEQ ID NO :7; 相对于 ATG 起始信号+59 处); 合成的寡脱氧核糖核苷酸 5'-TCTTCTTGAGACTGCAGTCA-3' (SEQ ID NO :8)。

鞘内注射

至少在药物施用前三天, 如文献所述(11)用戊巴比妥钠(65 mg/kg)麻醉大鼠并将腰脊椎导管插入鞘内空间。简而言之, 在大池处产生一个小开口, 将导管插入蛛网膜下空间并从尾部径直前进 ~8cm 至脊髓的腰膨大。从外科手术恢复后, 通过鞘内 (i.t.) 注射利多卡因(2%, 30 μ l)诱导下身麻痹从而证实正确的导管定位。只有对利多卡因呈现出适当的短暂麻痹现象以及无运动缺陷的动物被用于行为试验。在施用药物/载体后, 处死动物并解剖它们的脊柱以在视觉上证实导管的正确放置。药物包括 DIOA(10-30 μ g, 在 0.9% NaCl, 10% DMSO 中)和寡脱氧核糖核苷酸(每剂 2 μ g, 0 小时、12 小时和 24 小时各一剂; 0.9%NaCl)。如上所述进行行为试验, 在接受药物或载体之前, 在首次用于实验的大鼠中证实了消退反应的正常 (~15g) 机械阈值。在所使用的剂量时, 根据抓握、直立和放置反射以及行为观察(17)评估发现没有化合物产生运动干扰或镇静。

计算机模拟 (参阅图 5)

所有的模拟都通过 NEURON 4.3.1 基于 (19) 利用具有形态学和被动膜 (passive membrane) 性质的普通脊髓片层 I 纺锤状神经元的区室模型进行。将最多分叉至第四级且轴突与文献 (19) 所述相似的树突附着于躯体。基于 (30) 的快速 Na^+ 和延迟的整流器 K^+ 电流分别以 0.1 和 0.01 S/cm^2 插入躯体和轴突起始段及节点处, 形成尖峰的电压阈值是 -49 mV。两套抑制性突触随机分布于周围体细胞区 (perisomatic region), 而四套兴奋性突触则在更末梢, 每一套都通过独立的 Poisson 方法以文献 (31) 和 (32) 外推的速率驱动。

电子显微术 (参阅图 6)

如文献(35)所述处理组织用于超结构分析。简而言之,先用0.9%NaCl,后用含4%多聚甲醛(Sigma-Aldrich, 德国)的固定液从主动脉弓灌注大鼠。灌注后,除去脊髓,解剖冠状阻滞,然后低温保护切下60 μm 薄的切片并液氮冻融,用磷酸缓冲液漂洗数次后在初次抗血清中孵育。在含2%牛血清白蛋白(BSA)的封闭液中孵育后,将切片在兔抗KCC2(1:500, Upstate Biotechnology, USA)中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育48小时。充分洗涤后,将切片在1 nm金缀合的抗兔二级抗体(1:250, Aurion)中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12小时,随后银强化(SE-EM, Aurion)。将切片用0.5%OsO₄处理(20 min),梯度乙醇中脱水,然后在氧化丙烯中脱水,并包埋于Durcupan ACM (Fluka)中。超切片后(Ultracut UCT, Leica, 德国),用电子显微镜(Philips Tecnai 12, 配备了MegaView™ CCD照相机)检查样本。用电镜分析非连续(间隔>3 μm)超薄切片。随机选择具有突触特征的小结并用片层I和II及白质分析KCC2蛋白质的表达(36)。

鞘内施用 K-252a (参阅图 8)

用25 μl 含10% DMSO的0.9% NaCl溶液配制K-252a。通过在大池产生一个小的开口并将P10聚乙烯管插入蛛网膜下空间-从尾部径直~8cm至脊髓的腰膨大处,从而完成鞘内导管插入术。

实施例 2:

结果

通过长期压缩坐骨神经诱导外周神经病(图1a)。为了检测外周神经损伤(PNI)后的SDH神经元的超兴奋性(致敏)是否与阴离子梯度($\nabla_{\text{阴离子}}$)的变化相关,用穿孔短杆菌肽膜片钳记录检测阴离子逆转电位($E_{\text{阴离子}}$)。此技术避免了细胞内阴离子浓度的破坏(8)。对外源GABA应用的反应显示来自PNI大鼠片层I(LI)神经元的阴离子逆转电位($E_{\text{阴离子}}$)是 $-49.0 \pm 2.3 \text{ mV}$ (范围: -40至-62.2 mV, n=9),相比,来自首次用于实验的大鼠LI神经元的阴离子逆转电位为 $-72.6 \pm 3.5 \text{ mV}$ (范围: -63.0到-79.9 mV, n=5; $p < 0.005$) (图1b-d)。PNI ($-62 \pm 4 \text{ mV}$, n=7)和首次用于实验的大鼠LI神经元($-61 \pm 2 \text{ mV}$, n=16; $p > 0.1$)之间的静息膜电位无显著的差异。在快速谷

氨酸受体 (GluR) 阻断剂存在条件下从 PNI 大鼠 LI 神经元记录的自发和激发的突触后电流(PSCs)也是内向的 (从静止去极化), 它们的平均逆转电位相对于首次用于实验的大鼠片层 I 神经元中的逆转电位而言提高了 16.1 mV(n=6, PNI; n=4, 首次用于实验的)。

然后研究 PNI 后 SDH 中突触传递的其它特性是否改变。即使从局部抑制性中间神经元共释放出 GABA 和甘氨酸, 仅甘氨酸受体 (GlyR) 也能介导首次用于实验的大鼠的 LI 神经元中的抑制性小型 PSCs (mPSCs)(9; 图 2a)。而在所有来自 PNI 大鼠的被检测细胞中, GluR-介导的 mPSC 均未受 PNI 的影响(图 2b), 在 GlyR 拮抗剂马钱子碱存在的条件下持续出现 0mV 外向的一群 mPSC(最大 $1\mu\text{m}$; n=4)。这些残留的 mPSC 是由 GABA_ARs 介导的, 因为它们被荷包牡丹碱 ($10\mu\text{M}$) 所阻断并且与 GlyR 介导的组分相比呈现出延长的衰减动力学 ($\tau_D(\text{GABA}_A\text{R})=34.0 \pm 2.9 \text{ ms}$, n=5 相对于 $\tau_D(\text{GlyR})=11.3 \pm 1.3 \text{ ms}$, n=6; $p < 0.01$; 图 2C)。

动力学分析进一步显示出 mPSC 的 $36.9 \pm 2.3\%$ 衰减期遵循双指数函数 (dual exponential function) ($\tau_{D1}=7.5 \pm 2.0 \text{ ms}$ 且 $\tau_{D2}=51.3 \pm 7.9 \text{ ms}$; n=6; 图 2c)。这些事件具有 GABA_AR 和 GlyR 介导的成分, 因为马钱子碱或荷包牡丹碱都可导致它们相应成分的消除(n=4)。因此, 与 $\nabla_{\text{阴离子}}$ 衰减相并行, PNI 引起了 LI 突触处的再组织, 从而暴露出除了 GlyR 单独介导的 mPSC 之外由 GABA_AR 单独介导以及混合 $\text{GABA}_A\text{R}/\text{GlyR}$ -介导的 mPSC。此突触组织与不成熟 LI-II 神经元中观察到的类似(9)。此突触开关的净效果是它产生了一组具有显著较长的衰减动力学的量子突触事件。

为了检查 PNI-诱导的 GABA_AR -介导的对 mPSC 的贡献, 我们分析了峰电导和 mPSC 的频率。此操作的完成是利用填充了 CsCl 的移液器夹住来自 PNI 和首次用于实验的大鼠的 LI 神经元在 0mV 的 $E_{\text{阴离子}}$ 以防止由于驱动力改变而导致的 mPSC 的有偏检测。在来自 PNI 大鼠的 LI 神经元中记录到的仅 GlyR 的 mPSC 的峰电导明显小于 ($\sim 1/2$) 从首次用于实验的大鼠 LI 神经元记录得到的数据(图 2d)。不过, 在 PNI 条件下增加 GABA_AR -介导的事件部分补偿了仅 GlyR 时电导的降低。GluR 介导的量子事件的峰

电导在来自首次用于实验的大鼠和 PNI 大鼠的 LI 神经元之间无显著差异 (图 2d)。

通过对峰电导、动力学和驱动力改变的综合因素分析, 在来自 PNI 大鼠的 LI 神经元中静息膜电位上 GlyR 单独介导的 mPSC 携带的净电荷大约为首次用于实验的大鼠中的 1/3 (图 2e)。不过, 在有 GABA_AR 贡献的情况下, PNI 大鼠中 mPSC 所携带的净电荷回升至首次用于实验的大鼠中 GlyR 介导的水平。此结果显示, 尽管大小相当, 但是首次用于实验的大鼠 LI 神经元中超极化电荷只是由 GlyR-介导的 mPSC 携带, 而在 PNI 大鼠 LI 神经元中, 由于 GABA_AR-介导的 mPSC 衰减动力学的延长, 去极化电荷主要是通过 GABA_AR 转移。

据观察在来自 PNI 大鼠的 LI 神经元记录到的仅 GlyR mPSC 的频率 (0.13 ± 0.04 Hz, $n=5$) 显著低于首次用于实验的大鼠 LI 神经元在仅 GlyR 的 mPSC 频率 (0.18 ± 0.04 Hz, $n=6$; $p < 0.05$; 图 2f)。不过, 如同峰电导一样, GABA_AR-介导的 mPSC 的加入补偿了 PNI-导致的频率减小 (0.22 ± 0.10 Hz, $n=4$, 对于所有 GABA_AR 和/或 GlyR-介导的事件组合而言, $p > 0.5$)。相反, 分离自 PNI 大鼠的 LI 神经元中的 GluR 介导的事件频率 (1.51 ± 0.90 Hz, $n=9$) 与分离自首次用于实验的大鼠的 LI 神经元中的 (0.82 ± 0.40 Hz, $n=8$; $p > 0.3$; 图 2f) 相比较无显著变化。

如果去极化 GABA_AR/GlyR-介导的突触后电流在 PNI LI 神经元中产生净兴奋作用, 它们应直接引起动作电位, 并因此导致 Ca^{2+} 内向通量。为了检验这一假设, 我们利用切片中负荷 fura-2-am 的 LI 神经元进行 Ca^{2+} 成像以获得大数据集。对神经元体施用外源 GABA 在 PNI 部位身体同侧的 19% LI 神经元中导致了细胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 浓度的显著增加 ($n=53$; 图 3a, c)。这代表与首次用于实验的大鼠和/或对侧背角中发现的 LI 神经元相比增加了 7 倍, 其中在被检测的 37 个神经元中只观察到 1 个具有针对 GABA 施用而产生的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加 (图 3b, c)。这些反应可以被荷包牡丹碱 ($10 \mu M$; $n=5$) 以及电压敏感钠通道阻断剂河豚毒素 (TTX; $1 \mu M$; $n=31$) 所阻断。然后我们进一步从电生理学上证实了应用的 GABA 和突触引起的阴

离子突触后电位可直接引起动作电位(图 3d、e)。这些结果表明突触后阴离子内向通量可在 PNI 大鼠的片层 I 神经元中引起净兴奋。我们然后通过 SDH 的水平切片进行免疫印迹比较了 KCC2 蛋白质水平。相对于受伤部位的对侧而言,在 PNI 同侧的腰 SDH 中 KCC2 表达水平显著降低(> 2 倍)(图 3f)。在首次用于实验的大鼠中,两侧之间无显著的差异(n=3)。

如果 KCC2 转运蛋白表达的减少导致神经元 $[Cl^-]_i$ 的增加并,又导致了 GABA_AR-介导的去极化作用,那么在来自首次用于实验的大鼠 LI 神经元中 KCC2 转运蛋白的药理学阻断应具有相同的效果。为了检测此可能性,我们对首次用于实验的脊髓切片水浴应用选择性的 KCC2 阻断剂 DIOA(30 μ M)。如在 PNI 情况中,DIOA 存在时应用 GABA 引起 30% 被检测的首次用于实验的 LI 神经元中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加(图 3b、c)。为了检查凭经验确定的 GABA_AR/GlyR-介导的突触后控制的变化是否足以导致 PNI 之后中枢敏化,我们利用就生物物理学而言逼真的神经元模型模拟体内情况(图 5)。模拟证实 PNI 之后,LI 神经元敏化的程度随它们的 $E_{阴离子}$ 而变,从轻微的去抑制至净超兴奋变化。

为了检测此超兴奋性(敏化)是否将导致引起伤害感受消退反射的刺激阈值的降低,我们通过鞘内导管将 DIOA(15-30 μ g)直接施用于完整大鼠中脊椎的腰膨大处。DIOA 导致了针对对机械和热刺激物的伤害感受阈值快速且可逆的降低(图 4a-b)。通过脊髓施用针对 KCC2 mRNA 的反义寡脱氧核苷酸选择性击倒(knock-down)所述转运蛋白,也得到了伤害感受阈值的相似降低(图 4e),更进一步证实了 KCC2 下调的功能性影响。

如图 7 中所示,我们证实了在取自患外周神经病大鼠的片层 I 神经细胞中,跨膜阴离子逆转电位($E_{阴离子}$)的去极化程度显著高于取自首次用于实验的大鼠的片层 I 神经元中的 $E_{阴离子}$ 。记录自首次用于实验的大鼠片层 I 神经元的阴离子(碳酸氢盐和氯化物)逆转电位($E_{阴离子}$)显著小于从已接受外周神经损伤(PNI)的大鼠的片层 I 神经元中记录的 $E_{阴离子}$ 。水浴应用(bath application) BDNF (50 ng/ml;N/BDNF)和 NGF (50 ng/ml;N/NGF)二者都导致记录自首次用于实验的大鼠片层 I 神经元的 $E_{阴离子}$ 变得显著去极

化,标志着跨膜阴离子梯度的衰减。或者,对取自 PNI 大鼠的片层 I 神经元水浴应用 TrkB 拮抗剂 K-252a (200 nM;P/K252a)导致 $E_{\text{阴离子}}$ 超极化至与取自首次用于实验的大鼠片层 I 神经元中观察到的相似的水平。所有的 $E_{\text{阴离子}}$ 值都利用短杆菌肽-D 穿孔膜片电压钳记录得以证实。如上文所提及的,此去极化 $E_{\text{阴离子}}$ 是由于在取自神经病大鼠的片层 I 神经元中 KCC2 协同转运蛋白表达下降所导致的。在取自首次用于实验的大鼠的片层 I 神经元中,本文进一步表明可通过灌注生长因子 NGF 和 BDNF 显著去极化 $E_{\text{阴离子}}$,表明这些生长因子可降低表面背角中 KCC2 蛋白质的功能和/或表达。或者,本文表明在取自神经病大鼠的片层 I 神经元中用蛋白激酶抑制剂 K-252a 阻断 BDNF 受体 TrkB 逆转了 $E_{\text{阴离子}}$ 的去极化,使该值回复到与首次用于实验的大鼠片层 I 神经元中观察到的相似的水平。此外,如在图 8 中所示的,鞘内施用受体酪氨酸激酶抑制剂 K-252a (6 nM) (而非只注射载体)在已接受外周神经损伤的大鼠中导致触觉伤害感受消退的阈值提高。因此 K-252a 可在外周神经损伤后外周神经再发育之后逆转痛觉过敏/异常性疼痛。根据抓握、直立和放置反射以及行为观察进行评估, K-252a 不产生任何运动干扰或镇静作用。预计,此抑制剂通过阻断磷酸化再次激活了取自神经病大鼠的片层 I 神经元中 KCC2 协同转运蛋白,所述磷酸化可能是在转运蛋白或其转录因子(或其它调节底物)上蛋白质酪氨酸激酶位点处。

此处的结果表明, PNI 后导致疼痛的神经病变可通过 KCC2 exporter 下调和脊髓 LI 神经元中 $\nabla_{\text{阴离子}}$ 的所得变化来解释。它们还证实了在成年动物中所述 $\nabla_{\text{阴离子}}$ 的改变可发生于损伤部位跨突触的神经元中。早先为了鉴定外围神经病超兴奋特性潜在底物所作的努力都集中于测量 GABA 能中间神经元的数目、GABA 含量或 GABA_AR 表达的改变。结果是矛盾的(3-6)。本文所介绍的发现提供了了解所述去抑制机制的新途径。通过 $\nabla_{\text{阴离子}}$ 的变化, GABA_AR/GlyR-介导的突触后作用的转变提供了中枢敏化(central sensitization)的机械基础,包括神经元反应性和兴奋输入的增加。

脊髓的重要特征是它利用了两条非常不同的 GABA 能抑制机制: 感觉纤维中枢末端的 GABA 能控制涉及去极化机制(39),与 GABA 能抑制作

用涉及超极化的背角细胞相反。因此，此处所报道的 KCC2 表达的变化只影响了控制感觉输入的两种抑制机制中一种的 GABA 活动的极性。这一点通过初级传入缺乏 KCC2 表达这一事实得以证实(图 4f、g; 也参阅图 6)。

GABA/甘氨酸介导的去极化作用也可用作门控机制使得可通过电压敏感的 Ca^{2+} 通道 (VSCC) 和 NMDA 受体/通道激活(10)。经由这些通道的 Ca^{2+} 内向通量被认为对于脊髓神经元的敏化是重要的(11)。确实，已证实 在神经性疼痛的治疗中通过诸如加巴喷丁和氯胺酮等药物阻断人体内的这些 Ca^{2+} 通道非常有效(12-14)。不过，使用 Ca^{2+} 通道阻断剂，尤其是氯胺酮和其它 NMDA 拮抗剂，是与许多不希望的副作用相关的(14,15)。

实施例 3-KCC2 的体外 TrkB-依赖性调节

制备来自首次用于实验的大鼠或 PNI 大鼠背角的旁矢状面切片 (250-300 μm)。用加氧的林格溶液持续灌注切片并在进行进一步处理前将切片平衡至少 1.5 小时。除非另外说明，用 10 μM CNQX-一种非 NMDA 离子型谷氨酸受体的阻断剂进一步灌注切片。用短杆菌肽-D 穿孔膜片或全细胞电压膜片钳记录仪对肉眼可识别的片层 I 神经元进行记录。在两种情况下，用移液器吸取含甲基硫酸钾或葡糖酸铯的细胞内溶液作为主要的离子类型。通过对目的神经元体连续短暂 (5-10ms) 应用外源 GABA 来检测 $E_{\text{阴离子}}$ ；通过操纵神经元的膜电位，将 GABA 既不引起内向也不引起外向阴离子电流的点作为 $E_{\text{阴离子}}$ 。对液体接点电位、移液器偏移量和电阻校正膜电位的所有测量。

如图 12 中所示，脑源神经营养因子(BDNF;50 ng/ml 浴中)介导的 TrkB 活化和神经生长因子(NGF;50 ng/ml 浴中)介导的 TrkA 活化均在首次用于实验的大鼠片层 I 神经元中导致阴离子逆转电位 ($E_{\text{阴离子}}$) 显著的去极化作用。

利用取自外周神经损伤 (PNI) 大鼠的切片，其中 $E_{\text{阴离子}}$ 是慢性去极化的，应用与 TrkB 受体偶联的细胞内途径组分的多种抑制剂，发现这引起了 $E_{\text{阴离子}}$ (碳酸氢盐和氯化物) 显著的超极化，其程度达到了与在首次用

于实验的大鼠切片中观察到的相似的水平（图 13）。导致此效果的活性剂包括，但不局限于，针对 TrkB 的抗体(抗-TrkB-IgG 1 μ g/ml 浴中)；K-252a（TrkA/B 自磷酸化的抑制剂(200 nM 溶液)）；H-89，依赖 cAMP 的激酶(PKA)的膜渗透性抑制剂（15 μ M 浴中）；以及 KN-93（钙调蛋白依赖性激酶 II 和 IV 的膜可渗透性抑制剂(5 μ M 浴中)）。

实施例 4-体内伤害感受阈值的 TrkB-依赖型调节

用于通过鞘内导管局部脊髓递送的所有药物都溶于加有或未加 10% v/v DMSO 的 0.9% NaCl 中。通过在大池产生一个小的开口并将一短的 P10 聚乙烯管插入蛛网膜下空间-从尾部径直 ~8cm 至脊髓的腰膨大(L4-5)，完成鞘内导管插入术。根据通过抓握、直立和放置反射以及其它行为观察所进行的评估，施用的药物都不产生运动干扰或镇静作用。利如前所述(41) 用 Von Frey 试验评估机械刺激的 50% 消退阈值。所有的实验都在完整成年 Sprague-Dawley 大鼠中进行。

利用鞘内导管局部脊髓递送多种活性剂可鉴定导致首次用于实验的大鼠中触觉刺激的伤害感受阈值下降或提高 PNI 大鼠中伤害感受阈值的几种化合物。

局部脊髓递送转导 BDNF（图 14）或人重组 BDNF（10 μ g/天，共 6 天）的腺病毒而不是转导绿色荧光蛋白的腺病毒导致首次用于实验的大鼠中机械刺激的伤害感受阈值显著降低。同样的，鞘内递送人重组 NGF(图 15; 10 μ g/天，共 6 天)至首次用于实验的大鼠导致所述伤害感受阈值非常相似的降低。

另一方面，通过鞘内导管对 PNI 大鼠连续施用针对 TrkB 的抗体(抗-TrkB-IgG 12 μ g/2 小时，共 3 次)实现对机械刺激的伤害感受阈值显著提高（图 16）。局部脊髓递送 PKA 抑制剂 H-89 (380 nmol)也导致伤害感受阈值的提高（图 17）。

在整篇申请书中，引用了多种文献，它们更完整地描述了本发明所属领域的状况。这些文献的公开在此引用作为本公开的参考。

参考文献

- 1.Melzack, R.& Wall, P.D.(1965) *Science* 150:971-979.
- 2.Woolf, C.J.& Salter, M.W.(2000) *Science* 288:1765-1769.
- 3.Kontinen, V.K., 等人(2001) *Anesthesiology* 94:333-339.
- 4.Moore, K.A.等人(2002) *J.Neuroses* 22:6724-6731.
- 5.Somers, D.L.& Clemente,F.R.(2002) *Neurosci Lett* 323:171- 174.
- 6.Polgar, E., 等人 *Soc Neurosci Abstr* 28,655.3.6-11-2002.
- 7.Light, A.R.The initial processing of pain.Karger, Basel (1992).
- 8.Ebihara, S., 等人(1995) *J Physiol* 484 (Pt 1), 77-86.
- 9.Keller, A.F., 等人(2001) *J Neurosci* 21:7871-7880.
- 10.Staley, K.J., 等人(1995) *Science* 269:977-981.
- 11.Coderre, T.J.& Melzack, R.(1992) *J Neurosci* 12:3665-3670.
- 12.Serpell, M.G.(2002) *Pain* 99:557-566.
- 13.Rabben, T., 等人(1999) *J.Pharmacol.Exp.Ther.*289:1060-1066.
- 14.Martin, T.J.& Eisenach, J.C.(2001) *J.Pharmacol.Exp.Ther.*299:811-817.
- 15.Farber, N.B., 等人(2002) *Mol.Psychiatry* 7:726-733.
- 16.Mosconi, T.& Kruger,L.(1996) *Pain* 64:37-57.
- 17.Coderre, T.J.& Van, E., I.(1994) *Pain* 59:345-352.
- 18.Rivera, C.等人(1999) *Nature* 397:251-255.
- 19.Prescott, S.A.& de Koninck, Y.(2002) *J Physiol* 539:817- 836.
- 20.Payne, J.A., 等人(1996) *J.Biol.Chem.*271:16245- 16252.
- 21.Mount, D.B.等人 (1999) *J.Biol.Chem.*274:16355- 16362.
- 22.Kelsch, W.等人 (2001) *J Neurosci* 21:8339-8347.
- 23.Strange, K., 等人(2000) *Am.J.Physiol Cell Physiol* 279:C860-C867.
- 24.Shen, M.R.等人 (2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*98:14714-14719.
- 25.Gulyas, A.I., 等人 (2001) *Eur.J.Neurosci.*13:2205-2217.
- 26.Payne, J.A.(1997) *Am.J.Physiol* 273:C1516-C1525.

- 27.Flatman, P.W., 等人 (1996) *Am.J.Physiol* 271:C255-C263.
- 28.Howard, H.C.等人 (2002) *Nat.Genet.*32:384-392.
- 29.Sung, K.W., 等人 (2000) *J.Neurosci.*20:7531-7538.
- 30.Mainen, Z.F., 等人 (1995) *Neuron* 15:1427-1439.
- 31.Traub, R.J.& Miles, R.*Neuronal Networks of the Hippocampus.*Cambridge, Cambridge, U.K.(1991).
- 32.Narikawa, K., 等人 (2000) *J Neurophysiol* 84:2171- 2174.
- 33.Furue, H., 等人 (1999) *JPhysiol* 521:529-535.
- 34.Ribeiro-da-Silva, A.& Coimbra, A.(1982)*J.Comp Neurol.*209,176-186.
- 35.Ribeiro-da-Silva, A.*The Rat Nervous System.*Paxinos, G.(编者), 47-59 页(Academic Press, Sydney, Australia, 1995).
- 36.Sik, A., 等人 (2000) *Neuroscience* 101,51-65.
- 37.Gulyas, A.I., 等人 (2001) *Eur.J.Neurosci.*13, 2205-22 17.
- 38.Delpire, E.& Mount, D.B.(2002) *Annu.Rev.Physio.*64:803-403.
- 39.Woo, N-S., 等人 (2002) *Hippocampus* 12:258-268.
- 40.Rudomin, P.& Schmidt, R.F.(1999) *Exp Brain Res* 129:1-37.
- 41.Chaplan 等人 , (1994) *J.Neuroscience Methods* 53:55-63.
- 42.Jarolimek 等人(1999) *J.Neuroscience* 19:4695- 704.

<110> 拉瓦勒大学

<120> CNS 氯化物调节及其用途

<130> 85409-29

<150> US 60/470,885

<151> 2003-05-16

<160> 8

<170> PatentIn 版本 3.2

<210> 1

<211> 5907

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3351)

<400> 1

atg ccc aac aac ctg acg gac tgc gag gac ggc gat ggg gga gcc aac 48
Met Pro Asn Asn Leu Thr Asp Cys Glu Asp Gly Asp Gly Gly Ala Asn
1 5 10 15

ccg ggt gat ggc aac ccc aag gaa agc agt ccc ttc atc aac agc acc 96
Pro Gly Asp Gly Asn Pro Lys Glu Ser Ser Pro Phe Ile Asn Ser Thr
20 25 30

gac aca gag aag gga aag gag tat gat ggc aag aac atg gcc ttg ttt 144
Asp Thr Glu Lys Gly Lys Glu Tyr Asp Gly Lys Asn Met Ala Leu Phe
35 40 45

gag gag gag atg gac acc agc cct atg gtg tcc tcc ttg ctc agt ggc 192
Glu Glu Glu Met Asp Thr Ser Pro Met Val Ser Ser Leu Leu Ser Gly
50 55 60

ctg gcc aac tac acc aac ctg ccc cag gga agt agg gag cat gaa gag 240
Leu Ala Asn Tyr Thr Asn Leu Pro Gln Gly Ser Arg Glu His Glu Glu
65 70 75 80

gca gaa aac aat gag ggt gga aaa aag aag ccg gtg cag gcc cca cgc 288
Ala Glu Asn Asn Glu Gly Gly Lys Lys Lys Pro Val Gln Ala Pro Arg

85	90	95	
atg ggc acc ttc atg ggc gtg tac ctg ccg tgc ctg cag aac atc ttt			336
Met Gly Thr Phe Met Gly Val Tyr Leu Pro Cys Leu Gln Asn Ile Phe			
100	105	110	
ggc gtc atc ctc ttc ctg cgg ctc acc tgg gtg gtg ggc att gca ggc			384
Gly Val Ile Leu Phe Leu Arg Leu Thr Trp Val Val Gly Ile Ala Gly			
115	120	125	
atc atg gag tcc ttc tgc atg gtg ttc atc tgc tgc tcc tgt acg atg			432
Ile Met Glu Ser Phe Cys Met Val Phe Ile Cys Cys Ser Cys Thr Met			
130	135	140	
ctc acg gcc atc tcc atg agt gca att gca acg aat ggt gtt gtg cct			480
Leu Thr Ala Ile Ser Met Ser Ala Ile Ala Thr Asn Gly Val Val Pro			
145	150	155	160
gct ggt ggc tcc tac tac atg att tcc agg tct ctg ggc cca gag ttt			528
Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Met Ile Ser Arg Ser Leu Gly Pro Glu Phe			
165	170	175	
ggg ggt gcc gtg ggc ctc tgc ttc tac ctg ggc act acc ttt gca gga			576
Gly Gly Ala Val Gly Leu Cys Phe Tyr Leu Gly Thr Thr Phe Ala Gly			
180	185	190	
gcc atg tac atc ctg ggc acc atc gaa atc ctg ctg gct tac ctc ttc			624
Ala Met Tyr Ile Leu Gly Thr Ile Glu Ile Leu Leu Ala Tyr Leu Phe			
195	200	205	
cca gcc atg gcc atc ttc aag gca gaa gat gcc agt ggg gag gca gca			672
Pro Ala Met Ala Ile Phe Lys Ala Glu Asp Ala Ser Gly Glu Ala Ala			
210	215	220	
gcc atg ctg aac aac atg cgt gtt tac ggc acc tgt gtg ctc acc tgc			720
Ala Met Leu Asn Asn Met Arg Val Tyr Gly Thr Cys Val Leu Thr Cys			
225	230	235	240
atg gcc act gtg gtg ttt gtg ggt gtc aag tat gtc aac aag ttt gcc			768
Met Ala Thr Val Val Phe Val Gly Val Lys Tyr Val Asn Lys Phe Ala			
245	250	255	
ctt gtc ttc ctg ggt tgt gtc atc ctc tcc atc ctg gcc atc tat gct			816
Leu Val Phe Leu Gly Cys Val Ile Leu Ser Ile Leu Ala Ile Tyr Ala			
260	265	270	
ggg gtc atc aag tct gcc ttc gac cca ccc aac ttc ccg atc tgc ctc			864
Gly Val Ile Lys Ser Ala Phe Asp Pro Pro Asn Phe Pro Ile Cys Leu			
275	280	285	

ctg ggt aac cgc acg ctg tct cgc cat ggc ttt gat gtc tgt gcc aag Leu Gly Asn Arg Thr Leu Ser Arg His Gly Phe Asp Val Cys Ala Lys 290 295 300	912
ctg gct tgg gaa gga aat gag acg gtg acc aca cgg cta tgg ggc ctt Leu Ala Trp Glu Gly Asn Glu Thr Val Thr Thr Arg Leu Trp Gly Leu 305 310 315 320	960
ttc tgc tcc tct cgc ttc ctc aac gcc acc tgt gat gaa tac ttc acc Phe Cys Ser Ser Arg Phe Leu Asn Ala Thr Cys Asp Glu Tyr Phe Thr 325 330 335	1008
cga aac aat gtc aca gag atc cag ggc atc cct ggt gct gcc agt ggc Arg Asn Asn Val Thr Glu Ile Gln Gly Ile Pro Gly Ala Ala Ser Gly 340 345 350	1056
ctc atc aaa gag aac ctc tgg agc tcc tac ctg acc aag ggc gtg att Leu Ile Lys Glu Asn Leu Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Lys Gly Val Ile 355 360 365	1104
gtg gag agg agt ggg atg acc tcg gtg ggc ctg gcc gat ggc act cct Val Glu Arg Ser Gly Met Thr Ser Val Gly Leu Ala Asp Gly Thr Pro 370 375 380	1152
atc gac atg gac cac cct tat gtc ttc agt gat atg acc tcc tac ttc Ile Asp Met Asp His Pro Tyr Val Phe Ser Asp Met Thr Ser Tyr Phe 385 390 395 400	1200
acc ctg ctg gtt ggc atc tac ttc ccc tca gtc aca ggg atc atg gct Thr Leu Leu Val Gly Ile Tyr Phe Pro Ser Val Thr Gly Ile Met Ala 405 410 415	1248
ggt tct aac cgc tct ggg gac ctg agg gat gcc cag aag tca atc ccc Gly Ser Asn Arg Ser Gly Asp Leu Arg Asp Ala Gln Lys Ser Ile Pro 420 425 430	1296
act ggc acc atc ctg gcc atc gcc acc acc tct gct gtc tac atc agc Thr Gly Thr Ile Leu Ala Ile Ala Thr Thr Ser Ala Val Tyr Ile Ser 435 440 445	1344
tcc gtt gtt ctg ttt ggg gcc tgc att gag ggg gtc gtc ctg cgg gac Ser Val Val Leu Phe Gly Ala Cys Ile Glu Gly Val Val Leu Arg Asp 450 455 460	1392
aag ttt ggc gaa gct gtg aat ggc aac ctc gtg gtg ggc act ctg gcc Lys Phe Gly Glu Ala Val Asn Gly Asn Leu Val Val Gly Thr Leu Ala 465 470 475 480	1440

tgg cca tct cca tgg gta att gtc atc gga tcc ttc ttc tcc acc tgt Trp Pro Ser Pro Trp Val Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Ser Thr Cys 485 490 495	1488
ggg gct ggg ctg cag agc ctc acg ggg gcc cca cgc ctg ctg cag gcc Gly Ala Gly Leu Gln Ser Leu Thr Gly Ala Pro Arg Leu Leu Gln Ala 500 505 510	1536
atc tcg agg gat ggc att gtg ccc ttc ctg cag gtc ttt ggc cat ggc Ile Ser Arg Asp Gly Ile Val Pro Phe Leu Gln Val Phe Gly His Gly 515 520 525	1584
aag gcc aat gga gag ccg acc tgg gcc ctg ctc ctg act gcc tgc atc Lys Ala Asn Gly Glu Pro Thr Trp Ala Leu Leu Leu Thr Ala Cys Ile 530 535 540	1632
tgc gag att ggc atc ctc att gca tcc ctc gac gag gtg gcc ccc atc Cys Glu Ile Gly Ile Leu Ile Ala Ser Leu Asp Glu Val Ala Pro Ile 545 550 555 560	1680
ctc tct atg ttc ttc ctg atg tgc tac atg ttt gtg aat ctg gcc tgt Leu Ser Met Phe Phe Leu Met Cys Tyr Met Phe Val Asn Leu Ala Cys 565 570 575	1728
gca gtg cag acg ctg ctg agg aca ccc aac tgg agg cca cgc ttt cga Ala Val Gln Thr Leu Leu Arg Thr Pro Asn Trp Arg Pro Arg Phe Arg 580 585 590	1776
tat tac cac tgg acc ctc tcc ttc ctg ggc atg agc ctc tgc ctg gcc Tyr Tyr His Trp Thr Leu Ser Phe Leu Gly Met Ser Leu Cys Leu Ala 595 600 605	1824
ctc atg ttc atc tgc tcc tgg tat tat gca ctg gta gcc atg ctc att Leu Met Phe Ile Cys Ser Trp Tyr Tyr Ala Leu Val Ala Met Leu Ile 610 615 620	1872
gct gga ctc atc tac aag tac att gag tac cgt ggg gca gag aag gag Ala Gly Leu Ile Tyr Lys Tyr Ile Glu Tyr Arg Gly Ala Glu Lys Glu 625 630 635 640	1920
tgg ggc gat ggg ata cga ggt ctg tct ctc agt gcg gct cgc tat gcc Trp Gly Asp Gly Ile Arg Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ala Arg Tyr Ala 645 650 655	1968
ctc tta cgc ctg gag gaa ggg ccc cca cac acc aag aac tgg agg cca Leu Leu Arg Leu Glu Glu Gly Pro Pro His Thr Lys Asn Trp Arg Pro 660 665 670	2016
cag ctg ctg gtg ctg gtg cgt gtg gac caa gac cag aat gtg gtg cac	2064

Gln Leu Leu Val Leu Val Arg Val Asp Gln Asp Gln Asn Val Val His 675 680 685	
ccc cag ctg ctc tca ctg acc tcc cag ctg aag gca ggg aag ggc ctg Pro Gln Leu Leu Ser Leu Thr Ser Gln Leu Lys Ala Gly Lys Gly Leu 690 695 700	2112
acc atc gtg ggc tct gtc ctt gag ggc acc ttt ctg gaa aat cat cca Thr Ile Val Gly Ser Val Leu Glu Gly Thr Phe Leu Glu Asn His Pro 705 710 715 720	2160
cag gcc cag cgg gca gaa gag tct atc agg cgc ctg atg gag gca gag Gln Ala Gln Arg Ala Glu Glu Ser Ile Arg Arg Leu Met Glu Ala Glu 725 730 735	2208
aag gtg aag ggc ttc tgc cag gtg gtg atc tcc tcc aac ttg cgt gat Lys Val Lys Gly Phe Cys Gln Val Val Ile Ser Ser Asn Leu Arg Asp 740 745 750	2256
ggc gtg tcc cat ctg atc cag tcc ggg ggc ctc ggg ggg ctg cag cac Gly Val Ser His Leu Ile Gln Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gln His 755 760 765	2304
aac act gtg ctt gtt ggc tgg ccc cgc aac tgg cgc cag aag gaa gat Asn Thr Val Leu Val Gly Trp Pro Arg Asn Trp Arg Gln Lys Glu Asp 770 775 780	2352
cat cag acg tgg agg aac ttc att gag ctg gtc cgg gaa acc aca gct His Gln Thr Trp Arg Asn Phe Ile Glu Leu Val Arg Glu Thr Thr Ala 785 790 795 800	2400
ggc cac tta gcc ctg ctg gtc acc aag aac gtt tcc atg ttt cct ggg Gly His Leu Ala Leu Leu Val Thr Lys Asn Val Ser Met Phe Pro Gly 805 810 815	2448
aac cct gag cgc ttc tct gag ggc agc atc gac gtt tgg tgg att gtg Asn Pro Glu Arg Phe Ser Glu Gly Ser Ile Asp Val Trp Trp Ile Val 820 825 830	2496
cac gat gga ggc atg ctc atg ctg ctg ccc ttc ctg ctg cgg cac cac His Asp Gly Gly Met Leu Met Leu Leu Pro Phe Leu Leu Arg His His 835 840 845	2544
aag gtc tgg cgg aag tgc aag atg cgt atc ttc act gtg gcc cag atg Lys Val Trp Arg Lys Cys Lys Met Arg Ile Phe Thr Val Ala Gln Met 850 855 860	2592
gat gac aat agc atc cag atg aag aag gat ctg acc aca ttt ctg tat Asp Asp Asn Ser Ile Gln Met Lys Lys Asp Leu Thr Thr Phe Leu Tyr	2640

865	870	875	880	
cat tta cgc atc act gcg gag gtc gag gtg gtg gag atg cat gag agc				2688
His Leu Arg Ile Thr Ala Glu Val Glu Val Val Glu Met His Glu Ser				
	885	890	895	
gac atc tca gct tac acc tat gag aag acg ttg gtg atg gag cag cgt				2736
Asp Ile Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Lys Thr Leu Val Met Glu Gln Arg				
	900	905	910	
tcc cag atc ctc aaa cag atg cat tta acc aag aat gag cgg gag cgg				2784
Ser Gln Ile Leu Lys Gln Met His Leu Thr Lys Asn Glu Arg Glu Arg				
	915	920	925	
gag atc cag agt atc aca gat gag tca cga ggc tca atc cgg aga aag				2832
Glu Ile Gln Ser Ile Thr Asp Glu Ser Arg Gly Ser Ile Arg Arg Lys				
	930	935	940	
aat cca gcc aac acg cgg ctc cgc ctg aac gtc cca gaa gag acg gct				2880
Asn Pro Ala Asn Thr Arg Leu Arg Leu Asn Val Pro Glu Glu Thr Ala				
	945	950	955	960
ggt gac agt gaa gag aag cca gag gag gag gtg cag ctg atc cac gat				2928
Gly Asp Ser Glu Glu Lys Pro Glu Glu Glu Val Gln Leu Ile His Asp				
	965	970	975	
cag agt gct ccc agc tgc ccc agc agc tcc ccg tcc cca ggg gag gag				2976
Gln Ser Ala Pro Ser Cys Pro Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gly Glu Glu				
	980	985	990	
cct gag ggg gaa ggg gag aca gat ccg gag aag gtg cat ctc acc tgg				3024
Pro Glu Gly Glu Gly Glu Thr Asp Pro Glu Lys Val His Leu Thr Trp				
	995	1000	1005	
acc aag gac aag tcg gtg gca gag aag aat aag ggc ccc agt cct				3069
Thr Lys Asp Lys Ser Val Ala Glu Lys Asn Lys Gly Pro Ser Pro				
	1010	1015	1020	
gtc tcc tct gag ggc atc aag gac ttc ttc agc atg aag ccg gag				3114
Val Ser Ser Glu Gly Ile Lys Asp Phe Phe Ser Met Lys Pro Glu				
	1025	1030	1035	
tgg gag aac ttg aac cag tcc aac gtg cgg cgc atg cac acg gcc				3159
Trp Glu Asn Leu Asn Gln Ser Asn Val Arg Arg Met His Thr Ala				
	1040	1045	1050	
gtg cgg ctg aac gag gtc atc gtg aag aaa tcc cgg gac gcc aag				3204
Val Arg Leu Asn Glu Val Ile Val Lys Lys Ser Arg Asp Ala Lys				
	1055	1060	1065	

ctt gtt ttg ctc aac atg cct ggg cct ccc cgc aac cgc aat ggt	3249
Leu Val Leu Leu Asn Met Pro Gly Pro Pro Arg Asn Arg Asn Gly	
1070 1075 1080	
gat gaa aac tac atg gag ttt ctc gag gtc ctc aca gag cac ctg	3294
Asp Glu Asn Tyr Met Glu Phe Leu Glu Val Leu Thr Glu His Leu	
1085 1090 1095	
gac cgg gtg atg ctg gtc cgc ggt ggt ggc cga gag gtc atc acc	3339
Asp Arg Val Met Leu Val Arg Gly Gly Gly Arg Glu Val Ile Thr	
1100 1105 1110	
atc tac tcc tga gaaccaggtc ctgccaccg ggcccagcgc cgcccggccc	3391
Ile Tyr Ser	
1115	
gcggctccgg agccctcgcc gcgcccccg ccgctgtcac cgtttacata cagaccctgt	3451
gcccgtgtcc tggcccctta ccccgtgcc tgaagcccgg aggccacgcc tgttggggct	3511
gattcggaga gggcgccccg ccgcgagag accagagctc ctcaagtcca gtttgcccc	3571
tgggtcttcg ctgccctttt tctaagcccg gcctcgtctc gccggaggag acgctgcaat	3631
aaaggttggg agaaggcgcg gaaaggagag gagctggggc cttggggacc cccaggtagt	3691
ccatcgggcc cattctccc ctcccactc ccgcccggt cctcgtctg cgctcctccg	3751
gcgctgtcc ctggctcccg gcggcccgga gggccgcccgt ggccaagga cgcgcttgc	3811
gtctccgccg ccccttctcg ccgagccgtg gggcgccggc ggccgagcct atacatagt	3871
tacaggagac atcgcgtgta ttttiaacgt ccccatattt atgtgactag aagcgcaaca	3931
gacttctgc catagtgcgag ctctcccgt gggggcactg cggggaggcg aggcctcggg	3991
aagctgaatt ttccttgacg tccaagagtt tgagagcgaa agtgctttag gccaggcgg	4051
gggtcgtggc ctggttcct cgacacctc gtctgtctc cgctcttcg ccctttccgc	4111
gcgcccttgg ctcccaccc tcctctccag tccttttccg agatgagtg agacaagggt	4171
ccaacttttc ctggattcgc ctcccagcg acgtgagctt ccaactgcggc tgcagagacg	4231
cgagcaacct ctctcatcg gctcttatgc aagttggggc caggataggg gaggggtgct	4291
cctcaagagg aagaaaccga gaggcccgcg ccccaccgag gaagccccgc cccggtgcct	4351

tcgctgggga gcagcgtct ctcctcagtc ggcttgtcgc ctgctccccg tateccatgg	4411
ctcctcgcca aagactgaaa ttgtggagct ggagggcgcc cctccccgg agtttctcc	4471
ctgggacaag tgaggagga gggggccgat tctggttag gggccggacc cactgagagg	4531
ccccagagcc gcccgtgatg ttctcccc gtccccatct ggcagctcct gtctcgctg	4591
agggaccag cgccttctc cgtgctctgg ggccggcct cgtgcttag cagcggcctc	4651
tagctccgtc tcccgggac ctgggcctga gggaggctg gagtcagcac gcgcttctg	4711
cttagcgct gtctgctctc ctctaactag gaccagggc ctttgcttc cccagctcat	4771
ccttgccct tccgctccac cagcctggtc tgaggcgtgc tctgtcctta gagaaggcgc	4831
ggtggccggg ttcccttccc ctagggcaca ttactaaggg ggtcaggcac tgcattctcg	4891
ttccagcacc atctgggact ggttacagta cctccagccc cagggcctg acctgcgcac	4951
ctagcttgac atctcagca cctcccagag ctggcgccac tgagtaatcc ggacctcacc	5011
acctctttc cttgagccc aaggcagagc tagagctgga gctggcgcca cccagacagc	5071
gtcaggtgtg gctgggtag gtttgagggt ctgccagtta cgccaagtcc cctctgagat	5131
tcgatcagg gactggatag attctttcag gtactcaatc aggaagctgg aggtgttaga	5191
caccagcccc ctgcatcctt cagtagacct ccctctgaac accacagcca ggtcctgct	5251
tctgggggcc tgaatattcc agagctgatg tgatgggctg tgcagaaggg ggctgtatca	5311
acatcaatta gggaacaaa gttgcactat ctgggccag attgtctggt tggcaagagc	5371
aaagttccg ttgatgaaac agacatccca caacaaaaac ccaagtttc tgtgctacat	5431
gtgcaatatt tgttatgaat gttatcaca gtcattcacc aagttatctt tataatcact	5491
gtagttagat gttcatgct cattcaagtg acttttattc tgagtgcaat atttcaatag	5551
ccttgtagtg ataactagtg ttgctttgt ttagatgac tatgtgcagg gcaatgcaat	5611
gaagttgaaa ccccttgga ataggagagg ttgcaacca aatcaagagt atttattact	5671
attactgcta ttattattag gcctgccttt aattttcagt gtaagtgttc agtatccgc	5731
atcctgcctc agtattgatc ttgtgttctt tgtgccaata tgaaaaggag agggttggtt	5791
cttccttta ttgttgaatg ctcccattta atgctttatg gcttttactg tattactttt	5851

ttagactccc gtctgcacaa aatgcaataa aaataatttt attataaaaa aaaaaa 5907

<210> 2
 <211> 1116
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Pro Asn Asn Leu Thr Asp Cys Glu Asp Gly Asp Gly Gly Ala Asn
 1 5 10 15

Pro Gly Asp Gly Asn Pro Lys Glu Ser Ser Pro Phe Ile Asn Ser Thr
 20 25 30

Asp Thr Glu Lys Gly Lys Glu Tyr Asp Gly Lys Asn Met Ala Leu Phe
 35 40 45

Glu Glu Glu Met Asp Thr Ser Pro Met Val Ser Ser Leu Leu Ser Gly
 50 55 60

Leu Ala Asn Tyr Thr Asn Leu Pro Gln Gly Ser Arg Glu His Glu Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asn Asn Glu Gly Gly Lys Lys Lys Pro Val Gln Ala Pro Arg
 85 90 95

Met Gly Thr Phe Met Gly Val Tyr Leu Pro Cys Leu Gln Asn Ile Phe
 100 105 110

Gly Val Ile Leu Phe Leu Arg Leu Thr Trp Val Val Gly Ile Ala Gly
 115 120 125

Ile Met Glu Ser Phe Cys Met Val Phe Ile Cys Cys Ser Cys Thr Met
 130 135 140

Leu Thr Ala Ile Ser Met Ser Ala Ile Ala Thr Asn Gly Val Val Pro
 145 150 155 160

Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Met Ile Ser Arg Ser Leu Gly Pro Glu Phe
 165 170 175

Gly Gly Ala Val Gly Leu Cys Phe Tyr Leu Gly Thr Thr Phe Ala Gly
 180 185 190

Ala Met Tyr Ile Leu Gly Thr Ile Glu Ile Leu Leu Ala Tyr Leu Phe
 195 200 205

Pro Ala Met Ala Ile Phe Lys Ala Glu Asp Ala Ser Gly Glu Ala Ala
 210 215 220

Ala Met Leu Asn Asn Met Arg Val Tyr Gly Thr Cys Val Leu Thr Cys
 225 230 235 240

Met Ala Thr Val Val Phe Val Gly Val Lys Tyr Val Asn Lys Phe Ala
 245 250 255

Leu Val Phe Leu Gly Cys Val Ile Leu Ser Ile Leu Ala Ile Tyr Ala
 260 265 270

Gly Val Ile Lys Ser Ala Phe Asp Pro Pro Asn Phe Pro Ile Cys Leu
 275 280 285

Leu Gly Asn Arg Thr Leu Ser Arg His Gly Phe Asp Val Cys Ala Lys
 290 295 300

Leu Ala Trp Glu Gly Asn Glu Thr Val Thr Thr Arg Leu Trp Gly Leu
 305 310 315 320

Phe Cys Ser Ser Arg Phe Leu Asn Ala Thr Cys Asp Glu Tyr Phe Thr
 325 330 335

Arg Asn Asn Val Thr Glu Ile Gln Gly Ile Pro Gly Ala Ala Ser Gly
 340 345 350

Leu Ile Lys Glu Asn Leu Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Lys Gly Val Ile
 355 360 365

Val Glu Arg Ser Gly Met Thr Ser Val Gly Leu Ala Asp Gly Thr Pro
 370 375 380

Ile Asp Met Asp His Pro Tyr Val Phe Ser Asp Met Thr Ser Tyr Phe
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Val Gly Ile Tyr Phe Pro Ser Val Thr Gly Ile Met Ala
 405 410 415

Gly Ser Asn Arg Ser Gly Asp Leu Arg Asp Ala Gln Lys Ser Ile Pro
 420 425 430

Thr Gly Thr Ile Leu Ala Ile Ala Thr Thr Ser Ala Val Tyr Ile Ser
 435 440 445

Ser Val Val Leu Phe Gly Ala Cys Ile Glu Gly Val Val Leu Arg Asp
 450 455 460

Lys Phe Gly Glu Ala Val Asn Gly Asn Leu Val Val Gly Thr Leu Ala
 465 470 475 480

Trp Pro Ser Pro Trp Val Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Ser Thr Cys
 485 490 495

Gly Ala Gly Leu Gln Ser Leu Thr Gly Ala Pro Arg Leu Leu Gln Ala
 500 505 510

Ile Ser Arg Asp Gly Ile Val Pro Phe Leu Gln Val Phe Gly His Gly
 515 520 525

Lys Ala Asn Gly Glu Pro Thr Trp Ala Leu Leu Leu Thr Ala Cys Ile
 530 535 540

att tgc tgc tcc tgt acg atg ctc aca gcc att tcc atg agt gca atc Ile Cys Cys Ser Cys Thr Met Leu Thr Ala Ile Ser Met Ser Ala Ile 140 145 150	544
gca acc aat ggt gtt gtg cct gct ggt ggc tcg tac tac atg att tcc Ala Thr Asn Gly Val Val Pro Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Met Ile Ser 155 160 165	592
agg tct ctg ggc ccg gag ttt ggg ggc gcc gtg ggc ctc tgc ttc tac Arg Ser Leu Gly Pro Glu Phe Gly Gly Ala Val Gly Leu Cys Phe Tyr 170 175 180 185	640
ctg ggc acc acc ttt gct ggg gct atg tac atc ctt ggc acg atc gag Leu Gly Thr Thr Phe Ala Gly Ala Met Tyr Ile Leu Gly Thr Ile Glu 190 195 200	688
atc ctg ctg gct tat ctc ttc cca gct atg gcc atc ttc aag gca gaa Ile Leu Leu Ala Tyr Leu Phe Pro Ala Met Ala Ile Phe Lys Ala Glu 205 210 215	736
gat gcc agt ggg gag gcg gcc gcc atg ctg aac aac atg cgg gtg tat Asp Ala Ser Gly Glu Ala Ala Ala Met Leu Asn Asn Met Arg Val Tyr 220 225 230	784
ggc acc tgt gtg ctc acc tgc atg gcc acc gtt gtc ttt gtg ggt gtc Gly Thr Cys Val Leu Thr Cys Met Ala Thr Val Val Phe Val Gly Val 235 240 245	832
aag tac gtc aac aag ttt gcc ttg gtc ttc ctg ggt tgc gtc atc ctg Lys Tyr Val Asn Lys Phe Ala Leu Val Phe Leu Gly Cys Val Ile Leu 250 255 260 265	880
tcc atc ctg gcc atc tat gca ggg gtc atc aag tct gcc ttc gac cca Ser Ile Leu Ala Ile Tyr Ala Gly Val Ile Lys Ser Ala Phe Asp Pro 270 275 280	928
ccc aat ttc ccg atc tgc ctc ctg ggg aac cgc acg ctg tct cgc cat Pro Asn Phe Pro Ile Cys Leu Leu Gly Asn Arg Thr Leu Ser Arg His 285 290 295	976
ggc ttt gat gtc tgt gcc aag ctg gct tgg gaa gga aat gag aca gtg Gly Phe Asp Val Cys Ala Lys Leu Ala Trp Glu Gly Asn Glu Thr Val 300 305 310	1024
acc aca cgg ctc tgg ggc ctt ttc tgc tcc tcc cgc ctc ctc aat gcc Thr Thr Arg Leu Trp Gly Leu Phe Cys Ser Ser Arg Leu Leu Asn Ala 315 320 325	1072

Leu Gln Val Phe Gly His Gly Lys Ala Asn Gly Glu Pro Thr Trp Ala	
525 530 535	
ctg ctg ctg act gcc tgc atc tgt gag atc ggc atc ctc ata gcc tcc	1744
Leu Leu Leu Thr Ala Cys Ile Cys Glu Ile Gly Ile Leu Ile Ala Ser	
540 545 550	
ctg gat gag gtc gcc cct ata ctt tcc atg ttc ttc cta atg tgt tac	1792
Leu Asp Glu Val Ala Pro Ile Leu Ser Met Phe Phe Leu Met Cys Tyr	
555 560 565	
atg ttt gtg aac ttg gct tgt gcg gtg cag acg ctg ctg agg aca ccc	1840
Met Phe Val Asn Leu Ala Cys Ala Val Gln Thr Leu Leu Arg Thr Pro	
570 575 580 585	
aac tgg agg cca cga ttt cgc tat tac cac tgg act ctc tcc ttc ctg	1888
Asn Trp Arg Pro Arg Phe Arg Tyr Tyr His Trp Thr Leu Ser Phe Leu	
590 595 600	
ggc atg agc ctc tgc ctg gcc ctc atg ttc att tgc tcc tgg tac tac	1936
Gly Met Ser Leu Cys Leu Ala Leu Met Phe Ile Cys Ser Trp Tyr Tyr	
605 610 615	
gca ctg gtg gcc atg ctc att gcc gga ctc att tat aag tac atc gag	1984
Ala Leu Val Ala Met Leu Ile Ala Gly Leu Ile Tyr Lys Tyr Ile Glu	
620 625 630	
tac cgg ggg gcg gag aag gag tgg ggg gat gga atc cga ggc ctg tct	2032
Tyr Arg Gly Ala Glu Lys Glu Trp Gly Asp Gly Ile Arg Gly Leu Ser	
635 640 645	
ctc agt gca gca cgc tat gct ctc ttg cgc ctg gag gaa gga cct ccg	2080
Leu Ser Ala Ala Arg Tyr Ala Leu Leu Arg Leu Glu Glu Gly Pro Pro	
650 655 660 665	
cat acg aag aac tgg agg ccc cag ctg ctg gtg ctg gtg cgt gtg gac	2128
His Thr Lys Asn Trp Arg Pro Gln Leu Leu Val Leu Val Arg Val Asp	
670 675 680	
cag gat cag aac gtg gtg cat ccg cag ctg ctc tcc ctg acc tcc cag	2176
Gln Asp Gln Asn Val Val His Pro Gln Leu Leu Ser Leu Thr Ser Gln	
685 690 695	
ctc aag gca ggg aag ggc ctg acc att gtg ggc tcc gtc ctt gag ggc	2224
Leu Lys Ala Gly Lys Gly Leu Thr Ile Val Gly Ser Val Leu Glu Gly	
700 705 710	
acc ttt ctg gac aac cat cca cag gct cag cgg gca gag gag tct atc	2272
Thr Phe Leu Asp Asn His Pro Gln Ala Gln Arg Ala Glu Glu Ser Ile	

715	720	725	
agg cgc ctg atg gag gct gag aag gtg aag ggc ttc tgc cag gta gtg Arg Arg Leu Met Glu Ala Glu Lys Val Lys Gly Phe Cys Gln Val Val 730	735	740	2320 745
atc tcc tcc aac ctg cgt gat ggt gtg tcc cac ctg atc cag tct ggg Ile Ser Ser Asn Leu Arg Asp Gly Val Ser His Leu Ile Gln Ser Gly 750	755	760	2368
ggc ctc ggg gga ttg caa cac aat acc gtg ctg gtg ggc tgg cct cgc Gly Leu Gly Gly Leu Gln His Asn Thr Val Leu Val Gly Trp Pro Arg 765	770	775	2416
aac tgg agg cag aag gag gat cat cag aca tgg agg aac ttc atc gaa Asn Trp Arg Gln Lys Glu Asp His Gln Thr Trp Arg Asn Phe Ile Glu 780	785	790	2464
ctg gtc cgg gaa act aca gcc ggc cac ctc gcc ctg ctg gtc acc aag Leu Val Arg Glu Thr Thr Ala Gly His Leu Ala Leu Leu Val Thr Lys 795	800	805	2512
aat gtt tcc atg ttt ccc ggg aac cct gag cgc ttc tcg gag ggc agc Asn Val Ser Met Phe Pro Gly Asn Pro Glu Arg Phe Ser Glu Gly Ser 810	815	820	2560 825
att gac gtg tgg tgg att gtg cac gac ggg ggc atg ctc atg ctg ctg Ile Asp Val Trp Trp Ile Val His Asp Gly Gly Met Leu Met Leu Leu 830	835	840	2608
ccc ttc ctg ctg cga cac cac aag gtc tgg agg aaa tgc aaa atg cgg Pro Phe Leu Leu Arg His His Lys Val Trp Arg Lys Cys Lys Met Arg 845	850	855	2656
atc ttc acc gtg gcc cag atg gac gat aac agt atc cag atg aag aag Ile Phe Thr Val Ala Gln Met Asp Asp Asn Ser Ile Gln Met Lys Lys 860	865	870	2704
gac ctg acc acg ttt ctg tac cac tta cgc att act gca gag gtg gag Asp Leu Thr Thr Phe Leu Tyr His Leu Arg Ile Thr Ala Glu Val Glu 875	880	885	2752
gtg gtg gag atg cat gag agc gac atc tcg gca tac acc tac gag aag Val Val Glu Met His Glu Ser Asp Ile Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Lys 890	895	900	2800 905
aca tta gta atg gag caa cga tct cag atc ctc aaa cag atg cac ctc Thr Leu Val Met Glu Gln Arg Ser Gln Ile Leu Lys Gln Met His Leu 910	915	920	2848

acc aag aac gag cgg gaa cgg gag atc cag agc atc aca gac gag tct Thr Lys Asn Glu Arg Glu Arg Glu Ile Gln Ser Ile Thr Asp Glu Ser 925 930 935	2896
cgg ggc tcc att cgg agg aag aat cca gcc aac ccc cgg ctc cgc ctc Arg Gly Ser Ile Arg Arg Lys Asn Pro Ala Asn Pro Arg Leu Arg Leu 940 945 950	2944
aat gtt ccc gaa gag aca gcg tgt gac aat gag gag aag cca gag gag Asn Val Pro Glu Glu Thr Ala Cys Asp Asn Glu Glu Lys Pro Glu Glu 955 960 965	2992
gag gtg cag ctg atc cat gac cag agt gct ccc agc tgc cct agc agc Glu Val Gln Leu Ile His Asp Gln Ser Ala Pro Ser Cys Pro Ser Ser 970 975 980 985	3040
tgc cca tct cca ggg gag gag ccc gag ggg gag agg gag aca gac cca Ser Pro Ser Pro Gly Glu Glu Pro Glu Gly Glu Arg Glu Thr Asp Pro 990 995 1000	3088
gag gtg cat ctt acc tgg acc aag gat aag tca gtg gca gag aag Glu Val His Leu Thr Trp Thr Lys Asp Lys Ser Val Ala Glu Lys 1005 1010 1015	3133
aat aaa ggc ccc agt ccc gtc tcc tcc gag ggc atc aag gac ttc Asn Lys Gly Pro Ser Pro Val Ser Ser Glu Gly Ile Lys Asp Phe 1020 1025 1030	3178
ttc agc atg aag ccg gag tgg gaa aac ttg aac cag tcc aat gta Phe Ser Met Lys Pro Glu Trp Glu Asn Leu Asn Gln Ser Asn Val 1035 1040 1045	3223
cgg cgc atg cac aca gct gtg cgg ctg aac gag gtc atc gtg aat Arg Arg Met His Thr Ala Val Arg Leu Asn Glu Val Ile Val Asn 1050 1055 1060	3268
aaa tct cgg gat gcc aag cta gtt ttg ctc aac atg ccc ggg cct Lys Ser Arg Asp Ala Lys Leu Val Leu Leu Asn Met Pro Gly Pro 1065 1070 1075	3313
ccc cgc aac cgc aat ggg gat gaa aac tac atg gaa ttc ttg gag Pro Arg Asn Arg Asn Gly Asp Glu Asn Tyr Met Glu Phe Leu Glu 1080 1085 1090	3358
gtc ctc act gag caa ctg gac cgg gtg atg ctg gtc cgc ggt ggc Val Leu Thr Glu Gln Leu Asp Arg Val Met Leu Val Arg Gly Gly 1095 1100 1105	3403

ggc cga gag gtc atc acc atc tac tcc tga aggccaggac ctgccactcc 3453
 Gly Arg Glu Val Ile Thr Ile Tyr Ser
 1110 1115

 ggccccgagcg cgccccggccc gcggccccca gagccctcgc cgcgcctccc cgccgctgtc 3513

 accgtttaca taagaccag ttgccatgc cctggcccct ttccttcccg ctgctgcag 3573

 ccctgaggcc ttgccgtcg gggctgacct gcagggcggc ccgtgaggcc cctttctga 3633

 gcctggcctc gccccgccgg agc 3656

<210> 4
 <211> 1115
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 4

Met Leu Asn Asn Leu Thr Asp Cys Glu Asp Gly Asp Gly Gly Ala Asn
 1 5 10 15

Pro Gly Asp Gly Asn Pro Lys Glu Ser Ser Pro Phe Ile Asn Ser Thr
 20 25 30

Asp Thr Glu Lys Gly Arg Glu Tyr Asp Gly Arg Asn Met Ala Leu Phe
 35 40 45

Glu Glu Glu Met Asp Thr Ser Pro Met Val Ser Ser Leu Leu Ser Gly
 50 55 60

Leu Ala Asn Tyr Thr Asn Leu Pro Gln Gly Ser Arg Glu His Glu Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asn Asn Glu Gly Gly Lys Lys Lys Pro Val Gln Ala Pro Arg
 85 90 95

Met Gly Thr Phe Met Gly Val Tyr Leu Pro Cys Leu Gln Asn Ile Phe
 100 105 110

Gly Val Ile Leu Phe Leu Arg Leu Thr Trp Val Val Gly Ile Ala Gly

115	120	125
Ile Met Glu Ser Phe Cys Met Val Phe Ile Cys Cys Ser Cys Thr Met 130	135	140
Leu Thr Ala Ile Ser Met Ser Ala Ile Ala Thr Asn Gly Val Val Pro 145	150	155 160
Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Met Ile Ser Arg Ser Leu Gly Pro Glu Phe 165	170	175
Gly Gly Ala Val Gly Leu Cys Phe Tyr Leu Gly Thr Thr Phe Ala Gly 180	185	190
Ala Met Tyr Ile Leu Gly Thr Ile Glu Ile Leu Leu Ala Tyr Leu Phe 195	200	205
Pro Ala Met Ala Ile Phe Lys Ala Glu Asp Ala Ser Gly Glu Ala Ala 210	215	220
Ala Met Leu Asn Asn Met Arg Val Tyr Gly Thr Cys Val Leu Thr Cys 225	230	235 240
Met Ala Thr Val Val Phe Val Gly Val Lys Tyr Val Asn Lys Phe Ala 245	250	255
Leu Val Phe Leu Gly Cys Val Ile Leu Ser Ile Leu Ala Ile Tyr Ala 260	265	270
Gly Val Ile Lys Ser Ala Phe Asp Pro Pro Asn Phe Pro Ile Cys Leu 275	280	285
Leu Gly Asn Arg Thr Leu Ser Arg His Gly Phe Asp Val Cys Ala Lys 290	295	300
Leu Ala Trp Glu Gly Asn Glu Thr Val Thr Thr Arg Leu Trp Gly Leu 305	310	315 320

Phe Cys Ser Ser Arg Leu Leu Asn Ala Thr Cys Asp Glu Tyr Phe Thr
 325 330 335

Arg Asn Asn Val Thr Glu Ile Gln Gly Ile Pro Gly Ala Ala Ser Gly
 340 345 350

Leu Ile Lys Glu Asn Leu Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Lys Gly Val Ile
 355 360 365

Val Glu Arg Arg Gly Met Pro Ser Val Gly Leu Ala Asp Gly Thr Pro
 370 375 380

Val Asp Met Asp His Pro Tyr Val Phe Ser Asp Met Thr Ser Tyr Phe
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Val Gly Ile Tyr Phe Pro Ser Val Thr Gly Ile Met Ala
 405 410 415

Gly Ser Asn Arg Ser Gly Asp Leu Arg Asp Ala Gln Lys Ser Ile Pro
 420 425 430

Thr Gly Thr Ile Leu Ala Ile Ala Thr Thr Ser Ala Val Tyr Ile Ser
 435 440 445

Ser Val Val Leu Phe Gly Ala Cys Ile Glu Gly Val Val Leu Arg Asp
 450 455 460

Lys Phe Gly Glu Ala Val Asn Gly Asn Leu Val Val Gly Thr Leu Ala
 465 470 475 480

Trp Pro Ser Pro Trp Val Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Ser Thr Cys
 485 490 495

Gly Ala Gly Leu Gln Ser Leu Thr Gly Ala Pro Arg Leu Leu Gln Ala
 500 505 510

Ile Ser Arg Asp Gly Ile Val Pro Phe Leu Gln Val Phe Gly His Gly
515 520 525

Lys Ala Asn Gly Glu Pro Thr Trp Ala Leu Leu Leu Thr Ala Cys Ile
530 535 540

Cys Glu Ile Gly Ile Leu Ile Ala Ser Leu Asp Glu Val Ala Pro Ile
545 550 555 560

Leu Ser Met Phe Phe Leu Met Cys Tyr Met Phe Val Asn Leu Ala Cys
565 570 575

Ala Val Gln Thr Leu Leu Arg Thr Pro Asn Trp Arg Pro Arg Phe Arg
580 585 590

Tyr Tyr His Trp Thr Leu Ser Phe Leu Gly Met Ser Leu Cys Leu Ala
595 600 605

Leu Met Phe Ile Cys Ser Trp Tyr Tyr Ala Leu Val Ala Met Leu Ile
610 615 620

Ala Gly Leu Ile Tyr Lys Tyr Ile Glu Tyr Arg Gly Ala Glu Lys Glu
625 630 635 640

Trp Gly Asp Gly Ile Arg Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ala Arg Tyr Ala
645 650 655

Leu Leu Arg Leu Glu Glu Gly Pro Pro His Thr Lys Asn Trp Arg Pro
660 665 670

Gln Leu Leu Val Leu Val Arg Val Asp Gln Asp Gln Asn Val Val His
675 680 685

Pro Gln Leu Leu Ser Leu Thr Ser Gln Leu Lys Ala Gly Lys Gly Leu
690 695 700

Thr Ile Val Gly Ser Val Leu Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asn His Pro
 705 710 715 720

Gln Ala Gln Arg Ala Glu Glu Ser Ile Arg Arg Leu Met Glu Ala Glu
 725 730 735

Lys Val Lys Gly Phe Cys Gln Val Val Ile Ser Ser Asn Leu Arg Asp
 740 745 750

Gly Val Ser His Leu Ile Gln Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gln His
 755 760 765

Asn Thr Val Leu Val Gly Trp Pro Arg Asn Trp Arg Gln Lys Glu Asp
 770 775 780

His Gln Thr Trp Arg Asn Phe Ile Glu Leu Val Arg Glu Thr Thr Ala
 785 790 795 800

Gly His Leu Ala Leu Leu Val Thr Lys Asn Val Ser Met Phe Pro Gly
 805 810 815

Asn Pro Glu Arg Phe Ser Glu Gly Ser Ile Asp Val Trp Trp Ile Val
 820 825 830

His Asp Gly Gly Met Leu Met Leu Leu Pro Phe Leu Leu Arg His His
 835 840 845

Lys Val Trp Arg Lys Cys Lys Met Arg Ile Phe Thr Val Ala Gln Met
 850 855 860

Asp Asp Asn Ser Ile Gln Met Lys Lys Asp Leu Thr Thr Phe Leu Tyr
 865 870 875 880

His Leu Arg Ile Thr Ala Glu Val Glu Val Val Glu Met His Glu Ser
 885 890 895

Asp Ile Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Lys Thr Leu Val Met Glu Gln Arg

900	905	910
Ser Gln Ile Leu Lys Gln Met His Leu Thr Lys Asn Glu Arg Glu Arg 915	920	925
Glu Ile Gln Ser Ile Thr Asp Glu Ser Arg Gly Ser Ile Arg Arg Lys 930	935	940
Asn Pro Ala Asn Pro Arg Leu Arg Leu Asn Val Pro Glu Glu Thr Ala 945	950	955 960
Cys Asp Asn Glu Glu Lys Pro Glu Glu Glu Val Gln Leu Ile His Asp 965	970	975
Gln Ser Ala Pro Ser Cys Pro Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gly Glu Glu 980	985	990
Pro Glu Gly Glu Arg Glu Thr Asp Pro Glu Val His Leu Thr Trp Thr 995	1000	1005
Lys Asp Lys Ser Val Ala Glu Lys Asn Lys Gly Pro Ser Pro Val 1010	1015	1020
Ser Ser Glu Gly Ile Lys Asp Phe Phe Ser Met Lys Pro Glu Trp 1025	1030	1035
Glu Asn Leu Asn Gln Ser Asn Val Arg Arg Met His Thr Ala Val 1040	1045	1050
Arg Leu Asn Glu Val Ile Val Asn Lys Ser Arg Asp Ala Lys Leu 1055	1060	1065
Val Leu Leu Asn Met Pro Gly Pro Pro Arg Asn Arg Asn Gly Asp 1070	1075	1080
Glu Asn Tyr Met Glu Phe Leu Glu Val Leu Thr Glu Gln Leu Asp 1085	1090	1095

Arg Val Met Leu Val Arg Gly Gly Gly Arg Glu Val Ile Thr Ile
 1100 1105 1110

Tyr Ser
 1115

<210> 5
 <211> 5566
 <212> DNA
 <213> 大鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (116)..(3466)

<400> 5
 ccgctccacg gagagcaagc gacagagctc gagcaagcga gcgagcggcg aaggcgggca 60
 gaggggcgcg ggcgaagagg cgcagccatc ccgagcccgg cgccgcgcag ccacc atg 118
 Met
 1
 ctc aac aac ctg acg gac tgc gag gac ggc gat ggg gga gcc aac ccg 166
 Leu Asn Asn Leu Thr Asp Cys Glu Asp Gly Asp Gly Gly Ala Asn Pro
 5 10 15
 ggt gac ggc aat ccc aag gag agc agc ccc ttc atc aac agc acg gac 214
 Gly Asp Gly Asn Pro Lys Glu Ser Ser Pro Phe Ile Asn Ser Thr Asp
 20 25 30
 acg gag aag ggg aga gag tat gat ggc agg aac atg gcc ctg ttt gag 262
 Thr Glu Lys Gly Arg Glu Tyr Asp Gly Arg Asn Met Ala Leu Phe Glu
 35 40 45
 gag gag atg gac acc agc ccc atg gta tcc tcc ctg ctc agt ggg ctg 310
 Glu Glu Met Asp Thr Ser Pro Met Val Ser Ser Leu Leu Ser Gly Leu
 50 55 60 65
 gcc aac tac acc aac ctg cct cag gga agc aaa gag cac gaa gaa gca 358
 Ala Asn Tyr Thr Asn Leu Pro Gln Gly Ser Lys Glu His Glu Glu Ala
 70 75 80
 gaa aac aat gag ggc gga aag aag aag ccg gtg cag gcc cca cgc atg 406
 Glu Asn Asn Glu Gly Gly Lys Lys Lys Pro Val Gln Ala Pro Arg Met

85	90	95	
ggc acc ttc atg ggc gtg tac ctc ccg tgc ctg cag aac atc ttt ggt			454
Gly Thr Phe Met Gly Val Tyr Leu Pro Cys Leu Gln Asn Ile Phe Gly			
100	105	110	
ggt atc ctc ttt ctg cgg ctc act tgg gtg gtg gga atc gca ggc atc			502
Val Ile Leu Phe Leu Arg Leu Thr Trp Val Val Gly Ile Ala Gly Ile			
115	120	125	
atg gag tcc ttc tgc atg gtc ttc atc tgc tgc tcc tgc acg atg ctc			550
Met Glu Ser Phe Cys Met Val Phe Ile Cys Cys Ser Cys Thr Met Leu			
130	135	140	145
aca gcc att tcc atg agc gca att gca acc aat ggt gtt gtg cct gct			598
Thr Ala Ile Ser Met Ser Ala Ile Ala Thr Asn Gly Val Val Pro Ala			
150	155	160	
ggt ggc tcc tac tac atg att tcc agg tct ctg ggc ccg gag ttt ggg			646
Gly Gly Ser Tyr Tyr Met Ile Ser Arg Ser Leu Gly Pro Glu Phe Gly			
165	170	175	
ggc gcc gtg ggc ctc tgc ttc tac ctg ggc act acc ttt gct ggg gct			694
Gly Ala Val Gly Leu Cys Phe Tyr Leu Gly Thr Thr Phe Ala Gly Ala			
180	185	190	
atg tac atc ctg ggc acc atc gag atc ctg ctg gct tac ctc ttc cca			742
Met Tyr Ile Leu Gly Thr Ile Glu Ile Leu Leu Ala Tyr Leu Phe Pro			
195	200	205	
gcg atg gcc atc ttc aag gca gaa gat gcc agt ggg gag gca gcc gcc			790
Ala Met Ala Ile Phe Lys Ala Glu Asp Ala Ser Gly Glu Ala Ala Ala			
210	215	220	225
atg ttg aat aac atg cgg gtg tat ggc acc tgt gtg ctc acc tgc atg			838
Met Leu Asn Asn Met Arg Val Tyr Gly Thr Cys Val Leu Thr Cys Met			
230	235	240	
gcc acc gta gtc ttt gtg ggc gtc aag tac gtg aac aag ttt gcc ctg			886
Ala Thr Val Val Phe Val Gly Val Lys Tyr Val Asn Lys Phe Ala Leu			
245	250	255	
gtc ttc ctg ggt tgc gtg atc ctc tcc atc ctg gcc atc tac gca ggg			934
Val Phe Leu Gly Cys Val Ile Leu Ser Ile Leu Ala Ile Tyr Ala Gly			
260	265	270	
gtc atc aag tct gcc ttc gat cca ccc aat ttc ccg att tgc ctc ctg			982
Val Ile Lys Ser Ala Phe Asp Pro Pro Asn Phe Pro Ile Cys Leu Leu			
275	280	285	

ggg aac cgc acg ctg tct cgc cat ggc ttt gat gtc tgt gcc aag ctg Gly Asn Arg Thr Leu Ser Arg His Gly Phe Asp Val Cys Ala Lys Leu 290 295 300 305	1030
gct tgg gaa gga aat gag aca gtg acc aca cgg ctc tgg ggc cta ttc Ala Trp Glu Gly Asn Glu Thr Val Thr Thr Arg Leu Trp Gly Leu Phe 310 315 320	1078
tgt tcc tcc cgc ctc ctc aat gcc acc tgt gat gag tac ttc acc cga Cys Ser Ser Arg Leu Leu Asn Ala Thr Cys Asp Glu Tyr Phe Thr Arg 325 330 335	1126
aac aat gtc aca gag atc cag ggc att cct ggt gct gca agt ggc ctc Asn Asn Val Thr Glu Ile Gln Gly Ile Pro Gly Ala Ala Ser Gly Leu 340 345 350	1174
atc aaa gag aac ctg tgg agt tcc tac ctg acc aag ggg gtg atc gtg Ile Lys Glu Asn Leu Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Lys Gly Val Ile Val 355 360 365	1222
gag agg cgt ggg atg ccc tct gtg ggc ctg gca gat ggt acc ccc gtt Glu Arg Arg Gly Met Pro Ser Val Gly Leu Ala Asp Gly Thr Pro Val 370 375 380 385	1270
gac atg gac cac ccc tat gtc ttc agt gat atg acc tcc tac ttc acc Asp Met Asp His Pro Tyr Val Phe Ser Asp Met Thr Ser Tyr Phe Thr 390 395 400	1318
ctg ctt gtt ggc atc tat ttc ccc tca gtc aca ggg atc atg gct ggc Leu Leu Val Gly Ile Tyr Phe Pro Ser Val Thr Gly Ile Met Ala Gly 405 410 415	1366
tcg aac cgg tcc gga gac ctg cgg gat gcc cag aag tct atc cct act Ser Asn Arg Ser Gly Asp Leu Arg Asp Ala Gln Lys Ser Ile Pro Thr 420 425 430	1414
gga act atc ttg gcc att get acg acc tct gct gtc tac atc agc tct Gly Thr Ile Leu Ala Ile Ala Thr Thr Ser Ala Val Tyr Ile Ser Ser 435 440 445	1462
gtt gtt ctg ttc gga gcc tgc atc gaa ggg gtc gtc cta cgg gac aag Val Val Leu Phe Gly Ala Cys Ile Glu Gly Val Val Leu Arg Asp Lys 450 455 460 465	1510
ttt ggg gaa gct gtg aat ggc aat ctg gtg gtg ggc acc ctg gcc tgg Phe Gly Glu Ala Val Asn Gly Asn Leu Val Val Gly Thr Leu Ala Trp 470 475 480	1558

cct tct cct tgg gtc att gtc ata ggc tct ttc ttc tct acc tgc gga	1606
Pro Ser Pro Trp Val Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Ser Thr Cys Gly	
485 490 495	
gct gga cta cag agc ctc aca ggg gcc cca cgc ctg ctg cag gcc atc	1654
Ala Gly Leu Gln Ser Leu Thr Gly Ala Pro Arg Leu Leu Gln Ala Ile	
500 505 510	
tcc cgg gat ggc ata gtg ccc ttc ctg cag gtc ttt ggc cat ggc aaa	1702
Ser Arg Asp Gly Ile Val Pro Phe Leu Gln Val Phe Gly His Gly Lys	
515 520 525	
gcc aac gga gag cca acc tgg gcg ctg ctg ctg act gcc tgc atc tgt	1750
Ala Asn Gly Glu Pro Thr Trp Ala Leu Leu Leu Thr Ala Cys Ile Cys	
530 535 540 545	
gag atc ggc atc ctc atc gcc tcc ctg gat gag gtc gcc cct atc ctt	1798
Glu Ile Gly Ile Leu Ile Ala Ser Leu Asp Glu Val Ala Pro Ile Leu	
550 555 560	
tcc atg ttc ttc ctg atg tgt tac atg ttt gtg aac ttg gct tgc gcg	1846
Ser Met Phe Phe Leu Met Cys Tyr Met Phe Val Asn Leu Ala Cys Ala	
565 570 575	
gtg cag aca ctg ctg agg acg ccc aac tgg agg cca cgc ttc cga tat	1894
Val Gln Thr Leu Leu Arg Thr Pro Asn Trp Arg Pro Arg Phe Arg Tyr	
580 585 590	
tac cac tgg acc ctc tcc ttc ctg ggc atg agc ctc tgc ctg gcc ctg	1942
Tyr His Trp Thr Leu Ser Phe Leu Gly Met Ser Leu Cys Leu Ala Leu	
595 600 605	
atg ttc att tgc tcc tgg tat tat gcg ctg gta gct atg ctc atc gct	1990
Met Phe Ile Cys Ser Trp Tyr Tyr Ala Leu Val Ala Met Leu Ile Ala	
610 615 620 625	
ggc ctc atc tat aag tac atc gag tac cgg ggg gca gag aag gag tgg	2038
Gly Leu Ile Tyr Lys Tyr Ile Glu Tyr Arg Gly Ala Glu Lys Glu Trp	
630 635 640	
ggg gat ggg atc cga ggc ctg tct ctc agt gca gct cgc tat gct ctc	2086
Gly Asp Gly Ile Arg Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ala Arg Tyr Ala Leu	
645 650 655	
ttg cgt ctg gag gaa gga ccc ccg cat aca aag aac tgg agg ccc cag	2134
Leu Arg Leu Glu Glu Gly Pro Pro His Thr Lys Asn Trp Arg Pro Gln	
660 665 670	
cta ctg gtg ctg gtg cgt gtg gac cag gac cag aac gtg gtg cac ccg	2182

Leu Leu Val Leu Val Arg Val Asp Gln Asp Gln Asn Val Val His Pro	
675	680 685
cag ctg ctg tcc ttg acc tcc cag ctc aag gca ggg aag ggc ctg acc	2230
Gln Leu Leu Ser Leu Thr Ser Gln Leu Lys Ala Gly Lys Gly Leu Thr	
690	695 700 705
att gtg ggc tct gtc ctt gag ggc acc ttt ctg gac aac cac cct cag	2278
Ile Val Gly Ser Val Leu Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asn His Pro Gln	
	710 715 720
gct cag cgg gca gag gag tct atc cgg cgc ctg atg gag gct gag aag	2326
Ala Gln Arg Ala Glu Glu Ser Ile Arg Arg Leu Met Glu Ala Glu Lys	
	725 730 735
gtg aag ggc ttc tgc cag gta gtg atc tcc tcc aac ctg cgt gac ggt	2374
Val Lys Gly Phe Cys Gln Val Val Ile Ser Ser Asn Leu Arg Asp Gly	
	740 745 750
gtg tcc cac ctg atc caa tcc ggg ggc ctc ggg ggc ctg caa cac aac	2422
Val Ser His Leu Ile Gln Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gln His Asn	
	755 760 765
act gtg cta gtg ggc tgg cct cgc aac tgg cga cag aag gag gat cat	2470
Thr Val Leu Val Gly Trp Pro Arg Asn Trp Arg Gln Lys Glu Asp His	
	770 775 780 785
cag aca tgg agg aac ttc atc gaa ctc gtc cgg gaa act aca gct ggc	2518
Gln Thr Trp Arg Asn Phe Ile Glu Leu Val Arg Glu Thr Thr Ala Gly	
	790 795 800
cac ctc gcc ctg ctg gtc acc aag aat gtt tcc atg ttc ccc ggg aac	2566
His Leu Ala Leu Leu Val Thr Lys Asn Val Ser Met Phe Pro Gly Asn	
	805 810 815
cct gag cgt ttc tct gag ggc agc att gac gtg tgg tgg atc gtg cac	2614
Pro Glu Arg Phe Ser Glu Gly Ser Ile Asp Val Trp Trp Ile Val His	
	820 825 830
gac ggg ggc atg ctc atg ctg ttg ccc ttc ctc ctg cgt cac cac aag	2662
Asp Gly Gly Met Leu Met Leu Leu Pro Phe Leu Leu Arg His His Lys	
	835 840 845
gtc tgg agg aaa tgc aaa atg cgg atc ttc acc gtg gcg cag atg gat	2710
Val Trp Arg Lys Cys Lys Met Arg Ile Phe Thr Val Ala Gln Met Asp	
	850 855 860 865
gac aac agc att cag atg aag aaa gac ctg acc acg ttt ctg tac cac	2758
Asp Asn Ser Ile Gln Met Lys Lys Asp Leu Thr Thr Phe Leu Tyr His	

870	875	880	
tta cga att act gca gag gtg gaa gtc gtg gag atg cac gag agc gac			2806
Leu Arg Ile Thr Ala Glu Val Glu Val Val Glu Met His Glu Ser Asp			
885	890	895	
atc tca gca tac acc tac gag aag aca ttg gta atg gaa caa cgt tct			2854
Ile Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Lys Thr Leu Val Met Glu Gln Arg Ser			
900	905	910	
cag atc ctc aaa cag atg cac ctc acc aag aac gag cgg gaa cgg gag			2902
Gln Ile Leu Lys Gln Met His Leu Thr Lys Asn Glu Arg Glu Arg Glu			
915	920	925	
atc cag agc atc aca gat gaa tct cgg ggc tcc att cgg agg aag aat			2950
Ile Gln Ser Ile Thr Asp Glu Ser Arg Gly Ser Ile Arg Arg Lys Asn			
930	935	940	945
cca gcc aac act cgg ctc cgc ctc aat gtt ccc gaa gag aca gct tgt			2998
Pro Ala Asn Thr Arg Leu Arg Leu Asn Val Pro Glu Glu Thr Ala Cys			
950	955	960	
gac aac gag gag aag cca gaa gag gag gtg cag ctg atc cat gac cag			3046
Asp Asn Glu Glu Lys Pro Glu Glu Glu Val Gln Leu Ile His Asp Gln			
965	970	975	
agt gct ccc agc tgc cct agc agc tgc ccg tct cca ggg gag gag cct			3094
Ser Ala Pro Ser Cys Pro Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gly Glu Glu Pro			
980	985	990	
gag ggg gag ggg gag aca gac cca gag aag gtg cat ctc acc tgg acc			3142
Glu Gly Glu Gly Glu Thr Asp Pro Glu Lys Val His Leu Thr Trp Thr			
995	1000	1005	
aag gat aag tca gcg gct cag aag aac aaa ggc ccc agt ccc gtc			3187
Lys Asp Lys Ser Ala Ala Gln Lys Asn Lys Gly Pro Ser Pro Val			
1010	1015	1020	
tcc tcg gag ggg atc aag gac ttc ttc agc atg aag ccg gag tgg			3232
Ser Ser Glu Gly Ile Lys Asp Phe Phe Ser Met Lys Pro Glu Trp			
1025	1030	1035	
gaa aac ttg aac cag tcc aac gtg cgg cgc atg cac aca gct gtg			3277
Glu Asn Leu Asn Gln Ser Asn Val Arg Arg Met His Thr Ala Val			
1040	1045	1050	
cgg ctg aac gag gtc atc gtg aat aaa tcc cgg gat gcc aag ttg			3322
Arg Leu Asn Glu Val Ile Val Asn Lys Ser Arg Asp Ala Lys Leu			
1055	1060	1065	

gtg ttg ctc aac atg ccc ggg cct ccc cgc aac cgc aat gga gat	3367
Val Leu Leu Asn Met Pro Gly Pro Pro Arg Asn Arg Asn Gly Asp	
1070 1075 1080	
gaa aac tac atg gaa ttc ctg gag gtc ctc act gag caa ctg gac	3412
Glu Asn Tyr Met Glu Phe Leu Glu Val Leu Thr Glu Gln Leu Asp	
1085 1090 1095	
cgg gtg atg ctg gtc cgc ggt ggt ggc cga gag gtc atc acc atc	3457
Arg Val Met Leu Val Arg Gly Gly Gly Arg Glu Val Ile Thr Ile	
1100 1105 1110	
tac tcc tga aggccaggac ctgccactcc ggcccgagcg agcccggccc	3506
Tyr Ser	
1115	
gcggccccgg agccctcgcc gcgcctcccc gccctgtca cgtttacat aagaccccg	3566
tgcccgtgcc ctggccctct tcctccccgc tgctgcggc cggaggcct tgcccgtcg	3626
ggctgaccgg gagggcggcc cgtgggcccc tttctgagc cggcctcgc cctgccggag	3686
tagacgttgc aataaagggtg gcgaggcggc gtggagagga gcggaaccgt ggtcccgggc	3746
cggggagccc cgagcccgtc cctccccacg ccccgcggc ctcccccg accctggtcg	3806
ctgagcccgg gcgccctcg gctgcctat acatagtgt caggagacat cgagtgtatt	3866
tttaatgtcc ccatatttct gtaaactaga aacgcaacgg actcctcgcc acggccgcgc	3926
tctccccgct gcggcgcccc aggaaggcgg agaccggga agccagggtt cctgcgctc	3986
ccgagctgag agccaagtgc ttaaggccg gcctctctt tccctttcc tgtccacggc	4046
ccgggcttcc ctctcttccc tccagttctt ggccaacaca ggtgaagccc tgcccgtgc	4106
cttcgtggag gaggcggcgt ctctcctctg ttggcttgc gctgctccc cctgtcccgt	4166
ggctcctcgc caaagactga atttgtggag ctggagggca caccctccc actttcctc	4226
ctgggacagg tgaggggcca atgccagtct aggggcccgc tcacaggagg cctcgcgcag	4286
cctcttggtc cccactctgc aagtctgccc tggggaccca gccccctgg tggttctggg	4346
gcggagcttt gctgcctagc agcaagtcct tagttactgt ctccagatac caggacctgg	4406
agtagggaat ggagtcatat gggttcagtt gttcctggcg cttctctgccc cctgctccc	4466

cctctcccc tctcgttaga cacaaggact ttggctttct taactcatcc ttggcgcttc 4526
cgctccacca cgcccacctg tggggaggag ccctcagccc tagagaggcg tttggctggt 4586
tcccttcccc cagggcacgt tactaagagg acaggcactg catgctcctt taagcgcctt 4646
ctgggactgg gtacagtgcc tccagcccca gggeccctggt ctgcgcacct agttagacat 4706
cattgcccac tccagggcca gggccactag ctgacctcac cacctttttc cttgagccca 4766
aggcagagag agctgcagct ggtgccatct agacaggctc aagtgtggcc agtggcaggg 4826
ctcgagggcc actgcctgtg tgcttggctc aggacctctc tgagatttga tggggactgg 4886
atattcttcc aggtagtagc catcaagtgc gaagtgttgg acccaggacc tgacattcct 4946
tcaagactgc cctcccctgc tgtggttttg ccttttgggg caagagaggg gctgggcaaa 5006
cggggaggag gcagtatcaa caccgattag ggaaccaaag ttgcactacc tgggcccagc 5066
ctctggttgg caagagcaaa gtttctgttg atgaaaaca acagcccaca acaacacccc 5126
ccccccggtt ttctgtgctc catgtgcaat attgttatg aaccttgtgt cgttcaagtc 5186
acctttataa tcaactgtagc tagatgttcc atgtccatcc aggtgacttt actctgagtg 5246
caatatttca atagcctggt agtgagaaga gtgttgcttt tgtttcagcc gacctatgtg 5306
cagggcaatg caatgcagtc caaaacctt gtaaatagga gaggttcaa gccaaatcaa 5366
gagtatttat cgttattact attattatta ggctgcctt taattttagt gtttcggtat 5426
ttcgcacctt gcctcggtat tgatcgtgtg ttctctgtgc caatatgcaa aggagaggat 5486
cagttctttc ctttactggt gaatgctccc atttactgct ttaaggcttt tactgtgttc 5546
atTTTTAGA tacctgtctg 5566

<210> 6
<211> 1116
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 6

Met Leu Asn Asn Leu Thr Asp Cys Glu Asp Gly Asp Gly Gly Ala Asn
1 5 10 15

Pro Gly Asp Gly Asn Pro Lys Glu Ser Ser Pro Phe Ile Asn Ser Thr
 20 25 30

Asp Thr Glu Lys Gly Arg Glu Tyr Asp Gly Arg Asn Met Ala Leu Phe
 35 40 45

Glu Glu Glu Met Asp Thr Ser Pro Met Val Ser Ser Leu Leu Ser Gly
 50 55 60

Leu Ala Asn Tyr Thr Asn Leu Pro Gln Gly Ser Lys Glu His Glu Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asn Asn Glu Gly Gly Lys Lys Lys Pro Val Gln Ala Pro Arg
 85 90 95

Met Gly Thr Phe Met Gly Val Tyr Leu Pro Cys Leu Gln Asn Ile Phe
 100 105 110

Gly Val Ile Leu Phe Leu Arg Leu Thr Trp Val Val Gly Ile Ala Gly
 115 120 125

Ile Met Glu Ser Phe Cys Met Val Phe Ile Cys Cys Ser Cys Thr Met
 130 135 140

Leu Thr Ala Ile Ser Met Ser Ala Ile Ala Thr Asn Gly Val Val Pro
 145 150 155 160

Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Met Ile Ser Arg Ser Leu Gly Pro Glu Phe
 165 170 175

Gly Gly Ala Val Gly Leu Cys Phe Tyr Leu Gly Thr Thr Phe Ala Gly
 180 185 190

Ala Met Tyr Ile Leu Gly Thr Ile Glu Ile Leu Leu Ala Tyr Leu Phe
 195 200 205

Pro Ala Met Ala Ile Phe Lys Ala Glu Asp Ala Ser Gly Glu Ala Ala
 210 215 220

Ala Met Leu Asn Asn Met Arg Val Tyr Gly Thr Cys Val Leu Thr Cys
 225 230 235 240

Met Ala Thr Val Val Phe Val Gly Val Lys Tyr Val Asn Lys Phe Ala
 245 250 255

Leu Val Phe Leu Gly Cys Val Ile Leu Ser Ile Leu Ala Ile Tyr Ala
 260 265 270

Gly Val Ile Lys Ser Ala Phe Asp Pro Pro Asn Phe Pro Ile Cys Leu
 275 280 285

Leu Gly Asn Arg Thr Leu Ser Arg His Gly Phe Asp Val Cys Ala Lys
 290 295 300

Leu Ala Trp Glu Gly Asn Glu Thr Val Thr Thr Arg Leu Trp Gly Leu
 305 310 315 320

Phe Cys Ser Ser Arg Leu Leu Asn Ala Thr Cys Asp Glu Tyr Phe Thr
 325 330 335

Arg Asn Asn Val Thr Glu Ile Gln Gly Ile Pro Gly Ala Ala Ser Gly
 340 345 350

Leu Ile Lys Glu Asn Leu Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Lys Gly Val Ile
 355 360 365

Val Glu Arg Arg Gly Met Pro Ser Val Gly Leu Ala Asp Gly Thr Pro
 370 375 380

Val Asp Met Asp His Pro Tyr Val Phe Ser Asp Met Thr Ser Tyr Phe
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Val Gly Ile Tyr Phe Pro Ser Val Thr Gly Ile Met Ala

	405		410		415
Gly Ser Asn Arg Ser Gly Asp Leu Arg Asp Ala Gln Lys Ser Ile Pro					
	420		425		430
Thr Gly Thr Ile Leu Ala Ile Ala Thr Thr Ser Ala Val Tyr Ile Ser					
	435		440		445
Ser Val Val Leu Phe Gly Ala Cys Ile Glu Gly Val Val Leu Arg Asp					
	450		455		460
Lys Phe Gly Glu Ala Val Asn Gly Asn Leu Val Val Gly Thr Leu Ala					
465		470		475	480
Trp Pro Ser Pro Trp Val Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Ser Thr Cys					
	485		490		495
Gly Ala Gly Leu Gln Ser Leu Thr Gly Ala Pro Arg Leu Leu Gln Ala					
	500		505		510
Ile Ser Arg Asp Gly Ile Val Pro Phe Leu Gln Val Phe Gly His Gly					
	515		520		525
Lys Ala Asn Gly Glu Pro Thr Trp Ala Leu Leu Leu Thr Ala Cys Ile					
	530		535		540
Cys Glu Ile Gly Ile Leu Ile Ala Ser Leu Asp Glu Val Ala Pro Ile					
545		550		555	560
Leu Ser Met Phe Phe Leu Met Cys Tyr Met Phe Val Asn Leu Ala Cys					
	565		570		575
Ala Val Gln Thr Leu Leu Arg Thr Pro Asn Trp Arg Pro Arg Phe Arg					
	580		585		590
Tyr Tyr His Trp Thr Leu Ser Phe Leu Gly Met Ser Leu Cys Leu Ala					
	595		600		605

Leu Met Phe Ile Cys Ser Trp Tyr Tyr Ala Leu Val Ala Met Leu Ile
610 615 620

Ala Gly Leu Ile Tyr Lys Tyr Ile Glu Tyr Arg Gly Ala Glu Lys Glu
625 630 635 640

Trp Gly Asp Gly Ile Arg Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ala Arg Tyr Ala
645 650 655

Leu Leu Arg Leu Glu Glu Gly Pro Pro His Thr Lys Asn Trp Arg Pro
660 665 670

Gln Leu Leu Val Leu Val Arg Val Asp Gln Asp Gln Asn Val Val His
675 680 685

Pro Gln Leu Leu Ser Leu Thr Ser Gln Leu Lys Ala Gly Lys Gly Leu
690 695 700

Thr Ile Val Gly Ser Val Leu Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asn His Pro
705 710 715 720

Gln Ala Gln Arg Ala Glu Glu Ser Ile Arg Arg Leu Met Glu Ala Glu
725 730 735

Lys Val Lys Gly Phe Cys Gln Val Val Ile Ser Ser Asn Leu Arg Asp
740 745 750

Gly Val Ser His Leu Ile Gln Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gln His
755 760 765

Asn Thr Val Leu Val Gly Trp Pro Arg Asn Trp Arg Gln Lys Glu Asp
770 775 780

His Gln Thr Trp Arg Asn Phe Ile Glu Leu Val Arg Glu Thr Thr Ala
785 790 795 800

Gly His Leu Ala Leu Leu Val Thr Lys Asn Val Ser Met Phe Pro Gly
 805 810 815

Asn Pro Glu Arg Phe Ser Glu Gly Ser Ile Asp Val Trp Trp Ile Val
 820 825 830

His Asp Gly Gly Met Leu Met Leu Leu Pro Phe Leu Leu Arg His His
 835 840 845

Lys Val Trp Arg Lys Cys Lys Met Arg Ile Phe Thr Val Ala Gln Met
 850 855 860

Asp Asp Asn Ser Ile Gln Met Lys Lys Asp Leu Thr Thr Phe Leu Tyr
 865 870 875 880

His Leu Arg Ile Thr Ala Glu Val Glu Val Val Glu Met His Glu Ser
 885 890 895

Asp Ile Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Lys Thr Leu Val Met Glu Gln Arg
 900 905 910

Ser Gln Ile Leu Lys Gln Met His Leu Thr Lys Asn Glu Arg Glu Arg
 915 920 925

Glu Ile Gln Ser Ile Thr Asp Glu Ser Arg Gly Ser Ile Arg Arg Lys
 930 935 940

Asn Pro Ala Asn Thr Arg Leu Arg Leu Asn Val Pro Glu Glu Thr Ala
 945 950 955 960

Cys Asp Asn Glu Glu Lys Pro Glu Glu Glu Val Gln Leu Ile His Asp
 965 970 975

Gln Ser Ala Pro Ser Cys Pro Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gly Glu Glu
 980 985 990

Pro Glu Gly Glu Gly Glu Thr Asp Pro Glu Lys Val His Leu Thr Trp
 995 1000 1005

Thr Lys Asp Lys Ser Ala Ala Gln Lys Asn Lys Gly Pro Ser Pro
 1010 1015 1020

Val Ser Ser Glu Gly Ile Lys Asp Phe Phe Ser Met Lys Pro Glu
 1025 1030 1035

Trp Glu Asn Leu Asn Gln Ser Asn Val Arg Arg Met His Thr Ala
 1040 1045 1050

Val Arg Leu Asn Glu Val Ile Val Asn Lys Ser Arg Asp Ala Lys
 1055 1060 1065

Leu Val Leu Leu Asn Met Pro Gly Pro Pro Arg Asn Arg Asn Gly
 1070 1075 1080

Asp Glu Asn Tyr Met Glu Phe Leu Glu Val Leu Thr Glu Gln Leu
 1085 1090 1095

Asp Arg Val Met Leu Val Arg Gly Gly Gly Arg Glu Val Ile Thr
 1100 1105 1110

Ile Tyr Ser
 1115

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7

tctccttggg attgccgtca

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 8

tcttcttgag actgcagtca

20

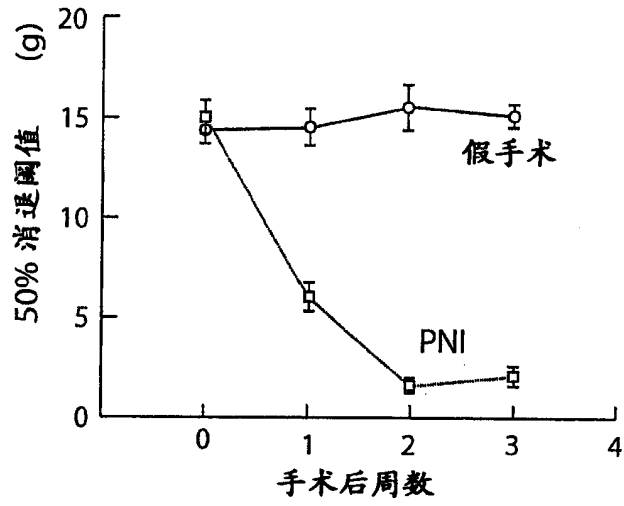


图 1A

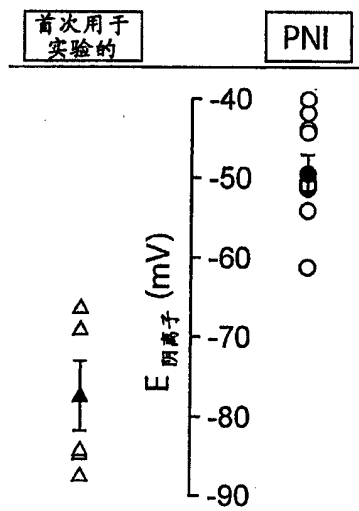


图 1B

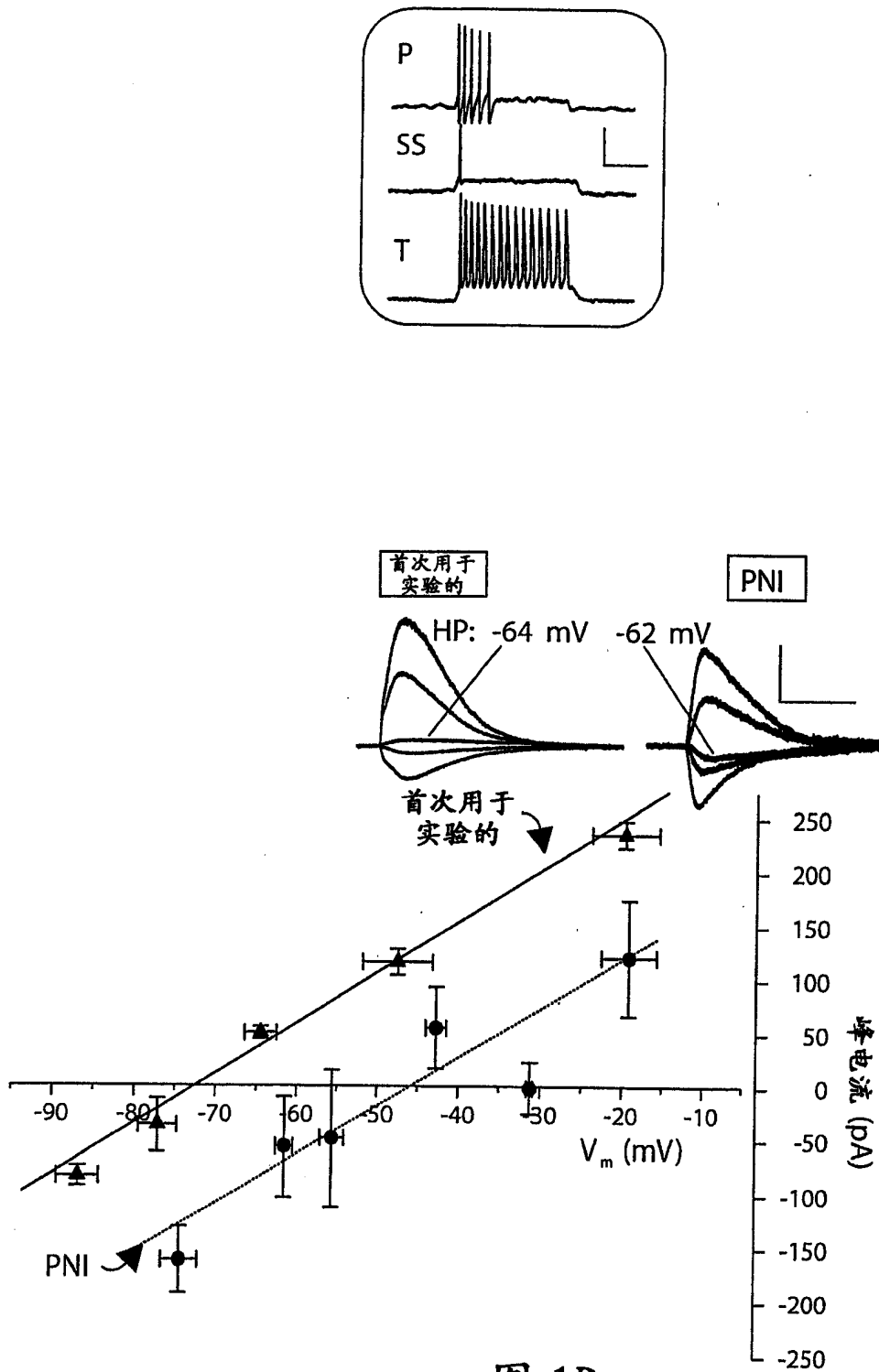


图 1D

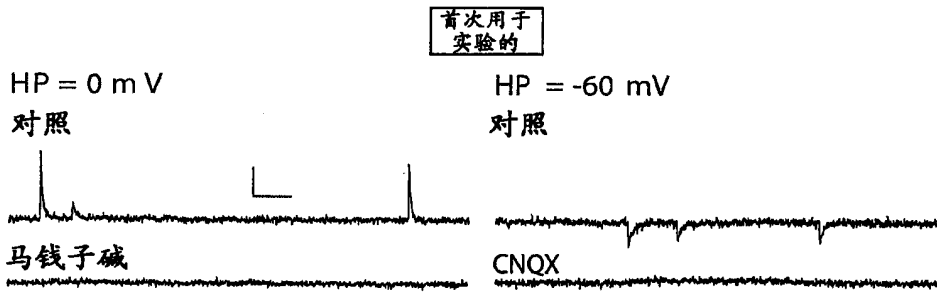


图 2A

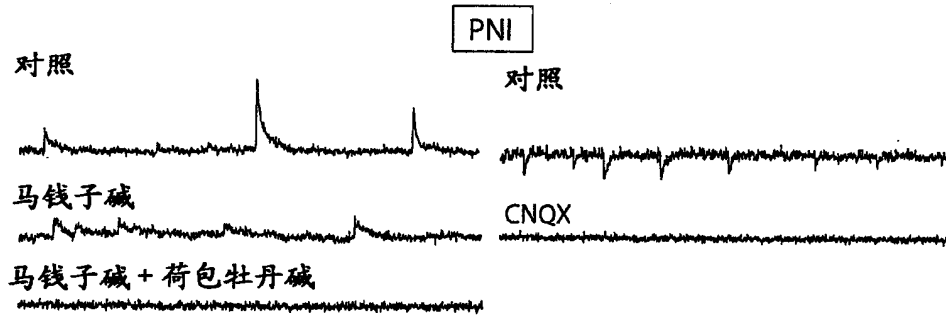


图 2B

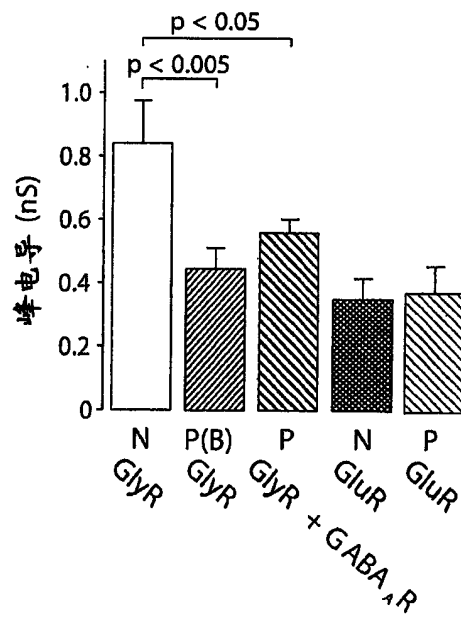
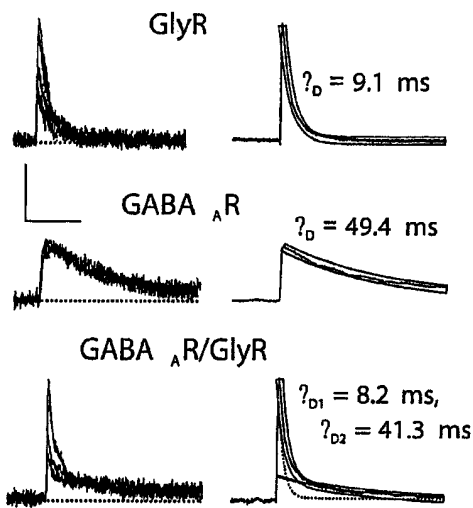


图 2C

图 2D

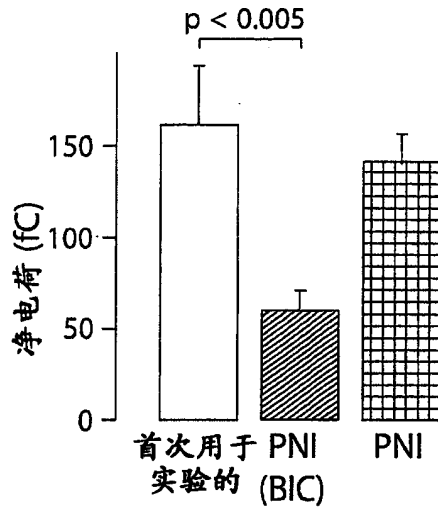


图 2E

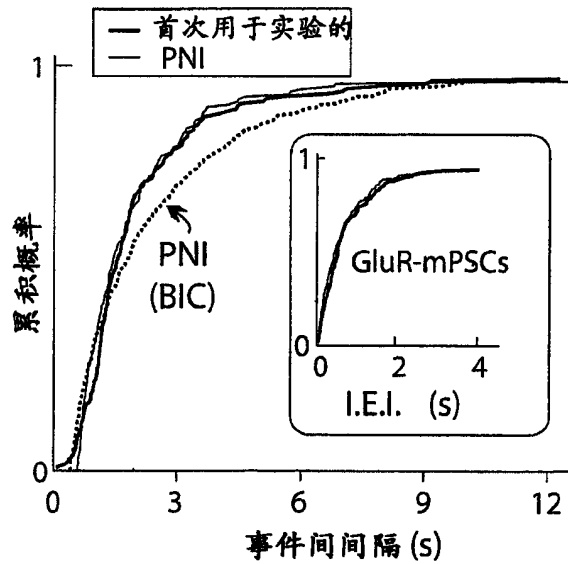


图 2F

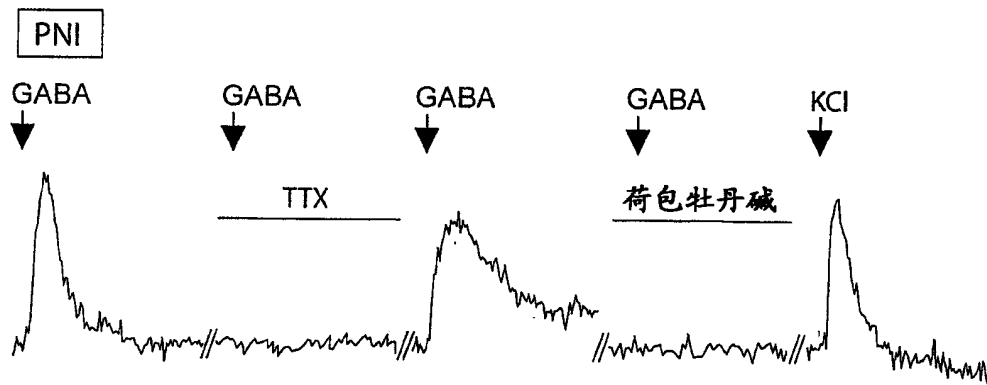


图 3A

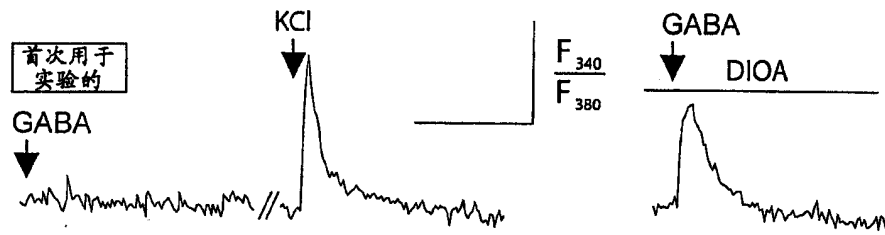


图 3B

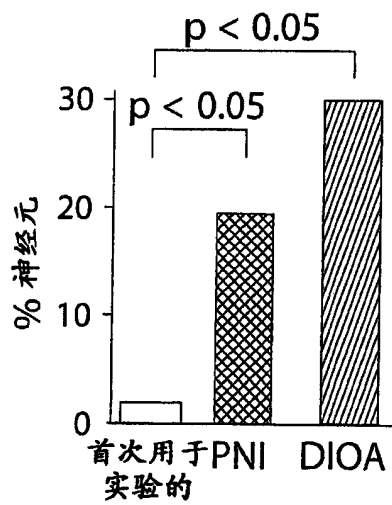


图 3C

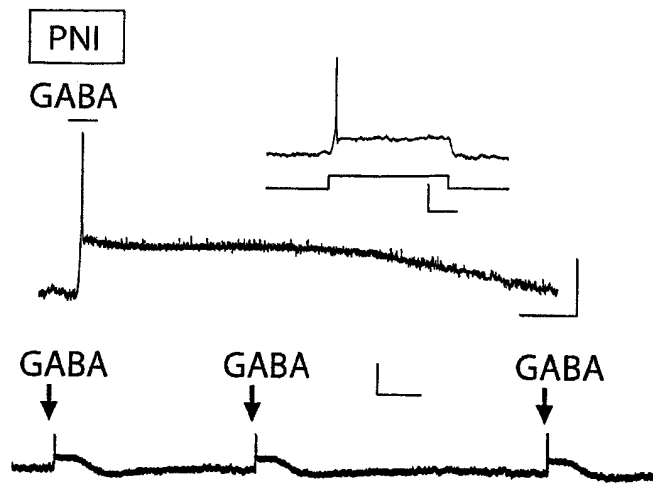


图 3D

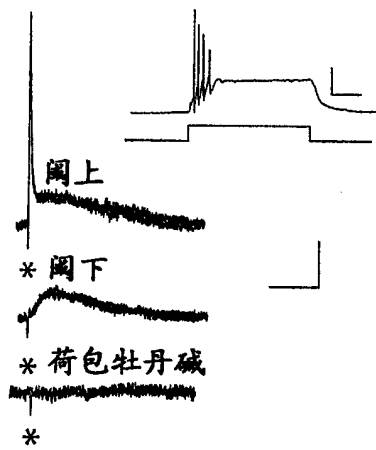


图 3E

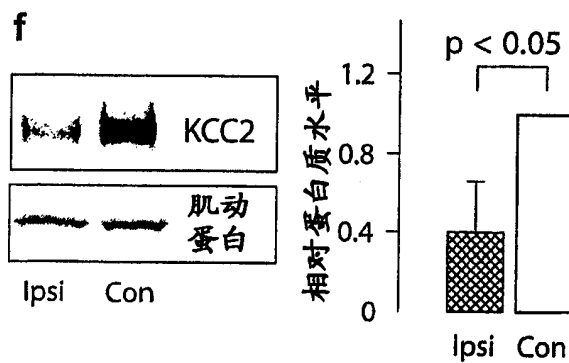


图 3F

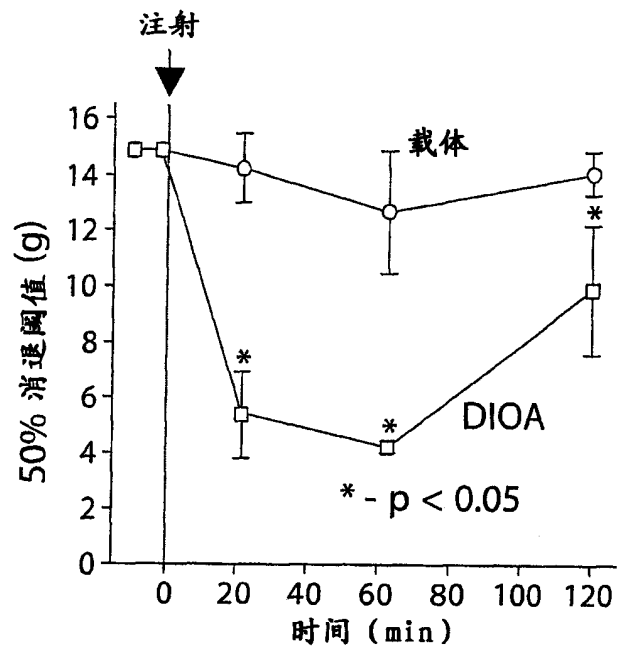


图 4A

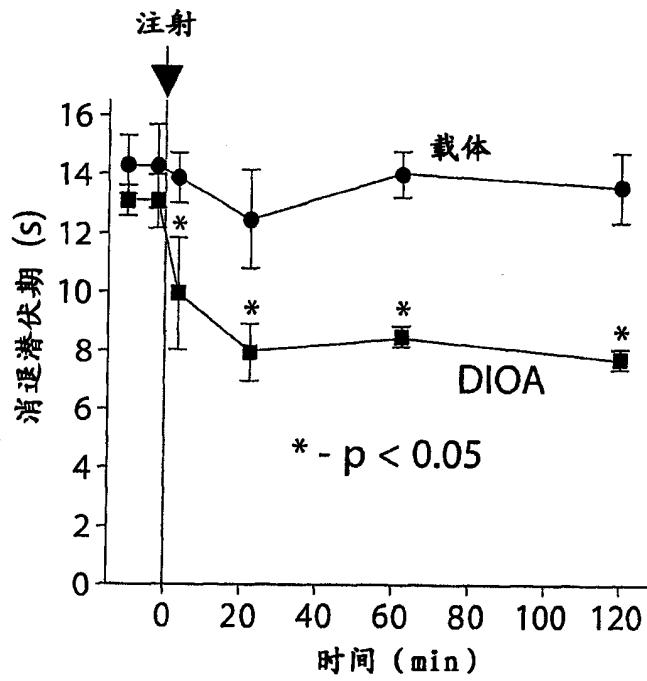


图 4B

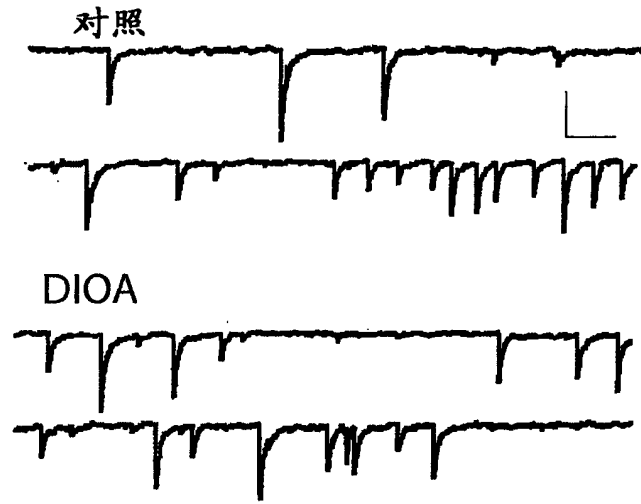


图 4C

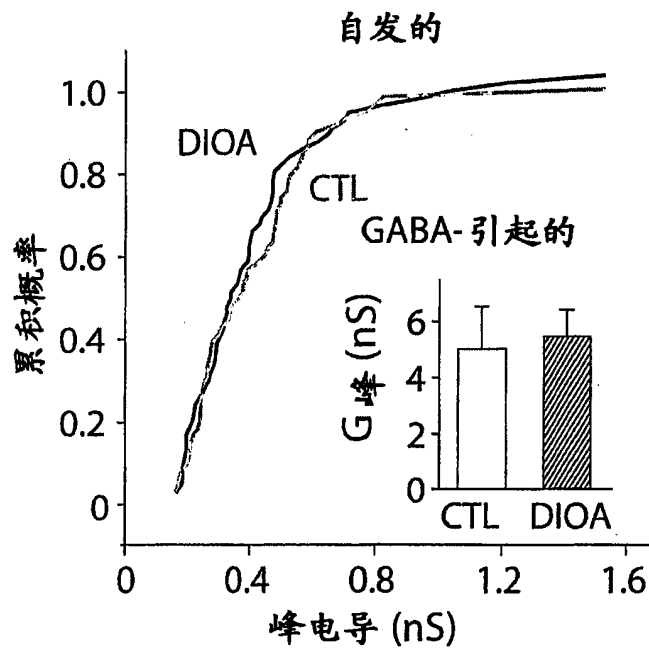


图 4D

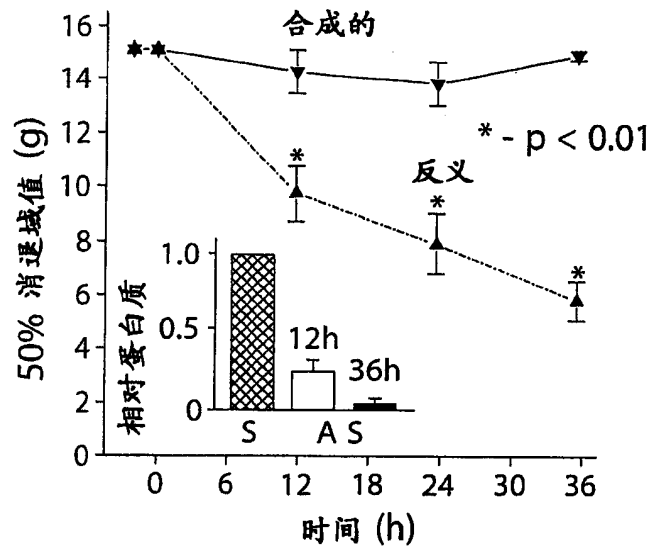


图 4E

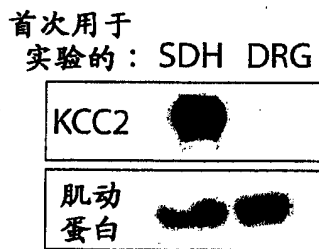


图 4F

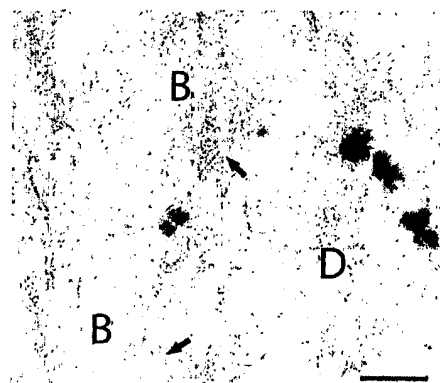


图 4G

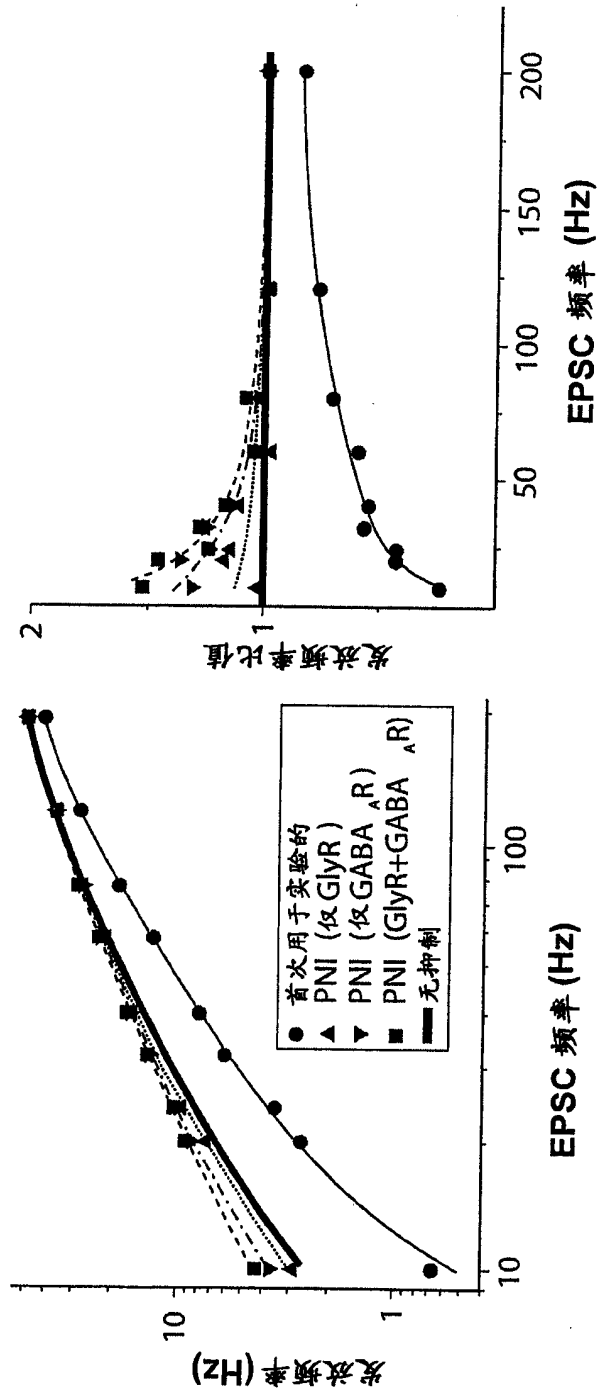


图 5A

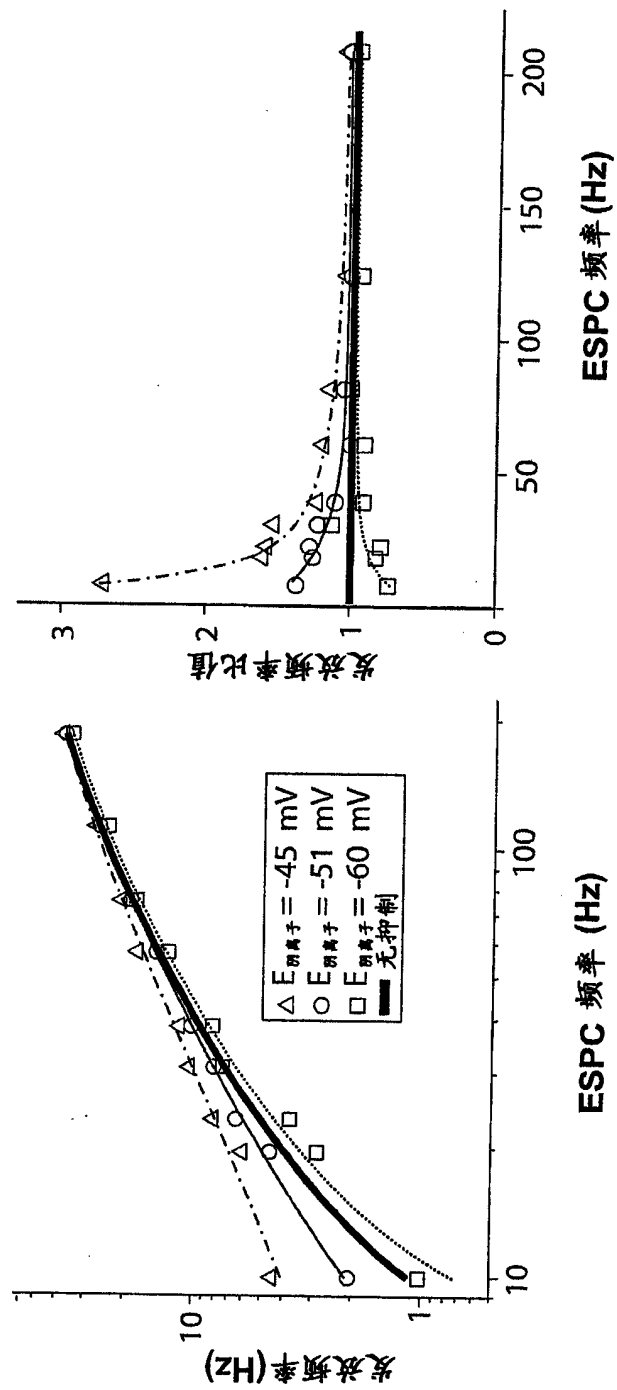


图 5B

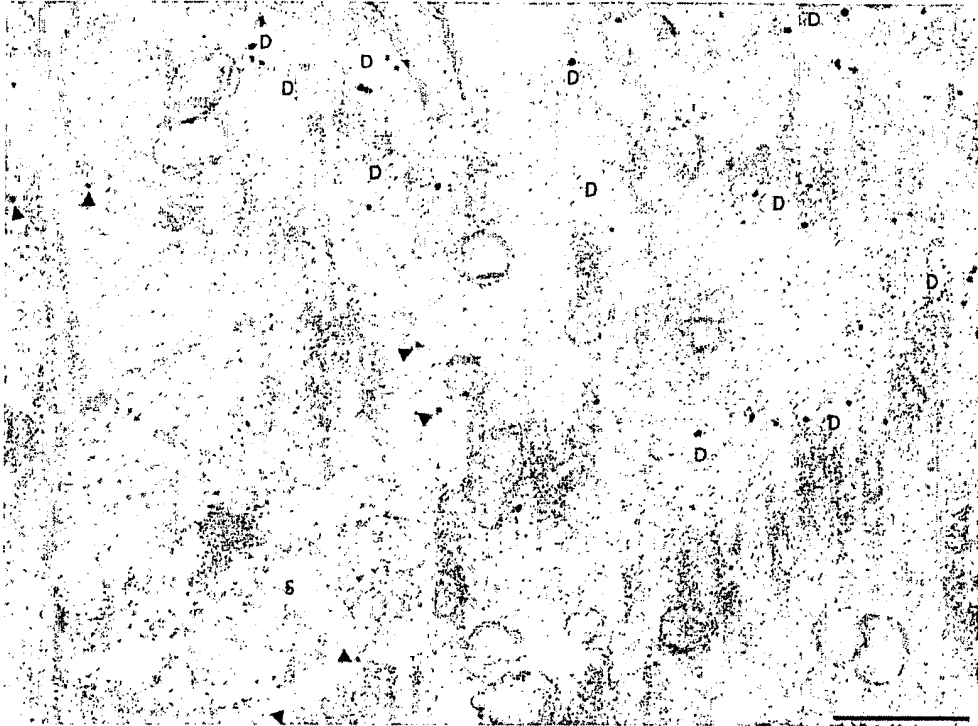


图 6A

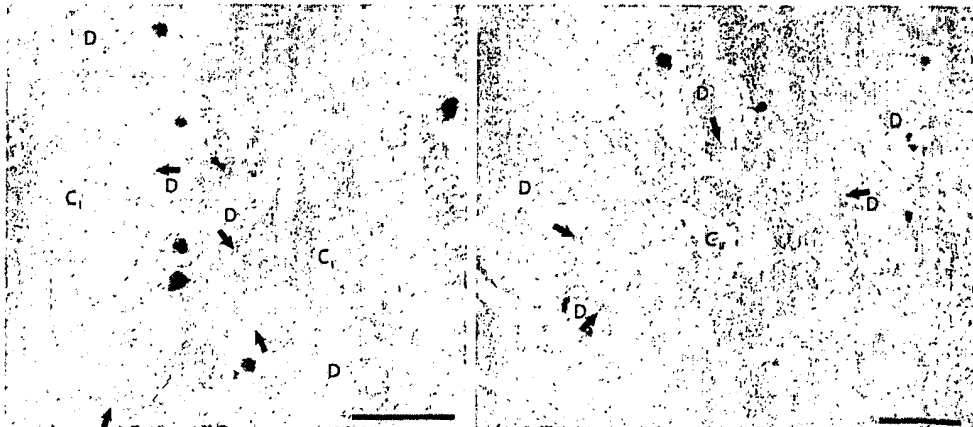


图 6B

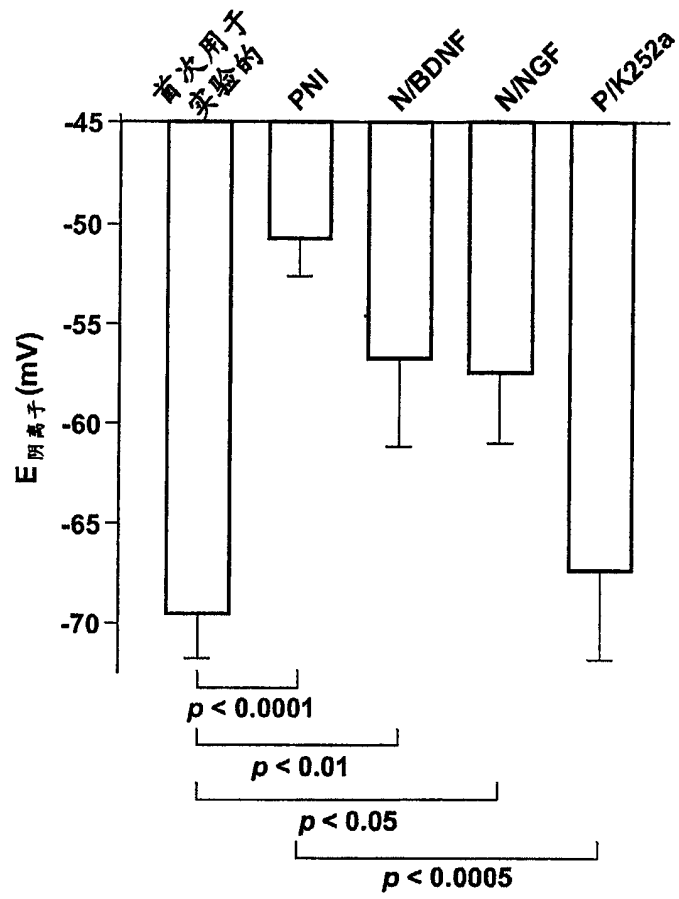


图 7

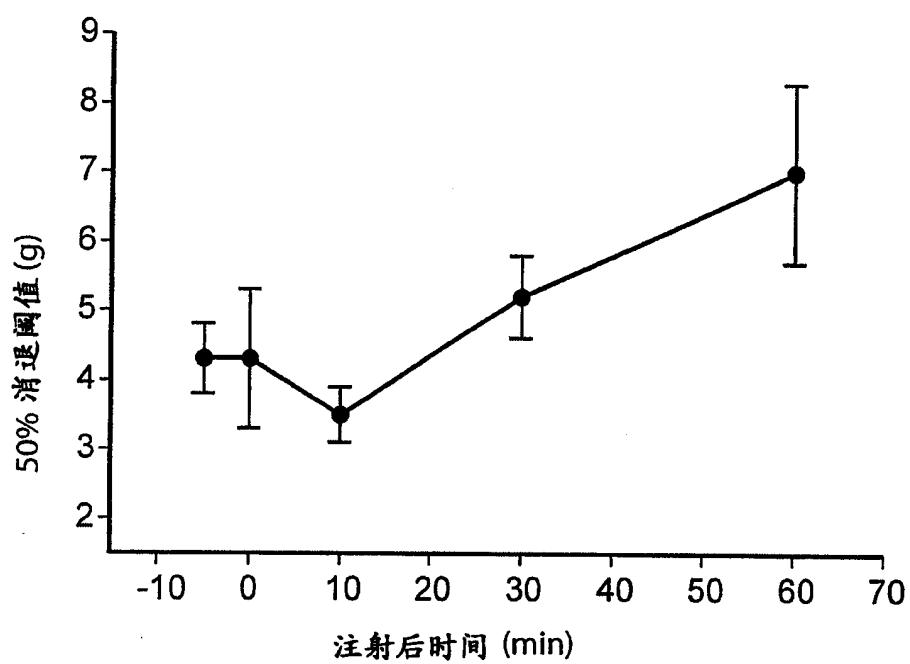


图 8

人 KCC2 多肽和 DNA 序列

(Mount, D.B. 和 Song, L. (2002) Brain Res. Mol.. Brain Res. 103 (1-2), 91-105; ACCESSION: AF208159)

人 KCC2 多肽 (SEQ ID NO:2):

```

MPNNLTDCEDGDGGANPGDGNPKESSFFINSTDTEKGKEYDGKN
MALFEEEMDTSMPMVSSLLSGLANYTNLPQGSREHEEAENNEGGKKKPVQAPRMGTFMG
VYLPCLQNIQFVILFLRLTWVVGIAGIMESFCMVFICCSCTMLTAISMSAIATNGVVP
AGGSYYMISRSLGPEFGGAVGLCFYLGTTFAGAMYILGTIEILLAYLFPAMAIFKAED
ASGEAAAMLNNMRVYGTCLVTCMATVVFVGVKYNKPALVFLGCVILSILAIYAGVIK
SAFDPPNFPICLGNRTLRSRHGFVCAKLAWEGNETVTTRLWGLFCSSRFLNATCDEY
FTRNNVTEIQIGIPGAASGLIKENLWSSYLTKGVIVERSGMTSVGLADGTPIDMDHPYV
FSDMTSYFTLLVGIYFVSVTGIMAGSNRSGDLRDAQSIPTGTILAIATTSAVYISSV
VLFGACIEGVVLRDKFGEAVNGNLVVGTLAWPSPWVIVIGSFFSTCGAGLQSLTGAPR
LLQAISRDLGIVPFLQVFGHGKANGEPTWALLLTACICEIGILIASLDEVAPILSMFFL
MCYMFVNLAQAVQTLRLTPNWRPRFRYYHWTL SFLGMSLCLALMFICSWYYALVAMLI
AGLIYKYIEYRGAEKWGDGIRGLSLSAARYALLRLEEGPPHTKNWRPQLLVLRVDQ
DQNVVHPQLLSLTSQKAGKGLTIVGSVLEGTFLFNHPQAQRAEESIRRLMEAEKVKG
FCQVVISSNLRDGVSHLIQSGGLGGLQHNTVLVGWPRNWRQKEDHQTWRNFIELVRET
TAGHLALLVTKNVSMFPGNPERFSEGSIDVWVIVHDGMLMLLPFLLRHHKVRKCKM
RIPTVAQMDDNSIQMKDLTTFYHLRITAEVEVVMHESDISAYTYEKTLMVMEQRSQ
ILKQMHMTKNEREREIQSITDESRSIRRKNPANTRRLRNVPETAGDSEEKPEEEVQ
LIHQDQAPSCPSSSPSGEPEGEGETDPEKVHLTWTKDKSVAEKNKGSPVPSSEGIK
DFFSMKPEWENLNQSNVRRMHTAVRLNEVIVKKSRAKLVLLNMPGPPRNRNGDENYM
BFLEVLTEHLDRVMLVRGGGREVITTIYS

```

人 KCC2 DNA (SEQ ID NO:1):

```

1 atgccaaca acctgacgga ctgaggagac ggcgatggg gagccaacc gggatgatg
61 aacccaagg aaagcagtcc ctcatcaac agcaccgaca cagagaagg aaaggat
121 gatggcaaga acatggcctt gtttgaggag gagatggaca ccagccctat ggtgtcctc
181 ttgctcagt gcctggccaa ctacaccaac ctgcccagc gaagtaggga gcatgaagag
241 gcagaaaaca atgagggtgg aaaaaagaag ccggtgcagg ccccacgcat gggcacctc
301 atgggcgtgt acctgcogtg cctgcagaac atctttggcg tcctcctct cctgcogctc
361 acctgggtgg tgggcattgc agcatcatg gtagtcctct gcatggtgt catctgctg

```

```

421 tcctgtacga tgctcacggc catctccatg agtgcaattg caacgaatgg tgttgtgcct
481 gctgggtggct cctactacat gatttccagg tctctggggc cagagtttgg ggggtgccgtg
541 ggctctgct tctacctggg cactaccttt gcaggagcca tgtacatcct gggcaccatc
601 gaaatcctgc tggcttacct ctcccagcc atggccatct tcaaggcaga agatgccagt
661 ggggaggcag cagccatgct gaacaacatg cgtgtttacg gcacctgtgt gctcacctgc
721 atggccactg tgggtgtttgt ggggtgtcaag tatgtcaaca agtttgcctt tgtcttctg
781 gggtgtgtca tctctccat cctggccatc tatgctgggg tcatcaagtc tgccttcgac
841 ccaccaact tcccgatctg cctcctgggt aaccgcacgc tgtctcgcca tggctttgat
901 gtctgtgcca agctggcttg ggaaggaaat gagacgggtg ccacacggct atggggcctt
961 ttctgctcct ctogcttct caacgccacc tgtgatgaat acttccccg aaacaatgtc
1021 acagagatcc agggcatccc tgggtgctgcc agtggcctca tcaaagagaa cctctggagc
1081 tcctacctga ccaagggcgt gattgtggag aggagtggga tgacctcggg gggcctggcc
1141 gatggcactc ctatcgacat ggaccacctt tatgtcttca gtgatatgac ctctacttc
1201 accctgctgg ttggcatcta ctcccctca gtcacagga tcatggctgg ttctaacgc
1261 tctggggacc tgagggatgc ccagaagtca atccccactg gcaccatcct ggccatcgcc
1321 accacctctg ctgtctacat cagctccgtt gttctgtttg gggcctgcat tgagggggtc
1381 gtctgcggg acaagtttgg cgaagctgtg aatggcaacc tcgtgggtggg cactctggcc
1441 tggccatctc catgggtaat tgtcatcgga tocttcttct ccacctgtgg ggctgggctg
1501 cagagcctca cgggggcccc acgctgctg caggccatct cgagggatgg cattgtgcc
1561 ttctctgagg tctttggcca tggcaaggcc aatggagagc cgacctgggc cctgctctg
1621 actgcctgca tctcgagat tggcatcctc attgcatccc tgcacgaggt gcccccatc
1681 ctctctatgt tcttctgat gtgtacatg tttgtgaatc tggcctgtgc agtgcagacg
1741 ctgctgagga cacccaactg gaggccacgc tttcgatatt accactggac cctctccttc
1801 ctgggcatga gcctctgcct ggccctcatg ttcactgct cctggatta tgactggta
1861 gccatgctca ttgctggact catctacaag tacattgagt accgtggggc agagaaggag
1921 tggggcgatg ggatacgagg totgtctctc agtgcggctc gctatgcctt cttacgctg
1981 gaggaagggc ccccacacac caagaactgg aggccacagc tgctgggtgt ggtgcgtgtg
2041 gaccaagacc agaattgtgt gcaccccag ctgctctcac tgacctcca gctgaaggca
2101 ggggaaggcc tgaccatcgt gggctctgtc cttgagggca cettctgga aatcatcca
2161 caggcccagc gggcagaaga gtctatcagg cgcctgatgg aggcagagaa ggtgaaggcc
2221 ttctgccagg tggatgatct ctccaactg cgtgatggcg tgtccatct gatccagtc
2281 gggggcctcg gggggctgca gcacaacact gtgcttgttg gctggccccg caactggcgc
2341 cagaaggaag atcatcagac gtggaggaac ttcattgagc tggctcggga aaccacagct
2401 ggccacttag ccctgctggt caccaagaa cgttccatgt ttctgggaa cctgagcgc
2461 ttctctgagg gcagctcga cgtttgtgg attgtgcacg atggaggcat gctcatctg
2521 ctgcccttcc tgctgcgga ccacaaggct tggcggaagt gcaagatgag tatcttact
2581 gtggcccaga tggatgacaa tagcatccag atgaagaagg atctgaccac atttctgtat
2641 catttacgca tcaactgcgga ggtcgaggtg gtggagatgc atgagagcga catctcagct
2701 tacacctatg agaagacgtt ggtgatggag cagcgttccc agatcctcaa acagatgcat
2761 ttaaccaaga atgagcggga gcgggagatc cagagtatca cagatgagtc acgaggtca
2821 atccggagaa agaatccagc caacacgcgg ctccgcctga acgtcccaga agagacggct
2881 ggtgacagtg aagagaagcc agaggaggag gtgcagctga tccacgatca gactgctccc
2941 agctgcccc a gcagctcccc gtccccaggg gaggagcctg agggggaagg ggagacagat
3001 ccggagaagg tgcattctac ctggaccaag gacaagtctg tggcagagaa gaataaggcc
3061 ccagtcctg tctcctctga gggcatcaag gacttcttca gcatgaagcc ggagtgggag
3121 aacttgaacc agtccaacgt gcggcgcatg cacacggccg tgcggctgaa cgaggtcatc
3181 gtgaagaaat cccgggagc caagcttgtt ttgctcaaca tgcctgggcc tccccgaa
3241 cgcaatggtg atgaaaacta catggagttt ctcgaggtcc tcacagagca cctggaccgg
3301 gtgatgctgg tccgcggtgg tggccgagag gtcatacca tctactctg agaaccaggt
3361 cctgccaccc gggcccagc gcgcccggcc cgcggctccg gagcctcgc cgcgcccc
3421 gccgctgtca ccgtttacat acagaccctg tgcccgtgtc ctggcccctt accccgtgc
3481 ctgaagcccg gaggccacgc ctgttggggc tgattcggag agggcgccc gccgcgaga
3541 gaccagagct cctcagtgcc agtttggccc ctgggtctt cgtgccctt ttctaagccc
3601 ggcctcgtct cgcggagga gacgtgcaa taaagttgg gagaaggcgc ggaaggaga
3661 ggagctgggg ccttggggac ccccagtag tccatgcggc ccattcctcc ccttcccact
3721 cccgcgcgg tectgctct gcgctctcc ggcgctgct cctggctccc ggcgagcgt
3781 aggccgcgg ggtgggaagg ccgcgcttgc cgtctccgcc gcccctctc gccgagcgt
3841 ggggcgcggg cggccgagcc tatacatagt gtacaggaga catcgctgtt attttaacg

```

图 9 (续)

```

3901 tccccatatt tatgtgacta gaagcgcaac agacttctcg ccatagtcga gctctcccgc
3961 tgggggcaact gcggggaggc gaggcctcgg gaagctgaat tttccttgac gtccaagagt
4021 ttgagagcga aagtgcctta ggcccaggcg ggggtcgtgg cctcgttccc tcgacacctc
4081 cgtcctgctc tcgcctcttc gccctttccg cgcgccttg gcttcccacc ctctctcca
4141 gtcttttcc gagatgaggt gagacaaggg tccaactttt cctggattcg cctcccagcg
4201 gacgtgagct tccactgagg ctgcagagac gcgagcaacc tcttctcatc ggctcttatg
4261 caagtgggg ccaggatagg ggaggggtgc tcctcaagag gaagaaaccg agaggcccgc
4321 gccccaccga ggaagcccc ccccggtgcc ttcgctgggg agcaggegtc tctcctcagt
4381 cggcttgtcg cctgctcccc gtatcccatg gctcctcgcc aaagactgaa attgtggagc
4441 tggaggcgc cccctcccc gagtttctc cctgggacaa gtgagggagg agggggccga
4501 ttctggttta ggggccggac cactgagag gcccagagc cgcctgat gtctctccc
4561 cgtccccatc tggcagctcc tgtctgcct gagggacca gccgccttct cctgctctg
4621 gggccgggccc tcgctgctta gcagcggcct ctactcctg ctcccgggga cctgggctg
4681 agggagggct ggagtcagca cgcgcttct ccttagcgcc tgtctgctc cctctaacta
4741 ggaccaggg cctttggctt cccagctca tccttggccc tccgctcca ccagcctggt
4801 ctgaggcgtg ctctgtcctt agagaagggc cgggtggcgg gtcccttcc cctagggcac
4861 attactaagg gggtcaggca ctgcatgctc gttccagcac catctgggac tgggtacagt
4921 acctccagcc ccagggcctt gacctgcgca cctagcttga catctcacgc acctcccaga
4981 gctggcgcca ctgagtaatc cggacctcac cacctctttt cctttgagcc caaggcagag
5041 ctagagctgg agctggcgcc acccagacag cgtcaggtgt ggctggggta ggtttggagg
5101 tctgccagtt acgccaagtc cctctgaga ttcgatcagg ggactggata gattcttca
5161 ggtactcaat caggaagctg gaggtgtag acaccagccc cctgcatcct tcagtagacc
5221 tcctctgaa caccacagcc aggtcctgcc ttctgggggc ctgaatattc cagagctgat
5281 gtgatgggct gtgcagaagg gggctgtatc aacatcaatt agggaaccaa agttgacta
5341 tctgggccc gattgtctgg ttggcaagag caaagtttcc gttgatgaaa cagacatccc
5401 acaacaaaaa cccaagtttt ctgtgctaca tgtgcaatat ttggtatgaa tgttatcaca
5461 agtcattcat caagttatct ttataatcac tgtagttaga tgttcatgt ccattcaagt
5521 gacttttatt ctgagtgcaa tatttcaata gcctttagt gataactagt gttgctttg
5581 tttagatgat ctatgtgcag ggcaatgcaa tgaagttgaa accccttgg aataggagag
5641 gttgcaaac aatcaagag tatttattac tattactgct attattatta ggctgcctt
5701 taattttcag tgtaagtgtt cagtatgcc catcctgcct cagtattgat cttgtgttct
5761 ttgtgccaat atgaaaagga gagggttgg tctttcctt attgttgaat gctcccattt
5821 aatgctttat ggcttttact gtattacttt tttagactcc cgtctgcaca aaatgcaata
5881 aaaataattt tattataaaa aaaaaa

```

图 9 (续)

小鼠 KCC2 (K-C1 协同转运蛋白 [Slc12a5])
polypeptide and DNA sequences

(Ehringer, M.A., 等人 (2001) Mamm. Genome 12 (8), 657-663;
ACCESSION: AF332064)

小鼠 KCC2 多肽 (SEQ ID NO:4):

MLNNLTDCEGDGGANPGDGNPKESSPFINSTDTEKGREYDGRN
MALFEEEMDTSPMVSSLLSGLANYTNLPQGSREHEEAENNEGGKKKPVQAPRMGTFMG
VYLPCLQNI FGVILFLRLTWVVG IAGIMESFCMVFICCSCTMLTAISMSAIATNGVVP
AGGSYYMISRS LGPEFGGAVGLCFYLGTTFAGAMYILGTIEILLAYLFPAMAIFKAED
ASGEAAAMLNMRVYGT CVLTCMATVVFVGVKYVNKFALVFLGCVILSILAIYAGVIK
SAFDPPNFPI CLLGNRTL SRHGFDVCAKLAWEGNETVTTRLWGLFCSSRLLNATCDEY
FTRNNVTEIQGIPGAASGLIKENLWSSYLTKGVIVERRGMPSVGLADGTPVDMHPYV
FSDMTSYFTLLVGIYF SVTGMAGSNRSGDLRDAQKS IPTGTILAIATTSAVYISSV
VLFGACIEGVVLRDKFGEAVNGNLVVGT LAWSPWVIVIGSFFSTCGAGLQSLTGAPR
LLQAISR DGI VPF LQVFGHGKANGEPTWALLLTACICEIGILIASLDEVAPILSMFFL
MCMYFVN LCAVQ TLLRTPNWRPRFRYYHW TLSFLGMSLCLALMFICSWYYALVAMLI
AGLIYKYIEYRGAEK EWGDGIRGLSLSAARYALLRLEEGPPHTKNWRPQLLVLRVDQ
DQNVVHPQLLSLTSQLKAGKGLTIVG SVLEGTFLDNHPQAQRAEESIRRLMEAEKVKG
FCQVVISSNLRDGVSHLIQSGGLGGLQHNTVLVGVWRNWRQKEDHQTWRNFIELVRET
TAGHLALLVTKNVSMFPGNPERFSEGSIDVWVIVHDGMLMLLPFLLRHHKVWRKCKM
RIPTVAQMDDNSIQMKDLTTFLYHLRITAEVEVVMHESDISAYTYEKTIVMEQRSQ
ILKQMH LTKNEREREIQSITDES RGSIRRKNPANPRRLNVP EETACDNEEKPEEEVQ
LIHDQSAPSCPSSSPSPGEEPEGERETDPEVHLTWTKD KSVAEKNKGPSFVSSEGIKD
FFSMKPEWENLNQSNVRRMHTAVRLNEVIVNKS RDAKLVL LNMPGPPRRNRNGDENYME
FLEVLTEQLDRVMLVRGGGREVITIYS

人 KCC2 DNA (SEQ ID NO:3):

1 gagcaagcga gcgagcggag aaggcgggca gaggggcgcg ggcgaagcgg cgcagccatc
61 ccgagcccgg cgccgcgcag ccaccatgct caacaacctg acggactgcg aggacggcga
121 tgggggagcc aaccccgggtg atggcaacc caaagagagc agtcccttca tcaacagcac
181 ggacacggag aagggcagag agtacgatgg caggaacatg gccctgtttg aggaggagat
241 ggacaccagc cccatggtat cctccctgct cagtgggctg gccactaca ccaacctacc
301 ccagggaggt agagagcatg aagaagcaga aaataatgag ggtggaaaaa agaagccggt

图 10

```

361 gcaggctcct cgaatgggca ccttcatggg .tgtgtacctg ccgtgcctgc agaacatctt
421 tgggtgcate ctcttcctgc ggctcacgtg ggtgggtgggc atcgcgggca tcatggagtc
481 cttctgtatg gtcttcattt gctgctcctg tacgatgctc acagccattt ccatggagtgc
541 aatcgcaacc aatgggtgtg tgcttctctg tggctcgtac tacatgattt ccaggctctct
601 gggcccggag tttgggggcg ccgtgggcct ctgcttctac ctgggcacca cctttgctgg
661 ggctatgtac atccttggca cgatcgagat cctgctggct tatctcttcc cagctatggc
721 catcttcaag gcagaagatg ccagtgggga ggcggccgcc atgctgaaca acatgccccg
781 gtatggcacc tgtgtgctca cctgcatggc caccgttgtc tttgtgggtg tcaagtacgt
841 caacaagttt gccttggctc tcttgggttg egtcatcctg tccatcctgg ccatctatgc
901 aggggtcate aagtctgcct tcgaccacc caatttcccg atctgcctcc tggggaaccg
961 cacgctgtct cgccatggct ttgatgtctg tgccaagctg gcttgggaag gaaatgagac
1021 agtgaccaca cggctctggg gccttttctg ctctcccgc ctctcaatg ccacctgtga
1081 tgagtacttc acccgaaaca atgtcacaga gatccagggc attcctgggtg ctgccagtg
1141 tctcatcaaa gagaacctgt ggagttctta cctgacaaa ggggtgattg tcgagagggc
1201 tgggatggcc tctgtgggce tggcagaccg taccccctga gacatggacc accctactgt
1261 cttcagtgat atgacctcct acttaccctt gctcgttgg atctacttcc cctcagtcac
1321 agggatcatg gctggctcaa accgatctgg agacctgagg gatgcccaga agtctatccc
1381 tactggaact atcctggcca ttgctaccac ctctgctgtc tacatcagct ctggttgttct
1441 gtttggagcc tgcatcgagg gggctcgtctt acgggacaag tttggggaag ctggtgaatgg
1501 caacttgggtg gtgggcaccc tggcctggcc ttctccctgg gtcatcgtca taggctctt
1561 cttctctacc tgtggggctg gattacagag cctcacaggg gccccacgtc tgctcagggc
1621 catctcccgg gatggcatag tgcccttctt gcaggctctt ggccatggca aagtgatgg
1681 agagccaacc tgggcgctgc tgcgtactgc ctgcatctgt gagatcggca tctcatagc
1741 ctccctggat gaggtcgcct ctatactttc catgttcttc ctaatgtgtt acatgtttgt
1801 gaaacttggct tgtgoggtgc agacgtgct gaggacaccc aactggaggc cacgatttcg
1861 ctattaccac tggactctct ccttccctgg catgagcctc tgccctggccc tcatgttcat
1921 ttgctcctgg tactacgcac tgggtggccat gctcattgcc ggactcattt ataagtacat
1981 cgagtaaccg ggggcggaga aggagtgggg ggatggaatc cgaggcctgt ctctcagtc
2041 agcacgctat gctctcttgc gcctggagga aggacctccg catacgaaga actggagggc
2101 ccagctgctg gtgctgggtg gtgtggacca ggatcagaac gtggtgcac cgcagctgct
2161 ctccctgacc tcccagctca aggcagggaa gggcctgacc attgtgggct ccgtccttga
2221 gggcaccttt ctggacaacc atccacaggc tcagcgggca gaggagtcta tcaggcgcct
2281 gatggaggct gagaaggtga agggcttctg ccaggtagtg atctcctcca acctgcgtga
2341 tgggtgtgtcc caactgatcc agtctggggg cctcggggga ttgcaacaca ataccgtgct
2401 ggtgggctgg cctcgcaact ggaggcagaa ggaggatcat cagacatgga ggaacttcat
2461 cgaactggtc cgggaaacta cagcggcca cctcgccctg ctggtcacca agaattttc
2521 catgtttccc gggaaacctg agcgttctc ggagggcagc attgacgtgt ggtggattgt
2581 gcacgacggg ggcattgctc tgcctgctgc cttcctgctg cgacaccaca aggtctggag
2641 gaaatgcaaa atgctgatct tcaccgtggc ccagatggac gataacagta tccagatgaa
2701 gaaggacctg accacgtttc tgtaccactt acgcattact gcagaggtgg aggtgggtgga
2761 gatgcatgag agcgacatct cggcatacac ctacgagaag acattagtaa tggagcaacg
2821 atctcagatc ctcaaacaga tgcacctcac caagaacgag cgggaacggg agatccagag
2881 catcacagac gactctcggg gctccattcg gaggaagaat ccagccaacc cccggctccg
2941 cctcaatggt cccgaagaga cagcgtgtga caatgaggag aagccagagg aggaggtgca
3001 gctgatccat gaccagagtg ctcccagctg ccctagcagc tcgccatctc caggggagga
3061 gcccaggggg gagaggggaga cagaccaga ggtgcatctt acctggacca aggataagt
3121 agtggcagag aagaataaag gccccagctc cgtctcctcc gagggcatca aggacttctt
3181 cagcatgaag ccggagtggg aaaacttgaa ccagtccaat gtacggcgca tgcacacagc
3241 tgtgcccgtg aacgaggtca tcgtgaataa atctcgggat gccaaagtat ttttgcctca
3301 catgcccggg cctccccgca accgcaatgg ggatgaaaac tacatggaat tcttggaggt
3361 cctcaactgag caactggacc ggggtgatgct ggtccgaggg ggcggccgag aggtcatcac
3421 catctactcc tgaaggccag gacctgccac tccggcccga gcggcccgg cccgcccgc
3481 ccagagccct cgccgcgct ccccgccgct gtcaccgttt acataagacc cagttgcca
3541 tgccctggcc cctttccttc ccgctgctg cagccctgag gccttgcctg tggggctga
3601 cccgcagggc ggccctgag gcccttttc tgagcctggt ctcgccccgc cggagc

```

图 10 (续)

大鼠 KCC2 多肽和 DNA 序列

(Payne, J.A., et al., (1996) J. Biol. Chem. 271 (27), 16245-16252; Gillen, C.M., et al., (1996) J. Biol. Chem. 271 (27), 16237-16244; ACCESSION: U55816)

大鼠 KCC2 多肽 (SEQ ID NO:6):

```
MLNNLTDCEDGDGGANPGDGNPKESSPFINSTDTEKGREYDGRN
MALFEEEMDTSMPVSSLLSGLANYTNLPQGSKEHEEAENNEGGKKKPVQAPRMGTFMG
VYLPCLQNI FGVILFLRLTWVVG IAGIMESFCMVFICCSCTMLTAISMSAIATNGVVP
AGGSYIMISRSLGPEFGGAVGLCFYLGTTFAGAMYILGTIEILLAYLFPAMAIFKAED
ASGEAAAMLNMRVYGTCVLTCMATVVFVGVKYNKFALVFLGCVILSILAIYAGVIK
SAFDPPNFPICLLGNRTLSRHGFVCAKLAWEGNETVTTRLWGLFCSSRLLNATCDEY
FTRNNVTEIQGIPGAASGLIKENLWSSYLTKGVIVERRGMPVSVGLADGTPVDMHPYV
FSDMTSYFTLLVGIYFPSVTGIMAGSNRSGDLRDAQKSIPTGTILAIATTSAVYISSV
VLFGACIEGVVLRDKFGEAVNGNLVVGTLAWPSPWVIVIGSFFSTCGAGLQSLTGAPR
LLQAISR DGI VPF LQV FGHG KANGEPTWALLLTACICEIGILIASLDEVAPILSMFFL
MCYMFVN LACAVQTL LRTPNWRPRFRYYHW TLSFLGMSLCLALMFICSWYYALVAMLI
AGLIYKYIEYRGAEK EWGDGIRGLSLSAARYALLRLEEGPPHTKNWRPQLLVLRVDQ
DQNVVHPQLLSLTSQLKAGKGLTIVG SVLEGTFLDNHPQAQRAEESIRRLMEAEKVKG
FCQVVISSNLRDGVSHLIQSGGLGGLQHNTVLVGVWPRNWRQKEDHQ TWRNFIELVRET
TAGHLA L LVTKNVSMFPGNPERFSEGSIDVWVIVHDGGM LMLLPFLLRHHK VWRKCKM
RIFTVAQMDDNSIQMKDLTTFLYHLRITAEVEVEMHESDISAYTYEKT LVMEQRSQ
ILKQMH LTKNEREREIQSITDES RGSIRRKNPANTRLRLNVP EETACDN EEKPEEEVQ
LIHDQSAPSC PSSSPSPGEEPEGEGETDPEKVHLTWTKDKSAAQKNKG PPSVSSEGIK
DFFSMKPEWENLNQSNVRRMHTAVRLNEVIVNKS RDAKLVLLNMPGPPRRNRNGDENYM
EFLEVLTEQLDRVMLVRGGGREVITIYS
```

大鼠 KCC2 DNA (SEQ ID NO:5):

```
1 cgcctccacg gagagcaagc gacagagctc gagcaagcga gcgagcggcg aaggcgggca
61 gaggggcgcy ggcgaagagg cgcagccatc cgcagcccgg cgccgcgcag ccaccatgct
121 caacaacctg acggactgcy aggacggcga tgggggagcc aaccggggtg acggcaatcc
181 caaggagagc agccccttca tcaacagcac ggacacggag aaggggagag agtatgatgg
241 caggaacatg gccctgtttg aggaggagat ggacaccagc cccatggtat cctccctgct
```

图 11

```

301 cagtgggctg gccaaactaca ccaacctgcc tcaggggaagc aaagagcagc aagaagcaga
361 aaacaatgag ggcggaaaga agaagccggt gcaggcccca cgcaggggca ccttcatggg
421 cgtgtacctc ccgtgcctgc agaacatctt tgggtttatc ctctttctgc ggctcacttg
481 ggtggtggga atcgcaggca tcatggagtc cttctgcatg gtcttcatct gctgctcctg
541 cacgatgctc acagccattt ccatgagcgc aattgcaacc aatggtggtg tgctgctgg
601 tggctcctac tacatgattt ccaggtctct gggcccgagc ttggggggcg ccgtgggcct
661 ctgcttctac ctgggcaacta cctttgctgg ggctatgtac atcctgggca ccatcgagat
721 cctgctggct tacctcttcc cagcgtatgg catcttcaag gcagaagatg ccagtgggga
781 ggagccgccc atgttgaata acatgcccgg gtatggcacc tgtgtgctca cctgcatggc
841 taccctagtc tttgtgggcg tcaagtacgt gaacaagtgt gccctggctc tcctggggtg
901 cgtgatcctc tccatcctgg ccatctacgc aggggtcatc aagttctgct tgcattccac
961 caatttcccg atttgcctcc tggggaaccg cacgctgtct cgccatggct ttgatgtctg
1021 tgccaagctg gcttgggaag gaaatgagac agtgaccaca cggctctggg gcctattctg
1081 ttctcccgc ctctcaatg ccacctgtga tgagtacttc acccgaaaca atgtcacaga
1141 gatccagggc attcctgggtg ctgcaagtgg cctcatcaaa gagaacctgt ggagttccta
1201 cctgaccaag ggggtgatcg tggagaggcg tgggatgccc tctgtgggcc tggcagatgg
1261 taccctagtc gagatggacc acccctatgt ctctcagtgt atgacctcct acctcaccct
1321 gcttgttggc atctatttcc cctcagtcac agggatcatg gctggctcga accggtccgg
1381 agacctgctg gatgcccaga agtctatccc tactggaact atcttggcca ttgctacgac
1441 ctctgctgct tacatcagct ctggttgttct gttcggagcc tgcactgaag gggctgctct
1501 acgggacaag tttggggaag ctgtgaatgg caatctgggt gtgggcaccc tggcctggcc
1561 ttctccttgg gtcattgtca taggctcttt ctctctacc tgcggagctg gactacagag
1621 cctcacaggg gccccacgcc tgctgcaggc catctcccgg gatggcatag tgccttctct
1681 gcaggtcttt ggccatggca aagccaacgg agagccaacc tgggcgctgc tgctgactgc
1741 ctgcatctgt gagatcggca tctcctcgc ctocctggat gaggtcgccc ctatccttct
1801 catgttcttc ctgatgtgtt acatgtttgt gaacttggct tgcgcggtgc agacactgct
1861 gaggacgccc aactggaggc cacgcttccg atattaccac tggaccctct ccttctggg
1921 catgagcctc tgccctggccc tgatgttcat ttgctcctgg tattatgctg ttgtagctat
1981 gctcatcgct ggccctcatct ataagtacat ctagtaccgg ggggcagaga aggagtgggg
2041 ggatgggatc cgaggcctgt ctctcagtc agctcgctat gctctcttgc gtctggagga
2101 aggacccccg catacaaaga actggaggcc ccagctactg gtgctggtgc gtgtggacca
2161 ggaccagaac gtggtgcacc cgcagctgct gtccttgacc tcccagctca aggcagggaa
2221 gggcctgacc attgtgggct ctgtccttga gggcaccttt ctggacaacc accctcaggc
2281 tcagcgggca gaggagtcta tccggcgct gatggaggct gagaaggatg agggctctctg
2341 ccaggtagtg atctcctcca acctgcctga cgggtgtgtcc cacctgatcc aatccggggg
2401 cctcgggggc ctgcaacaca aactgtgct agtgggctgg cctcgcaact ggcgacagaa
2461 ggaggtatc cagacatgga ggaactcat cgaactcgtc cgggaaacta cagctggcca
2521 cctcgcctct ctggtcacca agaattgttc catgttccc gggaaacctg agcgttctc
2581 tgagggcagc attgacgtgt ggtggatcgt gcacgacggg ggcagctca tgetgtgccc
2641 ctctcctctg cgtcaccaca aggtctggag gaaatgcaa atgctggatct tcacctggc
2701 gcagatggat gacaacagca ttcagatgaa gaaagacctg accacgttct tgtaccactt
2761 acgaattact gcagaggtgg aagtctgga gatgacagag agcgacatct cagcatacac
2821 ctacgagaag acatttggtaa tggacaacag ttctcagatc ctcaaacaga tgcacctcac
2881 caagaacgag cgggaacggg agatccagag catcacagat gaatctcggg gctccattcg
2941 gaggaagaat ccagccaaca ctcggtccg cctcaatggt cccgaagaga cagcttgtga
3001 caacgaggag aagccagaag aggaggtgca gctgatccat gaccagagtg ctcccagctg
3061 ccctagcagc tcgcccgtctc caggggagga gcctgagggg gagggggaga cagaccaga
3121 gaaggtgcat ctcacctgga ccaaggataa gtcagcggct cagaagaaca aaggccccag
3181 tcccgtctcc tcggagggga tcaaggactt ctctcagcat aagccggagt gggaaaactt
3241 gaaccagtcc aacgtgcggc gcatgcacac agctgtcggc ctgaacgagg tcatcgtgaa
3301 taaatcccgg gatgccaagt tgggtgtgct caacatgccc gggcctccc gcaaccgcaa
3361 tggagatgaa aactacatgg aattcctgga ggtcctcact gagcaactgg accgggtgat
3421 gctggtccgc ggtggtggcc gagaggtcat caccatctac tctgaaggc caggacctgc
3481 cactccggcc cgagcagacc cggcccggg .ccccggagcc ctgcggcgc ctcccgcgc
3541 ctgtcaccgt ttacataaga ccccggtgccc cgtgcccctgg ccctcttccc tcccgtgccc
3601 tgccggcccgg aggccttggc cgtcggggct gaccggagg gggcccctg ggcccctttt
3661 ctgagcccgg cctcgccctg ccggagtaga cgttgcaata aaggtggcga ggcggcgtgg
3721 agaggagcgg aacctggtc ccggccggg gagccccgag cccgtcctc cccacgcccc

```

图 11 (续)


```

3781 gccgcgctcc ccccggaccc tggtcgctga gcccggggcgc cgctcggctg cgctatacat
3841 agtgtacagg agacatcgag tgtatTTTTA atgtcccatc atttctgtaa actagaaacg
3901 caacggactc ctccgacagg ccgcgctctc cccgctgcgg gcgcccagga aggcggagac
3961 ccgggaagcc agggttccct gcgctcccca gctgagagcc aagtgcTTTA aggcggcgc
4021 tctccttcc cttcctgtc cacggcccgg gcttccctct cttccctcca gttcttggcg
4081 aacacagggtg aagccctgcc cggTgccttc gtggaggagc agcgtctct cctctgttgg
4141 cttgcgcctt gctccccctg tcccgTgget cctcgccaaa gactgaattt gtggagctgg
4201 agggcacacc ctccccactt tccttctctg gacaggTgag gggccaatgc cagtctaggg
4261 gccgactcac aggaggcctc gcgcagcctc ttggTcccca ctctgcaagt cctgcctggg
4321 gaccagcccc ccctggTggt tctggggcgg agctttgctg cctagcagca agtccttagt
4381 tactgtctcc agataccagg acctggagta gggaaTggag tcatatgggt tcagttgttc
4441 ctggcgcttc tctgccccct gctccccctc tcccctctc gtaggacaca aggactttgg
4501 cttcttTaa tcatccttgg cgcttccgct ccaccacgcc cacctgtggg gaggagccct
4561 cagccctaga gaggcgTtTg gctggTtccc ttccccagg gcacgttact aagaggacag
4621 gcactgcatg ctcttTaaG gcgccctctg gactgggtac agTgcctcca gcccagggc
4681 cctggTctgc gcacctagtt agacatcatt gccactcca gggccagggc cactagctga
4741 cctcaccacc ttttctctg agcccaaggc agagagagct gcagctggTg ccatctagac
4801 aggcTcaagt gtggccagtG gcaggGctcg agggccactg ccctgttGct tggctcagga
4861 cctctctgag atttgatggg gactggatat tcttccaggT agtagccatc aagtcggaag
4921 tgttggaccc aggacctgac attcctTcaa gactgccctc ccttGctgtg gttttgcctt
4981 ttggggcaag agaggggctg ggcaaacggg gaggaggcag tatcaacacc gattagggaa
5041 ccaaagTtgc actacctggg ccagcctct ggTtggcaag agcaaagTtT ctgTtgatga
5101 aaacaaacag cccacaacaa cccccccc cccgTtttct gtgctccatg tgcaatattt
5161 gttatgaacc ttgtgtcgtt caagtcaCct ttataatcac tgtagctaga tgttccatgt
5221 ccataccaggT gactttactc tgagtGcaat atttcaatag cctggtagtg agaagagtgt
5281 tgcttttGtt tcagccgacc tatgtgcagg gcaatgcaat gcagtccaaa acccttGtaa
5341 ataggagagg ttgcaagcca aatcaagagt atttatcgTt attactatta ttattagggc
5401 tgcttTaat tttagtgttT cggTatttct catcctgcct cggTattgat cgtgtgtct
5461 ctgtgccaat atgcaaagga gaggatcagT tctttccttT actgttgaat gctcccattt
5521 actgcttTaa ggcttttact gtgttcattt tttagatacc tgtctg

```

图 11 (续)

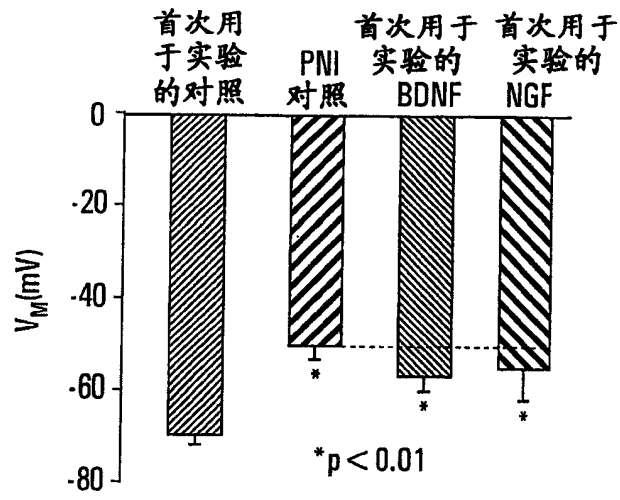


图 12

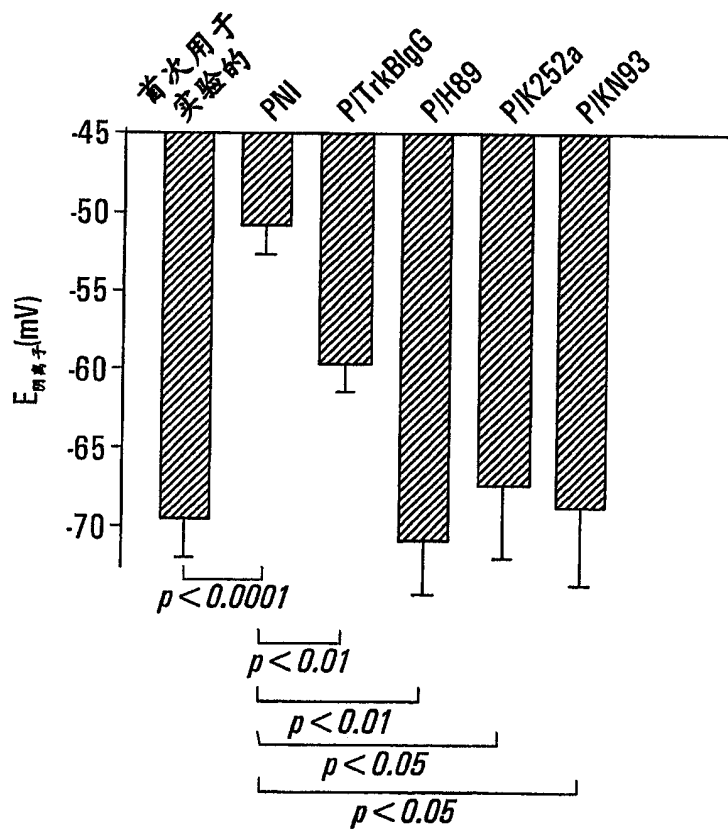


图 13

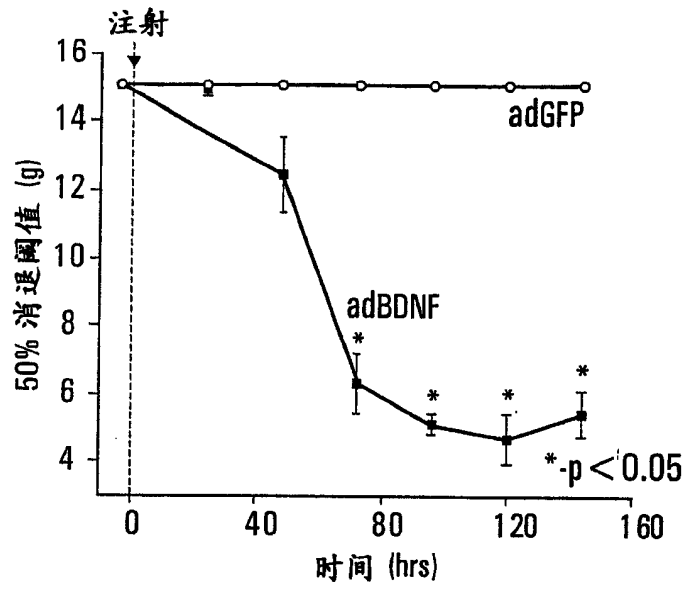


图 14

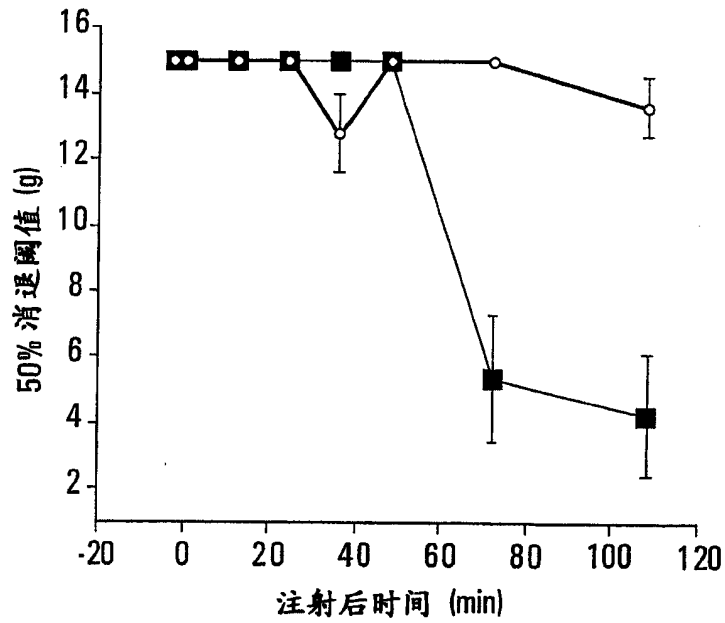


图 15

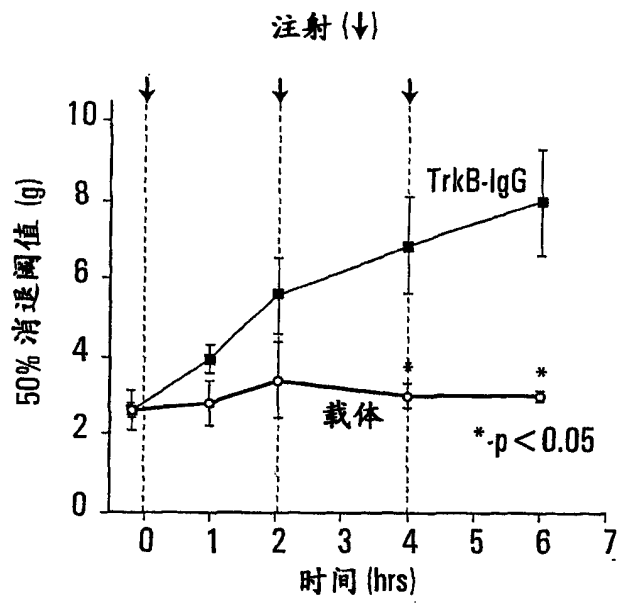


图 16

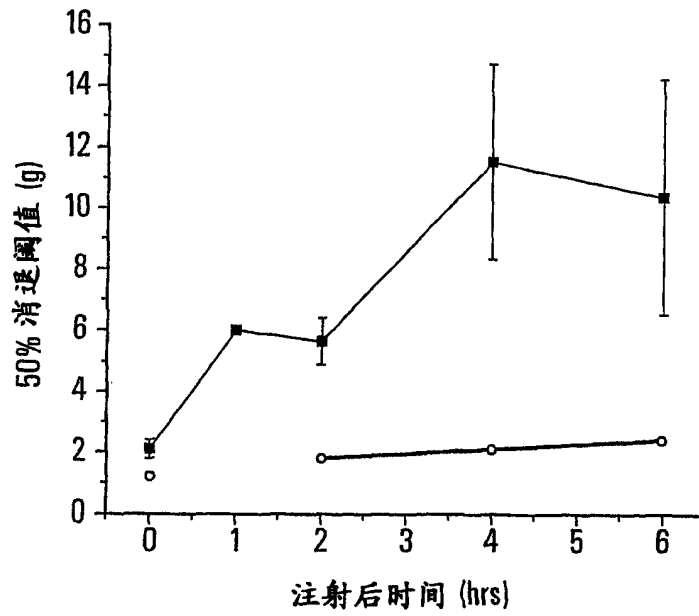


图 17