



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93119818.6

[51]Int.Cl⁶

C07K 14/435

[45]授权公告日 1996年11月20日

[24]颁证日 96.8.24

[21]申请号 93119818.6

[22]申请日 93.11.2

[30]优先权

[32]92.11.3 [33]US[31]973,323

[73]专利权人 美国辉瑞有限公司

地址 美国纽约

共同专利权人 NPS药物有限公司

[72]发明人 R·A·福克曼 N·A·萨科曼诺

A61K 38/17

D·M·内森 D·菲利普斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜 王景朝

权利要求书 0.5 页 说明书 8.5 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 从无声杆捕鸟蛛中得到的阻断钙通道的多肽

[57]摘要

从无声杆捕鸟蛛蜘蛛的毒液分离的多肽阻断各种生物物体细胞的钙通道，并且本身用于阻断上述细胞中钙通道和治疗钙通道介导的疾病和症状，并用于控制无脊椎有害动物。

权利要求书

1.一种基本上纯的多肽或其可药用盐,该多肽含有的氨基酸顺序为 SEQIDNo: 1、SEQIDNo: 2、SEQIDNo: 3、SEQIDNo: 4、SEQIDNo: 5、SEQIDNo: 6或 SEQIDNo: 8。

2.权利要求1的多肽或其可药用盐在生产阻断细胞钙通道药物中的用途。

3.一种药物组合物,它含有作为活性成分的权利要求1的多肽或其可药用盐,及可药用载体或稀释剂。

本发明涉及从无声杆捕鸟蛛(Theraphosidaeaphonopelma)蜘蛛毒液中发现的多肽及基本上具有与上述多肽相同氨基酸顺序和相同活性的多肽。该多肽及其可药用盐阻断细胞(包括无脊椎动物和脊椎动物的各种生物的神经细胞和肌细胞)中的钙通道。本发明还涉及上述肽及其盐本身阻断细胞(例如生物的肌肉和神经系统的细胞)中钙通道和治疗哺乳动物的钙通道介导的疾病与症状的用途。而且,本发明还涉及含有所述肽及其盐的组合物。

钙拮抗剂化合物具有广泛的用途。已知钙拮抗剂可临床用于治疗许多疾病,其中包括绞痛、高血压、心肌病、室上性心律失常、食管弛缓不能(aesophageal achalasia)、早产和雷诺病。见 W. G. Nayler, Calcium Antagonists, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, New York, NY 1988, 本文引入其教导作为参考。并且,此类化合物用于细胞(如神经和肌肉细胞)的生理学研究。

本发明涉及无声杆捕鸟蛛蜘蛛毒液中发现的多肽。本发明的多肽及含有本发明多肽的级份如下:

无声杆捕鸟蛛的肽 6-6 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:1。

无声杆捕鸟蛛的肽 6-8 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:2。

无声杆捕鸟蛛的肽 7-6.1 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:3。

无声杆捕鸟蛛的肽 7-13.1 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:4。

无声杆捕鸟蛛的肽 7-13.2 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:5。

无声杆捕鸟蛛的肽 7-15.2 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:6。

无声杆捕鸟蛛的肽 7-17.1 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:7。

无声杆捕鸟蛛的肽 7-17.3 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:8。

无声杆捕鸟蛛的肽 7-17.4 具有氨基酸顺序, SEQ ID No:9。

本发明的多肽阻断细胞中钙通道。因此,这些多肽本身可用于阻断细胞中钙通道。这些多肽也可用于控制无脊椎有害动物及治疗哺乳动物中由细胞钙通道功能介导的疾病和症状。

那些具有与上述多肽基本相同的氨基酸顺序及基本相同的钙通道阻断活性的多肽也在本发明范围之内。

本发明还涉及含有上述多肽的药物组合物和施用上述多肽的方法。

通过本领域专业人员熟知的电刺激挤取的一般方法,从无声杆捕鸟蛛蜘蛛得到毒液。所用方法以防止全毒液被腹部的回流液和血液污染的方法为好。这种方法是本领域专业人员所熟知的。得到的全毒液冷冻存放(约-78°C),直至用于如下述的精制。通过反相高效液相层析(HPLC)用不同的制备及半制备柱如 C-4 和 C-18Vydac[®]柱(Rainin Instrument co.Inc., Mack Road, Woburn Massachusetts 01801)完成由全毒液开始的组份精制。在 220-230nm 处成单色光地进行峰值测定。可以用如 Waters 990 二极管矩阵检测器(Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757)收集的多色紫外数据将级份进行进一步分析。用已知方法如用 ISCO/“FOXY”级份收集器和 ISCO2159 峰值检测器(ISCO, 4700 Superior, Lincoln, Nebraska 68504)收集柱级份。以适宜大小的容器如洁净的聚乙烯实验室容器收集级份。这些级份的浓缩是通过冻干洗脱液然后冻干水完成的。然后通过层析分析(用分析柱,和比级份的最后精制过程所用的洗脱系统更为等效的梯度洗脱系统)测定所得组份级份的纯度。

本发明的多肽可以根据已知方法来测序。测定

一级结构的方法包括,例如下列步骤。1)为提高底物对酶进攻的敏感性,将二硫键的半胱氨酸残基还原并 S-吡啶基化。2)通过一步或多步酶促消化,控制该肽的裂解。3)通过反相高效液相(HPLC)分离和精制肽片断。4)通过 N-末端测序及离子喷雾质谱来描述肽片断的特征。

例如,可以在溶液中将研究的多肽半胱氨酸残基进行 S-吡啶基乙基化,然后进行多肽的氨基酸测序。一种这类 S-吡啶基乙基化方法可按下面的描述完成。

将约 1 至 10 μ g 的多肽溶于或稀释到最多达 50 μ l 的缓冲液中,该缓冲液由 1 份 1M Tris 盐酸缓冲液(pH8.5,含有 4mM EDTA)和 3 份 8M 盐酸胍混合而制得。加入 2.5 μ l 10%的 2-巯基乙醇水溶液,并将该混合物在氩气氛下、室温避光处培养两小时。之后,加入 2 μ l 4-乙烯基吡啶(存于 -20 $^{\circ}$ C 氩气中的新鲜试剂)并将该混合物于氩气氛下、室温避光处继续培养 2 小时。然后将该混合物脱盐,优选通过一根短的、反相柱层析脱盐。再根据已知方法对回收的烷基化的多肽测序。

得益于本文公开了关于由无声杆捕鸟蛛的毒液中得到的存在于级份 6-6, 6-8, 7-6.1, 7-13.1, 7-13.2, 7-15.2, 7-17.1, 7-17.3 和 7-17.4 中的肽,现在可以不通过全毒液分离/精制的方法得到上述肽。本发明的多肽可以通过克隆上述肽或其部分编码顺序使用重组 DNA 技术来生产。例如,按本领域专业人员熟知的方法,可以应用利用了现在已知的上述多肽的氨基酸序列信息的杂交探针来克隆该完整多肽的编码顺序。结合重组 DNA 技术和体外蛋白质合成,也可用于生产本发明的多肽。这类体外蛋白质合成方法包括(但不限于)使用运用了本领域专业人员熟知的标准 Merrifield 化学或其它固相化学方法的 ABI 430A 固相肽合成仪(Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404)合成多肽。

本领域熟知,多肽中可以进行某些不影响或基本不影响所述多肽功能的氨基酸替换。确切可能的替换因多肽不同而不同。根据本领域专业人员熟知的方法来确定可允许的替换。这样,本发明的范围包括了具有基本相同氨基酸顺序和基本相同钙通道阻断活性的全部多肽。

本发明的多肽阻断许多细胞中的钙通道,例如

无脊椎动物和脊椎动物的神经及肌肉系统的细胞。

以下的方法证实了本发明的多肽阻断钙通道的能力。由 8 日龄大白鼠的小脑制备小脑粒细胞(Wilkin 等., Brain Res, 115, 181-199, 1976)。用多-L-赖氨酸覆盖 Aclar 小块(1cm²) (Proplastics Inc., 5033 Industrial Ave., Wall, NJ 07719)并置于含有 1ml Eagles Basal 介质的 12 孔培养盘中。分离细胞,并将含有 6.25 \times 10⁶ 个细胞的等分试样加到含有 Aclar 小块的每个孔中。铺板后 24 小时加入胞嘧啶- β -D-阿拉伯呋喃糖苷(终浓度 10 μ M)。该细胞用于在培养第 6、7 和 8 天的 fura2 分析。将细胞(附着于 Aclar 小块上)转移到含有 1ml 的 2 μ M fura 2 / AM(于 HEPES 缓冲液中,该缓冲液含 0.01% 牛血清白蛋白、0.01% 右旋糖, pH7.4, 不含镁)(Molecular Probes Inc., Eugene, OR 97402)的 12 孔盘中。该细胞于 37 $^{\circ}$ C 培养 40 分钟;取出含 Fura 2 / AM 的缓冲液并重新加入 1ml 不含 fura 2 / AM 的相同缓冲液。往一小石英杯中加入 2.0ml 预先温热(37 $^{\circ}$ C)的缓冲液。将 Aclar 上的细胞加到该杯中并将该杯插入一个安有磁力搅拌器的保温装置中(37 $^{\circ}$ C),并用荧光光度计(Biomedical Instrument Group, University of Pennsylvania)检测其荧光。使荧光信号稳定约 2 分钟。然后,将 5-20 μ l 合适浓度的受试化合物的磷酸缓冲盐水标准溶液(PBS, pH7.4)加到该杯中。在完成每批测定中,使用 Nemeth 等建立的方法(J. Biol. Chem., 262, 5188(1987)进行荧光信号校正和 fura 2 / AM 渗漏校正。由加入伊屋诺霉素(35 μ M)测到了最大的荧光值(F_{max}),而随后加入与钙螯合的 EGTA(12mM)测到了最小的荧光值(F_{min})。使用前述方法,加入本发明多肽,荧光降低,显示出发生了本发明多肽对钙通道的阻断作用。使用该试验,本发明的多肽阻断了钙通道,在 200nm 下表现出低 IC₅₀ 值。为比较说明,两种已知的商用钙通道阻断剂,硝苯吡啶和异搏定分别具有 33nM 和 4800nM 和 IC₅₀ 值。

本发明的多肽本身用作细胞中的钙通道阻断剂。因此,这些多肽也可用于控制无脊椎有害动物的病害及治疗哺乳动物的白细胞中钙通道功能介导的疾病和症状,例如绞痛、高血压、心肌病、室上性心律失常、食管弛缓不能、早产和雷诺病。并且,这些肽用于细胞(包括(但不限于)神经、肌

肉和心血管系统的细胞)的生理学研究。

本发明多肽的可药用盐也在本发明的范围之内。此类盐通过本领域专业人员熟知的方法生成。例如,多肽的酸式盐可通过常规方法来制备。

当给哺乳动物施用本发明的多肽时,依一般药用惯例,本发明多肽可以单独使用或与可药用载体或稀释剂结合使用。该多肽可口服或经非胃肠道给药,但多肽优选非胃肠道给药途径。非胃肠道给药包括静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下和局部给药。

用于口服的本发明多肽,例如可以以片剂或胶囊剂形式、或作为水溶液剂或悬浊剂形式服用该化合物。用于口服的片剂情形时,通常用的载体包括乳糖和玉米淀粉,也常加入润滑剂,如硬脂酸镁。用于口服的胶囊形式中,有利的稀释剂是乳糖和干玉米淀粉。当需口服水悬浊剂时,将活性成份与乳化剂和悬浮剂混合。如果需要,也可加入某些甜味和/或调味剂。

用于肌内、腹膜内、皮下和静脉内,通常要制备该活性成份的无菌溶液剂,并且该溶液剂的 pH 应当适当调节并缓冲。静脉内使用时,应控制溶质的总浓度,以使得该制剂等渗。

当本发明的多肽或其盐用于人类对象时,一般应由处方医师来确定每日剂量。并且,该剂量随患者个体的年龄、体重和反应,以及患者症状的严重程度和所施用的具体化合物的效能不同而不同。

当本发明的多肽或其盐用于控制无脊椎有害动物时,将上述多肽直接施用于上述无脊椎动物或将上述多肽施用到上述无脊椎有害动物环境中。例如,可将本发明的化合物以溶液形式喷洒于上述无脊椎动物。控制上述无脊椎动物所需的化合物剂量随无脊椎动物及环境条件不同而不同,并决定于人们所用的化合物。

当本发明的多肽或其盐用于细胞的生理研究时,按照本领域技术人员熟知的方法给细胞施用上述多肽。例如,可在合适的生理缓冲液中给细胞施用上述多肽。此类研究所用的本发明多肽的适宜浓度为 $200\mu\text{M}$ 。但是,在此类研究中上述肽的浓度可以大于或大大低于 $200\mu\text{M}$ 。本领域专业人员可按熟知的方法来确定所施用多肽的量。

实施例

第 I 步,无声杆捕鸟蛛的天然毒液的分级分离
将无声杆捕鸟蛛的天然毒液(约 $40\mu\text{l}$)上样

至反相 HPLC 柱(Vydac^o, C-18, 300A, $22\times 250\text{mm}$)并使用双相线性梯度系统洗脱(从 95%A 和 5%B 至 80%A 和 20%B 洗脱 30 分钟,然后从 80%A 和 20%B 至 30%A 和 70%B 洗脱 25 分钟(A=0.1%三氟乙酸(TFA), B=乙腈)),在波长为 220nm 处检测,流速为 15ml/分。按如下规定收集了级份。

表 1

级份 6	35.9 至 37.3 分钟
级份 7	37.3 至 39.5 分钟
级份 8	39.5 至 40.1 分钟
级份 9	40.1 至 40.9 分钟
级份 10	40.9 至 41.8 分钟

通过冻干浓缩了分段合并的上面每组级份。如下述进行进一步分级分离。

第 II 步,第 I 步级份的细分级分离

A) 级份 6 的细分级分离

将由约 $60\mu\text{l}$ 天然毒液经上述第 I 步得到的级份 6 样品上样至反相 HPLC 柱(BakerWPC-18, $4.6\times 250\text{mm}$),用 85%A 和 15%B 至 65%A 和 35%B 的线性梯度洗脱系统洗脱 45 分钟(A=0.1%TFA, B=乙腈),在 220nm 处检测,流速为 1.0ml/分。按下述规定收集了级份。

表 2

级份 6-6	24.0 至 24.8 分钟
级份 6-7	25.0 至 25.4 分钟
级份 6-8	25.6 至 26.5 分钟
级份 6-9	27.0 至 28.7 分钟
级份 6-13	33.5 至 34.4 分钟
级份 6-14	34.4 至 35.4 分钟

经冻干浓缩了分段合并的上面各组级份。

B) 级份 7 的细分级分离

将从约 $60\mu\text{l}$ 天然毒液经上述第 I 步处理得到的级份 7 样品上样于强阳离子交换柱(磺乙基天冬酰胺(The Nest Group, 45 Valley Rd., Southborough, MA 01772), $5\mu\text{m}$, $4.6\times 200\text{mm}$),使用从 100%A 和 0%B 至 0%A 和 100%B 的线性梯度系统洗脱 45 分钟(A=5mM H_3PO_4 /20%乙腈, B=5mM H_3PO_4 , 1.0M NaCl/20%乙腈),于 230nm 处检测,流速为 1.0ml/分。按下述规定收集了级份。

7

表 3

级份 7-6	21.9 至 22.3 分钟
级份 7-9	24.8 至 25.5 分钟
级份 7-11	26.1 至 26.7 分钟
级份 7-12	27.1 至 27.6 分钟
级份 7-13	27.6 至 28.9 分钟
级份 7-14	29.7 至 30.8 分钟
级份 7-15	31.0 至 32.3 分钟
级份 7-16	32.5 至 33.1 分钟
级份 7-17	34.2 至 36.0 分钟

经冻干浓缩了分段收集的上述各组级份。

C) 级份 8 的分级分离

将从约 100 μ l 天然毒液经上述第 I 步分离得到的级份 8 样品物质上样至反相 HPLC 柱 (Vydac^o, C-18,300A,10 \times 250mm), 以线性梯度洗脱系统进行洗脱: 从 80%A 和 20%B 至 71%A 和 29%B 洗脱 35 分钟, 然后用 71%A 和 29%B 洗脱 10 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 6.0ml/分。按下规定收集了级份。

表 4

级份 8-5	19.2 至 21.2 分钟
级份 8-6	21.3 至 22.5 分钟
级份 8-7	25.9 至 26.5 分钟
级份 8-8	27.4 至 28.3 分钟

经冻干浓缩了分级合并的上述各组级份。

第三步, 第 II 步级份的细分级分离。

A) 级份 7-6 的细分级分离

将由约 70 μ l 天然毒液经上述第 II-B 步处理得到的级份 7-6 样品上样至反相 HPLC 柱 (Vydac^o, C-18,300A,10 \times 250mm), 并用线性梯度系统展开: 用 90%A 和 10%B 洗脱 10 分钟, 然后用 90%A 和 10%B 至 60%A 和 40%B 洗脱 40 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 3.5ml/分。如下规定收集了级份。

表 5

8

级份 7-6.1	32.2 至 34.3 分钟
级份 7-6.2	35.5 至 36.2 分钟

经冻干浓缩分段收集的上每组级份。

B) 级份 7-9 的细分级分离

将从约 300 μ l 天然毒液经上述第 II-B 步骤得到的级份 7-9 样品上样至反相 HPLC 柱 (Vydac^o, C-18,300A,10 \times 250mm), 用线性梯度系统进行洗脱: 用 90%A 和 10%B 洗脱 10 分钟, 然后用 90%A 和 10%B 至 65%A 和 35%B 洗脱 40 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 3.5ml/分。收集洗脱时间从 33 至 35 分钟的洗脱级份, 并合为级份 7-9.1。

C) 级份 7-11 的细分级分离

将由约 600 μ l 天然毒液经上述第 II-B 步得到的级份 7-11 样品上样至反相 HPLC 柱 (Vydac^o, C-18,300A,10 \times 250mm), 用线性梯度系统进行洗脱: (90%A 和 10%B 洗脱 10 分钟, 然后用 90%A 和 10%B 至 65%A 和 35%B 洗脱 60 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 3.5ml/分。收集洗脱时间从 34.2 至 35.5 分钟的洗脱级份, 合并为级份 7-11.1。

D) 级份 7-12 的细分级分离

将由约 600 μ l 天然毒液经上述第 II-B 步得到的级份 7-12 样品上样至反相 HPLC 柱 (Vydac^o, C-18,300A,10 \times 250mm), 先用 90%A 和 10%B 洗脱 10 分钟, 然后用从 90%A 和 10%B 至 65%A 加 35%B 的线性梯度洗脱系统展开 60 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 3.5ml/分。如下规定收集了级份。

表 6

级份 7-12.1	28.0 至 29.1 分钟
级份 7-12.2	38.4 至 39.6 分钟

E) 级份 7-13 的细分级分离

将从约 200 μ l 天然毒液经上述第 II-B 步得到的级份 7-13 样品上样至反相 HPLC 柱 (Vydac^o, C-18,300A,10 \times 250mm), 先用 90%A

和 10%B 洗脱 10 分钟, 然后用从 90%A 加 10%B 至 60%A 加 40%B 的线性梯度系统洗脱 40 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 3.5ml/分。按下述规定收集了级份。

表 7

级份 7-13.1	33.0 至 34.5 分钟
级份 7-13.2	35.1 至 36.5 分钟

经冻干浓缩了分段合并的上述每组级份。

F) 级份 7-15 的细分级分离

将从约 200 μ l 天然毒液经上述第 II-B 步得到的级份 7-15 样品上样至反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300 \AA , 10 \times 250mm), 先用 90%A 加 10%B 洗脱 10 分钟, 然后用从 90%A 加 10%B 至 60%A 加 40%B 的线性梯度洗脱系统展开 40 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 3.5ml/分。按下述规定收集了级份。

表 8

级份 7-15.1	33.1 至 33.6 分钟
级份 7-15.2	34.5 至 36.2 分钟
级份 7-15.3	37.7 至 39.1 分钟

经冻干浓缩了分段合并的上述各组级份。

G) 级份 7-16 的细分级分离

将从约 600 μ l 天然毒液经上述第 II-B 步得到的级份 7-16 样品上样至反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300 \AA , 10 \times 250mm), 先用 90%A 加 10%B 洗脱 10 分钟, 然后用从 90%A 加 10%B 至 60%A 加 35%B 的线性梯度洗脱系统展开 60 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 3.5ml/分。收集了洗脱时间为 31.8 至 33.0 分钟的级份, 合并为级份 7-16.1。

H) 级份 7-17 的细分级分离

将由约 25 μ l 天然毒液经上述第 II-B 步得到的级份 7-17 样品上样至反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300 \AA , 10 \times 250mm), 先用 90%A 加 10%B 洗脱 10 分钟, 然后用从 90%A 加 10%B 至 60%A 加 40%B 的线性梯度系统洗脱 40 分钟 (A = 0.1% TFA, B = 乙腈), 在 220nm 处检测, 流速为 3.5ml/分。按下述规定收集了级份。

表 9

级份 7-17.1	15.6 至 18.4 分钟
级份 7-17.2	18.5 至 19.4 分钟
级份 7-17.3	27.1 至 28.6 分钟
级份 7-17.4	28.6 至 30.1 分钟

级份 7-17.5 30.1 至 31.9 分钟

级份 7-17.6 31.9 至 33.5 分钟

经冻干浓缩了分段收集的上述各组级份。

实施例 1 无声杆捕鸟蛛的肽 6-6

用下面的方法测定并证实了上述第 II-A 步骤中制备的肽 6-6 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1-10nmols 样品 (分三份) 进行苯氨基磺甲基 (PTC) 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪 (ABI) 上, 对天然肽和还原/吡啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 6-6 的结构如下所示。

SEQ ID No:1, 39 个残基, 6 个半胱氨酸, 3 个二硫键。

计算质量 = 4382.3。

观测质量 = 4382.16 \pm 0.54 (离子喷雾质谱)。

实施例 2 无声杆捕鸟蛛的肽 6-8

用下面的方法测定并证实了上述第 II-A 步骤中制备的肽 6-8 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1-10nmols 样品 (分三份) 进行 PTC 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪 (ABI) 上对天然肽和还原/吡啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 6-8 结构如下所示。

SEQ ID No:2, 39 个残基, 6 个半胱氨酸, 3 个二硫键。

计算质量 = 4369.2。

观测质量 = 4368.26 \pm 0.27 (离子喷雾质谱)。

实施例 3 无声杆捕鸟蛛的肽 7-6.1

用下列方法测定并证实了上述第 III-A 步骤中制备的肽 7.6-1 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1-10nmols 样品 (分三份) 进行 PTC 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪 (ABI) 上对天然肽和还原/吡啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 7-6.1 的结构如下所示。

SEQ ID No:3, 33 个残基, 6 个半胱氨酸, 3 个二硫键。

计算质量 = 3786.2。

观测质量 = 3784.54 (离子喷雾质谱)。

实施例 4 无声杆捕鸟蛛的肽 7-13.1

用下列方法测定并证实了上述第 III-E 步骤中

制备的肽 7-13.1 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1~10nmols 样品（分三份）进行 PTC 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪（ABI）上对天然肽和还原/吡啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 6-8 的结构如下所示。

SEQ ID No:4, 34 个残基, 6 个半胱氨酸, 3 个二硫键。

计算质量 = 3814.32。

观测质量 = 3813.67 ± 0.27 (离子喷雾质谱)。

实施例 5 无声杆捕鸟蛛的肽 7-13.2

用下面的方法测定并证实了上述第 III-E 步骤中制备的肽 7-13.2 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1~10nmols 样品（分三份）进行 PTC 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪（ABI）上对天然肽和还原/吡啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 7-13.2 的结构如下所示。

SEQ ID No:5, 42 个残基, 6 个半胱氨酸, 3 个二硫键。

计算质量 = 4844.45。

观测质量 = 4844.66 (离子喷雾质谱)。

实施例 6 无声杆捕鸟蛛的肽 7-15.2

用下面方法测定并证实了上述第 III-F 步骤中制备的肽 7-15.2 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1~10nmols 样品（分三份）进行 PTC 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪（ABI）上对天然肽和还原/吡啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 7-15.2 的结构如下所示。

SEQ ID No:6, 39 个残基, 6 个半胱氨酸, 3 个二硫键。

计算质量 = 4342.19。

观测质量 = 4341.84 ± 0.33 (离子喷雾质谱)。

实施例 7 无声杆捕鸟蛛的肽 7-17.1

用下面的方法测定并证实了上述第 III-H 步骤中制备的肽 7-17.1 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1~10nmols 样品（分三份）进行 PTC 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪（ABI）上对天然肽和还原/吡

啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 7-17.1 的结构如下所示。

SEQ ID No:7, 39 个残基, 6 个半胱氨酸, 3 个二硫键。

计算质量 = 4383.28。

观测质量 = 4382.33 ± 0.52 (离子喷雾质谱)。

实施例 8 无声杆捕鸟蛛的肽 7-17.3

用下面方法测定并证实了上述第 III-H 步骤中制备的肽 7-17.3 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1~10nmols 样品（分三份）进行 PTC 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪（ABI）上对天然肽和还原/吡啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 7-17.3 的结构如下所示。

SEQ ID No:8。

观测质量 = 4368.23 ± 0.47 (离子喷雾质谱)。

实施例 9 无声杆捕鸟蛛的肽 7-17.4

用下面方法测定并证实了上述第 III-H 步骤中制备的肽 7-17.4 的结构。用 Waters Pico-Tag 系统对 1~10nmols 样品（分三份）进行 PTC 氨基酸分析。在脉冲液相顺序分析仪（ABI）上对天然肽和还原/吡啶基乙基化肽都进行了 N-末端测序分析。由 SCIEX APIIII 离子喷雾质谱仪获得质谱分析。

取得的数据共同证实了肽 7-17.4 的结构如下所示。

SEQ ID No:9, 39 个残基, 6 个半胱氨酸, 3 个二硫键。

计算质量 = 4383.23。

观测质量 = 4382.19 ± 0.38 (离子喷雾质谱)。

序列表

(1) 一般资料

(i) 申请人

(A) 名称: Pfizer Inc

(B) 街道: 235 East 42nd Street

(C) 城市: New York

(D) 州: New York

(E) 国家: U.S.A.

(F) 邮政编码 (ZIP): 10017

(G) 电话: (203) 441-4905

13

- (H) 电传: (203) 441-5221
 (A) 名称: NPS Pharmaceuticals, Inc.
 (B) 街道: 420 Chipeta Way
 (C) 城市: Salt Lake City
 (D) 州: Utah
 (E) 国家: U.S.A.
 (F) 邮政编码 (ZIP): 84108
 (G) 电话: (801) 583-4939
 (H) 电传: (801) 583-4961
 (ii) 发明名称: 从无声杆捕鸟蛛中得到的阻

断钙通道的多肽

- (iii) 序列数: 9
 (iv) 计算机可读形式:
 (A) 介质类型: 软磁盘
 (B) 计算机: IBM PC 兼容机
 (C) 操作系统: PC-DOS / MS-DOS
 (D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version

#1.25(EPO)

- (vi) 优选申请资料
 (A) 申请号: US 07 / 973, 323
 (B) 申请日: 03-11-1992
 (2) SEQ ID No:1 的信息
 (i) 顺序特征:
 (A) 长度: 39 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链: 单
 (D) 拓扑学: 线型
 (ii) 分子类型: 肽
 (iii) 假说 (Hypothetical): 无
 (iv) 反有意义 (链 (Anti-Sense)): 无
 (vi) 最初来源:
 (A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛
 (B) 组织类型: 毒液
 (xi) 顺序描述: SEQ ID No:1

Leu Phe Glu Cys Val Leu Ser Cys
 1 5

Asp Ile Lys Lys Asn Gly Lys Pro
 10 15

Cys Lys Pro Lys Gly Glu Lys Lys
 20

Cys Ser Gly Gly Trp Arg Cys Lys
 25 30

14

Ile Asn Phe Cys Leu Lys Val

- (2) SEQ ID No:2 的信息
 (i) 顺序特征:
 (A) 长度: 39 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链: 单
 (D) 拓扑学: 线型
 (ii) 分子类型: 肽
 (iii) 假说: 无
 (iv) 反有意义 (链): 无
 (vi) 最初来源:
 (A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛
 (B) 组织类型: 毒液
 (xi) 顺序描述: SEQ ID No:2
 Leu Phe Glu Cys Ala Leu Ser Cys
 1 5

Asp Ile Lys Lys Asn Gly Lys Pro
 10 15

Cys Lys Pro Lys Gly Glu Lys Lys
 20

Cys Ser Gly Gly Trp Arg Cys Lys
 25 30

Ile Asn Phe Cys Leu Lys Ile
 35

- (2) SEQ ID No:3 的信息
 (i) 顺序特征:
 (A) 长度: 33 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链: 单
 (D) 拓扑学: 线型
 (ii) 分子类型: 肽
 (iii) 假说: 无
 (iv) 反有意义 (链): 无
 (vi) 最初来源:

(A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛
 (B) 组织类型: 毒液

(xi) 顺序描述: SEQ ID No:3

Cys Ala Glu Phe Gln Ser Lys Cys
 1 5

Lys Lys Asp Ser Glu Cys Cys Gly
 10 15

15

Thr Leu Glu Cys Ser Pro Thr Trp
20

Lys Trp Cys Val Tyr Pro Ser Pro Phe
25 30

(2) SEQ ID No:4 的信息

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 34 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链: 单

(D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 无

(iv) 反有意义 (链): 无

(vi) 最初来源:

(A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛

(B) 组织类型: 毒液

(xi) 顺序描述: SEQ ID No:4

Ser Cys Gly His Val Gly Thr
1 5

Pro Cys Glu Lys Asn Trp Asp
10

Cys Cys Lys Gly Lys Val Cys
15 20

Ser Pro Arg Trp Lys Leu Cys
25

Ala Tyr Glu Ser Pro Phe
30

(2) SEQ ID No:5 的信息

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 42 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链: 单

(D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 无

(iv) 反有意义 (链): 无

(vi) 最初来源:

(A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛

(B) 组织类型: 毒液

(xi) 顺序描述: SEQ ID No:5

Cys Leu Gly Glu Asn Val Pro
1 5

16

Cys Asp Lys Asp Arg Pro Asn
10

Cys Cys Ser Lys Tyr Glu Cys
15

Leu Glu Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25

Arg Cys Tyr Ala Ser Tyr Tyr
30 35

Ser Tyr Lys Lys Lys Thr Leu
40

(2) SEQ ID No:6 的信息

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 39 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链: 单

(D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 无

(iv) 反有意义 (链): 无

(vi) 最初来源:

(A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛

(B) 组织类型: 毒液

(xi) 顺序描述: SEQ ID No:6

Leu Ile Glu Cys Ala Phe Ser
1 5

Cys Asp Ile Thr Lys Asn Gly
10

Lys Pro Cys Lys Pro Lys Gly
15 20

Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly
25

Trp Arg Cys Lys Ile Asn Phe
30 35

Cys Leu Lys Ile

(2) SEQ ID No:7 的信息

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 39 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链: 单

(D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

17

(iii) 假说: 无
 (iv) 反有意义 (链): 无
 (vi) 最初来源:
 (A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛
 (B) 组织类型: 毒液
 (xi) 顺序描述: SEQ ID No:7
 Leu Phe Glu Cys Val Leu Ser
 1 5
 Cys Asp Ile Lys Lys Asn Gly
 10
 Lys Pro Cys Lys Pro Lys Gly
 15 20
 Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly
 25
 Trp Arg Cys Lys Ile Asn Phe
 30 35
 Cys Leu Lys Val

(2) SEQ ID No:8 的信息

(i) 顺序特征:
 (A) 长度: 35 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链: 单
 (D) 拓扑学: 线型
 (ii) 分子类型: 肽
 (iii) 假说: 无
 (iv) 反有意义 (链): 无
 (vi) 最初来源:
 (A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛
 (B) 组织类型: 毒液
 (xi) 顺序描述: SEQ ID No:8
 Leu Phe Glu Cys Ala Leu Ser
 1 5
 Cys Asp Ile Lys Lys Asn Gly
 10
 Lys Pro Cys Lys Pro Xaa Gly
 15 20
 Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly
 25
 Xaa Arg Xaa Xaa Ile Asn Phe
 30 35

(2) SEQ ID No:9 的信息

(i) 顺序特征:

18

(A) 长度: 39 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链: 单
 (D) 拓扑学: 线型
 (ii) 分子类型: 肽
 (iii) 假说: 无
 (iv) 反有意义 (链): 无
 (vi) 最初来源:
 (A) 生物体: 无声杆捕鸟蛛
 (B) 组织类型: 毒液
 (xi) 顺序描述: SEQ ID No:9
 Leu Phe Glu Cys Val Leu Ser
 1 5
 Cys Asp Ile Lys Lys Asn Gly
 10
 Lys Pro Cys Lys Pro Lys Gly
 15 20
 Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly
 25
 Trp Arg Cys Lys Ile Asn Phe
 30 35
 Cys Leu Lys Val