



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103097402 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201080066642. 1

(22) 申请日 2010. 09. 23

(30) 优先权数据

261-2010 2010. 03. 23 CL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 11. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2010/054298 2010. 09. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/117685 ES 2011. 09. 29

(73) 专利权人 拉弗朗特拉大学

地址 智利特木科

专利权人 智利大学

圣保罗联邦大学

安德罗玛克实验室股份有限公司

(72) 发明人 F·罗梅罗梅希亚

R·桑切斯古铁雷斯

E·布斯托斯奥夫雷贡 A·德米兰达

A·鲁道菲芳泰尼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006. 01)

C12N 15/12 (2006. 01)

A61K 38/10 (2006. 01)

A61K 38/17 (2006. 01)

A61P 15/16 (2006. 01)

A61P 15/18 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2009083808 A2, 2009. 07. 09, 全文.

Jorge Parodi et al., Synaptic effects of low molecular weight components from Chilean Black Widow spider venom.

《NeuroToxicology》. 2008, 第 29 卷 (第 6 期), 第 1121-1126 页.

审查员 王奇

权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

源自蜘蛛毒素的避孕肽

(57) 摘要

本发明涉及具有避孕性质的活性试剂。所述活性试剂是来自蜘蛛 *Latrodectus mirabilis* 的毒素的分子级份。活性试剂是具有 SEQ ID NO:1 的序列或与其至少 85% 相似的序列的肽, 其是通过化学合成或重组 DNA 技术获得的。在优选实施方式中, 具有避孕性质的活性试剂是具有 10 至 30 个氨基酸、优选 20 个氨基酸的肽。所述优选实施方式通过 SEQ ID NO:2 的序列或与其至少 85% 相似的序列例示, 其是通过化学合成或重组 DNA 技术获得的。本发明还涉及获得避孕肽的方法, 其包括在微生物中克隆核苷酸序列。避孕药物组合物包括至少一种如上所述的肽和一种或多种药学上可接受的载体。最后, 本发明涉及肽的用途, 其可用于制备适合用作避孕药剂和用作杀精子试剂的药物。

1. 避孕肽,其由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成。
2. 编码根据权利要求 1 的避孕肽的核苷酸序列,其中所述序列为 SEQ ID NO:4。
3. 获得根据权利要求 1 的避孕肽的方法,其中所述方法包括在微生物中克隆权利要求 2 的核苷酸序列。
4. 获得根据权利要求 1 的避孕肽的方法,其中所述方法包括通过 t-Boc 型化学合成法获得所述肽。
5. 避孕药物组合物,其中所述组合物包含根据权利要求 1 的肽和一种或多种药学上可接受的介质。
6. 根据权利要求 5 的避孕药物组合物,其中所述药学上可接受的介质选自:水、甘油、丙二醇、羟甲基纤维素、尿素醛、磷酸二氢钠、三乙醇胺、carcomer、聚丙烯酸、磷酸氢二钠、尼泊金丙酯和尼泊金甲酯。
7. 权利要求 1 的避孕肽的用途,其中所述肽用于制备用作避孕药剂的药物组合物。
8. 权利要求 1 的避孕肽的用途,其中所述肽用于制备用作杀精子剂的药物组合物。

源自蜘蛛毒素的避孕肽

发明领域

[0001] 本发明涉及具有避孕活性的肽。具体地,所述肽获自来自蜘蛛 *Latrodectus mirabilis* 的毒素的分子级份。

[0002] 发明背景

[0003] 避孕是使用不同的方法防止进行性行为时受精或怀孕。目前,有不同的方法来避免受精,其可分为屏障法和化学或激素法。

[0004] 杀精子剂是杀死或灭活精子的化学化合物,是化学方法中最主要的方法之一。

[0005] 从生理角度来看,杀精子剂必须影响精子运动性或通过影响电容性应答 (capacitive response),通过阻断与完全精子成熟相关的任何离子物质(例如钙)的特定电流来改变膜电位,阻断孕酮受体或作为精子的趋化成分的物质的受体。

[0006] 在一些国家已被使用的杀精子剂之一是壬苯醇醚-9,一种生物有机分子,其主要作为膜结构的生物去污剂来发挥其作用。其引起构成膜屏障的脂质的部分消化。通过这种方式,该生物去污剂引起膜上形成微孔,破坏分隔细胞内和细胞外空间的屏障,这最终建立引起细胞死亡的跨膜热力学平衡。壬苯醇醚-9的药学形式包括被用作屏障避孕法(安全套)的添加剂,作为润滑剂和杀精子剂的一部分;阴道胚珠 (vaginal ovules) 含有 168mg 该物质;避孕海绵含有 1,000mg 该物质;用于阴道的润滑凝胶和阴道隔。该分子的副作用已经使美国食品与药品管理局 (FDA) 拒绝批准其使用。这些不希望的效应的产生是由于壬苯醇醚-9 引起其它细胞组织(在女性中为阴道粘膜、子宫颈和大阴唇及小阴唇的衬膜;在男性中为龟头的被覆上皮和尿道外口的被覆上皮的表面)中的临床环境刺激,炎症和角化病。因此,当该分子被应用至夫妻之一或夫妻二人的生殖器区域时,感染性传播疾病 (STD) 的概率增大,一些 WHO 报告已经将壬苯醇醚-9 的反复使用与尿道感染联系起来。例如,润滑凝胶已经被设计为在阴道内使用。然而,一些人在直肠内使用这些凝胶,这将促进直肠上皮的破坏,因为存在壬苯醇醚-9 (Phillips DM et al. 2000)。

[0007] 杀精子剂可以是天然的或合成的。天然杀精子剂的例子是棉酚。从 1950 年以来,在中国即从棉籽中提取棉酚。该产物是强有力的男性避孕药,因为其竞争性抑制乳酸脱氢酶,该酶在精细胞的产生中具有重要意义。其使用浓度为 75 至 100 μ g,每月 2 次。与该分子结构相关的问题是其在受试者中引起化学不孕,因此其不能作为化学杀精子剂被专利化,并且其还引起低钾血症,消化系统中的效应,疲乏和麻痹(在极端情况下)。

[0008] Reddy et al., "Antimicrobial peptides: premises and promises" *International Journal of Antimicrobial Agents* 24(2004) 536 - 547 进行的工作描述了抗微生物肽作为避孕药的潜在应用,其改变通过精子膜的离子流动。该工作提及爪蟾抗菌肽 (magainin)-A 和乳链球菌素 (nisin) 作为此类肽的实例。然而,没有提及从 *Latrodectus mirabilis* 毒素的级份获得天然或合成类似物肽。

[0009] Yeung 等人在 "Effects of the ion-channel blocker quinine on humansperm volume, kinematics and mucus penetration, and the involvement of potassium channels" *Molecular Human Reproduction* Vol. 7, No. 9 pp. 819-828, 2001 中描述了奎宁对

于不同离子通道的效应,特别是对于细胞体积的影响。他们提及:所述通道可以是潜在避孕药的靶标,但是没有给出应用实例,也没有提示具有相似作用的其它的肽。特别地,没有提及来自 *Latrodectus mirabilis* 毒素的提取物。

[0010] 专利申请 EP448464A1 描述了使用蛋白 C3、C3b 或 iC3 或其片段测定精子是否有顶体反应的方法。该文献描述了针对所述蛋白或蛋白片段的抗体可用作男性或女性避孕疫苗。虽然该文献提及了肽或蛋白替代物,但其目标是产生避孕疫苗,其与本发明是不同的,本发明涉及基于来自 *Latrodectus mirabilis* 毒素的提取物的杀精子剂或基于从所述提取物获得的核苷酸序列的合成肽。

[0011] 美国专利 US6897291B1 描述了可用于鉴定潜在地可用作避孕药的分子,然而该文献没有描述新的避孕药或杀精子剂分子,而是仅描述了鉴定所述分子的方法。

[0012] 澳大利亚专利 AU772403B2 描述了基于 FSP95 的多肽,FSP95 是位于精子尾巴中的蛋白,一旦精子获能,其对于精子运动性具有作用。提及了所述肽的用途与避孕方法,但是所述公开物中没有提供关于它们的有效性的信息,因为没有描述生物学数据。

[0013] 美国专利申请 US20040157292-A1、US20090104604-A1、US20060257868-A1、US20090249499-A1 描述了不同的离子通道(分别是 CatSper1、CatSper2、CatSper3、CatSper4)。所述通道用于诊断不育,所有这些文献提及了包含所述通道的抑制剂的制剂作为可能的避孕药的用途。特别地,提及了针对所述离子通道的抗体,但是没有提示或提及避孕肽。

[0014] 美国专利申请 US20070105188A1 描述了鉴定潜在避孕分子的方法,但没有描述此类分子。

[0015] 总之,现有技术中没有具有杀精子性质的可用于制备有效的药物产品来抑制精子的肽、有机或免疫抑制剂分子。

附图说明

[0016] 图 1:野生型肽的氨基酸序列(上部)和从所述肽设计的 3 个合成类似物。第三行,被称作 Ac-[Ala43]-Atx41-62-NH₂,显示了具有杀精子活性的被用于进行精子运动性测定的类似物的序列,其序列显示于 SEQ ID NO:2。

[0017] 图 2:总毒素(Vt)、级份(F)和设计的类似物在选择的人类精子中的制动效应(游上来):在 HTF 培养基中温育 45 分钟(Log atx:测定的杀精子剂的浓度(mg/ml)的对数)。类似物的 IC₅₀ 是 39.81 μg/ml。总毒素的 IC₅₀ 是 17.8 μg/ml。

[0018] 图 3:曲线显示了融合于雌性配子(仓鼠卵母细胞)的纹膜中的人类精子(sp)的数目。使用了 Yanagimachi et al. (1976) 的技术,其为用于测试精子能育性的分离方法。每次进行一式三份重复,每组 5 个卵母细胞(n=15 个卵母细胞/组);对照组(中空条柱)中挤入卵母细胞的纹膜的精子的平均数目是 2.75,当把含有总毒素(灰色条柱)或肽类似物(黑色条柱)的培养基放入精液中时,粘附的精子的数目小于 1(对于实验中所用的相同的卵母细胞群体)。这清楚地证明了在存在总毒素和肽类似物的情况下,精子的能育性分别降低 90±0.1% 和 82±0.3%。实验中所用的浓度是之前从进行性精子运动性剂量应答曲线(图 2)计算得出的 IC₅₀。

[0019] 发明简述

[0020] 为了更好地理解本发明的描述,非获能的精子是无活性的细胞配子,其需要在从无活性细胞到有功能细胞的转化过程中经历生物化学和电生理学变化,该过程被称作获能(capacitation)。

[0021] 本发明涉及从来自蜘蛛 *Latrodectus mirabilis* (通用名:黑寡妇或红腹蜘蛛) 的毒素获得的分子级份。所述分子级份使得可以开发一组具有生物药物作用的合成肽产品,包括生物化学和电生理学变化,其通过改变能育性获能潜力而影响成熟的射出的精子(阻止精子获能)。因此,所述生物药物作用对应于避孕作用,其中人类精子的能育性应答被抑制。

[0022] 本发明的避孕药的活性物质诱导精子中的生物化学改变,涉及细胞内 pH 变化,细胞内一氧化氮生成水平的改变,诱导细胞内 Ca^{2+} 浓度的改变,线粒体电位和膜电位的改变,以及细胞内钾和钙离子电流的改变。

[0023] 肽杀精子剂,对应于 *Latrodectus mirabilis* 毒素的分子级份中发现的肽的修饰,是可容易合成的低分子量化合物 (2837Da),其作用于钙和钾运动性膜机制,所述机制影响精子的能量和运动性质并抑制它们的能育性。

[0024] 活性物质是 20 个氨基酸的水溶性肽,其可使用冷冻干燥技术结晶。活性物质可包括在用于表面使用的凝胶的制剂中或组合于加入到安全套中的油性制剂中。

[0025] 本发明的活性试剂影响能育性潜力而不改变细胞膜的完整性。活性物质作为药物试剂发挥作用,其抑制成熟的被射出的精子的电容性应答并将此类精子转化为非能育性配子。

[0026] 发明详述

[0027] 本发明涉及具有避孕性质的活性试剂。所述活性试剂对应于来自蜘蛛 *Latrodectus mirabilis* 的毒素的分子级份。特别地,活性试剂是具有 SEQ ID NO:1 的序列或与其至少 85% 相似的序列的肽,其是通过化学合成或通过重组 DNA 技术获得的。

[0028] 在优选实施方式中,具有避孕性质的活性剂是具有 10 至 30 个氨基酸、优选 20 个氨基酸的肽。所述实施方式通过 SEQ ID NO:2 所示的序列或与其至少 85% 相似的序列例示,其是通过化学合成或通过重组 DNA 技术获得的。

[0029] 来自 *Latrodectus mirabilis* 的毒素的天然结构具有高分子量 (7843Da, SEQ ID NO:1) 并具有 3 个半胱氨酸桥(如图 1 所示,其在上部显示了天然肽和设计的类似物肽)。所述结构使得天然肽在生物技术无法被转化为药物,因为蛋白折叠和正确形成二硫桥方面的内在问题。因此,分离了包含活性物质的片段,将位置 43 处的半胱氨酸替换为丙氨酸,从而除掉二硫桥以获得“线性”肽。

[0030] 设计的类似物具有线性的四级和二级结构。修饰的肽(SEQ IDNO:2)的分子表面上的电荷分布使得与细胞膜的粘附是非常有效率的,这使其在最大剂量能够影响 100% 的精子(图 2)。细胞膜具有对于药物结合敏感的受体或离子通道,其中主要分子具有电荷(由于通道的开启诱导的去极化)。

[0031] 在另一个优选实施方式中,杀精子剂活性试剂的使用也被考虑到用于制备组合物,其用作安全套、阴道胚珠、避孕海绵、阴道润滑凝胶和隔、阴道膜或增压胶和表面霜剂中的润滑剂和杀精子剂。

[0032] 包含活性试剂的组合物除其它成分之外还包括凝胶成分,其被添加至安全套的内

侧,或胚珠形式的凝胶-溶胶,于 37° C 溶解于阴道中。

[0033] 包含本发明的肽的药物组合物可包含一种或多种选自下列的药学上可接受的赋形剂或介质:溶剂、稀释剂、悬浮剂、乳化剂、抗氧化剂、药学防腐剂、着色剂、芳香剂、介质、赋形剂油性基底,例如:水、甘油、丙二醇、羟甲基纤维素、尿素醛、磷酸二氢钠、三乙醇胺、carcomer、聚丙烯酸、磷酸氢二钠、尼泊金丙酯、尼泊金甲酯等。

[0034] 上述赋形剂列举仅是为了示例性目的,不是意在限制本发明的范围,其中杀精子剂的活性物质对应于本发明的肽,如随附的权利要求中所述。

实施例

[0035] 实施例 A:从 *Latrodectus mirabilis* 毒素获得具有杀精子活性的活性物质

[0036] 为了获得毒素,需要从蜘蛛 *Latrodectus mirabilis* 中提取包含毒素提取物的毒腺,其包含 2 至 4 μ l 毒素/腺。为此,通过使用干冰将动物冷击而将其杀死。从螫肢(携带那些腺的结构)提取腺。将腺等分于含有 200 μ l 蒸馏水的冷环境下(-4° C)的 2.5ml 的 Eppendorf 中。将通过这种方式获得的生物材料储存于冷室(-20° C)中的密闭容器中,以便随后进行分级处理和冷冻-干燥过程。

[0037] 粗提取物的纯化这样进行:将粗制 *Latrodectus mirabilis* 毒素在 Sephadex G-50 上进行色谱,回收率 85%,将每个汇合物标记为 Arachnotoxin=Atx 1, 2, 3, 4。然后,将级份通过 HPLC 柱进行第二次色谱。分离峰并将其内容物冷冻干燥。产率计算为每个级份中获得的毫克数/100 毫克用于纯化的粗制毒素。在纯化肽时,使用了制备型 Waters 色谱系统(型号 Delta Prep 4000),其偶联于 UV-VIS 检测器(型号 486)、级份收集器 Pharmacia LKB-Frac-200 和记录模块 Servogor 120。

[0038] 所使用的实验设定为:

[0039] 柱: Vydac C18(10x250mm), **300 Å**, 150 μ m

[0040] 溶剂: A:0.1%TFA/H₂O

[0041] B: 0.1%TFA-60%ACN/H₂O

[0042] 梯度: 1-61%B,在 60 分钟内

[0043] 流速: 10mL/分钟

[0044] 检测波长:220nm

[0045] 在被鉴定为 F50 的级份(在色谱中获得的)中,分离了 7850Da 的片段,将其纯化并测序,序列为 69 个氨基酸(SEQ ID NO:1)。使用 BLAST 分析该 69 个氨基酸的链,其显示出与获自蜘蛛 *Latrodectus tredecimguttatus* 的 α -黑寡妇蜘蛛毒素(latrotoxin)的末端链的高相似度。使用末端的 20 个氨基的片段(从 Ser41 至 Lys52)(高度保守部分),构建了肽类似物,将 43 位的半胱氨酸替换为丙氨酸,从而除掉二硫桥以获得“线性”肽。

[0046] 使用固相合成法人工合成用于本工作的肽。对于该方法,在作为固体支持物的树脂 MBAR、BAR 和 Rink 上使用 t-Boc 和 Fmoc 法。使用 2.5 倍过量的 Boc-aa 和 DIC/HOBt 的 DCM/DMF 溶液(按体积 1:1)偶联 1 小时,并使用 Kaiser 测试法监控。如果必要,使用 2.5 倍过量的 Boc-aa 和 TBTU 和/或 BOP 与过量的 DIEA(pH 为 8.0-9.0)的 DMSO/NMP 溶液(按体积 1:4)再偶联 1 小时。如果必要,在一般合成中,进行 3 次连续再偶联,然后进行阳性茚三酮测试。最后,使用醋酸酐的 DMF 溶液(按体积 1:4)使肽树脂进行 20 分钟的乙酰化反

应。

[0047] 实施例 B:测定 SEQ ID NO:1 的野生型肽对于人类精子的杀精子效应

[0048] 通过测定人类精子的精子运动性来测定野生型肽和构建的类似物的杀精子效应。为此,将 15mL HTF-0.1%BSA 介质(0.02g BSA 在 20mL HTF 中)和 3mL HTF-1%BSA 介质(0.04g BSA 在 4mL HTF 中)置于试管中,并在 37° C 温育。然后,将 2.6mL 的人精子样品温育 25 分钟直至液化。一旦液化,将样品分入 3 个 15mL 的锥形管中,每个管中含有 2mL 温的 HTF-0.1%BSA。将 860 μ L 液化的精子垂直地加入每个管的底部,轻微吸液以混匀混合物,避免形成气泡。除掉大的结块。然后,将样品在 1,800rpm 离心 8 分钟,弃上清,使用移液枪头只在管壁处仅触及介质表面,吸出液体。将沉淀重悬于 3mL HTF-0.1%BSA,打散,然后在 1,800rpm 离心 10 分钟,然后除去上清液。将由此获得的沉淀物重悬于 1mL 温的 HTF-1%BSA 中,管处于垂直位置,并轻轻地加入介质。然后,将制备物在 37° C 温育 1 小时,管倾斜 45° 角(游上来)。完成该阶段之后,除掉精子云状物,将上清液组合,然后在 1,800rpm 离心 8 分钟,弃上清。然后计数精子,达到约 10,000,000 个所选精子/mL(10×10^6 /mL)的数值。将不同浓度的总毒素和色谱纯化中获得的不同毒素级份以及构建的类似物肽加入之前选择并计数的精子样品中,在 HTF 介质中在 37° C 温育 45 分钟。取出一滴样品并置于加温至 36-37° C 的载玻片上,将加温至相同温度的盖玻片放置于样品上,在显微镜下观察样品,放大 400 倍,一直保持在加热的板上。检查整个视野,对按照直线渐进性移动并跨越观察视野的精子进行主观评分。变为圆形或以振荡途径前进的精子被认为是不正常移动的精子。所显示的百分率(图 2)是不具有渐进性线性运动的精子相对于接受的精子总数目的百分率,50% 是最低可接受值,相对于实验中使用的杀精子剂的浓度的对数(log ATX:总毒素、构建的类似物或毒素的色谱级份 F47、F48、F50)。

[0049] 实施例 C:活性肽的化学合成

[0050] 使用 t-Boc 型化学合成法合成肽,其开发了针对 N- α -氨基的临时保护基团,即不稳定的酰基-叔丁氧基羰基,和针对侧链的保护基团,源自苄基(Bz1),其对于弱酸(三氟乙酸;TFA)是抗性的,并通过强酸例如氢氟酸(HF)被除掉。在 t-Boc 方法中,N- α -氨基的脱保护这样进行:使用 TFA 在二氯甲烷(DCM)中的 30%-50% 的梯度,随后使用 5% 的 TEA(四乙基铵)的 DCM(二氯甲烷)溶液至 10%DIPEA(N,N'-二异丙基乙胺)的 DCM 溶液中和。使用 50%TFA 的 DCM 溶液,随后使用 10% 的 TEA 中和来进行 N- α -氨基的脱保护。在氨基酸偶联步骤中,使用下列反应剂:BOP(苯并三唑-1-基氧(三二甲基胺)磷六氟磷酸酯),存在 DIPEA;和 TBTU(N,N,N',N'-四甲基-O-(苯并三唑-1-基)脲),存在 DIPEA。在所有的情况下,使用 2.5 倍过量的当量,反应时间为 1 至 2 小时。在存在 DIC/HOBt 的情况下使用的溶剂系统是 50%DCM 的 DMF(二甲基甲酰胺)溶液,而对于 BOP/DIPEA 或 TBTU/DIPEA,使用 20%DMSO 在 NMP(N-甲基-吡咯烷酮)中的混合物。在第三偶联替代方式失败的情况下,将引入的氨基酸乙酰化。乙酰化这样进行:以 DMF 中的 20% 乙酸酐 +3 滴 Pyr 反应 20 分钟。

[0051] 在整个反应过程中,使用 Kaiser 测试法监视偶联和对应的氨基酸的脱保护。

[0052] 为了从树脂释放肽,通过以浓度为 10ml/克肽基树脂的无水 HF 处理从每个氨基酸除掉保护基,使用 10% 苯甲醚、硫酸二甲酯和苯甲硫醚。为此使用真空库和 Teflon 瓶。反应在 0° C 进行,恒定搅拌 2 小时(因为在肽中存在大量精氨酸残基),对于 TOS 侧保护基团(其对于使用 HF 的去除具有部分抗性)类似地重复该过程。在反应完成之后,通过抽真

空除掉 HF 并以 80mg 碳酸氢钠在 800ml 去离子水中的溶液进行中和。以乙醚 (g) 洗涤肽，使其树脂沉淀，使用 5% 和 50% 的乙酸水溶液萃取粗肽。

[0053] 然后，将肽环化以形成二硫桥。用于该步骤的设备是 3L 的 3 开口的圆底烧瓶。将粗制肽溶解于 400ml 去离子水中，使用磁力搅拌、氧气泵和 pH 计。将溶液在冷室中在 8-10° C、7.0 的恒定 pH 通气 72 小时。通过 RP-HPLC 测定环化效率。

[0054] 最后，将肽冷冻干燥、纯化并通过 HPLC 表征。

[0055] 实施例 D :使用重组 DNA 技术产生杀精子肽 (Ac-[Ala43]-Atx41-62-NH₂)

[0056] 杀精子肽 Ac-[Ala43]-Atx41-62-NH₂ (MW 2387.72Da) 具有已知的氨基酸序列 (SEQ ID NO 2)，这允许知晓编码该肽的 DNA 序列 (SEQ IDNO 4)。可以通过常规 DNA 寡核苷酸合成方法组装该序列，也可使用这些合成方法引入对应于用于亚克隆的质粒载体的限制性位点。例如，质粒载体 pF25A 和 F 允许在 Sf21 昆虫细胞系或 BL21Codon Plus 细菌 (获自 PROMEGA Corp. USA) 中表达该肽。

[0057] 可以使用常规 HPLC 方法纯化获得的肽以分离该肽并根据产品要求获得所需的量。

[0058] 实施例 E :使用重组 DNA 技术产生天然肽

[0059] 野生型肽 (MW 7843.70Da) 具有已知的氨基酸序列 (SEQ ID NO1)，这允许知晓编码该肽的 DNA 序列 (SEQ ID NO 3)。可以通过常规 DNA 寡核苷酸合成方法组装该序列，也可使用这些合成方法引入对应于用于亚克隆的质粒载体的限制性位点。例如，质粒载体 pF25A 和 F 允许在 Sf21 昆虫细胞系或 BL21Codon Plus 细菌 (获自 PROMEGACorp. USA) 中表达该肽。

[0060] 可以使用常规 HPLC 方法纯化获得的肽以分离该肽并根据产品要求获得所需的量。

[0061] 实施例 F :在存在 *Latrodectus mirabilis* 总毒素和构建的类似物的情况下，精子的能育性降低

[0062] 根据最初由 Yanagimachi et al. (1976) 描述的方法在仓鼠卵母细胞中使用渗透测定法测定人类精子的能育性的降低。简而言之，收集金仓鼠卵母细胞，取下它们的纹膜，然后将卵母细胞与浓度为 10⁷ 个精子 /ml 的之前获能的人类精子一起温育。温育持续 3-6 小时。然后，洗涤卵母细胞以除去未渗透它们的精子，然后固定并以地衣红染色。使用相差显微镜观察卵母细胞，仅当它们包含解凝阶段的头部或在它们的细胞质内包含雄性前核时认为已经被精子渗透。

[0063] 实施例 G :用于表面施用本发明的杀精子剂的药物组合物

[0064]

成分	% 重量
根据 SEQ ID NO:2 的肽	0.00365
苯甲酸	0.8
尼泊金丙酯	0.02

山梨酸	0.05
氯甲酚	0.075
凡士林	99.05

[0001]

序列表

<110> UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
UNIVERSIDAD DE CHILE
UNIVERSIDAD FEDERAL DE SAO PAULO
LABORATORIOS ANDROMACO S. A.

<120> 源自蜘蛛毒素的避孕肽

<130> PXWO75-2010

<150> CL 261-2010

<151> 2010-03-23

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 69

<212> PRT

<213> Latrodectus mirabilis

<400> 1

Glx Asp Ser Leu Asp Pro Ala Glu Phe Ala Cys Ala Asp Asp Ile Asp
1 5 10 15

Gln Ala Glu Leu Leu Lys Asn Asn Asp Ile Cys Leu Gln Cys Glu Asp
20 25 30

Leu His Lys Glu Gly Leu Val Phe Ser Leu Cys Lys Thr Asn Cys Phe
35 40 45

Ser Thr Glu Tyr Phe Gln His Cys Val Lys Asp Leu Glu Glu Ala Lys
50 55 60

Lys Glu Pro Pro Glu
65

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO 1的41至60位(将其43位的Cys改变为Ala, 即本序列的第3位; 将其49位的Ser改变为Thr, 即本序列的第9位)

<400> 2

Ser Leu Ala Lys Thr Asn Cys Phe Thr Thr Glu Tyr Phe Gln His Cys
1 5 10 15

Val Lys Asp Leu
20

<210> 3

<211> 207

<212> DNA

<213> Latrodectus mirabilis

<400> 3

taagatagcc tggatccgge ggaatttgcg tgcgcgatg atattgatca ggcggaactg 60

ctgaaaaaca acgatatttg cctgcagtcg gaagatctgc ataaagaagg cctggtgttt 120

agcctgtgca aaaccaactg ctttagcacc gaatattttc agcattgcgt gaaagatctg 180

[0002]

gaagaagcga aaaaagaacc gecggaa

207

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO 3的121至180位 (将其127-128-129位的核苷酸t-g-c改变为g-c-g, 即本序列的7-8-9位; 将其第26位的核苷酸g改变为c, 即本序列的第26位)

<400> 4

agcctggcga aaaccaactg ctttaccacc gaatattttc agcattgcgt gaaagatctg

60

=

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	69
ATK ₁₋₆₉	ZDSLDPAEFACADDIDQAEILLKNNNDICLQCEDLHKEGLVFSLCKTNC(Acm)FSTEFYQHCVK-NH ₂														
	PK = 7842, 7075														
(Cys(Acm)) ₁₇ -ATK ₁₈₋₆₉	ZDSLDPAEFAC(Acm)ADDIDQAEILLKNN-NH ₂														
	PK = 2617, 8584														
Ac-(Cys(Acm)) ₁₇ -ATK ₁₈₋₆₉ -NH ₂	Ac-DICLQCEDLHKEGLVFSLCKTNC(Acm)FSTEFYQHCVK-NH ₂														
	PK = 4089, 7124														
Ac-(Ala ⁴⁷ -ATK ₄₈₋₆₉ -NH ₂	Ac-SLAKTNCFTTEYFQHCNDL-NH ₂														
	PK = 2387, 7232														

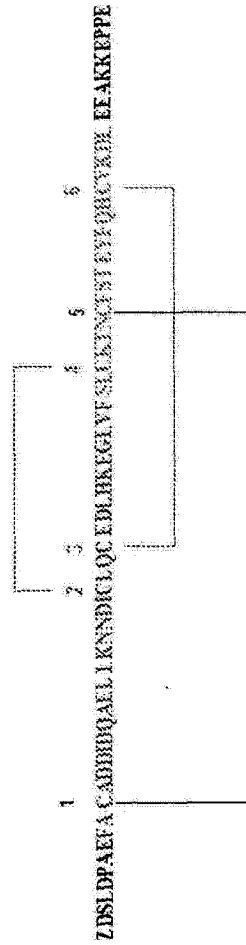


图 1

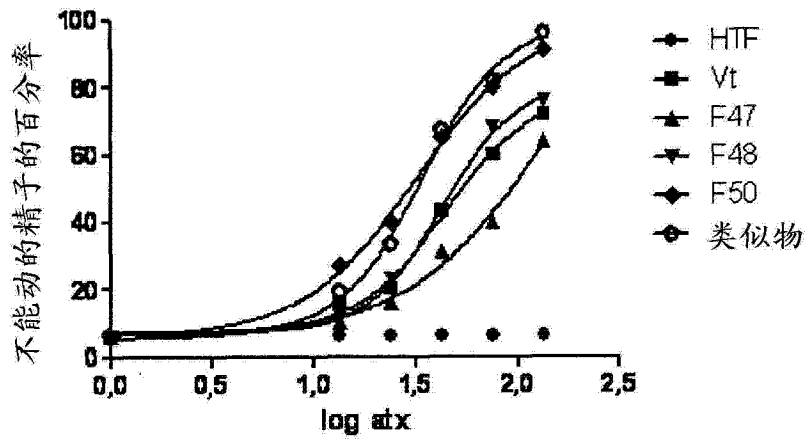


图 2

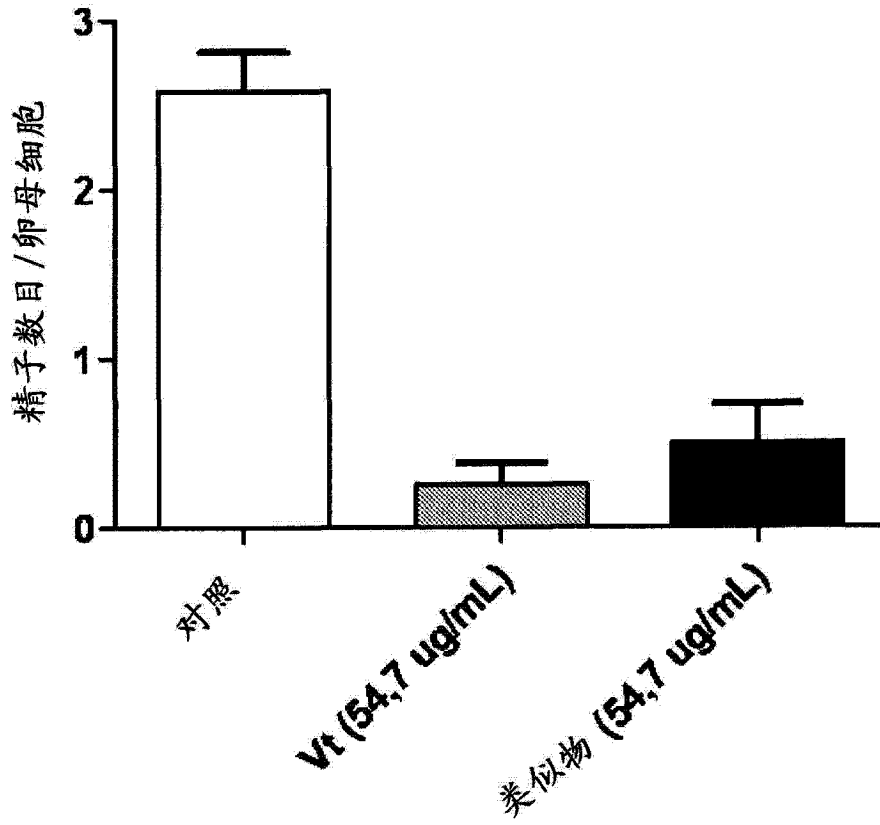


图 3