

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6483858号
(P6483858)

(45) 発行日 平成31年3月13日(2019.3.13)

(24) 登録日 平成31年2月22日(2019.2.22)

(51) Int.Cl.	F I	
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	Z N A
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	
G O 1 N 30/88 (2006.01)	G O 1 N 30/88	J
G O 1 N 30/72 (2006.01)	G O 1 N 30/72	C
G O 1 N 30/26 (2006.01)	G O 1 N 30/26	A
請求項の数 2 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-554073 (P2017-554073)	(73) 特許権者	517353932
(86) (22) 出願日	平成28年12月26日(2016.12.26)		大連医科大学
(65) 公表番号	特表2018-529626 (P2018-529626A)		中華人民共和国 116044 遼寧省大
(43) 公表日	平成30年10月11日(2018.10.11)		連市旅順南路西段9号
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/112078	(74) 代理人	100095407
(87) 国際公開番号	W02018/028117		弁理士 木村 満
(87) 国際公開日	平成30年2月15日(2018.2.15)	(74) 代理人	100109449
審査請求日	平成29年10月10日(2017.10.10)		弁理士 毛受 隆典
(31) 優先権主張番号	201610645111.7	(74) 代理人	100132883
(32) 優先日	平成28年8月8日(2016.8.8)		弁理士 森川 泰司
(33) 優先権主張国	中国 (CN)	(74) 代理人	100148633
			弁理士 桜田 圭
		(74) 代理人	100147924
			弁理士 美恵 英樹
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 サソリ毒耐熱合成ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列が S E Q I D N o . 1 である、ことを特徴とするサソリ毒耐熱合成ペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のサソリ毒耐熱合成ペプチドのてんかん、アルツハイマー病やパーキンソン病の治療薬の製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はポリペプチド薬物研究分野に属し、特に漢方薬としての東亜サソリのサソリ毒からサソリ毒耐熱ペプチド(SVHRP)を取得するアミノ酸配列及びその合成製品であるサソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)のてんかん、アルツハイマー病とパーキンソン病の治療薬としての用途に関する。

【背景技術】

【0002】

パーキンソン病(Parkinson's Disease, PD)の臨床症状の出現は、中脳黒質内のドーパミン(DA)ニューロンの損傷により、線条体のDA神経伝達物質のレベルが顕著に低下するのが原因である。PDの酸化ストレス説はDA酸化ストレスに基づいて提出されており、自由基説は中脳黒質緻密部(NCS)DAニューロン損傷の

重要な機構であり、耐酸化治療は現在公認されている効果的な治療手段である。

【0003】

漢方薬としての東亜サソリ (*Buthus martensii* Karsch, Bmk) は、キョクトウサソリとも呼ばれる。現代医学研究によって、サソリ尻尾の囊腺から作られるサソリ毒 (*Scorpion Venom*, SV) には毒素が豊かに含まれているのが証明された。その毒素作用機構に基づいて神経毒素と細胞毒素に分けられ、その中、神経毒素は長鎖サソリ毒 (60 - 70 個のアミノ酸残基を含む) と短鎖サソリ毒 (30 - 40 個のアミノ酸残基を含む) に分けられる。長鎖サソリ毒が作用する標的は、主に神経興奮を起こすことが可能な膜上の電圧依拠性ナトリウムイオンチャンネル (*Voltage-dependent Na⁺ channels*) であり、短鎖サソリ毒は Ca^{2+} チャンネル、 K^{+} チャンネル又は Cl^{-} チャンネルに作用することができる。サソリ毒は既に膜イオンチャンネルの持薬と抗毒素の研究に広く用いられている。サソリは中国の伝統的な漢方薬であり、今まで、Bmk サソリ毒から抗癌、アンチパイン、抗てんかん、抗血栓、抗炎症、抗リウマチ、抗菌などの機能を有するサソリ毒が分離純化されている。サソリ毒の毒性は僅かに蛇毒に劣るだけである。特許文献1において、天然薬物としてのサソリの薬用部位である尾部節囊腺から作られる毒液 - サソリ毒が、難治性てんかん (*Refractory Epilepsy*, RE) に対する有効性及び処理を行った後、安全性を有することが開示された。特許文献2 (中国特許出願番号 201310330290.1) において、Bmk の SV から、非耐熱と耐熱の有毒成分を除去することによって、より安全なサソリ毒耐熱ペプチド抽出液を取得できることが開示された。該ポリペプチドは難治性てんかん (*Refractory Epilepsy*, RE)、パーキンソン病 (*Parkinson's Disease*, PD)、アルツハイマー病 (*Alzheimer's Disease*, AD) の予防と治療に用いられ、共同の作用ターゲットを有しており、それぞれの特種な効果を有する。しかし、サソリ毒耐熱ペプチド抽出液からのペプチド取得率が低く、そのため、化学合成したサソリ毒耐熱ペプチドを取得することは、この創造性研究成果の開発及び産業化生産に転化できるか否かを決定する重要な点である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】中国特許出願公開第1324621号明細書

【特許文献2】中国特許出願公開第104341495号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、化学合成されたサソリ毒耐熱ペプチド及びその用途を提供することを目的とする。本願は、サソリ毒耐熱ペプチドのアミノ酸配列の測定、固相化学合成法による該ペプチドの合成、及びサソリ毒耐熱合成ペプチド (SVHRSP) の薬力活性と安全性の測定などの内容を含む。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明に係るサソリ毒耐熱合成ペプチド (SVHRSP) のアミノ酸配列は以下のとおりである: SEQ ID No. 1: (N端) Lys - Val - Leu - Asn - Gly - Pro - Glu - Glu - Glu - Ala - Ala - Ala - Pro - Ala - Glu (C端)。サソリ毒耐熱合成ペプチドは人工合成された活性ポリペプチドであり、15個のアミノ酸残基を含み、分子量が1524Daである。

【0007】

本発明に係るサソリ毒耐熱合成ペプチド (SVHRSP) は、まず従来漢方薬としての Bmk サソリ毒からサソリ毒耐熱ペプチドのアミノ酸配列を取得する。主に以下を含む: 動物試験によって試料 (*xiedu 20060112-peptide summar*

y) がてんかん、パーキンソン病、老年性認知症に対して顕著の予防と治療の作用を有することを確認し、その後、試料に対してLaGM複合材料と快速磁気分離を繰り返し行ってから、ナノ逆相クロマトグラフィーエレクトロスプレとイオン化質量分析法(nanoLC-ESI-MS)を連用する質量分析法による平行試験を行ってサソリ毒耐熱ペプチドのアミノ酸配列を検定し、最後に固相化学合成法、クロマトグラフィーによる純化及び質量分析法による解析を行うことで、サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)を得る。そのアミノ酸配列はSEQ ID No. 1に示しており、この配列はサソリ毒耐熱ペプチドの薬力活性や安全性及びさまざまな生物活性を保持している。

本発明に係るサソリ毒耐熱合成ペプチドの製造方法は以下のとおりである。

1. サソリ毒耐熱ペプチドのアミノ酸配列の測定

(1) BmKサソリ毒の凍結乾燥粉末を溶かして遠心し、上清液を取って100の水浴で加熱した後、遠心し、上清液即ちサソリ毒耐熱成分抽出液を取り、順次に分画分子量が50kDaと30kDaの濾過膜を用いる遠心式限外濾過管で、サソリ毒耐熱成分抽出液を遠心限外濾過し、上槽液を収集し、サソリ毒耐熱ペプチド抽出液を得る。Superdex Peptide 10/300GL分子ふるいカラム(Optimum Separation range (peptides) M, 100-7000Da)で上記サソリ毒耐熱ペプチド抽出液を粗分離した後(図1をご参照)、得られた試料をHPLCにより更に細分離する(図2を参照)。クロマトグラフィー条件は、クロマトグラフィーカラムはZorbax SB-C18 4.6*250 5µm(Agilent USA)であり、移動相はA液とB液を含み、その中、A液は0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル/水=2:98であり、B液は0.08%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル/水=98:2であり、順次に0-40%のB液を含む移動相3-6カラム体積、40-100%のB液を含む移動相0.5-1カラム体積、100%B液1-3カラム体積(CV)を流し、流速は0.8mL/minであり、紫外線検出器の検出波長は280nm/258nm/214nmである。

【0008】

(2) 凍結乾燥したポリペプチド試料を再度Nano-RPLC Buffer Aに溶解させ、オンラインNano-RPLC液体クロマトグラフィーはEksigent nanoLC-UltraTM 2Dシステム(AB SCIEX)で行い、溶解させた上記試料は2µL/minの流速でC18予備カラム(100µm×3cm、C18、3µm、150)に掛け、流速を保持しながら10min洗浄し脱塩する。質量スペクトルはTriple TOF 5600システム(AB SCIEX)とナノ噴霧IIIイオン源(AB SCIEX, USA)を連用したシステムを用い、質量スペクトルより採集した原始wiffグラフファイルは、Protein Pilot Software v. 4.5(AB SCIEX, USA)ソフトウェアでデータ加工処理を行い、サソリ耐熱ペプチド(SVHRP)を得る。その配列は、配列表SEQ ID No. 1に示す。

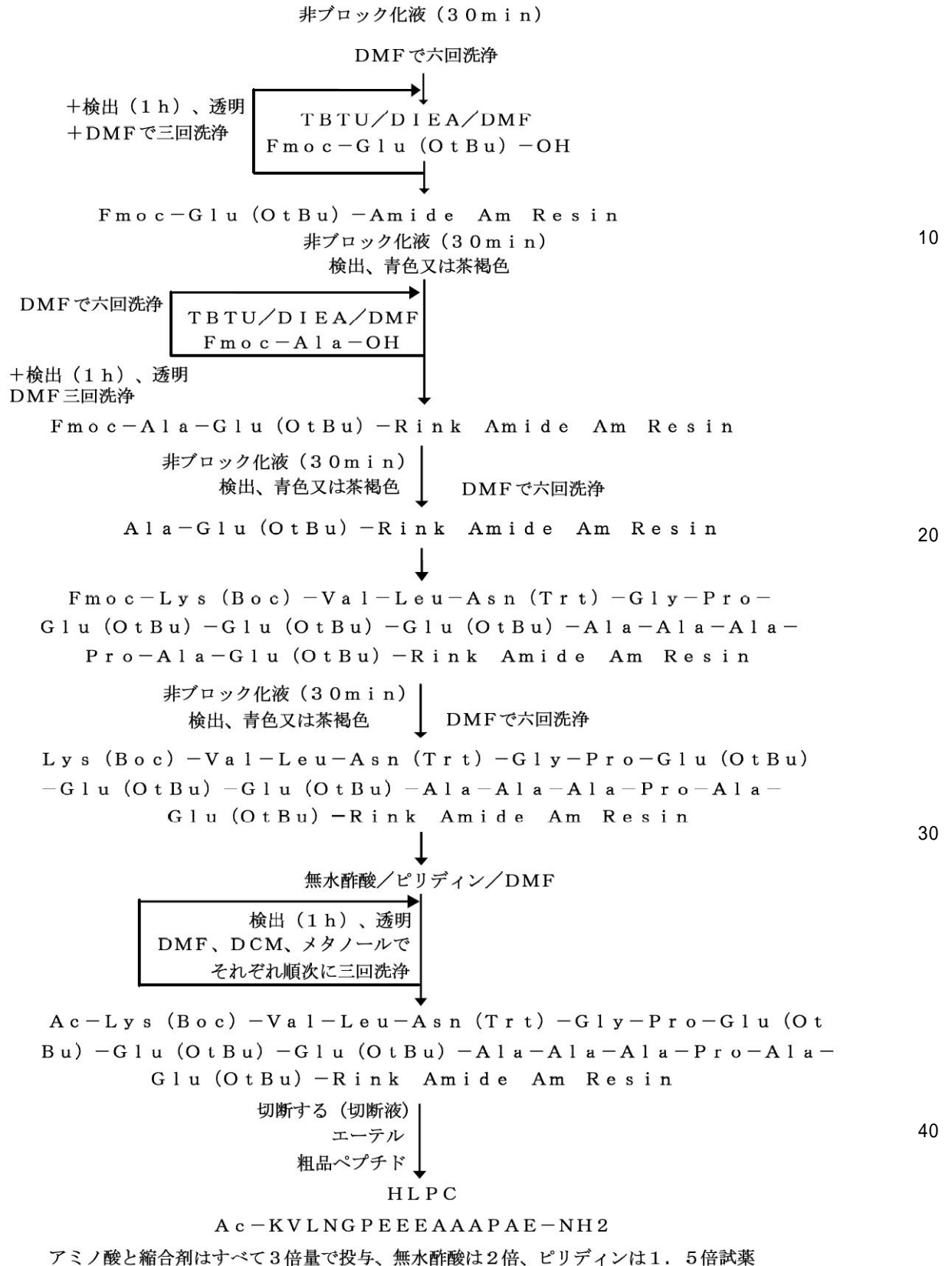
【0009】

2. 固相化学合成法でサソリ毒耐熱合成ペプチドを製造する。

(1) 該当ポリペプチドの合成とは、上記サソリ毒耐熱ペプチドのアミノ配列に従い、アミド結合の指向形成方法で目標分子を得るものである。固相合成とは、原料薬の一つのアミノ酸のカルボキシル基を共有結合の形式で固相担体(Fmoc 樹脂)と連結して、このアミノ酸のアミノ基を合成起点として、隣接するアミノ酸(アミノ基保護)のカルボキシル基とアシル化反応させ、ペプチド結合を形成するものである。その後、この二つのアミノ酸を含んだ樹脂ペプチドのアミノ基を脱保護させた後、次のアミノ酸のカルボキシル基と反応させる。目標ペプチドが得られるまで、この過程を繰り返す。

【0010】

【化 1】



【0011】

(2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による純化：ポリペプチド合成過程において、目標ペプチドの構造に類似するポリペプチド (図6を参照) が生成される。例えばアミノ酸のラセミ化によるジアステレオ異性体、一部のアミノ酸が連結されないことによる欠乏ペプチド、ペプチド連鎖の断裂による断裂ペプチドなどである。クロマトグラフ

10

20

30

40

50

イー条件：クロマトグラフィーカラムはInertsil ODS-SP 4.6 mm * 250 mmであり、移動相は0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルと0.1%トリフルオロ酢酸を含む水で構成される混合液であり、紫外線検出器の検出波長は214 nmである。

(3) 質量スペクトルを用い、合成ポリペプチドの構造解析を行い、検索及び解析を経て、サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)のアミノ酸配列を確定し、該当SVHRSPのアミノ酸配列は、SEQ ID No. 1に示す。

【発明の効果】

【0012】

本発明におけるサソリ毒耐熱合成ペプチドにおいて、Morrisウォーターメイズ実験法を用い、サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)がADマウスの学習記憶に与える影響を測定したところ、サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)はADマウスの空間学習記憶能力に対して促進作用を有することが証明された。線虫走化性行動実験法によるA神経毒性の測定結果より、サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)はニューロンを保護でき、Aによる毒性作用に対抗でき、またニューロンのAの発現による走化性行動異常を改善させることがわかった。サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)について、難治性てんかんピロカルピンモデルラットに対する予防及び治療作用を観察したところ、サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)はリチウム-ピロカルピンてんかんラット慢性モデルのてんかん性発作に対して著しい制御効果を有し、発作回数を著しく低減させた。サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)が初代培養したニューロンのナトリウム電流に対する抑制作用を観察したところ、サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)は初代培養した海馬ニューロンのナトリウムチャンネル電流を明らかに抑制することがわかった。また、NMDAにより誘導されるSH-SY5Y細胞損傷に対して保護作用を有する。サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)についてII型星状神経膠細胞に対する影響を観察した結果、サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)はII型星状神経膠細胞が再プログラミング(逆分化)により脳内内在性神経幹細胞になるのを促進することが分かった。細胞内ROSを測定する方法でSVHRSPの6-OHDAによりSH-SY5Y細胞内に生成される活性酸素に対する除去能力を測定したところ、SVHRSPは明らかに細胞内ROSを除去でき、PD酸化ストレスを抑制することがわかった。サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)の薬用安全性と薬用活性の比は2000/0.05=40,000倍より大きく、昆明種マウスの腹腔注射投与量が2000 mg/kg・BWに達する場合でも、何の毒性反応も認められず、これらの結果は、本願SVHRSPが新型耐てんかん、アルツハイマー病とパーキンソン病薬物としての応用前景を表す。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】サソリ毒耐熱ペプチド抽出液試料のゲル濾過クロマトグラフィーにおけるグラフである。

【図2】サソリ毒耐熱ペプチド抽出液試料のゲル濾過クロマトグラフィーにおけるグラフである。

【図3】Morrisウォーターメイズ実験法において、サソリ毒耐熱合成ペプチドの老人性認知症(AD)マウスの空間学習記憶能力に対する影響の測定結果である。

【図4】サソリ毒耐熱合成ペプチドが6-OHDA PD細胞モデルにおいてROSの生成を除去することを示すグラフである。

【図5】サソリ毒耐熱合成ペプチドが海馬脳切片の癲癇様放電を抑制することを示すグラフである。

【図6】サソリ毒耐熱合成ペプチドの逆相-高速液体クロマトグラム(RP-HPLC)結果を示すグラフである。

【図7】サソリ毒耐熱合成ペプチドのMS解析結果を示すグラフである。

【図8】サソリ毒耐熱合成ペプチドのリチウム-ピロカルピンてんかんラットの繰り返し

10

20

30

40

50

発作に対する抑制作用を示すグラフである。

【図 9】サソリ毒耐熱合成ペプチドが A D の遺伝子導入カエノラブリディティス・エレガンス (*Caenorhabditis elegans*) C L 2 3 5 5 の走化性行動に与える影響を示すグラフである。

【図 10】サソリ毒耐熱合成ペプチドが初代培養ニューロンにおけるナトリウム電流に対する抑制作用を示すグラフである。

【図 11】サソリ毒耐熱合成ペプチドが N M D A により誘導される S H - S Y 5 Y 細胞の損傷に対して保護作用を有することを示すグラフである。

【図 12】サソリ毒耐熱合成ペプチドが I I 型星状神経膠細胞の脳内内在性神経幹細胞への再プログラミング (逆分化) を促進することを示すグラフである。

【図 13】サソリ毒耐熱合成ペプチドが O P C 細胞の内在性神経幹細胞への分化を促進することを示すグラフである。

【図 14】サソリ毒耐熱合成ペプチドが N e s t i n 蛋白質の表現を向上させるのを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下の実施例は、更に本発明の内容を解釈する為のものであり、本発明を限定するものではない。

【0015】

(実施例 1)

サソリ毒耐熱ペプチドのアミノ酸配列の測定：

(1) 三次蒸留水で河南宜昌由来の B m K サソリ毒の凍結乾燥粉末を溶解した後、遠心し、上清液、即ち B m K サソリ毒抽出液を得る。カバー付きの耐熱プラスチックチューブに分注し、恒温水浴槽において、100 で 4 h 加熱した後取り出し、自然に室温まで冷却させて、遠心分離及び高速遠心分離を行って、上清液、即ちサソリ耐熱成分抽出液を得る。その抽出液を順次に分画分子量が 50 k D a と 30 k D a の濾過膜を用いる遠心限外濾過管で遠心限外濾過し、上槽液、即ちサソリ毒耐熱ポリペプチド抽出液を得る。これを遠心し、上清液、即ちサソリ毒耐熱成分抽出液を得る。

【0016】

サソリ毒耐熱ペプチド抽出液を Superdex Peptide 10/300 GL 分子ふるいカラム (Optimum Separation range (peptides) M、100 - 7000 D a) で粗分離し (図 1 を参照)、得られた試料を H P L C で更に細分離する (図 2 を参照)。クロマトグラフィー条件は以下の通りである。クロマトグラフィーカラムは Z o r b a x S B - C 1 8 4 . 6 * 2 5 0、5 μ m (A g i l e n t . U S A) であり、移動相は A 液と B 液を含み、その中、A 液は 0 . 1 % のトリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル / 水 = 2 : 9 8 であり、B 液は 0 . 0 8 % のトリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル / 水 = 9 8 : 2 である。0 - 4 0 % の B 液を含む移動相約 3 - 6 カラム体積、4 0 - 1 0 0 % の B 液を含む移動相 0 . 5 - 1 カラム体積、1 0 0 % の B 液を含む移動相 1 - 3 カラム体積 (C V) を順次に流す。流速は、0 . 8 m L / m i n であり、紫外線検出器の検出波長は 2 8 0 n m / 2 5 8 n m / 2 1 4 n m である。上記条件において、分離を行い、サソリ毒耐熱ポリペプチド抽出純化物を得る。

【0017】

(2) 1 . 5 m L のサソリ毒耐熱ポリペプチド抽出純化物を取り、10000 r p m で 1 0 m i n 遠心分離した後上清液を取り、上清液 : 3 0 m g / m L の L a G M 複合材料 = 5 0 : 1 の比率で、3 0 m g / m L の L a G M 複合材料を上清液に加え、2 分間十分にボルテックスした後 1 0 0 0 r、室温下で 1 0 m i n 振とうし、1 0 0 0 0 r で 5 m i n 遠心分離して磁気分離を行う。上清液を除去し、沈殿に 5 0 0 μ L の水を加え、1 分間十分にボルテックスした後、室温で 5 m i n 振とうし、1 0 0 0 0 r で 5 m i n 遠心分離して磁気分離を行い、上清液を除去する。このステップを 2 回繰り返す。沈殿に 2 0 μ L の 8 0 % + 1 % T F A 洗浄液を加え、1 分間ボルテックスした後、室温で 5 m i n 振とうし、

10

20

30

40

50

10000rで5min遠心分離して磁気分離を行い、上清液を収集する。このステップを1回繰り返し、冷凍乾燥する。磁性材料を分離した後、冷凍乾燥したポリペプチド試料を再度Nano-RPLC Buffer Aに溶解させ、オンラインNano-RPLC液体クロマトグラフィーはEksigent nano LC-UltraTM 2Dシステム(AB SCIEX)で行い、溶解後の試料は2μL/minの流速でC18予備カラム(100μm×3cm、C18、3μm、150)に掛け、流速を保持しながら10min洗浄し脱塩する。分析カラムはC18逆相クロマトグラム(75μm×15cm C18-3μm 120、ChromXP Eksigent)であり、70min内に、移動相においてのB液の濃度が5%から80%に向上するように制御する。質量スペクトルはTriple TOF 5600システム(AB SCIEX)とナノリットル噴霧IIIイオン源(AB SCIEX、USA)を連用したシステムを採用し、その中、噴霧電圧が2.4kVであり、エアカーテン気圧が30Psiであり、霧化気圧が5Psiであり、加熱温度が150 であり、一段TOF-MSにおいて、一枚のグラフに対するスキャン時間が250msであり、毎回IDA循環において最大で35個の電荷が2⁺乃至8⁺で、且つ単秒計数が100以上の二段グラフを採集し、毎枚の二段グラフの累積時間が80msである。毎回循環時間を2.5秒に固定し、衝撃室のエネルギー設定はすべての前駆体イオン衝撃誘導解離(CID)に適応し、動的排除を11秒に設置する。

【0018】

(3) データ解析条件

質量スペクトルより採集した原始wiffグラフファイルに対して、Protein Pilot Software v.4.5(AB SCIEX、USA)ソフトウェアでデータ加工処理と検索分析を行う。データベースはuniprotベース中のサソリであり、検索方式は徹底分析であり、仮陽性率を1%FDRに制御する。得られたサソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)のアミノ酸配列は、配列表SEQ ID No. 1に示す。検索結果は表1のとおりである。

【0019】

【表1】

nano LC-ESI-MS連用の質量スペクトル平行実験において、サソリ毒耐熱ペプチドのアミノ酸配列を検出する

ロット番号 LotNo	アミノ酸配列 Sequence	修飾 Modifications	ジスルフィド結合 Disulfide bond	分子量 Prec/Theor	信号強度 Precursor Signal
Xiedu-9-20160112	KVLNGPEEEAAAP AE	without	without	1523.765/1523.747	460257.3
Xiedu-10-20160112	KVLNGPEEEAAAP AE	Deamidated (N) @4	without	1524.67/1524.73	2827.23
Xiedu-11-20160112	KVLNGPEEEAAAP AE	without	without	1523.773/1523.747	83587.16
Xiedu-12-20160112	KVLNGPEEEAAAP AE	without	without	1523.758/1523.747	13350.15
Xiedu-13-20160112	KVLNGPEEEAAAP AE	without	without	1523.763/1523.747	31358.74

試料LotNo:xiedu 20160112-peptide summary. Txt Microsoft Excel。

【0020】

サソリ毒耐熱ペプチド(SVHRP)抽出液はLaGM複合材料と複数回の快速磁気分離を経た後、冷凍乾燥する。冷凍乾燥したポリペプチド試料を再度Nano-RPLC Buffer Aに溶解させ、オンラインNano-RPLC液体クロマトグラフィーはEksigent nano LC-UltraTM 2Dシステム(AB SCIEX)で行い、流速を保持しながら10min洗浄し脱塩する。質量スペクトルはTriple TOF 5600システム(AB SCIEX)とナノリットル噴霧IIIイオン源(AB SCIEX、USA)を連用したシステムを採用し、質量スペクトルが採集した原始wiffグラフファイルに対して、Protein Pilot Software v.4.5(AB SCIEX、USA)ソフトウェアでデータ加工処理と検索分析を行い、サソリ毒耐熱ポリペプチドのアミノ酸配列を検出する。

【 0 0 2 1 】

(実施例 2)

合成サソリ毒耐熱ポリペプチドの高速液体クロマトグラフィー (H P L C) による純化 :

ポリペプチドの合成過程において目標ペプチドの構造に類似する不純ペプチドが生成される可能性があり、例えばアミノ酸のラセミ化によるジアステレオ異性体、一部のアミノ酸が連結されないことによる欠乏ペプチド、ペプチド連鎖の断裂による断裂ペプチドなどが生成される。従って R P - H P L C で純化を行う。

試料純化条件は以下のとおりである :

構造 : K E - 1 5

番号 : 0 2 0 0 0 4 6

ロット番号 : P 1 6 0 4 1 8 - C Q 4 5 5 2 1 6

カラム : 4 . 6 m m * 2 5 0 m m 、 I n e r t s i l O D S - S P

溶液 A : 0 . 1 % のトリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル

溶液 B : 0 . 1 % のトリフルオロ酢酸を含む水

傾度 :	A	B
0 . 0 1 m i n	1 0 %	9 0 %
2 5 . 0 0 m i n	3 5 %	6 5 %
2 5 . 0 1 m i n	1 0 0 %	0 %
3 0 . 0 0 m i n	S t o p	

波長 : 2 1 4 n m

試料供給体積 : 1 0 μ L

【 0 0 2 2 】

(実施例 3)

M o r r i s ウォーターメイズ実験法で S V H R S P が (A D) マウスの空間学習記憶能力に与える影響の測定 :

モリスウォーターメイズ実験において行動学の変化を検出する。定位・航行実験を 5 d 持続する。毎日 4 回訓練し、マウスがプラットホーム (プラットホームは第 1 象限に置く) を探し出す時間、即ち、脱出潜伏期を記録し、且つマウスをプラットホームで 2 0 s 停留させる。マウスが 6 0 s 内にプラットホームを探し出せない場合、脱出潜伏期を 6 0 s と記録する。空間探索実験は、定位・航行実験の第 5 d における 4 回訓練後に行う。プラットホームを取り外した後、第 3 象限の入水点でマウスをプールに入れて、試験を開始する。マウスの目標象限 (第 1 象限) 内の水泳距離と水泳時間との百分比を算出し、総時間は 6 0 s にする。マウスが隠しプラットホームを通過する回数を測定する。

モリスウォーターメイズ実験から S V H R S P が A D マウスの空間学習記憶能力に対して促進作用を有することがわかった。モリスウォーターメイズの隠しプラットホーム獲得実験のテスト日 (第 5 日) において、A D モデル薬物投与組マウスの脱出潜伏期 (第 5 d 、 12 ± 2 回) が明らかに A D モデル組 (第 5 日 、 22 ± 2 回) の脱出潜伏期 * * $p < 0 . 01$ より短く、その水泳距離はモデル組の第 5 d の 5 0 0 c m から薬物投与組の 3 0 0 c m に低下し、プラットホームを通過する回数はモデル組の 5 回から薬物投与組の 8 回に向上した。

【 0 0 2 3 】

(実施例 4)

線虫走化行動学の実験方法 :

同期化した遺伝子組み換え線虫 C L 2 3 5 5 及びそのコントロール株 C L 2 1 2 2 に対してそれぞれ異なる濃度の S V H R S P (2 、 2 0 、 4 0 μ g / m L) 及び等量の三次蒸留水を投与する。虫卵である時から投与し、毎日線虫を新しい薬物含有の N G M 培養皿に移転する。すべての線虫を 1 6 で 3 6 時間培養した後、インキュベーターの温度を 2 3 に向上し、継続して 3 6 時間培養する。上記線虫を収集し、M 9 緩衝液で 3 回洗浄する。走化実験を行う時に 1 0 0 m m の大きい培養皿を用いる。固体培地は 1 . 9 % の寒天、

10

20

30

40

50

1 mMのCaCl₂、1 mMのMgSO₄、25 mMのリン酸塩緩衝液を含み、pHは6.0であり、マイクロ波で均一に混合した後、皿に入れて、冷却させる。培養皿の底部に、中心位置を経由するようにマジックペンで二本の互いに垂直する直線を描くことにより、皿全体を均一に四つの象限に分ける。

各組の約60本の線虫を走化培養皿の中心位置に置いて、1 μLのベンズアルデヒド（濃度が0.1%であり、無水エタノールで希釈する）と1 μLの0.25 Mアジ化ナトリウムを1、3象限の中心位置に滴下し、1 μLの無水エタノールと1 μLの0.25 Mアジ化ナトリウムを2、4象限に滴下し、その中、該点から中心点までの距離は2センチメートル以上である必要がある。走化培養皿を23のインキュベーターに移動させ、1時間が経過した後、走化指数を計数する。ベンズアルデヒドは高濃度気味を有する化学物質であり、線虫はベンズアルデヒドの気味に吸引されその区域へ移動するはずであり、そこでアジ化ナトリウムに接触すると麻痺して原地に止まる。走化指数の算出方法は、1、3象限（吸引物が所在する象限）に計数する線虫の数から2、4象限での線虫の数を差し引き、得られた数を線虫の総数で割るものである。

サソリ毒耐熱合成ペプチド（SVHRSP）は投与量依拠性でCL2355のCIを向上させることができ、40 μg/mLのSVHRSPのニューロンに対する保護作用が最も顕著であり、ほとんど完全にAの発現による走化性行動損傷を逆転させた。コントロール組の39.45 ± 6.2に比べて、薬物投与組は7 ± 5.66にまで減少され、p < 0.01であった。これらの結果は、SVHRSPは、ニューロンを保護し、Aによる毒性作用に対抗し、ニューロンのAの発現による走化性行動異常を改善させる作用があることを表明する。結果は、表2に示す。

【0024】

【表2】

線虫走化性行動結果

組 (μg/mL)	平均値	標準差	N
コントロール	18.25	1.77	3
SVHRSP20	39.45	6.12	3
SVHRSP40	7	5.66	3
SVHRSP80	10.30	2.406	3

【0025】

（実施例5）

SVHRSPが6-OHDAによるSH-SY5Y酸化ストレスに与える影響：

蛍光プローブDCFH-DAによりROSを検出し、SVHRSPが6-OHDAによるSH-SY5Y酸化ストレスに与える影響を観察する。実験は、対照組、ROS up陽性対照組、6-OHDAモデル組及び異なる濃度（2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL）のSVHRSP薬物組に分けて行う。指数増殖期にあるSH-SY5Y細胞を取り、培地を除き、滅菌PBSで一回洗浄した後、0.25%のパンクレアチンを加えて消化し、ピペッチングして細胞を分散させる。細胞計数板で細胞をカウントして、1.5 × 10⁴ 個/mLになるように調製した後、96ウエルプレートに巻き込み、細胞がプレートの底に沈んだ後、5%CO₂、37のインキュベーターに入れ、24h培養する。濃度が20 μg/mLのSVHRSP薬物組は、薬物を加えて1h作用させた後、6-OHDAを加え、5%CO₂、37のインキュベーターに入れて24h継続して培養する。1:500の希釈比率でROS upを培地で希釈して、各ウエルに100 μLずつ加え、27分間培養する。1:2000の希釈比率でDCFH-DAを無血清培地で希釈し、最終濃度が5 μmol/Lになるようにする。培地を捨て、各ウエルに

50 μ L ずつ上記希釈したDCFH-DA溶液を加えて、軽く均一に揺れてから5%CO₂、37℃のインキュベーターに入れ、20min培養する。上清液を捨て、PBSで3回洗浄し、蛍光マイクロプレートリーダーにおいて、488nmの励起波長、525nmの発射波長で蛍光測定を行う。OD値を測定し、比較する。

【0026】

細胞内のROSを測定する方法によってSVHRSPの6-OHDAによりSH-SY5Y細胞内に生成される活性酸素に対する除去能力を測定する。SVHRSP(20 μ g/mL)を加えて1h予め処理し、続いて6-OHDA(100 μ M)を入れ24h損傷させた後、蛍光マイクロプレートリーダーにおいて、488nmの励起波長、525nmの発射波長で、細胞内のROSの発現状況を測定する。測定結果により、6-OHDAは細胞内のROSの発現を明らかに向上させ、統計的に有意な差(control 1 \pm 0.2 vs 6-OHDA 3.4 \pm 0.4 p < 0.01)を示したが、SVHRSPを加えた場合、細胞内のROSが明らかに除去されるのを確認でき、統計的にも有意な差(control 3.4 \pm 0.4 vs 1.5 \pm 0.4 p < 0.05)があった。

【0027】

(実施例6)

サソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)の難治性てんかんピロカルピンモデルラットに対する予防・治療作用：

1) 体重180gの健康なオスSDラットを用い、リチウム-ピロカルピンを300mg/kgの用量でipより投与して、側頭葉てんかんの発作を誘発する。てんかんが急性に発作した後の15日目に、てんかんラットをモデル組とモデル薬物投与組にランダムにグルーピングする。てんかんモデル組の動物は生理塩水(NS)を腹腔内に注射し、15日間連続する。てんかんモデル薬物投与組のラットは更に3つのモデル薬物投与組にグルーピングし、それぞれSVHRP抽出液を50 μ g/kg/dの用量でipより投与した組、SVHRSPを50 μ g/kg/dの用量でipより投与した組、陽性対照薬物-バルプロ酸ナトリウム投与組である。即ち、ピロカルピンてんかんモデル+NS組、リチウム-ピロカルピンてんかんモデル+SVHRP組、リチウム-ピロカルピンてんかんモデル+SVHRSP組、リチウム-ピロカルピンてんかんモデル+バルプロ酸ナトリウム組である。各組において、てんかんレベルを観察して記録し、Racine'sレベルを評価標準とし、表3に示す。

【0028】

【表3】

てんかん発作レベル

レベル	てんかん発作状態
1	目を閉じ、髭を動き、顔が痙攣され、咀嚼する
2	咀嚼が高じるとともに點頭する
3	片側の前肢を上げるとともに痙攣する
4	両側の前肢を上げるとともに痙攣する
5	両側の前肢を上げるとともに痙攣が高じ、倒れる

【0029】

結果解析：

(1) SVHRSPは、リチウム-ピロカルピンてんかんラットの慢性モデルてんかん発作に対して著しい制御効果を有し、発作回数を著しく低減させる。

(2) SVHRSPがリチウム-ピロカルピンてんかんラット慢性モデルの発作レベル

及び発作回数を低下する能力は、いずれも陽性対照組であるバルプロ酸ナトリウムより強い。

【 0 0 3 0 】

【表 4】

総発作平均値の重ね合せ±標準誤差

日数	NS n=10	SVHRP (50ug/kg) n=5	SVHRSP (50ug/kg) n=5	バルプロ酸ナトリウム (300ug/kg) n=9
第1日	3.78±0.57	1.4±0.6	0.8±0.58	2.67±0.85
第2日	6.67±1.19	2.6±0.75	1±0.77	5.56±1.27
第3日	9.33±1.78	4.8±1.36	1±0.774	7.56±1.39
第4日	11.66±2.028	7±1.94	1.4±0.68	9.56±1.96
第5日	13.89±2.45	7.2±1.94	1.8±0.86	11.67±2.24
第6日	17.3±2.64	9.6±2.42	3.8±0.734	12.67±2.30
第7日	19.89±3.04	11.4±3.09	5.8±0.8	13.89±2.45
第8日	22.22±3.64	12.6±3.69	7.6±0.87	15.11±2.73
第9日	23.89±3.95	13.8±3.45	9.4±0.97	16.33±3.05
第10日	24.78±4.04	15±3.391	11±1.38	17.55±2.91
第11日	27.33±4.21	16.5±3.39	11.8±1.2	18.89±3.13
第12日	29.22±4.78	19.25±3.47	13±1.14	20.56±3.33
第13日	31±5.09	22.5±4.18	14.6±1.21	21.78±3.58
第14日	31.78±5.24	24±4.67	15.8±1.50	22.67±3.56
第15日	32.56±5.39	25.75±5.18	16.6±1.51	23.56±3.79

【 0 0 3 1 】

(実施例 7)

サソリ毒耐熱合成ペプチド (SVHRSP) の初代培養ニューロンのナトリウム電流に対する抑制作用：

(1) 初代培養による海馬ニューロンの培養：

生まれて 24 h 後の SD ラットを 75 % アルコールで消毒した後、氷上で断頭し、解剖顕微鏡下で解剖し快速に両側の海馬を完全に剥離し、解剖液中に置いて体積が 1 mm³ の小塊になるように切って、終濃度が 0.125 % のパンクレアチン消化液に入れ、37、10 % CO₂ のインキュベーターに入れて 30 min 消化させる。消化された組織を取り出して、播種液を入れて、消化を終止し、ピペッチングで懸濁させ、濾過を行うことによって、密度が 1 × 10⁵ / mL の細胞懸濁液を作り、ポリリシン (0.1 mg / mL) で事前にコーティングして置いた培養プレートに播種し、37、10 % CO₂ のインキュベーターにおいて培養する。第 2 d に播種液を全部培地に切替えて、培養する。培養第 4 d に培地にシタラピン (3 μg / mL) を加え、非神経細胞の過度増殖を抑制する。その後 3 d ごとに 50 % の新鮮な培地を切替える。体外培養により、海馬ニューロンは第 9 - 12 d 培養することで、成熟ニューロンになり、本実験においては、培養して第 10 d 目に得られたニューロンを用いる。

【 0 0 3 2 】

(2) 全細胞パッチクランプ記録：

初代培養した海馬ニューロンを 10 d 培養した後、全細胞パッチクランプ記録を行う。記録用ガラス管微小電極の外径は 1.5 mm、内径は 0.6 - 0.8 mm、長さは 8 cm

であり、PP-830型微小電極引張機で兩段階垂直引張を行って製作する。引張後の電極直径が約 $1\text{ }\mu\text{m}$ であり、電極内液を充填した後、電極抵抗が $3\text{--}5\text{ M}$ である。参照電極はAg-AgCl電極である。全細胞パッチクランプ記録において、電極と細胞膜との間に安定な高抵抗封止を形成した後、快速のコンデンサー補償(C-fast)を行い、やや負圧を加えて破膜させ、全細胞構造を形成した後、減速コンデンサー補償(C-slow)を行う。減速コンデンサー補償率は $80\%\text{--}85\%$ である。リーク電流法でリーク電流(Leak Subtraction)を差し引く。設定された刺激電圧で電流のアクティブ状況を観察する。全細胞パッチクランプ記録に用いられる機器の設置条件は以下の通りである。EPC-10二重チャンネルパッチクランプ増幅器実験パラメータ、データの採集と刺激の与えは、いずれもPulseソフトウェアによって制御され、Be

10
sselフィルター1の周波数は 10 KHz であり、Be
sselフィルター2の周波数は 2.9 KHz である。実験過程中に、所用する薬物はいずれもBPS-8灌流装置により投与され、排出管毎個の直径は 0.2 mm であり、管口は記録に用いる細胞より約 $100\text{ }\mu\text{m}$ 離れる。初代培養したニューロンシステムに対して、パッチクランプを行いナトリウムチャンネル電流を記録する。同じ細胞に対してサソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)を加える前後の電流を比較する。

全細胞パッチクランプ記録において、同じ細胞に対してサソリ毒耐熱合成ペプチド(SVHRSP)を加える前後の電流を比較する。比較結果により、 $2\text{ }\mu\text{m/mL}$ のSVHRSPは初代培養した海馬神経細胞体のナトリウムチャンネル電流を顕著に抑制し、その抑制率は 90% 以上に達し($n=6$)($p<0.0001$)、細胞外液で洗浄した後電流が回復できることが分かった。

20

【0033】

(実施例8)

SH-SY5Y細胞は人の神経芽腫細胞株由来の細胞株である。NMDAモデル：NMDA $20\text{ mM} + \text{Gly } 10\text{ }\mu\text{M}$ 。

実験過程：実験前、実験目的に応じてグルーピングする。SH-SY5Yを96ウェルのプレートに 0.8×10^4 /穴になるように巻き込み、 24 h 培養した後、SVHRSPとpeptideを加え 24 h プレインキュベーションする。その後、グルーピングされた各組において、NMDA $20\text{ mM} + \text{Gly } 10\text{ }\mu\text{M}$ を加えて 24 h 培養した後、MTTアッセイにより各組細胞の生存率を測定する。測定結果は図11に示す。測定結果により、SVHRSPは、NMDAによるSH-SY5Y細胞損傷に対して保護作用を有することが判明された。その中、SVHRP濃度は $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ であり、SVHRSP濃度は $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ であり、NMDA $20\text{ mM} + \text{Gly } 10\text{ }\mu\text{M}$ であり、 $p<0.05$ ($n=3$)である。

30

【0034】

(実施例9)

II型星状膠細胞は逆分化によって増殖及び分化能力を有する多能性神経幹細胞を形成する。

実験過程：生まれて 24 h 後のSDラットを用い、大脳皮層を無菌分離し、細胞懸濁液を得、 10% ウシ胎仔血清を含有するDMEM培地において、混合膠細胞の初代培養を行う。7-9d培養した後、まずL-ロイシンメチル塩酸塩(L-leucine methyl ester hydrochloride)で 1 h 処理し、新鮮な無菌の細胞培地を切替えて、 37°C の恒温振とう台で 180 r/min の速度で 18 時間揺らした後、上清液を 200 メッシュの濾過網で濾過し、得られた上清液をポリリシンで予備処理した6ウェルプレートに播種して、相対的に純化されたOPCを得る。細胞をインキュベーターに中で自然沈降させ、 2 h 後に細胞が壁に接着したか否かを観察する。壁に接着した後、上清液を捨ててII型星状膠細胞誘導液(20% DMEM)を切替え、4-5d継続して培養して、相対的に純化されたII型星状膠細胞を得る。

40

5d後、II型星状膠細胞を消化させ超低接着6ウェルプレートに播種し、培地を幹細胞培養培地に切替えて、 12 d 継続して培養して、幹細胞コロニーを形成させる。この超

50

低接着 6 ウェルプレート中のコロニーを取って、ポリリシンを処理した細胞クライミングスライドを敷設した 24 ウェルプレートに巻き込んで 24 h 培養した後、細胞クライミングスライドを取出し、4 % のパラホルムアルデヒドで固定し、免疫蛍光染色を行う。Nestin (green) でコロニーが幹細胞であるか否かを確認する。Nestin は、神経幹細胞の特異性マーカーであり、サソリ毒耐熱合成ペプチド (SVHRSP) は II 型星状膠細胞が逆分化して神経幹細胞を形成する過程のマーカーである Nestin に影響する。

【 0 0 3 5 】

(実施例 1 0)

サソリ毒耐熱合成ペプチド (SVHRSP) の急性毒性実験：

10

1) 主な観察指標：

i) 最大耐性量 (Maximal tolerated dose, MTD)：即ち最大非致死投与量、受験動物が死に至らない最大の用量を言う。

ii) 最小致死投与量 (Minimal lethal dose, MLD)：個別の受験動物が死亡し始める用量を言う。

iii) 最大無毒性量 (最高無毒)：即ち毒性反応が現れない最大の用量 (No observed adverse effect level, NOAEL) であり、即ち一定の時間内に、動物に損害作用を与えない最大の用量を言う。

iv) 最小毒性量：動物が毒性反応を現す最低用量を言い、毒性反応が現れたばかりの用量、即ち動物が毒性反応を現す最低用量を言う。

20

2) 注：

i) 受験動物：昆明種マウス、雌と雄がそれぞれ半分ずつである (健康な成年であり、体重が 19 - 20 g である)。

ii) 受験試薬：SVHRSP：

a . 出所：河南省宜昌 XINXIN サソリ養殖工場 (2012 - 05 - 28) から BmK サソリ毒抽出液を購入する。

b . Lot No：P160418 - CQ455216。

c . 含有量 (又は仕様)：10 mg / 1 つ。

d . 保存条件及び配合方法：- 20 で長期保存でき、4 では 7 - 10 d で保存でき、使用時に超純水で溶かす。

30

iii) 投与経路：それぞれ ip で投与する (マウス ip 経路投与において、常用する最大容積は 0 . 1 - 1 . 0 mL / 20 g BW である)。

投与経路に基づいて当該動物種の最適な投与容量 (投与量が異なっても、投与容量は同じにする) を選択することであり、今回実験において、ip 投与経路は、いずれも 0 . 2 mL / 20 g BW にする。

iv) 採用方法の選択

近似致死量法によって、可能な配列表を作成する。

従来サソリ毒耐熱ポリペプチドの昆明種マウスに対する急性毒性試験結果に基づき、サソリ毒耐熱合成ペプチド (SVHRSP) の可能な最大耐性量と最小致死量を算出し、複数の投与量を含んだ投与量配列表を設計する。

40

可能な最大耐性量 (Maximal tolerated dose, MTD)：76 . 8、51 . 2、34 . 1 mg / kg。

可能な最小致死量 (Minimal lethal dose, MLD)：115 . 2、76 . 8、51 . 2 mg / kg。

算出した投与量配列表から可能な致死量範囲 (115 . 2、76 . 8、51 . 2、34 . 1 mg / kg) を探し出し、この範囲内にある各投与量を一匹の動物に投与し、最小致死量と最大耐性量を測定した後、両者の間にいる投与量を一匹の動物に投与する。当該投与量で動物が死亡に至らない場合、当該投与量と最小致死量との間の範囲を近似致死量範囲とする。当該投与量で動物が死亡する場合、当該投与量と最大耐性量との間の範囲を近似致死量範囲とする。

50

【 0 0 3 6 】

【表 5】

腹腔注射投与経路におけるサソリ毒耐熱合成ペプチドの安全性（最大耐性量と最小致死量）の測定

薬物投与組	投与量	死亡 (%)	生存 (%)	毒性反応
BmKサソリ毒抽出液	15.4 mg/kg BW	100	0	
BmKサソリ毒耐熱成分抽出液	15.4 mg/kg BW	0	100	55.5 mg/kg BW i.v. 引き起こし可能 100%死亡 n=10
BmKサソリ毒耐熱ペプチド抽出液	38.4 mg/kg BW	0	100	
BmKサソリ毒耐熱ポリペプチド抽出液	78.6 mg/kg BW	66	33	
サソリ毒耐熱合成ペプチド	78.6 mg/kg BW	0	100	何の毒性反応もない
サソリ毒耐熱合成ペプチド	115.2 mg/kg BW	0	100	何の毒性反応もない
サソリ毒耐熱合成ペプチド	172.8 mg/kg BW	0	100	何の毒性反応もない
サソリ毒耐熱合成ペプチド	500 mg/kg BW	0	100	何の毒性反応もない
サソリ毒耐熱合成ペプチド	2000 mg/kg BW	0	100	何の毒性反応もない

【 0 0 3 7 】

結果：本発明のサソリ毒耐熱合成ペプチド（SVHRSP）の薬用安全性と薬の効果活性との比は $2000 / 0.05 = 40,000$ 倍より大きく、昆明種マウスの腹腔注射投与量は 2000 mg/kg BW に達する場合にも、何の毒性反応も起こさなかった。最大無毒性反応投与量（最高無毒）、即ち毒性反応が認められない最大投与量に達してない。

【 0 0 3 8 】

（付記）

（付記 1）

完全な遺伝子配列が SEQ ID No. 1 である、ことを特徴とするサソリ毒耐熱合成ペプチド。

【 0 0 3 9 】

（付記 2）

BmKサソリ毒の凍結乾燥粉末を溶かして遠心し、上清液を取り 100 の水浴で加熱した後、遠心し、上清液を回収してサソリ毒耐熱成分抽出液を得、該サソリ毒耐熱成分抽出液を順次に分画分子量が 50 kDa と 30 kDa である遠心式限外濾過管において遠心限外濾過を行って上槽液を回収し、サソリ毒耐熱ポリペプチド抽出液を得るステップと、

Superdex Peptide 10/300 GL 分子ふるいカラム (Optimum Separation range (peptides) M, 100 - 7000 Da) により前記サソリ毒耐熱ポリペプチド抽出液を粗分離した後、得られた試料を HPL

Cによりさらに分離し、その中、クロマトグラフィー条件は、クロマトグラフィーカラムはZorbax SB-C18 4.6*250 5 μm (Agilent USA)、移動相はA液とB液を含み、その中、A液は0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル/水=2:98であり、B液は0.08%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル/水=98:2であり、順次に0-40%のB液を含む移動相3-6カラム体積、40-100%のB液を含む移動相0.5-1カラム体積、100%B液1-3カラム体積(CV)を流し、流速は0.8 mL/minであり、紫外線検出器の検出波長は280 nm/258 nm/214 nmであるステップと、

冷凍乾燥したポリペプチド試料をNano-RPLC Buffer Aに再び溶解させ、オンラインNano-RPLC液体クロマトグラフィーはEksigent nano LC-UltraTM 2Dシステム(AB SCIEX)で行い、溶解させた前記試料は2 μL/minの流速でC18予備カラム(100 μm×3 cm、C18、3 μm、150)に掛け、流速を保持しながら10 min洗浄して脱塩し、質量スペクトルはTriple TOF 5600システム(AB SCIEX)とナノリットル噴霧IIIイオン源(AB SCIEX、USA)を連用するシステムを用い、質量スペクトルより採集した原始wiffグラフファイルに対して、Protein Pilot Software v.4.5(AB SCIEX、USA)ソフトウェアでデータ加工処理を行って、アミノ酸配列がSEQ ID No.1であるサソリ毒耐熱合成ペプチドを得るステップと、

10

固相化学合成法で前記サソリ毒耐熱合成ペプチドを製造するステップと、

20

前記ポリペプチド合成過程において、目標ペプチドの構造に類似するポリペプチドが生成され、それに対して、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により純化を行い、その中、クロマトグラフィー条件は、クロマトグラフィーカラムはInertsil ODS-SP 4.6 mm*250 mmであり、移動相は0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸を含む水であり、紫外線検出器の検出波長は214 nmであるステップと、

質量スペクトルを用い、前記合成ポリペプチドの構造解析を行い、検索及び解析を経て、サソリ毒耐熱合成ペプチドのアミノ酸配列を確定し、そのアミノ酸配列がSEQ ID No.1であるステップを含む、ことを特徴とするサソリ毒耐熱合成ペプチドの製造方法。

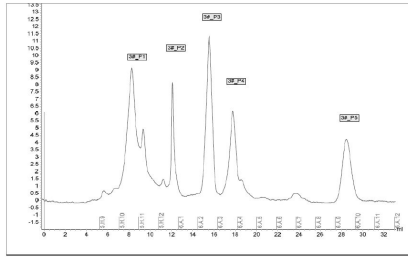
30

【0040】

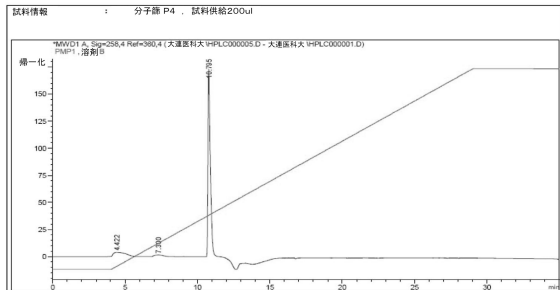
(付記3)

付記1に記載のサソリ毒耐熱合成ペプチドのてんかん、アルツハイマー病やパーキンソン病の治療薬としての用途。

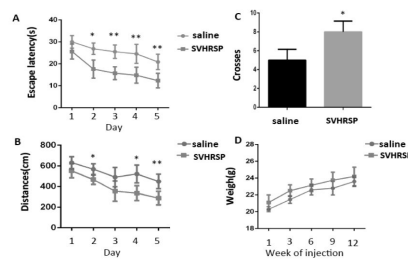
【図 1】



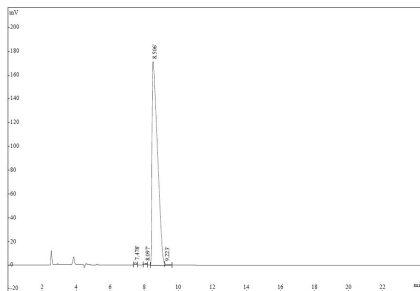
【図 2】



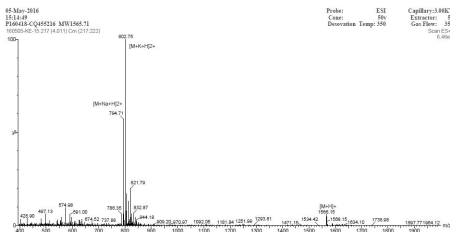
【図 3】



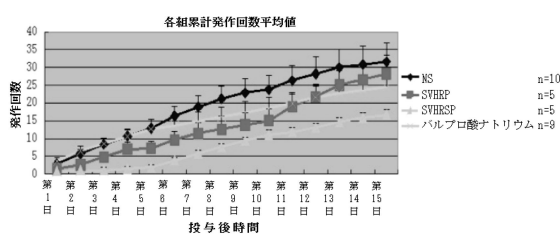
【図 6】



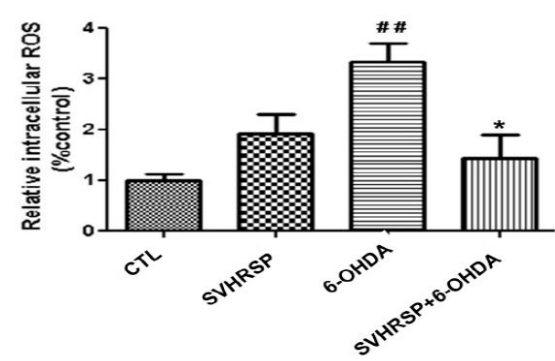
【図 7】



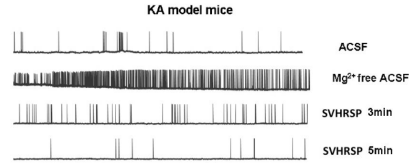
【図 8】



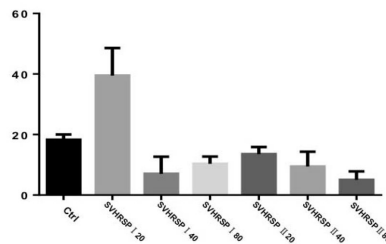
【図 4】



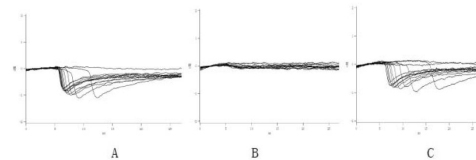
【図 5】



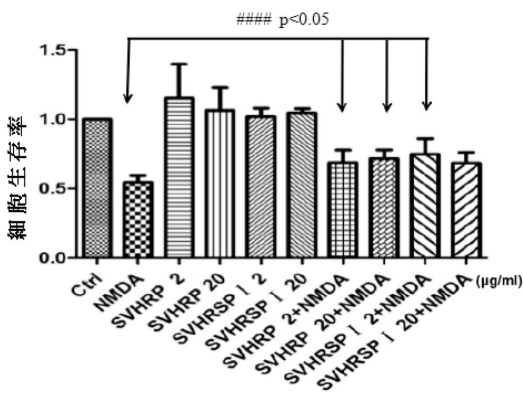
【図 9】



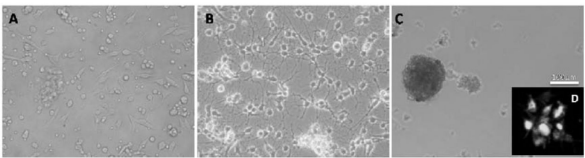
【図 10】



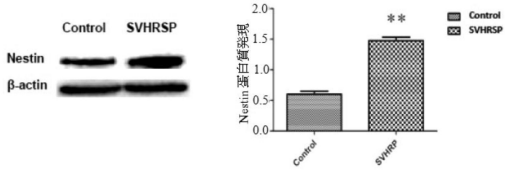
【 図 1 1 】



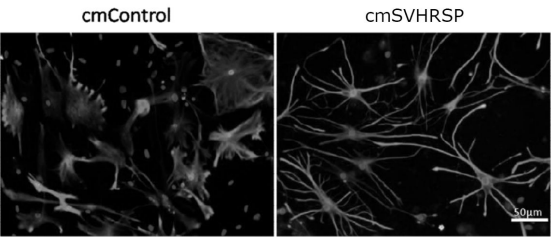
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
B 0 1 J	20/287	(2006.01)	B 0 1 J 20/287
G 0 1 N	30/74	(2006.01)	G 0 1 N 30/74 E
G 0 1 N	27/62	(2006.01)	G 0 1 N 27/62 V
A 6 1 K	38/10	(2006.01)	G 0 1 N 27/62 X
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 K 38/10
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/08
			A 6 1 P 25/16

- (72)発明者 趙 杰
 中華人民共和国 1 1 6 0 4 4 遼寧省大連市旅順南路西段9号
- (72)発明者 李 韶
 中華人民共和国 1 1 6 0 4 4 遼寧省大連市旅順南路西段9号
- (72)発明者 張 万琴
 中華人民共和国 1 1 6 0 4 4 遼寧省大連市旅順南路西段9号

審査官 田名部 拓也

- (56)参考文献 中国特許出願公開第101450966(CN,A)
 中国特許出願公開第101284870(CN,A)
 中国特許出願公開第103304630(CN,A)
 Zhao Ruiming et al., BMC Genomics, 2010年, 11:452
 Xian-Chun Zeng et al., Peptides, 2012年, 33, 44-51

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 7 / 0 6
 A 6 1 K 3 8 / 1 0
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)