



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102573884 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 14

(21) 申请号 201080041208. 8

(22) 申请日 2010. 09. 13

(30) 优先权数据

61/272, 336 2009. 09. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2010/002275 2010. 09. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/033358 EN 2011. 03. 24

(73) 专利权人 阿洛莫恩临床有限公司

地址 以色列耶路撒冷

(72) 发明人 阿隆·梅厄

罗尼特·西姆哈·切尔基

埃拉·科尔贝 耶尔·兰古特

尼西姆·巴扎约

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1307900 A, 2001. 08. 15, 权利要求 1 以及

实施例 1.

US 5877026 A, 1999. 03. 02, 摘要, 第 2 栏第 25-28 行, 第 7 栏第 52-57 行, 第 9 栏第 1-2 行.

Yucheng Xiao. Tarantula Huwentoxin-IV Inhibits Neuronal Sodium Channels by Binding to Receptor Site 4 and Trapping the Domain II Voltage Sensor in the Closed Configuration. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2008, 第 283 卷 (第 40 期),

Frank Bosmans. Four Novel Tarantula Toxins as Selective Modulators of Voltage-Gated Sodium Channel Subtypes. 《MOLECULAR PHARMACOLOGY》. 2006, 第 69 卷 (第 2 期),

审查员 李有朝

权利要求书1页 说明书35页

序列表5页 附图35页

(54) 发明名称

从蜘蛛毒液中分离的新型肽及其应用

(57) 摘要

本发明描述的主题涉及用作有效和选择性离子通道阻断剂的分离的蜘蛛毒液肽, 以及组合物和用于治疗疼痛的方法。

1. 一种分离肽,由以下氨基酸序列组成:
SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其 C 端酰胺化形式。
2. 根据权利要求 1 所述的分离肽在制备用于治疗神经源性疼痛和 / 或神经性疼痛的药物中的应用。
3. 一种药物组合物,包括:
根据权利要求 1 所述的分离肽 ;以及
药用载体或稀释剂。
4. 根据权利要求 3 所述的药物组合物在制备用于治疗神经源性疼痛和 / 或神经性疼痛的药物中的应用。
5. 镇痛量的根据权利要求 1 所述的分离肽在制备用于治疗神经源性疼痛和 / 或神经性疼痛的药物中的应用。
6. 一种用于分离根据权利要求 1 所述的肽的方法,包括:
离心粗蜘蛛毒液以获得离心毒液 ;
过滤所述离心毒液以获得过滤毒液 ;
将所述过滤毒液加载在凝胶过滤柱上 ;以及
洗脱所述柱以获得包含分离肽的部分。
7. 一种编码根据权利要求 1 所述的分离肽的核酸序列。
8. 根据权利要求 1 所述的分离肽,其中,所述肽分离自蜘蛛毒液。
9. 根据权利要求 1 所述的分离肽,其中,所述肽是分离的合成肽。
10. 根据权利要求 8 所述的分离肽,其中,所述蜘蛛为一种狼蛛。
11. 分离肽在制备用于阻断 Na_v 通道的药物中的应用,
所述分离肽由 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其 C 端酰胺化形式表示。
12. 一种用于对根据权利要求 1 所述的肽进行再折叠的方法,包括:
收集粗肽以生产收集肽 ;
溶解所述收集肽以生产溶解肽 ;
还原所述溶解肽以生产还原肽 ;
在包含还原和 / 或氧化的半胱氨酸或谷胱甘肽的氧化还原混合物中折叠所述还原肽以生产折叠肽 ;以及
纯化所述折叠肽以生产再折叠肽。
13. 一种用于阻断 Na_v 通道的组合物,所述组合物包括由 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其 C 端酰胺化形式表示的分离肽。

从蜘蛛毒液中分离的新型肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明描述的主题涉及用作有效和选择性离子通道阻断剂的分离的蜘蛛毒液肽, 以及用于治疗神经性疼痛的组合物和方法。

背景技术

[0002] 根据动作电位的生成和传递, 电压依赖性钠 (Na_v1) 通道和在某些情况下的低电压激活钙 (Ca_v3) 通道是这样的膜蛋白, 其存在于所有可兴奋细胞中, 包括神经元。抑制 Na_v1 通道导致神经元不能产生动作电位, 因此不能编码和传输信息。

[0003] 神经性疼痛是涉及外周神经过度兴奋和中枢神经敏感化的复合神经元过程。外周神经过度兴奋可能是由于受损的背根神经节 (DRG) 神经元的异位自发放电 (ectopic spontaneous firing), 其传递至中枢神经系统 (CNS) 并感知为疼痛。通过特异性抑制外周中受损的感觉疼痛的神经元中的 Na_v1 (或 Ca_v3) 通道来处理该现象可有效减少或消除神经性疼痛。这可以通过局部应用非特异性 Na_v 阻断剂 (阻滞剂) (如局部麻醉剂) 或通过全身应用特异性识别 DRG 神经元膜中 Na_v1 通道的 Na_v1 阻断剂来实现。增加该特异性的一种通用方法是通过避开 CNS (在 CNS 中大多数 Na_v1 同工型 (亚型, isoforms) 对神经元活动至关重要)。另一种方法是找到其表达受限于过度兴奋的 DRG 神经元的 Na_v1 同工型的选择性阻滞剂 (Devor, 2006 ; Cummins 等人, 2007)。关于 Na_v1 阻断剂特异性的主要问题之一是避免心脏阻滞活性。

[0004] 河豚毒素 (TTX) 敏感型 $\text{Na}_v1.3$ 通道通常在胚胎期在 CNS 和外周神经系统 (PNS) 中表达, 并且其表达随着成熟而大幅下调。然而, 报导了神经元损伤后该通道表达的上调。这些观察数据表明特异性靶向 $\text{Na}_v1.3$ 同工型可专门阻断受损的过度兴奋 DRG 神经元 (Devor, 2006 ; Cummins 等人, 2007)。

[0005] TTX 耐受型 $\text{Na}_v1.8$ 通道几乎专门在 PNS 中表达, 并显示可介导大多数有据可依的 DRG 神经元动作电位的抗 TTX 成分。最近, 已经发表了一篇文章, 强调了在疼痛控制中 $\text{Na}_v1.8$ 通道作为靶的重要性 (Jarvis, M. F. 等人, 2007 ; Zimmermann, K. 等人, 2007)。

[0006] 通过靶向在外周中特异性表达的蛋白来治疗疼痛的重要性在 ASIC1 通道的情况中得到强调, 所述 ASIC1 通道在脊髓中表达, 并且在大鼠神经性疼痛模型中它们的抑制可诱导镇痛 (痛觉缺失)。然而, 由于全身性给予肽不能穿过血脑屏障而到达其靶蛋白, 因此应直接给予肽调节子 (Mazzuca, M. 等人 2007, Nat. Neurosci. 10, 943)。

[0007] 在整个说明书中引用了各种科学出版物和专利或已公布的专利申请。将所有这些出版物公开的全部内容以引用方式并入本说明书, 以便更充分地描述本发明所属领域的状态。在该部分或本申请的任意其它部分中引用或指出的参考文献不应解释为承认该参考文献可用作本发明的现有技术。

发明内容

[0008] 提供了从蜘蛛毒液中分离的肽。还提供了所分离的合成性蜘蛛毒液肽。合适的蜘蛛

蛛可包括狼蛛种。

[0009] 在一个实施方式中,根据本文描述的主题,纯化或分离肽可以包括氨基酸序列或由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列具有 2 至 50 个连续氨基酸,10 至 50 个连续氨基酸,20 至 50 个连续氨基酸,25 至 45 个连续氨基酸,29 至 40 个连续氨基酸,29 至 35 个连续氨基酸,至少 29 和至多 35 个连续氨基酸。

[0010] 在另一个实施方式中,根据本文描述的主题,纯化或分离肽具有在 3000 至 5000 道尔顿,3250 至 4750 道尔顿,3500 至 4500 道尔顿,3550 至 4300 道尔顿,或 3600 至 4250 道尔顿的范围内的分子量。

[0011] 在一个实施方式中,本文所描述的肽可显示离子通道抑制活性。离子通道可以为钠离子通道或钙离子通道。

[0012] 在又一个实施方式中,本文所描述的主题提供了纯化或分离肽,其包括包括 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4,SEQ ID NO :5,或 SEQ ID NO :6 中任一序列的序列、包括由 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4,SEQ ID NO :5,或 SEQ ID NO :6 中任一序列组成的序列,或包括属于 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4,SEQ ID NO :5,或 SEQ ID NO :6 中任一序列的序列;或包括通过以下方式获得的序列:(i) 通过不同的氨基酸残基置换 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4,SEQ ID NO :5,或 SEQ ID NO :6 中任一个的一个或多个氨基酸残基,(ii) SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4,SEQ ID NO :5,或 SEQ ID NO :6 的任一个中缺失一个或多个氨基酸残基,和/或(iii) 在 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4,SEQ ID NO :5,或 SEQ ID NO :6 的任一个中添加一个或多个氨基酸残基,或肽的盐或化学衍生物。对于缺失、置换或添加的一个或多个,可以是指 1 至 10,1 至 8,1 至 6,1 至 4,1 至 2,或 1 个。在一个实施方式中,保持离子通道阻断活性。

[0013] 根据本文所描述的主题,纯化或分离肽可以包括一个或多个氨基酸序列或由一个或多个氨基酸序列组成,所述一个或多个氨基酸序列包括,例如 DDCLGMFSSCDPDNDKCCEGRKC NKDKWCKYVL(SEQ ID NO :1),YQEFLLWTCDEERKCCGDMVCRLWCKKRL(SEQ ID NO :2),ACLGFGKCNPSNDKCKSSSLVCSQKHKWKYGW(SEQ ID NO :3),ACKGLFVTCTPGKDECCPNHVCSSKHKWKYKI(SEQ ID NO :4),DCLGFMRCIPDNDKCCRPNLVCSRTHKWKYVF(SEQ ID NO :5) 和 DCLGWFKGCDPDNDKCCEGYKCNRRDKWKYKLW(SEQ ID NO :6)。可替换地,肽可以包括由 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4,SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所表示的氨基酸序列的 C 端酰胺化形式或者由 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4,SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 所表示的氨基酸序列的 C 端酰胺化形式组成。特别地,肽可以包括由 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所表示的氨基酸序列的 C 端酰胺化形式或者由 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所表示的氨基酸序列的 C 端酰胺化形式组成。当肽包括由 SEQ ID NO :6 所表示的氨基酸序列或者由 SEQ ID NO :6 所表示的氨基酸序列组成时,蜘蛛毒液可以为 Red Morph Grammostola(RMG) 毒液并且不是 Brown Morph Grammostola(BMG)。

[0014] 在另一个实施方式中,本文所描述的主题提供了具有 20 至 40 个连续氨基酸的纯化或分离肽,所述连续氨基酸包括序列 DCLGX₁X₂X₃X₄CX₅PDNDKCC(SEQ ID NO :7);其中 X₁ 为 M 或 F;X₂ 为 M 或 F;X₃ 为 R 或 S;X₄ 为 K 或 S;并且 X₅ 为 D 或 I,并且肽显示离子通道抑制活

性。离子通道可以为钠离子通道或钙离子通道。肽可纯化自蜘蛛毒液或可分离自合成性蜘蛛毒液肽。

[0015] 在一个实施方式中,本文所描述的主题提供了具有 20 至 40 个连续氨基酸的纯化或分离肽,所述连续氨基酸包括序列 ACX₆GX₇X₈X₉X₁₀CX₁₁PX₁₂X₁₃DX₁₄CC(SEQ ID NO:8),其中 X₆ 为 K 或 L;X₇ 为 L 或 F;X₈ 为 G 或 F;X₉ 为 E 或 V;X₁₀ 为 K 或 T;X₁₁ 为 N 或 T;X₁₂ 为 S 或 G;X₁₃ 为 N 或 K;且 X₁₄ 为 K 或 E,并且肽显示离子通道抑制活性。离子通道可以为钠离子通道或钙离子通道。肽可纯化自蜘蛛毒液或可分离自合成性蜘蛛毒液肽。

[0016] 在另外的实施方式中,本文所描述的主题提供了具有 20 至 40 个连续氨基酸的纯化或分离肽,所述连续氨基酸包括序列 X₁₅VCSX₁₆X₁₇HKWKY(SEQ ID NO:9);其中 X₁₅ 为 L 或 H;X₁₆ 为 Q、S 或 R;且 X₁₇ 为 K 或 T,并且肽显示离子通道抑制活性。离子通道可以为钠离子通道或钙离子通道。肽可纯化自蜘蛛毒液或可分离自合成性蜘蛛毒液肽。

[0017] 在又一个实施方式中,根据本文所描述的主题,提供了可以包括或由本文所描述的肽或其盐中的任一种或多种组成的离子通道抑制剂。离子通道可以为钠离子通道或钙离子通道。

[0018] 根据本文所描述的主题,提供了可以包括或由以下物质组成的药物组合物:包括,属于或由 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8,和 / 或 SEQ ID NO:9 中任一个所表示的一个或多个氨基酸序列组成的肽;以及药用载体或稀释剂。在一个实施方式中,载体可为水性载体。在一个实施方式中,肽可以包括或由 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8,和 / 或 SEQ ID NO:9 中任一个所表示的氨基酸序列的 C 端酰胺化形式所表示的一个或多个氨基酸序列组成。在一个实施方式中,肽可以包括或由 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所表示的氨基酸序列的 C 端酰胺化形式所表示的一个或多个氨基酸序列组成。当肽包括或由 SEQ ID NO:6 所表示的氨基酸序列组成时,蜘蛛毒液可以为 Red Morph Grammostola(RMG) 毒液并且不是 Brown Morph Grammostola(BMG)。

[0019] 在一个实施方式中,根据本文所描述的主题,提供了治疗受试者体内疼痛的方法,所述方法包括或由以下组成:给予需要其的受试者治疗有效量的肽,所述肽包括,属于,或由 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 中任一个所表示的一个或多个氨基酸序列,和 / 或其药用盐组成。在一个实施方式中,肽可以包括或由 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8,和 / 或 SEQ ID NO:9 中任一个所表示的氨基酸序列的 C 端酰胺化形式所表示的一个或多个氨基酸序列组成。在另一个实施方式中,肽可以包括或由 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所表示的氨基酸序列的 C 端酰胺化形式所表示的一个或多个氨基酸序列组成。在另外的实施方式中,治疗有效量可以包括镇痛或抗炎有效量。当肽包括或由 SEQ ID NO:6 所表示的氨基酸序列组成时,蜘蛛毒液可以为 Red Morph Grammostola(RMG) 毒液并且不是 Brown Morph Grammostola(BMG)。

[0020] 在另一个实施方式中,根据本文所描述的主题,提供了治疗受试者体内疼痛的方法,所述方法包括或由给予需要其的受试者治疗有效量的包括或由以下肽以及药用载体或

稀释剂组成的药物组合物组成,所述肽包括,属于,或由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9中任一个所表示的一个或多个氨基酸序列,和/或其药用盐组成。在一个实施方式中,肽可以包括或由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,和/或SEQ ID NO:9中任一个所表示的氨基酸序列的C端酰胺化形式所表示的一个或多个氨基酸序列组成。在另一个实施方式中,肽可以包括或由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所表示的氨基酸序列的C端酰胺化形式所表示的一个或多个氨基酸序列组成。在另外的实施方式中,治疗有效量可以包括镇痛或抗炎有效量。当肽包括或由SEQ ID NO:6所表示的氨基酸序列组成时,蜘蛛毒液可以为Red Morph Grammostola(RMG)毒液而不是Brown Morph Grammostola(BMG)。

[0021] 在另外的实施方式中,本文所描述的主题提供了用于抑制受试者体内离子通道活性的方法,其包括给予受试者治疗有效量的本文所描述的药物组合物,其中对离子通道活性进行抑制而不损害心脏功能。

[0022] 还提供了阻断受试者体内 Na_v 通道的方法。所述方法可以包括或由给予需要其的受试者治疗有效量的肽或包括或由肽以及药用载体或稀释剂组成的药物组合物组成,所述肽包括,属于,或由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9中任一个所表示的一个或多个氨基酸序列,和/或其药用盐组成。在一个实施方式中,肽可以包括或由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,和/或SEQ ID NO:9中任一个所表示的氨基酸序列的C端酰胺化形式所表示的一个或多个氨基酸序列组成。在另一个实施方式中,肽可以包括或由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所表示的氨基酸序列的C端酰胺化形式所表示的一个或多个氨基酸序列组成。在另外的实施方式中,治疗有效量可以包括镇痛或抗炎有效量。当肽包括或由SEQ ID NO:6所表示的氨基酸序列组成时,蜘蛛毒液可以为RedMorph Grammostola(RMG)毒液而不是Brown Morph Grammostola(BMG)。

[0023] 根据本文所描述的主题,提供了用于局部、注射、直肠、鼻内、肺、口腔、非肠道或肠道给予受试者的药物组合物。可通过吸入或输注给予药物组合物。药物组合物可以包括药物制剂(剂量剂型),其包括但不限于注射剂、水溶液、液体、乳剂、凝胶、洗剂、乳膏剂、软膏剂、片剂、胶囊剂、凝胶胶囊剂、以及栓剂。

[0024] 在又一个实施方式中,药物组合物可以包括用于口服、肠道外或肠道给药的液体制剂(液体剂型)。液体制剂可包括水性制剂。

[0025] 通过本文所述的任意方法治疗的疼痛可以为任何已知类型的疼痛,包括外周性疼痛。例如,待治疗的疼痛可以为一种或多种疼痛,其被描述为神经源性疼痛、神经性疼痛、癌症疼痛、术后疼痛、口腔或牙齿疼痛、来自所提及的三叉神经痛的疼痛、来自疱疹后神经痛的疼痛、或由于反射交感性营养不良引起的疼痛和/或与炎症病症相关的疼痛。

[0026] 疼痛可以表征为例如,伤害性疼痛、非伤害性疼痛、躯体痛、内脏痛、神经痛。疼痛可以是刺激应答热、冷、振动、拉伸以及由受损细胞所释放的化学刺激物的受体的结果。此外,疼痛可以由神经细胞功能障碍所产生的疼痛的结果。根据本发明的主题,疼痛可以是与组织如皮肤、肌肉、关节、骨骼和韧带相关的疼痛-通常称为肌肉-骨骼痛。疼痛也可以是

与主体腔的内脏器官相关的疼痛。在这方面,疼痛可以与胸部(心脏和肺),腹部(肝、肾、脾和肠),和/或盆腔(膀胱、子宫和卵巢)相关。此外,根据本发明主题所描述的疼痛可以为与神经系统自身相关的疼痛,例如与挟捏神经或压迫神经有关的疼痛。疼痛可源于外周神经系统,即组织和脊髓之间的神经,或源于中枢神经系统,即脊髓和大脑之间的神经。疼痛可与例如由多发性硬化、中风、脑出血和/或缺氧、神经压力、压迫神经、神经炎症、椎间盘破损或滑脱和/或神经感染如带状疱疹或其它病毒感染引起的神经退变相关。

[0027] 根据本文所描述的主题,炎性病症可以与一种或多种病症相关,所述病症选自急性疼痛,偏头痛,头痛,周期性偏头痛,外伤性神经损伤,神经压迫,神经卡压,疱疹后神经痛,三叉神经痛,糖尿病性神经病变,慢性下腰痛,幻肢痛,慢性盆腔疼痛,神经瘤疼痛,复杂区域疼痛综合症,慢性关节炎疼痛,以及与癌症、化疗、HIV 和 HIV 治疗诱导的神经病变、肠易激综合症和有关疾病和克罗恩病相关的疼痛组成的组。

[0028] 此外,提供了用于从蜘蛛毒液中分离肽的方法,所述肽包括或由 SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :7, SEQ ID NO :8, 和/或 SEQ ID NO :9 中任一个所表示的一个或多个氨基酸序列组成,所述方法可包括离心冻干的粗蜘蛛毒液以获得离心毒液,过滤离心毒液以获得过滤毒液,将过滤毒液加载在凝胶过滤柱上,并洗脱该柱以获得含有所述分离肽的部分(馏分, fraction),可使用阳离子交换和/或 HPLC 色谱进一步纯化所述分离肽。当肽包括或由 SEQ ID NO :6 所表示的氨基酸序列组成时,蜘蛛毒液可以为 Red Morph Grammostola(RMG) 毒液而不是 Brown Morph Grammostola(BMG)。

[0029] 此外,提供了用于从蜘蛛毒液中分离肽的方法,所述肽包括或由 SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :7, SEQ ID NO :8, 和/或 SEQ ID NO :9 中任一个所表示的一个或多个氨基酸序列组成。当肽包括或由 SEQ ID NO :6 所表示的氨基酸序列组成时,蜘蛛毒液可以为 Red Morph Grammostola(RMG) 毒液而不是 Brown Morph Grammostola(BMG)。所述方法可以包括离心冻干的粗蜘蛛毒液以获得离心毒液,过滤离心毒液以获得过滤毒液,将过滤毒液加载到凝胶过滤柱上,并且洗脱该柱以获得含有分离肽的部分,可使用阳离子交换和/或 HPLC 色谱进一步纯化所述分离肽。

[0030] 在又一个实施方式中,提供了用于再折叠(refolding)肽的方法,其中所述方法包括或由以下组成:收集浓度为 1.1 mM 至 24 mM 的粗肽;在例如 0.1M Tris 缓冲液或 2M NH₄OAC 缓冲液中溶解粗肽;使用例如 20mMDTT 还原肽;例如在含有还原和/或氧化的半胱氨酸或谷胱甘肽系统的氧化还原混合物中,在 pH 为 7 至 9.5 范围内的缓冲水溶液中并且在 10-27.5 μM 的最终肽浓度下折叠肽;以及例如在半制备性 C18 柱上纯化折叠肽。合适的缓冲液可以包括,例如,醋酸铵缓冲液、碳酸氢铵缓冲液、和 0.1MTris-HCl 缓冲液。

附图说明

[0031] 图 1A 为来自 Pterinochilus spp. Usambara 毒液(Psp)的肽 A 的色谱纯化的示图。

[0032] 图 1B 为来自 Pterinochilus spp. Usambara 毒液(Psp)的肽 A 的色谱纯化的另一示图。

[0033] 图 2A 为来自 Psp 毒液的肽 B 的色谱纯化的示图。

- [0034] 图 2B 为来自 Psp 毒液的肽 B 的色谱纯化的另一示图。
- [0035] 图 2C 为来自 Psp 毒液的肽 B 的色谱纯化的另一示图。
- [0036] 图 3A 为来自金属蓝蜘蛛 (泰国金属蓝, *Haplopelma lividum*) 毒液 (Hv) 的肽 C 的色谱纯化的示图。
- [0037] 图 3B 为来自金属蓝蜘蛛毒液 (Hv) 的肽 C 的色谱纯化的另一示图。
- [0038] 图 3C 为来自金属蓝蜘蛛毒液 (Hv) 的肽 C 的色谱纯化的另一示图。
- [0039] 图 4A 为来自 Hv 的肽 D 的色谱纯化的示图。
- [0040] 图 4B 为来自 Hv 的肽 D 的色谱纯化的另一示图。
- [0041] 图 4C 为来自 Hv 的肽 D 的色谱纯化的另一示图。
- [0042] 图 5A 为来自 RedMorph *Grammostola* (RMG) 毒液的肽 E 的色谱纯化的示图。
- [0043] 图 5B 为来自 RedMorph *Grammostola* (RMG) 毒液的肽 E 的色谱纯化的另一示图。
- [0044] 图 5C 为来自 RedMorph *Grammostola* (RMG) 毒液的肽 E 的色谱纯化的另一示图。
- [0045] 图 5D 为来自 RedMorph *Grammostola* (RMG) 毒液的肽 E 的色谱纯化的又一示图。
- [0046] 图 6A 为来自 RMG 毒液的肽 F 的色谱纯化的示图。
- [0047] 图 6B 为来自 RMG 毒液的肽 F 的色谱纯化的另一示图。
- [0048] 图 6C 为来自 RMG 毒液的肽 F 的色谱纯化的另一示图。
- [0049] 图 7A 为在灌流 (bath perfusion) $2\mu\text{M}$ 纯肽 A 之前和期间 $r\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡 (电压斜升, voltage ramp) 刺激的示图。
- [0050] 图 7B 为在 (灌流 $3.4\mu\text{M}$ 纯肽 A) 之前和期间 $h\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。
- [0051] 图 7C 为在灌流 $2\mu\text{M}$ 纯肽 A 之前和期间 $r\text{Na}_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。
- [0052] 图 7D 为在灌流 $5.25\mu\text{M}$ 纯肽 A 之前和期间, 以及在灌流确定的 hERG 阻断剂过程中, $h\text{K}_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯 (电压阶跃) 刺激的示图。
- [0053] 图 7E 为剂量反应曲线的示图, 其总结了图 7A-7D 所示的针对每个通道的至少 3 个实验。
- [0054] 图 7F 为在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的示图。
- [0055] 图 7G 为总结了在图 7F 所描述的条件下的几个实验的条形图。
- [0056] 图 7H 为在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线的示图。动作电位自发且规则地发出, 并且它们的频率和幅度在以下表中绘制。
- [0057] 图 7I 为总结了其中 $3.75\mu\text{M}$ 肽 A 和 $3\mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图的示图。
- [0058] 图 8A 为在灌流 $0.5\mu\text{M}$ 纯肽 B 之前和期间 $r\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。
- [0059] 图 8B 为在灌流 $0.5\mu\text{M}$ 纯肽 B 之前和期间 $h\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。
- [0060] 图 8C 为在灌流 $0.7\mu\text{M}$ 纯肽 B 之前和期间 $r\text{Na}_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。
- [0061] 图 8D 为在灌流 $1.5\mu\text{M}$ 纯肽 B 之前和期间, 以及在灌流确定的 hERG 阻断剂过程中, $h\text{K}_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激的示图。

[0062] 图 8E 为总结了图 8A-8D 所示的针对每个通道的至少 3 个实验的剂量应答曲线的示图。

[0063] 图 8F 为在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的示图。

[0064] 图 8G 为总结了在图 8F 所描述的条件下去进行的几个实验的条形图。

[0065] 图 8H 为在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线的示图。

[0066] 图 8I 为总结了其中 $9\mu\text{M}$ 肽 B 和 $3\mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0067] 图 9A 为在灌流 $1.25\mu\text{M}$ (Hv3920) 纯肽 C 之前和期间 $r\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0068] 图 9B 为在灌流 $2.4\mu\text{M}$ (Hv3920) 纯肽 C 之前和期间 $h\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0069] 图 9C 为在灌流 $3.6\mu\text{M}$ (Hv3920) 纯肽 C 之前和期间 $r\text{Na}_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0070] 图 9D 为在灌流 $4\mu\text{M}$ 纯肽 C 之前和期间,以及在灌流确定的 hERG 阻断剂过程中, $h\text{K}_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激的示图。

[0071] 图 9E 为剂量反应 (剂量应答) 曲线的示图,其总结了图 9A-9D 所示的针对每个通道的至少 3 个实验。表 3 中给出了表观 IC_{50} 。

[0072] 图 9F 为在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的示图。

[0073] 图 9G 为总结了如在图 9F 所描述的条件下去进行的几个实验的条形图。

[0074] 图 9H 为在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线的示图。

[0075] 图 9I 为总结了其中 $5\mu\text{M}$ 肽 C 和 $3\mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0076] 图 10A 为在灌流 $0.15\mu\text{M}$ 纯肽 D 之前和期间 $r\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0077] 图 10B 为在灌流 $0.5\mu\text{M}$ 纯肽 D 之前和期间 $h\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0078] 图 10C 为在灌流 $0.48\mu\text{M}$ 纯肽 D 之前和期间 $r\text{Na}_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0079] 图 10D 为在灌流 $1\mu\text{M}$ 纯肽 D 之前和期间,以及在灌流确定的 hERG 阻断剂过程中, $h\text{K}_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激的示图。

[0080] 图 10E 为剂量反应曲线的示图,其总结了图 10A-10D 所示的针对每个通道的至少 3 个实验。

[0081] 图 10F 为在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的示图。

[0082] 图 10G 为总结了与在图 10F 所描述的条件下一样的几个实验的条形图。

[0083] 图 10H 为在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线的示图。

[0084] 图 10I 为总结了其中 $0.75\ \mu\text{M}$ 肽 D 和 $3\ \mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0085] 图 11A 为在灌流 $0.3\ \mu\text{M}$ 纯肽 E 之前和期间 $r\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0086] 图 11B 为在灌流 $0.93\ \mu\text{M}$ 纯肽 E 之前和期间 $h\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0087] 图 11C 为在灌流 $0.93\ \mu\text{M}$ 纯肽 E 之前和期间 $r\text{Na}_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0088] 图 11D 为在灌流 $0.93\ \mu\text{M}$ 纯肽 E 之前和期间,以及在灌流确定的 hERG 阻断剂过程中, $hK_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激的示图。

[0089] 图 11E 为剂量反应曲线的示图,其总结了图 11A-11D 所示的针对每个通道的至少 3 个实验。

[0090] 图 11F 为在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的示图。

[0091] 图 11G 为总结了与在图 11F 所描述的条件下一样的几个实验的条形图。

[0092] 图 11H 为在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线的示图。

[0093] 图 11I 为总结了其中 $0.83\ \mu\text{M}$ 肽 E 和 $3\ \mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0094] 图 12A 为在灌流 $0.1\ \mu\text{M}$ 纯肽 F 之前和期间 $r\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0095] 图 12B 为在灌流 $0.52\ \mu\text{M}$ 纯肽 F 之前和期间 $h\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0096] 图 12C 为在灌流 $0.5\ \mu\text{M}$ 纯肽 F 之前和期间 $r\text{Na}_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激的示图。

[0097] 图 12D 为在灌流 $0.92\ \mu\text{M}$ 纯肽 F 之前和期间,以及在灌流确定的 hERG 阻断剂过程中, $hK_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激的示图。

[0098] 图 12E 为剂量反应曲线,其总结了图 12A-12D 所示的针对每个通道的至少 3 个实验。

[0099] 图 12F 为在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的示图。

[0100] 图 12G 为总结了如在图 12F 所描述的条件下的几个实验的条形图。

[0101] 图 12H 为在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线 (continuous trace) 的示图。

[0102] 图 12I 为总结了其中 $1\ \mu\text{M}$ 肽 F 和 $3\ \mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0103] 图 13 为天然肽 A (三角形)、使用 20mM 二硫苏糖醇 (DTT) 还原 1 小时的合成性肽 A (正方形) 和折叠的合成肽 A (圆形) 的分析性反相 HPLC 色谱的示图。

[0104] 图 14 为天然肽 B (三角形)、使用 20mM DTT 还原 1.5 小时的合成性肽 B (正方形)

和折叠的合成肽 B(圆形)的分析性反相 HPLC 色谱的示意图。

[0105] 图 15 为天然肽 C(三角形)、使用 20mM DTT 还原 1 小时的合成性肽 C(正方形)和折叠的合成肽 C(圆形)的分析性反相 HPLC 色谱的示意图。

[0106] 图 16 为天然肽 D(三角形)、使用 20mM DTT 还原 1 小时的合成性肽 D(正方形)和折叠的合成肽 D(圆形)的分析性反相 HPLC 色谱的示意图。

[0107] 图 17 为天然肽 E(三角形)、使用 20mM DTT 还原 1 小时的合成性肽 E(正方形)和折叠的合成肽 E(圆形)的分析性反相 HPLC 色谱的示意图。

[0108] 图 18 为天然肽 F(三角形)、使用 20mM DTT 还原 1 小时的合成性肽 F(正方形)和折叠的合成肽 F(圆形)的分析性反相 HPLC 色谱的示意图。

[0109] 图 19A-F 为天然和合成肽阻滞活性比较的示意图,所述阻滞活性表示为 $rNa_v1.3$ 通道电流的抑制%对肽 A-F 的肽浓度(剂量应答)。

[0110] 图 20 为在结扎同侧和对侧的后爪前后的缩足阈值的示意图。

[0111] 图 21 为在急性和慢性给予测试化合物后的 1 小时和 3 小时时间点同侧缩足阈值的示意图。

[0112] 图 22 为在急性和慢性给予测试化合物后的 1 小时和 3 小时时间点处对侧缩足阈值的示意图。

具体实施方式

[0113] I. 定义

[0114] 以下定义用于提供对说明书和权利要求书的清楚和一致的理解,包括该术语提供的范围。

[0115] 如本文所使用的,术语“给予”、“给药”等术语是指在健全的医疗实践中以能够提供疗效的方式将组合物递送至受试者的任意方法。本发明主题的一个方面提供了将本主题的治疗有效量的组合物口服给予需要其的患者。

[0116] 本文所描述的蜘蛛毒液肽可用于治疗疼痛或诱导镇痛。如本文所使用的,术语“治疗”也包括预防具有发展这样的疼痛倾向的患者或受试者的疼痛,以及当疼痛被确定时改善或消除已发展的疼痛或减轻这样的疼痛的特有症状。

[0117] 如本文所使用的,术语“疼痛”是指所有类型的疼痛。特别地,该术语是指慢性疼痛,如神经性疼痛,和术后疼痛,慢性下腰痛,丛集性头痛,疱疹神经痛,幻肢痛,中枢性疼痛,牙痛,阿片耐药性疼痛,内脏痛,手术疼痛,骨损伤疼痛,产程和分娩过程中的疼痛,由烧伤引起的疼痛,包括晒伤,产后疼痛,偏头痛,心绞痛,和泌尿生殖道相关的疼痛(包括膀胱炎)。此外,神经性疼痛可起因于多种单独的病因。神经性疼痛的发生可由眼科手术、牙科修复(根管)、烧伤、反射交感性营养不良、疱疹后神经痛、糖尿病性神经病变、关节炎等引起。该术语也指由于反射交感性营养不良和伤害性疼痛或伤害感受引起的疼痛。此外,术语“疼痛”是指与炎症病症相关的疼痛,包括但不限于与以下相关的疼痛:关节炎;自身免疫性疾病包括例如系统性红斑狼疮(SLE)或狼疮;慢性前列腺炎;慢性炎症;超敏;炎性肠道疾病;再灌注损伤;血管炎;移植排斥;盆腔炎性疾病;肾小球肾炎;哮喘;炎性肌病;系统性硬化症;皮炎;多肌炎;包涵体肌炎;Chediak-Higashi 综合征;和慢性肉芽肿疾病。

[0118] 可根据传统药物复配技术来制备含有本发明的化合物或其药用盐或溶剂化物作

为活性成分的药物组合物。参见,例如 Remington' s Pharmaceutical Sciences,18 版 (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.)。

[0119] 如本文所使用的,术语“赋形剂”或“佐剂”是指药物组合物中不是药物物质的任何成分。

[0120] 如本文所使用的,术语“药品”、“药物剂型”、“最终剂型”等是指给予需要治疗的患者的一种或多种药物物质和一种或多种赋形剂的组合(即药物组合物),并且可以为溶液、水溶液、乳剂、混悬剂、片剂、胶囊剂、贴剂、栓剂、乳膏剂、凝胶剂、洗剂等的形式。

[0121] 如本文所使用的,术语“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指需要诊断、预后或治疗的任意受试者,尤其是哺乳动物受试者,例如人类。

[0122] 如本文所使用是,术语疾病、障碍或病症的“治疗”或“处理”包括减轻其至少一种症状,降低其严重程度,或延缓,防止或抑制其进展。治疗不需要指疾病、障碍或病症完全治愈。为了有效治疗,本文所述的有用组合物仅需要降低疾病、障碍或病症的严重程度,降低与其相关的症状的严重程度,提高患者或受试者的生活质量,或延缓,防止或抑制疾病、障碍或病症的发作。

[0123] 如本文所使用的,术语“药用的(药学上可接受的)”载体是指无毒,惰性固体,半固体液体填充剂,稀释剂,包封材料,任意类型的配方助剂,或简单的无菌水性介质,如盐水。可充当药用载体的材料的一些实例为糖,如乳糖,葡萄糖和果糖,淀粉如玉米淀粉和马铃薯淀粉,纤维素及其衍生物如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素和醋酸纤维素;粉末状黄耆胶;麦芽,明胶,滑石粉;赋形剂如可可脂和栓剂蜡;油如花生油,棉籽油,红花油,芝麻油,橄榄油,玉米油和豆油;二醇类,如聚乙二醇,多元醇如甘油,山梨醇,甘露醇和聚乙烯乙二醇;酯类如油酸乙酯和月桂酸乙酯,琼脂;缓冲剂如氢氧化镁和氢氧化铝;褐藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及其它用于药物制剂的无毒的相容性物质。

[0124] 优选以治疗有效量给予活性剂。如本文所使用的,术语“安全和有效的量”是指成分的量足以产生期望的治疗反应而无过分的不利副作用(如毒性、刺激性或过敏性反应),当以本文所描述的方式使用时具有合理的益处/风险比例。如本文所使用的短语“治疗有效量”是指可有效产生期望的治疗反应的本文所描述的活性剂的量。例如,“治疗有效量”可以为足够量的活性剂以适用于任何医学治疗的合理的益处/风险比例来治疗或减轻疼痛或诱导镇痛。实际给予的量和给予的速率和时程将取决于待治疗病症的性质和严重程度。治疗的处方,例如剂量、时间等的确定在普通从业人员或专家的职责内,并通常需考虑治疗的障碍、个体患者的状况、递送的部位、给予方法和从业人员已知的其它因素。技术和方案的实例可以在 Remington' s Pharmaceutical Sciences 中找到。

[0125] 如本文所使用的,术语“肽”是指由两个或多个氨基酸通过共价键结合而构成的化合物,所述共价键是通过从一个氨基酸的氨基基团和下一个氨基酸的羧基中消除 H₂O 分子而形成的。

[0126] 对于本发明来说,术语“分离的”表明将生物材料(核酸或蛋白)从其初始环境(其天然存在的环境)中移出。例如,以天然状态存在于植物或动物中的肽是未分离的,然而,从其天然存在的相邻氨基酸中分离的相同肽则认为是“分离的”。

[0127] 术语“纯化的”并不要求材料以显示绝对纯度的形式存在并排除其它化合物的存

在。相反,它是一个相对的定义。在将起始原料或天然材料纯化至少一个数量级,优选 2 或 3 个并且优选 4 或 5 个数量级后,肽为“纯化的”状态。

[0128] 如本文所使用的,术语“基本纯的”描述了已经与其天然污染物分离的肽或其它材料。通常,当至少约 60 至 75% 的样品显示单一的肽骨架时,单体肽是基本纯的。轻微变体或化学修饰通常共享相同的肽序列。通常基本纯的肽将包括超过约 85 至 90% 的肽样品,特别是将超过 95% 的纯度,超过 97% 的纯度,或将超过约 99% 的纯度。通常在聚丙烯酰胺凝胶上测定纯度,其中通过染色测定同质性。可替换地,对于特定用途,高分辨率将是必要的,并且使用 HPLC 或用于纯化的类似手段。对于大多数用途,可使用简单的色谱柱或聚丙烯酰胺凝胶测定纯度。

[0129] 术语“基本没有天然相关的宿主细胞成分”描述了与在其天然宿主细胞状态下伴随其的天然污染物分离的肽或其它材料。因此,化学合成或在与天然产生肽的宿主细胞不同的细胞系统中合成的肽没有其天然相关的宿主细胞成分。

[0130] 术语“同源性”是指两个多核苷酸或两个肽部分之间的百分比同一性。可通过本领域已知的技术来测定一个部分和另一个部分的序列之间的一致性。例如,可通过比对序列信息和使用现有的计算机程序直接比较两个肽分子之间的序列信息来测定同源性。

[0131] 如本文所使用的,在其所有语法形式和拼写变化中,术语“同源的”是指具有“共同的进化起源”的蛋白之间的关系,包括来自超家族的蛋白(例如免疫球蛋白超家族)和来自不同物种的同源蛋白(例如,肌球蛋白轻链等)(Reeck 等人,1987,Cell 50 :667)。这样的蛋白(及其编码基因)具有序列同源性,如通过其高度的序列相似性所反映的。然而,在通常使用和实时应用中,当使用副词如“高度”修饰术语“同源的”时,可指序列相似性而不是共同的进化起源。

[0132] 因此,所有语法形式的术语“序列相似性”均是指可能具有或不具有共同进化起源的蛋白的核酸或氨基酸序列之间的同一性或一致性的程度(参见 Reeck 等人,1987,Cell 50 :667)。

[0133] 在一个具体实施方式中,当氨基酸的至少约 50% (优选至少约 75%,并且最优选至少约 90 或 95%) 与规定的序列长度匹配时,两个氨基酸序列为“基本同源的”或“基本相似的”。可使用已知技术,通过比较序列来识别基本同源的序列。

[0134] 术语“与……相对应”在本文中用来指相似或同源的序列,无论其确切位置与进行相似性或同源性测量的分子相同或不同。核酸或氨基酸序列比对可以包括空位(spaces)。因此,术语“与……相对应”是指序列相似性,而不是氨基酸残基或核苷酸碱基的编号。

[0135] 术语“蜘蛛”是指捕鸟蛛科的任意狼蛛,捕鸟蛛科分为若干亚科,其中包含超过 100 个属和 900 个种。捕鸟蛛亚科包括:

[0136] Acanthopelminae, 小型陆栖新世界狼蛛亚科。该亚科仅有一个属, Acanthopelma, 和两个种, A. beccarri 和 A. rufescens ;

[0137] Aviculariinae 为热带树栖新世界狼蛛亚科。属包括 Avicularia, Ephebopus, Iridopelma, Pachistopelma 和 Tapinauchenius ;

[0138] Eumenophorinae 为旧世界狼蛛亚科。属包括 Anoploscelus, Batesiella, Citharischius, Encyocrates, Eumenophorus, Hysteroocrates, Loxomphalia, Loxoptygus, Mascaraneus, Monocentopus, Myostola, 和 Phoneyusa。Proshapalopus 有时也包括在该亚

科中；

[0139] Harpactirinae 为来自非洲的旧世界狼蛛亚科。属包括 Augacephalus, Brachionopus, Ceratogyrus, Eucratoscelus, Harpactira, Idiothele, Pterinochilus, 和 Trichognathella；

[0140] Ischnocolinae 亚科包括来自全世界的蜘蛛。属包括 Catumiri, Chaetopelma, Cratorrhagus, Guyruita, Hemiercus, Heterothele, Holothele, Ischnocolus, Nesiergus, Oligoxystre, Plesiophriectus, 和 Sickius；

[0141] Ornithoctoninae 亚科的地老虎 (earth tigers) 形成了一个旧世界狼蛛群体。属包括 Citharognathus, Cyriopagopus, Haplopelma, Lampropelma, Ornithoctonus, 和 Phormingochilus；

[0142] Poecilotheriinae 为来自印度和斯里兰卡的树蜘蛛。该亚科仅包含 Poecilotheria 属；

[0143] Selenocosmiinae 是主要来自于东亚和澳大利亚的狼蛛组成的亚科。属包括 Baccallbrapo, Chilobrachys, Chilocosmia, Coremiocnemis, Haplocosmia, Lyrognathus, Orphnaecus, Phlogiellus, Phlogius, Psalmopoeus, Selenobrachys, Selenocosmia, Selenopelma, Selenotholus, Selenotypus, Tapinauchenius, 和 Yamia；

[0144] Selenogyrinae 为来自印度和非洲的狼蛛亚科。属包括 Annandaliella, Euphriectus, 和 Selenogyrus；

[0145] Stomatopelminae 为来自非洲西部的树栖狼蛛。属包括 Encyocratella, Heteroscodra, 和 Stomatopelma；

[0146] Theraphosinae 为新世界陆栖狼蛛。属包括 Acanthoscurria, Aenigmarachne, Ami, Aphonopelma, bonnetina, brachypelma, Chromatopelma, Citharacanthus, Clavopelma, Crassicrus, Cubanana, Cyclosternum, Cyriocosmus, Cyrtopholis, Euathlus, Eupalaestrus, Grammostola, Hapalopus, Hapalotremus, Hemirrhagus, Homoeomma, Kochiana, Lasiodora, Lasiodorides, Magulla, Maraca, Megaphobema, Melloleitaoina, Metriopelma, Neostenotarsus, Nesipelma, Nhandu, Ozopactus, Pamphobeteus, Paraphysa, Phormictopus, Plesiopelma, Proshapalopus, Pseudhapalopus, Reversopelma, Schismatothele, Schizopelma, Sericopelma, Sphaerobothria, Stichoplastoris, Theraphosa, Thrixopelma, Tmesiphantes, Vitalius, 和 Xenesthis；

[0147] Thrigmopoeinae 为印度狼蛛。属包括 Haploclastus 和 Thrigmopoeus；

[0148] 合适的种包括但不限于 Harpactirinae 亚科, Pterinochilus 属的狼蛛, 包括坦桑尼亚叶尾 (Pterinochilus alluaudi), 乌桑巴拉星团巴布蜘蛛 (Pterinochilus chordates), 坦桑尼亚侏儒 (Pterinochilus leetzi), 坦桑尼亚灰星巴布 (多多马巴布, Pterinochilus lugardi), 橙巴布 (Pterinochilus murinus) (即 Pterinochilus spp. Usambara(Psp)), Pterinochilus simoni, 和 Pterinochilus vorax。其它合适的种包括但不限于 Ornithoctoninae 亚科, Haplopelma 属的狼蛛, 包括泰国斑马脚 (Haplopelma albostriatum), Haplopelma doriae, 海南捕鸟蛛 (Haplopelma hainanum), 金属蓝蜘蛛, 越南老虎尾 (Haplopelma longipes), 泰国黑捕鸟 (Haplopelma minax), 泰国红脚 (Haplopelma robustum), 马来西亚捕鸟蛛 (Haplopelma salangense), 虎纹捕鸟

蛛 (*Haplopelma schmidtii*), 和越南地老虎 (*Haplopelma vonwirthi*)。其它合适的种包括但不限于 Theraphosinae 亚科, *Grammostola* 属的狼蛛, 包括巴西红尾 (*Grammostola actaeon*), 巴西灰烟雾 (*Grammostola alticeps*), *Grammostola andreleetzi*, 巴西黑丝绒 (*Grammostola pulchripes*), 阿根廷玫瑰 (*Grammostola burzaquensis*), 巴西巨人金直间 (*Grammostola chalcothrix*), *Grammostola doeringi*, 阿根廷长翅 (*Grammostola fossor*), 阿根廷红翅 (*Grammostola gossei*), 阿根廷褐红 (*Grammostola grossa*), 巴西巨人红尾 (*Grammostola iheringi*), 阿根廷棕烟雾 (*Grammostola inermis*), 阿根廷侏儒 (*Grammostola mendozae*), 彭巴斯茶红 (*Grammostola mollicoma*), 巴西巨人猛 (*Grammostola monticola*), 智利红玫瑰 (*Grammostola porteri*)、巴西黑 (*Grammostola pulchra*), 智利火玫瑰 (*Grammostola rosea*), 智利大虎斑 (*Grammostola schulzei*), 南美狼蛛 (*Grammostola spatulata*), 和阿根廷褐黄 (*Grammostola vachoni*)。

[0149] 关于智利火玫瑰 (*Grammostola rosea*) 的分类, 应理解, 智利火玫瑰 (*Grammostola rosea*) 可分为例如棕色变种或红色变种。智利火玫瑰的红色变种也称作 *Phrixotrichus auratus* 和智利粉爆纹 (*Paraphysa scrofa*), 并可称为 RedMorph *Grammostola* (RMG)。智利火玫瑰的棕色变种也称作智利红玫瑰 (*Grammostola poteri*) 和南美狼蛛 (*Grammostola spatulata*), 并可称为 Brown Morph *Grammostola* (RMG)。此外, *Grammostola* 的至少两个其它种或变种, 一个来自康塞普西翁 (Concepcion), 而一个来自智利北部。

[0150] 特别合适的狼蛛种包括但不限于 *Pterinochilus* spp. *Usambara* (Psp), 金属蓝蜘蛛 (Hv) 和 RedMorph *Grammostola* (RMG)。

[0151] 除非另有说明, 否则应理解, 本文所列举的任意浓度范围、百分比范围、或比率范围包括所述范围内的任意浓度、百分比或比率的整数及其分数, 如整数的十分之一和百分之一。

[0152] 除非另有说明, 否则应理解, 本文所列举的与任意物理性质如聚合物亚单元、尺寸或厚度有关的任意数值范围包括所列举范围内的任意整数。

[0153] 应理解, 如以上和本文别处所使用的术语“一个”和“一种”是指“一个或多个 (一种或多种)”所列举的成分。本领域普通技术人员清楚的是, 除非另有具体规定, 否则单数形式的使用包括复数形式。因此, 术语“一个”、“一种”和“至少一个”在该申请中可交替使用。

[0154] 在整个本申请中, 各实施方式的描述使用“包括”的语言; 然而, 本领域技术人员将理解到, 在某些具体实例中, 可以可替换地使用语言“基本由……组成”或“由……组成”来描述实施方式。

[0155] 除非另有说明, 否则为了更好的理解本发明的教导并绝不限限制教导的范围, 应理解所有表达数量、百分比或比例的数值, 以及在说明书和权利要求书中使用的其它数值在所有情况下由术语“约”进行修饰。因此, 除非有相反规定, 否则在以下说明书和所附权利要求中阐述的数值参数为近似值, 其根据期待获得的所需性能而可以不同。最低程度低, 至少应依据所报导的有效数字并通过应用常规舍入技术对每个数值参数进行解释。

[0156] 如本文所使用的其它术语通过本领域的熟知的含义来定义。

[0157] II. 分离蜘蛛毒液肽的方法

[0158] 本文所描述的分离的蜘蛛毒液肽可分离自粗蜘蛛毒液。特别地, 用于纯化粗毒液

以获得本文所述的分离肽的方法可以包括或由以下步骤组成：离心粗蜘蛛毒液以获得离心毒液；过滤离心毒液以获得过滤毒液；将过滤毒液加载到凝胶过滤柱上；和洗脱该柱以获得含有所述分离肽的部分，可使用阳离子交换和 / 或 HPLC 色谱进一步纯化所述分离肽。

[0159] 粗毒液可以为一种或多种新鲜毒液、冷冻保存的毒液或冻干的粗毒液。可以在例如约 10,000 至约 16,000 rpm 或约 13,000 rpm 下例如约 2 至约 15 分钟或约 7 分钟，将粗毒液例如冻干的毒液溶于缓冲液中，例如 pH 为约 6.0 的 100 mM AmAc (缓冲液 A)。可选地通过例如膜过滤器进一步过滤上清液，例如 0.22 μ m 过滤器。此后，将上清液或滤液加载到预冲洗的凝胶过滤柱，例如 Superdex-30 上。可使用约 2 倍柱体积 (cv) 的缓冲液 A 预洗该柱，然后注射样品。运行参数可以包括例如使用 2 cv 的缓冲液 A 以 0.8 ml/min 洗脱样品，7 ml/ 部分。随后可吸取部分并可选地通过膜过滤器再次过滤，例如 0.22 μ m 过滤器。此后，可选地使用反相 HPLC 并通过分级梯度洗脱而进一步纯化所得的样品，所述梯度洗脱包括溶剂例如在 0.1% TFA 中的 5% ACN(A)，和流动相例如在 0.1 TFA 中的 60% ACN(B)。步骤可以为 3 cv 的 0-30% B, 10 cv 的 30-55% B, 0.5 ml/ 部分和 2 cv 的 55-100% B。本文所描述的肽在第二步中洗脱。运行参数可以为在 0.1% TFA 中的缓冲液 5% -60% CAN。三级梯度：0% -30% -55% -100%，0.5 ml/ 部分，1 ml/min。

[0160] III. 合成蜘蛛毒液肽的方法

[0161] 可以通过化学合成制备或可以使用重组 DNA 技术生产本文所描述的肽。为了通过化学合成来制备本发明的肽，可以使用公开的已知方法，例如可通过使用叠氮化物、酰基氯、酸酐、复合酸酐、DCC、活化酯、伍德沃德试剂 K、羰基咪唑、去氧化、DCC/HONB、BOP 试剂的方法来获得本发明的肽（参见例如 Bozanszky, M 和 M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York(1966) ;Schroeder 和 Luebke, The Peptide, Academic Press, New York(1965) ;F.M.Finn 和 K.Hofmann, The Proteins Vol.2, H.Nenrath, R.L.Hill ed., Academic Press Inc., New York(1976) ;Nobuo Izumiya 等人, Peptide Gosei no Kiso to Jikken(Basics and experiments of peptide synthesis), Maruzen Co. (1985) ;Haruaki Yajima 和 Shunpei Sakakibara 等人, Seikagaku Jikken Koza(Biochemical Experiment)1, Japanese Biochemical Society ed., Tokyo Kagaku Dojin Co. (1977) ;Toshiya Kimura, Zoku Seikagaku Jikken Koza(Sequel to Biochemical Experiment)2, Japanese Biochemical Society ed., Tokyo Kagaku Dojin Co. (1987))。此外，可使用自动肽合成仪（例如 PE Applied Bio Systems Co.）通过化学合成来制备本文所描述的肽。诸如在 Bulaj G. 等人 (2006) Biochemistry 45, 7404 中描述的方法也可用于合成本文所描述的肽和再折叠程序中。

[0162] 此外，在反应完成后，可通过已公开的已知纯化方法对本文所描述的肽进行纯化和分离。例如，可通过溶剂提取、蒸馏、柱色谱、液相色谱、重结晶等的组合对本发明的肽进行纯化和分离。当通过上述方法获得的本文所述的肽为游离形式时，可使用公开的已知方法将其转换为盐形式，并且另一方面，当获得的肽为盐形式时，可使用公开的已知方法将其转换为游离形式。

[0163] 此外，大肠杆菌中的重组表达系统可用于将本文所述的肽表达为具有特定酶切位点的融合蛋白 (TRX 或 GST)，例如肠激酶或 TEV。接着，破坏并离心细菌，并且所产生的浆液包含融合蛋白。然后可将融合蛋白加载到特定亲和柱，例如 Ni²⁺ 或谷胱甘肽柱上以进行洗

脱。在洗脱之后,使纯化的融合蛋白经受特定的酶切反应。然后,通过 HPLC 或离子交换色谱将肽从所产生的混合物中纯化出来。

[0164] IV. 其它生物学方法

[0165] 本文描述了涉及传统和分析化学、分子生物学和细胞生物学技术的方法。这样的技术通常在本领域中是已知的,并且在方法学论著如 *Classics in Total Synthesis, Targets, Strategies, Methods*, K. C. Nicolaou and E. J. Sorensen, VCH, New York, 1996; *The Logic of Chemical Synthesis*, E. J. Coney and Xue-Min Cheng, Wiley&Sons, NY, 1989; 和 *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wuthrich, K., Wiley&Sons, New York, 1986 中详细描述。分子生物学和细胞生物学方法描述在论著如 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook 等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001; 和 *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel 等人, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (定期更新) 中。

[0166] V. 包括蜘蛛毒液肽的药物组合物

[0167] 制剂

[0168] 可通过肠道外、局部或直肠给予本文所描述的药物组合物。当然,它们通过适合于每种给予途径的形式给予。例如,它们通过注射、吸入、软膏、栓剂等给予。通过注射、输注或吸入给予;通过洗剂或软膏局部给予;并且通过栓剂直肠给予。

[0169] 如本文所使用的短语“肠道外给予”和“非肠道给予”是指除肠道和局部给予以外的给予模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射以及输注。

[0170] 如本文所使用的短语“全身给予”、“系统给予”、“外周给予”是指除了直接给予中枢神经系统以外,化合物、药物或其它物质的给予,以使其进入患者身体,因此经受代谢和其它类似过程,例如皮下给予。

[0171] 一般配制程序的详情和另外赋形剂的信息可以在 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th 版中找到。

[0172] 可以将包含有效量的本文所述的肽的组合物给予需要治疗的受试者。可以通过肠道外、静脉内、局部、口服、颊、鼻、直肠、皮下、肌内或腹膜内给予组合物。在一个实施方式中,可将组合物注射入例如脑脊液中。

[0173] 可配制治疗的组合物以与给予途径相一致。组合物可配制成片剂、胶囊剂、溶液、粉末、吸入剂、洗剂、酏剂、锭剂、栓剂或透皮贴剂。参见,例如 *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1963), 52: 918 et seq.

[0174] 用于肠道外、皮内或皮下给予的溶液可以包括例如: 无菌稀释剂如水、盐水、甘油、不挥发性油、聚乙二醇、丙二醇、或其它合成溶剂; 抗菌剂如苯甲醇或尼泊金甲酯; 抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂; 缓冲剂如乙酸盐或磷酸盐。溶液可储存在安瓿、一次性注射器、或塑料或玻璃瓶中。

[0175] 用于注射或静脉内给予的制剂(剂型)可以包括载体,其为溶剂或分散介质。合适的载体包括水、生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ)、磷酸盐缓冲盐

水 (PBS)、乙醇、多元醇 (例如,甘油、乙二醇、丙二醇等),以及它们的混合物。这些组合物必须是无菌的并且是流体以便于注射。可使用涂层如卵磷脂或表面活性剂保持流动性。通过包括抗菌剂和抗真菌剂可防止微生物污染,如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、和硫柳汞。糖和多元醇如甘露醇、山梨醇、氯化钠,可用于维持组合物的等渗性。

[0176] 通过溶液的过滤灭菌可确保无菌性。可替换地,可以使用分别过滤灭菌的成分来生产溶液。过滤灭菌的成分可以被真空干燥或冻干以制备无菌粉末。在注射之前可使用无菌载体溶液再水化这样的粉末。

[0177] 口服组合物包括例如:片剂;胶囊剂;锭剂;混悬剂;和溶液。可使用惰性稀释剂或食用载体来制备组合物。可通过将合适的稀释剂与肽或其制剂组合并用该混合物填充胶囊来配制胶囊剂。常见的稀释剂为淀粉如粉状纤维素,或糖如蔗糖、果糖或甘露醇。可以借助于挤压或借助于其它已知方法,通过湿法或干法制粒来制备片剂。除了期望的肽/化合物之外,用于片剂的组合物可以包括例如:粘合剂如微晶纤维素,或明胶;赋形剂如淀粉;糖(例如,乳糖、果糖、葡萄糖、甲基纤维素、乙基纤维素);树胶(例如黄蓍胶、阿拉伯树胶);崩解剂(例如褐藻酸、Primogel、或玉米淀粉);润滑剂(例如,硬脂酸镁或 Sterotes);助流剂(例如,胶状二氧化硅);甜味剂(例如,蔗糖或糖精);芳香剂(例如,薄荷、水杨酸甲酯、或橙味剂);或具有类似性质的任何化合物。可生物降解的聚合物如聚-D, L-丙交酯-共-乙醇酸交酯或聚乙醇酸交酯可用作基质以延缓组合物的释放(参见例如美国专利号 5, 417, 986、4, 675, 381、和 4, 450, 150)。

[0178] 对于通过吸入的给予,可以将化合物从包含合适的推进剂例如气体的加压容器分配器中以例如气溶胶喷雾的形式或通过其它已知的方法来递送。例如,也可透粘膜给予,例如使用鼻喷剂或栓剂,或通过透皮方式给予,例如使用药膏、软膏剂、凝胶剂或乳膏剂。可以使用包括例如胆汁盐和夫西地酸衍生物的制剂进行这样的给予模式。

[0179] 给予的模式

[0180] 本文所述的肽可通过例如推注、持续输注来给予,以便延长与硬膜外区域的接触,或通过其它已知方法给予。肽可以输注任意时间量。可以例如在治疗疼痛的标准临床协议的框架内,根据特定受试者的需要调整剂量和给予时间。也可以通过鞘内途径来递送肽,并进入血流中。此外,可以使用可植入或可固定于身体的泵以受控的速率来递送本文所述的肽。可替换地,可以通过本领域已知的储库或缓释制剂来实现延长的给予。

[0181] 剂量

[0182] 必须确定用于治疗合适的剂量。抑制剂的有效量为改善受试者脊髓性肌萎缩症状所需的量或剂量。治疗个体受试者所需的量或剂量的确定对于本领域技术人员(例如医生、药剂师或研究者)来说是惯常的。

[0183] 还可以确定肽和/或肽制剂的毒性和治疗效能。常规方案可用于确定非人类动物的 LD_{50} (使 50% 的群体致死的剂量) 和 ED_{50} (对 50% 的群体治疗有效的剂量)。治疗指数测量为 LD_{50}/ED_{50} 的比率。合适的比率包括例如,大于约 2、5、10、50、或 100 的比率。可以确定具有高治疗指数的化合物、制剂和给予方法,这是由于这样的治疗在提供高效能的剂量下具有较小的毒性。如果可提供方法以将化合物递送至受疾病侵袭的组织同时使未受疾病侵袭的组织例如内皮组织的损伤最小化,则可以使用具有毒性或不期望的副作用的化合物。

[0184] 在配制用于人类的剂量范围时,可以通过对实验动物进行的研究而估计肽制剂的

有效剂量,例如如下所述。例如,在细胞培养测定中的治疗有效量包括例如约 0.1nM、1nM、10nM、100nM、1 μ M、或 10 μ M 的肽,以及其间的范围。可以在动物中配制剂量以便使抑制剂的循环血浆浓度落入该范围中。示例性的剂量可产生超过如在细胞培养测定中所确定的 IC₅₀ 的血浆浓度(即,可达到症状的半数最大抑制的测试化合物的浓度)。可通过例如获取血液样本,并且通过使用基于抗体的特异性 ELISA 分析或使用高效液相色谱或质谱分析样本来确定循环血浆浓度。

[0185] 可替换地,可以根据如下所述的动物模型中的试验来估计剂量。当大鼠接受剂量为至少约 1 μ g/kg 至 10mg/kg 或更多的肽或药物组合物时,可观察到症状的减轻。例如,剂量可以为 10 μ g/kg、20 μ g/kg、40 μ g/kg、80 μ g/kg、120 μ g/kg、180 μ g/kg、240 μ g/kg、300 μ g/kg、或 360 μ g/kg、1mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、7mg/kg 或 10mg/Kg。动物和人类剂量间的相互关系(基于每平方米体表的毫克数)由例如 Freireich 等人, Cancer Chemother. Rep. 1966, 50, 219 来描述。可以通过患者的高度和重量来粗略估计体表面积。参见,例如 Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, New York, 1970, 537。估计用于治疗人类患者的有效剂量为大约至少 3 μ g/kg、30 μ g/kg、120 μ g/kg、180 μ g/kg、240 μ g/kg、300 μ g/kg、或 500 μ g/kg。可以以一定频率或持续给予肽以便维持有效减少受试者疼痛的局部浓度。

[0186] 取决于给予的方法,合适的剂量可以从例如约 1 μ gkg⁻¹天⁻¹至约 10mg kg⁻¹天⁻¹变化。当患者在被医生、药剂师或研究者照管时,可对用于该患者的剂量进行优化。例如,最初可给予相对低剂量的所述肽。可以如下所述监测患者的症状和疼痛的感觉。可增加剂量直到获得合适的反应。此外,用于任意特定受试者的具体剂量水平会随着受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别、以及受试者的饮食、给予时间、给予途径、排泄速率、和组合提供的其他药物而变化。

[0187] 实施例

[0188] 方法

[0189] 粗毒液的凝胶过滤

[0190] Pterinochilus spp. Usambara, 金属蓝蜘蛛和 Red Morph Grammostola 蜘蛛毒液购自 Spiderpharm, AZ, USA。将 100 mg 来自 SpiderPharm 的冻干粗毒液(每批也由 Nanodrop 测定了蛋白含量)溶于 2.5 ml 的缓冲液 A(100mM AmAc pH 6.0)中,以 13000 rpm 离心 7 分钟,通过 0.22 μ m 醋酸纤维素膜过滤器过滤,然后使用 AKTA prime 系统(GE HealthCare, Amersham)将其加载在填充到 XK 柱 26/70(代号:56876900;GE HealthCare)中的 Superdex-30 制备性凝胶过滤介质(GE HealthCare)中。使用 2 柱体积(cv)的缓冲液 A 预冲洗该柱,并使用进样环管注射样品。运行参数:用 2cv 的缓冲液 A = 100 mMAmAc pH 6.0 以 0.8 ml/min 洗脱样品,7ml/ 部分。

[0191] 其它色谱程序

[0192] 在图 1-6 的图例中详细地描述了阳离子交换和 HPLC 程序。

[0193] 质谱分析

[0194] MALDI-TOF M. S. (Applied Biosystems, Voyager Biospectrometry-DE, Sequenom), 使用芥子酸基质根据制造商协议进行制备。

[0195] 肽测序

[0196] 随后对纯化的肽进行测序,其包括:

[0197] •天然肽的Edman 测序,由德国的Proteome Factory 和 / 或瑞士的Atheris 进行。

[0198] •天然肽的MS-MS 分析,由德国的Proteome Factory 和 / 或瑞士的Atheris 进行。

[0199] •天然肽的酶裂解和片段的HPLC 分离。

[0200] •片段的Edman 测序,由德国的Proteome Factory 和 / 或瑞士的Atheris 进行。

[0201] •天然肽的氨基酸分析,在美国加州大学戴维斯分校进行。

[0202] •单一同位素的LC-MS 分析,由德国的Proteome Factory 和 / 或瑞士的Atheris 进行。

[0203] 细胞培养

[0204] 大鼠DRG 神经元:从3 周龄Charles River 大鼠中收集来自背根神经节(DRG) 的神经元的原代培养物。DRG 通过在胶原酶 / 分散酶中的酶消化来制备,在胰蛋白酶中分离并通过抛光的巴斯德吸管破碎成单一细胞混悬液。使用percole 梯度纯化细胞以浓缩用于神经元的培养物。随后将它们接种在matrigel®包被的盖玻片上的24 孔组织培养板上,并且在37℃下在50 ng/ml NGF 和10 mM AraC 存在下在F-12 培养基,10%胎牛血清(FCS) 中培养。然后,制备24 小时-4 天后,所培养的DRG 可用于电生理学。

[0205] 衍生自心肌细胞的小鼠ES 细胞:根据制造商的说明书,使用衍生自转基因修饰的小鼠胚胎干细胞的可随时使用的Cor.At®心肌细胞,其代表原代样细胞,并显示原代心肌细胞的典型特征和性质。对细胞进行简单解冻并分别附着于(1×10^4 细胞)在含有嘌呤霉素Cor.At®培养基中的0.1%明胶或0.1%明胶 / 纤维连接蛋白包被的盖玻片48 h,然后将培养基更换为Cor.At®培养基。1 周内的4 天后细胞可用于电生理学。

[0206] 如所描述的使rNa_v1.3 通道在HEK-293 细胞中表达(Cummins, T. R., 等人,2001)

[0207] 如所描述的,通过使用传统的瞬时或稳定转染使rNa_v1.8 通道在ND7-23 细胞中表达(Zhou, X., 等人,2003 ;John, V. H., 等人,2004 ;Jarvis, M. F., 等人,2007 ;Zimmermann, K., 等人,2007)。

[0208] 爪蟾卵母细胞中的hNa_v1.3。合成RNA 并注入爪蟾卵母细胞中(每个卵母细胞中约10 ng),并且在三天后使用双电极电压钳方法记录内部电流(Dascal 1987)。

[0209] 如所描述的,使hK_v11.1(hERG) 在HEK-293 细胞中表达(Zhou 等人,1998)。

[0210] 电生理学方案:

[0211] 膜片钳方法(Hamil 等人,1981) 用于跟踪和记录来自几种细胞类型的离子电流或膜电压。这些包括过表达重组通道的异源表达系统以及天然或模型细胞。表1 给出了用于跟踪活性的溶液和电压方案。在所有膜片钳记录中,采样速率为10-50 kHz(间隔20-100 μs)。膜片钳的配置包括放大器和数字化仪(Axopatch 200B,DIGDATA 1322A-Axon instruments)、显微镜(Nikon ECLIPSE 100) 和显微操作器(MP-225-SUTTER INSTRUMENT Co.)。使用硼硅酸盐玻璃管(SUTTER INSTRUMENT Co.) 拉制吸管。始终使用对照细胞外溶液灌注细胞,并使用ValveLink 16(Automate Scientific Inc.) 和蠕动泵(Iismatec) 灌注系统进行更换含有试剂的溶液。除了TTX,rBeKM-1 来自Alomone(以色列) 以外,所有化学品均来自Sigma。

[0212] 使用ND 96 槽液、Geneclamp 和Digidata 1320(Axon instruments) 和手动(基于重力) 灌注系统记录爪蟾卵母细胞中的电流。

[0213] 表 1

[0214]

通道和/或细胞类型	胞内溶液(以 mM 为单位) 均包括 10 HEPES (pH=7.2 使用 KOH 滴定)	胞外溶液(以 mM 为单位) 均包括 1 MgCl ₂ , 2 CaCl ₂ , 5 葡萄糖, 10 HEPES (pH=7.4 使用 NaOH 滴定)	电压方案
rNa _v 1.3-HE K	120 CsF, 10 NaCl,	115 NaCl, 20 TEA-OH	电压钳: 保持水平-100mV, 从-100 至+60 mV 渐变 (50 msec), 扫描间隔最短时间为 10 秒
rNa _v 1.8-ND7	10 TEA-OH, 1 MgCl ₂ , 1 CaCl ₂ , 11 EGTA,	115 NaCl, 20 TEA-OH, 600nM TTX	
hK _v 11.1 (hERG)-293 T	135 KCl 2 CaCl ₂ , 5 EGTA, 4 Mg-ATP	135 NaCl, 5.4 KCl 600nM TTX	电压钳: 保持水-100mV, 递变至 80mV (250msec), 递变至-40mV (250msec) 并递变至-90mV (100msec), 扫描间隔最短时间为 10 秒
小鼠 ES 衍生的心肌细胞中的自发 AP	130 葡萄糖酸钾, 4 NaCl, 10 磷酸肌酸钠,	135 NaCl, 5.4 KCl	电流钳: 无刺激
在大鼠 DRG 中诱发的 AP	10 葡萄糖酸钠, 4 Mg-ATP, 0.3 GTP,		电流钳: 步长(阶跃) 0.8-2.6 nA (2msec), 扫描间隔最短时间为 10 秒。

[0215] 实施例 1

[0216] 从粗毒液中纯化肽和化学表征

[0217] 使用几种不同的色谱步骤, 从 *Pterinochilus* spp. Usambara (Psp), 金属蓝蜘蛛 (Hv) 和 RedMorph *Grammostola* (RMG) 蜘蛛毒液中分离肽 A、B、C、D、E 和 F (参见图 1-6):

[0218] 从 Psp 毒液中对肽 A 进行色谱纯化

[0219] 根据在方法部分中所描述的程序, 将 100 mg 冻干的粗毒液 (Nanodrop 测量为 110 mg) 加载在凝胶过滤柱上。

[0220] 收集部分 (#32-36), 通过 0.22 μ m 醋酸纤维素过滤器过滤, 然后使用 HPLC 系统 (AKTA purifier, GE HealthCare-Amersham) 将 1/4 的样品加载到预先使用溶剂 A (在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 进行平衡的 Phenomenex Jupiter 反相 HPLC 柱 (5 μ , C18, 300A, 250 x 4.6mm, 00G-4053-E0, S/No397274-10) 上。使用溶剂 A (=在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 和在 0.1% TFA 中的 60% ACN 作为流动相 (=缓冲液 B) 通过分级梯度来洗脱蛋白, 以 1ml/min 的恒定流速运行。步骤为: 3cv 的 0-30% B (1cv ~ 4.125 ml), 10cv 的 30-55% B, 0.5 ml/部分和 2cv 的 55-100% B。有关的肽在第二步中洗脱。对剩余样品实施相同程序 (=4 次顺序运行)。运行参数: 缓冲液: 在 0.1% TFA 中的 5% -60% ACN。3 级梯度: 0% -30% -55% -100%, 0.5 ml/部分, 1ml/min。

[0221] 从 Psp 毒液中对肽 B 进行色谱纯化

[0222] 根据如在方法中所描述的程序,将 100 mg 冻干的粗毒液 (Nanodrop 测量为 110 mg) 加载在凝胶过滤柱上。

[0223] 收集部分 #37-40 并且收集 #41-43, 并且进一步通过 0.22 μ m 过滤器过滤每个所收集的部分, 然后使用 AKTAprime 系统 (GE HealthCare-Amersham) 将其加载在 HiTrap SP 琼脂糖快速流动 5 ml 阳离子交换柱 (GE-Amersham ; 批号 : 10005383-3) 上。预先使用缓冲液 B (25mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0) 对柱进行活化并使用缓冲液 A (25 mM 醋酸铵 pH = 6.0 和 10 mM NaCl) 冲洗。通过以 1 ml/min 的流速, 3ml/ 部分的分级梯度进行分离。步骤为 : 30cv 的 0% A-50% B (A = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, B = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, 1cv = 5 ml), 10cv 的 50-50% B, 4cv 的 50-100% B。有关的肽在第一步中洗脱。运行参数 : 30cv 的 0-50% B 为 25 mM AmAc pH 6.0 和 10 mM 至 1M 的 NaCl 梯度, 1ml/min, 3ml/ 部分。

[0224] 通过 0.22 μ m 过滤器来过滤来自 SP- 琼脂糖凝胶柱的有关峰, 然后通过 HPLC 在 2 次顺序运行 (sequential runs) 中 (在 AKTApurifier, GE HealthCare-Amersham 上) 进行进一步纯化, 其中使用预先用溶剂 A (在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 平衡的 Phenomenex Jupiter 反相 HPLC 柱 (5 μ , C18, 300A, 250 x 4.6mm, 00G-4053-E0, S/No 397274-10)。使用溶剂 A (= 在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 和在 0.1% TFA 中的 60% ACN 作为流动相 (= 缓冲液 B) 通过分级梯度来洗脱肽, 以 1 ml/min 的恒定流速运行。步骤为 : 3cv 的 0-30% B (1cv ~ 4.125 ml), 10cv 的 30-55% B, 0.5 ml/ 部分和 2cv 的 55-100% B。有关的肽在第二步中洗脱。运行参数 : 缓冲液 : 在 0.1% TFA 中的 5% -60% ACN。3 级梯度 : 0% -30% -55% -100%, 0.5 ml/ 部分, 1 ml/min。

[0225] 从 Hv 毒液中对肽 C 进行色谱纯化

[0226] 根据如在方法中所描述的程序,将 100 mg 冻干的粗毒液 (Nanodrop 测量为 55 mg) 加载在凝胶过滤柱上 (参见上文)。

[0227] 将胶凝过滤后的冻干峰溶于双蒸馏水 (重蒸馏水) (DDW) 中, 通过 0.22 μ m 过滤器过滤并使用 AKTAprime 系统 (GE HealthCare-Amersham) 加载在 HiTrap SP 琼脂糖快速流动 5 ml 阳离子交换柱 (GE-Amersham ; 批号 : 10005383-3) 上。预先使用缓冲液 B (= 25mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0) 对该柱进行活化并使用缓冲液 A (= 25 mM 醋酸铵 pH = 6.0 和 10mM NaCl) 冲洗。通过以 1 ml/min 的恒定流速, 3ml/ 部分的分级梯度进行分离。步骤为 : 30cv 的 0% A-50% B (A = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, B = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, 1cv = 5 ml), 10cv 的 50-50% B, 4cv 的 50-100% B。运行参数 : 30cv 的 0-50% B 为 25 mM AmAc pH 6.0 和 10mM 至 1M NaCl 梯度, 1ml/min, 3ml/ 部分。

[0228] 使用预先用溶剂 A (在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 平衡的 Phenomenex Jupiter 反相 HPLC 柱 (5 μ , C18, 300A, 250 x 4.6mm, 00G-4053-E0, S/No 397274-10), 通过 HPLC (在 AKTApurifier, GE HealthCare-Amersham 上) 对来自 SP- 琼脂糖凝胶柱的活性峰进一步进行纯化。通过使用溶剂 A (= 在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 和在 0.1% TFA 中的 60% ACN 作为流动相 (= B) 分级梯度来洗脱肽, 以 1 ml/min 的恒定流速运行。步骤为 : 2cv 的 0-28% B (1cv ~ 20 ml), 8cv 的 28-47% B, 0.5 ml/ 部分和 2cv 的 47-100% B。有关肽在第二步中洗脱。运行参数 : 缓冲液 : 在 0.1% TFA 中的 5% -60% ACN, 3 级梯度 : 0% -28% -47% -100%, 0.5 ml/ 部分, 1 ml/min。

[0229] 从 Hv 毒液中对肽 D 进行色谱纯化

[0230] 将 100 mg 冻干的粗毒液 (Nanodrop 测量为 55 mg) 记载在凝胶过滤柱上, 并根据如在所述方法中所描述的程序进行处理。

[0231] 将胶凝过滤后的冻干峰溶于 DDW 中, 通过 0.22 μ m 过滤器过滤并使用 AKTAprime 系统 (GE HealthCare-Amersham) 加载到 HiTrap SP 琼脂糖快速流动 5 ml 阳离子交换柱 (GE-Amersham; 批号: 10005383-3) 上。预先使用缓冲液 B (= 25mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0) 对该柱进行活化并使用缓冲液 A (= 25 mM 醋酸铵 pH = 6.0 和 10 mM NaCl) 冲洗。通过以 1 ml/min 的流速, 3ml/ 部分的分级梯度进行分离。步骤为: 30cv 的 0% A-50% B (A = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, B = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, 1cv = 5 ml), 10cv 的 50-50% B, 4cv 的 50-100% B。运行参数: 30cv 的 0-50% B 为 25 mM AmAc pH 6.0 和 10 mM 至 1M NaCl 梯度, 1ml/min, 3ml/ 部分。

[0232] 使用预先用溶剂 A (在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 平衡的 Phenomenex Jupiter 反相 HPLC 柱 (5 μ , C18, 300A, 250 x 4.6mm, 00G-4053-E0, S/No397274-1 0), 通过 HPLC (在 AKTApurifier, GE HealthCare-Amersham 上) 对来自 SP- 琼脂糖凝胶柱的活性峰进一步进行纯化。使用溶剂 A (= 在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 和在 0.1% TFA 中的 60% ACN 作为流动相 (= B) 通过分级梯度来洗脱肽, 以 1 ml/min 的恒定流速运行。步骤为: 2cv 的 0-28% B (1cv ~ 20 ml), 8cv 的 28-47% B, 0.5 ml/ 部分和 2cv 的 47-100% B。有关的肽在第二步中洗脱。运行参数: 缓冲液: 在 0.1% TFA 中的 5% -60% ACN, 3 级梯度: 0% -28% -47% -100%, 0.5 ml/ 部分, 1 ml/min。

[0233] 从 RMG 毒液中对肽 E 进行色谱纯化

[0234] 将 100 mg 冻干的粗毒液 (Nanodrop 测量为 150 mg) 加载到凝胶过滤柱上, 并根据如在所述方法中所描述的程序进行处理。

[0235] 使用 HPLC 系统 (AKTApurifier, GE HealthCare-Amersham) 将部分 #37-38 加载到预先用溶剂 A (在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 平衡的 Phenomenex Jupiter 反相 HPLC 柱 (C18, 10 μ , 300A, 250 x 10mm, 00G-4055-E0, S/No 378159-1) 上。使用溶剂 A (= 在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 和在 0.1% TFA 中的 60% ACN 作为流动相 (= 缓冲液 B) 通过分级梯度来洗脱蛋白, 以 2.5 ml/min 的恒定流速运行。步骤为: 3cv 的 0-35% B (1cv ~ 20 ml), 6cv 的 35-38% B, 和 2cv 的 38-100% B。有关的肽在第二步中洗脱。最后, 汇集来自部分 #37-38 的有关峰并冻干用于进一步分离。运行参数: 缓冲液: 在 0.1% TFA 中的 5% -60% ACN, 3 级梯度: 0% -35% -38% -100%, 2 ml/ 部分, 2.5 ml/min。

[0236] 将冻干峰溶于 DDW 中, 通过 0.22 μ m 过滤器过滤并使用 AKTApurifier 系统 (GE HealthCare-Amersham) 将其加载到 HiTrap SP 琼脂糖快速流动 1 ml 阳离子交换柱 (GE-Healthcare; 批号: 10012762) 上。预先使用缓冲液 B (25mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0) 对该柱进行活化并使用缓冲液 A (25 mM 醋酸铵 pH = 6.0 和 10 mM NaCl) 冲洗。通过以 1ml/min 的流速, 0.5ml/ 部分的分级梯度进行分离。步骤为: 30cv 的 0% A-50% B (A = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, B = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, 1cv = 1 ml), 10cv 的 50-50% B, 4cv 的 50-100% B。有关的肽在第一步中洗脱。运行参数: 30cv 的 0-50% B 为 25 mM AmAc pH 6.0 和 10mM 至 1M 的 NaCl 梯度, 1ml/min, 3ml/ 部分。

[0237] 使用预先用溶剂 A (在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 平衡的 Phenomenex Jupiter

反相 HPLC 柱 (C18 10u 300A, 250 x 10mm, 00G-4055-NO, S/No378159-1), 通过 HPLC (在 AKTApurifier, GE HealthCare-Amersham 上) 对来自 SP- 琼脂糖凝胶柱的活性峰进一步进行纯化。使用溶剂 A (= 在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 和在 0.1% TFA 中的 60% ACN 作为流动相通过分级梯度洗脱肽, 以 1 ml/min 的恒定流速运行。步骤为 :3cv 的 0-30% B (1cv ~ 20ml), 6cv 的 30-55% B, 0.5 ml/ 部分和 2cv 的 55-100% B。有关的肽在第二步中洗脱。运行参数 :缓冲液 :在 0.1% TFA 中的 5% -60% ACN。3 级梯度 :0% -30% -55% -100%, 0.5 ml/ 部分, 1 ml/min。

[0238] 从 RMG 毒液中对肽 F 进行色谱纯化

[0239] 将 100 mg 冻干的粗毒液 (Nanodrop 测量为 150 mg) 加载到凝胶过滤柱上, 并根据如在所述方法中所描述的程序进行处理。

[0240] 将冻干峰溶于 DDW 中, 通过 0.22 μ m 过滤器过滤并使用 AKTApurifier 系统 (GE HealthCare-Amersham) 将其加载到 HiTrap SP 琼脂糖快速流动 5 ml 阳离子交换柱 (GE-Amersham ;Lot :10005383-3) 上。预先使用缓冲液 B (25mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0) 对该柱进行活化并使用缓冲液 A (25 mM 醋酸铵 pH = 6.0 和 10 mM NaCl) 冲洗。通过以 1ml/min 的流速, 0.5ml/ 部分的分级梯度进行分离。步骤为 :30cv 的 0% A-50% B (A = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, B = 25 mM 醋酸铵和 1M NaCl, pH = 6.0, 1cv = 1 ml), 10cv 的 50-50% B, 4cv 的 50-100% B。有关的肽在第一步中洗脱。运行参数 :30cv 的 0-50% B 为 25 mM AmAc pH 6.0 和 10mM 至 1M 的 NaCl 梯度, 1ml/min, 3ml/ 部分。

[0241] 使用预先用溶剂 A (在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 平衡的 Phenomenex Jupiter 反相 HPLC 柱 (C18 10u 300A, 250 x 10mm, 00G-4055-NO, S/No378159-1), 通过 HPLC (在 AKTApurifier, GE HealthCare-Amersham) 对来自 SP- 琼脂糖凝胶柱的活性峰进一步进行纯化。使用溶剂 A (= 在 0.1% TFA 中的 5% ACN) 和在 0.1% TFA 中的 60% ACN 作为流动相 (= 缓冲液 B) 通过分级梯度来洗脱肽, 以 2.5 ml/min 的恒定流速运行。步骤为 :3cv 的 0-35% B (1cv ~ 20 ml), 15cv 的 30-55% B, 1.5 ml/ 部分和 2cv 的 55-100% B。有关的肽在第二步中洗脱。运行参数 :缓冲液 :在 0.1% TFA 中的 5% -60% ACN。3 级梯度 :0% -35% -55% -100%, 1.5 ml/ 部分, 2.5 ml/min。

[0242] 所得肽的质量和序列总结在表 2 中。

[0243] 表 2

[0244]

肽	M.W.	A A	SEQ ID NO:	序列
A	3966.7	34	1	DDCLGMFSSCDPDNDKCCEGRKCNRKDKWCKY VL*
B	3636.6	29	2	YCQEFLWTCDEERKCCGDMVCRLWCKKRL*
C	3917.8	35	3	ACLGFGKEKCNPSNDKCKSSSLVCSQKHKWCKY

[0245]

				GW
D	3705.6	33	4	ACKGLFVTCTPGKDECCPNHVCSSKHKWCKYK T*
E	4070.8	34	5	DCLGFMRKCIPDNDKCCRPNLVCSRTHKWCKYV F*
F ^{&}	4168.8	34	6	DCLGWFKGCDPDNDKCCEGYKCNRRDKWCKY KLW

[0246] *—C—端酰胺化。

[0247] &—F = VSTx-3 (Ruta 和 Mackinnon, 2004, Acc#P0C2P5)

[0248] 根据从 N 端侧的出现顺序所记录的所有六种肽的序列中含有六个半胱氨酸。通过对所有肽的天然和还原样品的 MS 分析,证实了在半胱氨酸对之间存在三个二硫化物桥。根据与多种其它狼蛛毒素的相似性可推断成对半胱氨酸键的顺序,并且可能为以下顺序: C1-C4, C2-C5 和 C3-C6 (综述参见 Escoubas, F. 和 Rash, L., 2004)。此外,对肽 A、B、D 和 E 的 C 端进行酰胺化。

[0249] 实施例 2

[0250] 合成肽的再折叠

[0251] 根据 Schnolzer, M. 等人, (1992) In situ neutralization in BOC-chemistry solid phase peptide synthesis, Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193, 和 Atherton, E. 等人, (1989) Solid Phase Peptide Synthesis (IRL, Oxford, U. K.), 通过使用 BOC (叔丁氧基羰基) 或 Fmoc (9-苄基甲氧基羰基) 固相肽合成的化学合成, 通过固相合成程序合成性地生产肽 A、B、C、D、E 和 F, 并作为纯度为 70-95% 的冻干粉末提供。随后如下所述对每种肽进行不同的再折叠程序以实现正确的折叠和与毒液纯化的天然肽相同的生物活性。

[0252] 肽 A 的再折叠

[0253] 将粗合成肽以 5mM 的蛋白浓度溶于 0.1M Tris 缓冲液 pH 8.5 中, 然后用 20mM DTT 在室温 (RT) 下还原 1 小时。将还原肽以 25 μ M 的最终浓度加入到含有 0.1M Tris 缓冲液 pH 8.5 以及 0.5mM 半胱氨酸和 0.5mM 胱氨酸的混合物的折叠溶液中。使用半胱氨酸 / 胱氨酸缓冲系统在 4°C 下处理 8 天可实现再折叠并形成正确的二硫化物桥模式。

[0254] 借助反相 HPLC, 使用从 26% 至 53% 的在 0.1% TFA 中的 60% CH₃CN (5mL/min) 的 31.5min 梯度在半制备性 C18 柱 (Phenomenex Jupiter, 250x10mm, 10 微米, 300A) 上纯化再折叠的合成毒素。通过 MALDI-TOF 质谱和生物测定来证实肽 A 的再折叠。

[0255] 为了对合成肽 A 与天然肽进行色谱比较, 借助反相 HPLC (Shimadzu system), 使用分析性 C18 柱 (Phenomenex Kinetex, 50x4.6mm, 2.6 微米, 100A) 对天然、折叠和还原肽的样品进行纯化。所获得的反相 HPLC 分析具有 5% -60% CH₃CN 的 10min 线性梯度 (2.5 ml/min) (参见图 13)。

[0256] 肽 B 的再折叠

[0257] 将粗合成肽以 1.1 mM 的蛋白浓度溶于 6M GnHCl (盐酸胍) 和 0.1M Tris 缓冲液 pH 9.5 中, 然后用 20mM DTT 在 RT 下还原 1.5 小时。将还原肽以 27.5 μ M 的最终浓度加入到含有 0.1M Tris 缓冲液 pH 9.5 以及 0.15mM 半胱氨酸和 1.5mM 胱氨酸的混合物的折叠溶液中。使用半胱氨酸 / 胱氨酸缓冲系统在 4°C 下处理 1 天可实现再折叠并形成正确的二硫化物桥模式。

[0258] 借助反相 HPLC, 使用从 30% 至 55% 的在 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 中的 60% CH₃CN (6 mL/min) 的 26.18min 梯度在半制备性 C18 柱 (Phenomenex Jupiter, 250x10mm, 10 微米, 300A) 上纯化再折叠的合成毒素。通过 MALDI-TOF 质谱和生物测定来证实肽 B 的再折叠。

[0259] 为了对合成肽 B 与天然肽进行色谱比较, 借助反相 HPLC (Shimadzu system), 使用分析性 C18 柱 (Phenomenex Kinetex, 50x4.6mm, 2.6 微米, 100A) 对天然、折叠和还原肽的样品进行纯化。所获得的反相 HPLC 分析具有 5% -60% CH₃CN 的 10min 线性梯度 (2.5ml/min) (参见图 14)。

[0260] 肽 C 的再折叠

[0261] 将粗合成肽以 10.6 mM 的蛋白浓度溶于 6M GnHCl 和 0.1M Tris 缓冲液 pH 7.5 中, 然后用 20mM DTT 在 RT 下还原 1 小时。将还原肽以 25.5 μM 的最终浓度加入到含有 0.1M Tris 缓冲液 pH 7.5 以及 0.15mM 半胱氨酸和 1.5mM 胱氨酸的混合物的折叠溶液中。使用半胱氨酸 / 胱氨酸缓冲系统在 4°C 下处理 5 天可实现再折叠并形成正确的二硫化物桥模式。

[0262] 借助反相 HPLC, 使用从 22% 至 45% 的在 0.1% TFA 中的 60% CH₃CN (6mL/min) 的 26.18min 梯度在半制备性 C18 柱 (Phenomenex Jupiter, 250x10mm, 10 微米, 300A) 上纯化再折叠的合成毒素。通过 MALDI-TOF 质谱和生物测定来证实肽 C 的再折叠。

[0263] 为了对合成肽 C 与天然肽进行色谱比较, 借助反相 HPLC (Shimadzu system), 使用分析性 C18 柱 (Phenomenex Kinetex, 50x4.6mm, 2.6 微米, 100A) 对天然、折叠和还原肽的样品进行纯化。所获得的 RP-HPLC 分析具有 5% -60% CH₃CN 的 10min 线性梯度 (2.5ml/min) (参见图 15)。

[0264] 肽 D 的再折叠

[0265] 将粗合成肽以 24 mM 的蛋白浓度溶于 0.1M Tris 缓冲液 pH 7.5 中, 然后用 20mM DTT 在 RT 下还原 1 小时。将还原肽以 13.5 μM 的最终浓度加入到含有 0.1M Tris 缓冲液 pH 7.5 以及 1.5mM 半胱氨酸和 0.15mM 胱氨酸的混合物的折叠溶液中。使用半胱氨酸 / 胱氨酸缓冲系统在 4°C 下处理 4 天可实现再折叠并形成正确的二硫化物桥模式。

[0266] 借助反相 HPLC, 使用 25% 至 55% 的在 0.1% TFA 中的 60% CH₃CN (4.5mL/min) 的 35min 梯度在半制备 C18 柱 (Phenomenex Jupiter, 250x10mm, 10 微米, 300A) 上纯化再折叠的合成毒素。通过 MALDI-TOF 质谱和生物测定来证实肽 D 的再折叠。

[0267] 为了对合成肽 D 与天然肽进行色谱比较, 借助反相 HPLC (Shimadzu system), 使用分析性 C18 柱 (Phenomenex Kinetex, 50x4.6mm, 2.6 微米, 100A) 对天然、折叠和还原肽的样品进行纯化。所获得的 RP-HPLC 分析具有 5% -60% CH₃CN 的 10min 线性梯度 (2.5ml/min) (参见图 16)。

[0268] 肽 E 的再折叠

[0269] 将粗合成肽以 6 mM 的蛋白浓度溶于 0.1M Tris 缓冲液 pH 7.5 中, 然后用 20mM DTT 在 RT 下还原 1 小时。将还原肽以 24.5 μM 的最终浓度加入到含有 0.1M Tris 缓冲液 pH 7.5 以及 0.15mM 半胱氨酸和 1.5mM 胱氨酸的混合物的折叠溶液中。使用半胱氨酸 / 胱氨酸缓冲系统在 4°C 下处理 2 天可实现再折叠并形成正确的二硫化物桥模式。

[0270] 借助反相 HPLC, 使用从 23% 至 45% 的在 0.1% TFA 中的 60% CH₃CN (6mL/min) 的 35min 梯度在半制备性 C18 柱 (Phenomenex Jupiter, 250x10mm, 10 微米, 300A) 上纯化再折叠的合成毒素。通过 MALDI-TOF 质谱和生物测定来证实肽 E 的再折叠。

[0271] 为了对合成 BS-07 与天然肽进行色谱比较,借助反相 HPLC(Shimadzu system),使用分析性 C18 柱 (Phenomenex Kinetex, 50x4.6mm, 2.6 微米, 100A) 对天然、折叠和还原肽的样品进行纯化。所获得的反相 HPLC 分析具有 5% -60% CH₃CN 的 10min 线性梯度 (2.5ml/min) (参见图 17)。

[0272] 肽 F 的再折叠

[0273] 称量粗肽,溶解于水中并在 280 nm 下测定。

[0274] 通过以 20 mM 的最终浓度加入 DTT 进行肽的还原,并在 RT 下孵化 1 小时。

[0275] 在含有 1mM 谷胱甘肽 (GSH), 0.1mM 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 和 1mM EDTA 的 2M NH₄OAc 缓冲液 (pH = 7.0) 中对还原肽 F 进行氧化性折叠反应。将还原肽分 6 个部分逐滴加入到溶液中至 10 μM 的最终浓度。在 24℃ 下搅拌溶液 120 小时。

[0276] 通过三级纯化程序对再折叠的物质进行纯化,包括反相 HPLC 和另外的离子交换色谱。

[0277] 通过使用含有 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的 60% 含水 CH₃CN 的 40min 线性梯度 (29-38%) 作为洗脱液,使用 Jupiter C-18 柱进行反相 HPLC 纯化。收集峰部分并冻干。通过含有 25% CH₃CN 的在磷酸钾缓冲液 (pH = 2.5) 中的 700mM 氯化钾的 25min 线性梯度 (50-70%),使用 Luna SCX 柱通过离子交换色谱来除去多余的污染物。将峰部分再次加载到 Jupiter C-18 柱上,并使用 30-50% 的 60% CH₃CN 的 20min 线性梯度脱盐。冻干峰部分并通过 M.S, 分析性 HPLC 和生物测定分析进行表征。(参见图 18)。

[0278] 实施例 3

[0279] 分离纯肽的体外生物活性

[0280] 针对 TTX 敏感型 Na_v1.3 和 TTX 耐受型 Na_v1.8 通道进行阻滞活性的测试。这些中的每一种均在哺乳动物细胞系中稳定表达,并通过合适的电压刺激引发通道电流。通过测量灌流毒素之前,期间 (通常以增加的剂量) 和之后的电流来检查毒素的活性。在至少三种分开的细胞中测量每个毒素剂量下抑制电流的比例,并绘制平均值 ± SD。

[0281] 肽 A 抑制 Na_v1.3 和 Na_v1.8 通道,其中表观 IC₅₀ 分别为 1.75 和 2.5 μM。

[0282] 肽 B 抑制 Na_v1.3 通道,其中表观 IC₅₀ 为 230 nM。

[0283] 肽 C 抑制 Na_v1.3 通道,其中表观 IC₅₀ 为 1.2 μM。

[0284] 肽 D 抑制 Na_v1.3 通道,其中表观 IC₅₀ 为 160 nM。

[0285] 肽 E 抑制 Na_v1.3 通道,其中表观 IC₅₀ 为 310 nM。

[0286] 肽 F 抑制 Na_v1.3 和 Na_v1.8 通道,其中表观 IC₅₀ 分别为 130 和 170 nM。

[0287] 通过背根神经节 (DRG) 神经元来感受外周疼痛刺激并将其以动作电位 (由 DRG 神经元膜中的 Na_v 通道开放而产生) 的形式传递至脊髓。在外周神经病变中,疼痛信号由受损 DRG 神经元所发出的内部动作电位产生,可能由于一类不同的 Na_v 通道在其膜上表达。假定阻断 DRG 神经元上的 Na_v 通道会抑制动作电位的生成和疼痛信号的传递。因此,我们记录了大鼠 DRG 神经元中的动作电位并研究毒素是否可抑制该电位,作为进一步确立目标的一个步骤。肽 A (5 μM)、B (0.7 μM)、C (5 μM)、D (0.75 μM)、E (0.83 μM) 和 F (1 μM) 在高于 Na_v1.3 通道的 IC₅₀ 的剂量下抑制 DRG 动作电位 (图 7-12)。在所有被检测的细胞中比较了肽的作用与 600nM TTX 的作用 (参见图 7-12, 图 F、G)。

[0288] 使用另外两个体外系统测定毒素活性的特异性以及测量体外安全性试验。

[0289] 首先测量细胞中异源性表达人类心脏 $K_v11.1$ (hERG) 通道的 K^+ 电流。使用了每种肽的三个剂量,分别为所测得 $Na_v1.3$ 的 IC_{50} ,该 IC_{50} 的三倍和十倍。即使在所检验的最高剂量,肽 A、C、E 和 F 仍没有影响。肽 B 和 D 仅在所检验的最高剂量下具有 25% 的抑制作用。

[0290] 第二个系统在小鼠胚胎干细胞 (ES) 衍生的心肌细胞中自发发射动作电位。通过许多离子通道的整体活性而自发产生动作电位。毒素在该系统中的作用表明其特异性(由于心脏动作电位的产生取决于心脏 $Na_v1.5$ 通道的同工型)以及推测至少在心脏副作用方面的体内安全性。作为阳性对照,以低 (300–600 nM) 和高 (3 μ M) 浓度在所有检验的细胞中灌注 TTX。通常,仅较高的剂量抑制这些细胞中产生的动作电位(参见例如图 9H 和 11H)。肽 A (3.8 μ M)、B (9 μ M)、C (5 μ M)、D (0.75 μ M)、E (0.83 μ M) 和 F (1 μ M) 对这些细胞的动作电位的频率或幅度没有影响(或对于肽 B 和 F 具有非常轻微的约 20% 的抑制)(图 7–12, 图 H、I)。

[0291] 对于每种肽,所有测试的结果总结在表 3 和图 7–12 中。

[0292] 如图 1A 和图 1B 中所示,可通过色谱纯化从 *Pterinophilus* spp. Usambara 毒液 (Psp) 中获得肽 A。

[0293] 如图 2A、2B 和 2C 所示,可通过色谱纯化从 Psp 毒液中获得肽 B。

[0294] 如图 3A、3B 和 3C 所示,可通过色谱纯化从金属蓝蜘蛛毒液 (Hv) 中获得肽 C。

[0295] 如图 4A、4B 和 4C 所示,可通过色谱纯化从 Hv 中获得肽 D。

[0296] 如图 5A、5B、5C 和 5D 所示,可通过色谱纯化从 Red Morph *Grammostola* (RMG) 毒液中获得肽 E。

[0297] 在图 6A、6B 和 6C 中所示出的,可通过色谱纯化从 RMG 毒液中获得肽 F。

[0298] 图 7A–I 示出了肽 A 的体外活性。

[0299] 图 7A 示出了在灌流 2 μ M 纯肽 A 之前和期间 $rNa_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激(参见方法)的叠加迹线 (superimposed traces) 的实例。如图 7A–7D 中的每一个所示出的,对照浓度由黑线表示并在灌流前测定。相反,灰线代表在灌流过程中测得的电压。

[0300] 图 7B 示出了在灌流 3.4 μ M 纯肽 A 之前和期间 $hNa_v1.3$ 通道(在爪蟾卵母细胞中表达)响应于电压斜坡刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。

[0301] 图 7C 示出了在灌流 2 μ M 纯肽 A 之前和期间 $rNa_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。

[0302] 图 7D 示出了在灌流 5.25 μ M 纯肽 A 之前和过程中, $hK_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。图 7D 还示出了对确定的 hERG 阻断剂 (200 nM BeKM-1) 灌流的响应。该响应由细黑线表示。

[0303] 图 7E 示出了剂量响应曲线,其总结了针对每个通道的至少 3 个实验(插图中符号)。在表 3 中给出了表观 IC_{50} 。

[0304] 图 7F 示出了在急性分离的大鼠 DRG 神经元中响应于电流刺激的电压的叠加迹线的实例。在对照条件下,在灌流 600 nM TTX 过程中和灌流 5 μ M 肽 A 的过程中进行跟踪。如图 7F 所示,较粗的黑线代表在对照条件下的反应(应答),细黑线代表在灌流 600 nM TTX 过程中的应答,而灰线代表在灌流 5 μ M 肽 A 的过程中的反应(应答)。

[0305] 图 7G 示出了总结如在图 7F 所描述的条件下的几个实验的条形图。

[0306] 图 7H 示出了在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持

续迹线的实例。动作电位自发并且规则地发出,并在以下图中绘制其频率和幅度。条形图代表化合物在指定浓度下灌流的时间。

[0307] 图 7I 示出了总结其中 $3.75\ \mu\text{M}$ 肽 A 和 $3\ \mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0308] 图 8A-I 示出了肽 B 的体外活性。

[0309] 图 8A 示出了在灌流 $0.5\ \mu\text{M}$ 纯肽 B 之前和期间 $r\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。如图 8A-8D 的每一个中所示,对照浓度由黑线表示并在灌流前测定。相反,灰线代表在灌流过程中测得的电压。

[0310] 图 8B 示出了在灌流 $0.5\ \mu\text{M}$ 纯肽 B 之前和期间 $h\text{Na}_v1.3$ 通道(在爪蟾卵母细胞中表达)响应于电压斜坡刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。

[0311] 图 8C 示出了在灌流 $0.7\ \mu\text{M}$ 纯肽 B 之前和期间 $r\text{Na}_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。

[0312] 图 8D 示出了在灌流 $1.5\ \mu\text{M}$ 纯肽 B 之前和期间, $hK_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。图 8D 还示出了在确定的 hERG 阻断剂 ($200\ \text{nM}$ BeKM-1) 灌流过程中的反应(应答),如由细黑线表示。

[0313] 图 8E 示出了剂量反应曲线,其总结了针对每个通道的至少 3 个实验(插图中符号)。在表 3 中给出了表观 IC_{50} 。

[0314] 图 8F 示出了在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的实例。在对照条件下,在灌流 $600\ \text{nM}$ TTX 过程中和灌流 $0.7\ \mu\text{M}$ 肽 B 的过程中进行跟踪。如图 8F 所示,较粗的黑线代表在对照条件下的应答,细黑线代表在灌流 $600\ \text{nM}$ TTX 过程中的应答,而灰线代表在灌流 $0.7\ \mu\text{M}$ 肽 B 的过程中的应答。

[0315] 图 8G 示出了总结如在图 8F 所描述的条件下去进行的几个实验的条形图。

[0316] 图 8H 示出了在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的连续迹线的实例。动作电位自发且规则地发出,并且其频率和幅度绘制在以下图中。条形图代表化合物在指定浓度下灌流的时间。

[0317] 图 8I 示出了总结其中 $9\ \mu\text{M}$ 肽 B 和 $3\ \mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0318] 图 9A-I 示出了肽 C 的体外活性。

[0319] 图 9A 显示了在灌流 $1.25\ \mu\text{M}$ 纯肽 C 之前和期间 $r\text{Na}_v1.3$ 通道响应于电压阶梯刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。如图 9A-9D 的每一个中所示,对照浓度由黑线表示并在灌流前测定。相反,灰线代表在灌流过程中测得的电压。

[0320] 图 9B 显示了在灌流 $2.4\ \mu\text{M}$ 纯肽 C 之前和期间 $h\text{Na}_v1.3$ 通道(在爪蟾卵母细胞中表达)响应于电压阶梯刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。

[0321] 图 9C 显示了在灌流 $3.6\ \mu\text{M}$ 纯肽 C 之前和期间 $r\text{Na}_v1.8$ 通道响应于电压阶梯刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。

[0322] 图 9D 显示在灌流 $4\ \mu\text{M}$ 纯肽 C 之前和期间, $hK_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激(参见方法)的叠加迹线的实例。图 9D 还显示在灌流确定的 hERG 阻断剂 ($200\ \text{nM}$ BeKM-1) 过程中的应答,如由细黑线表示的。

[0323] 图 9E 为剂量应答曲线的示图,其总结了针对每个通道的至少 3 个实验(插图中符

号)。在表 3 中给出了表观 IC_{50} 。

[0324] 图 9F 显示了在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的实例。在对照条件下,在灌流 300 nM TTX 过程中和灌流 5 μ M 肽 C 的过程中进行跟踪。如图 9F 所示,较粗的黑线代表在对照条件下的应答,细黑线代表在灌流 300 nM TTX 过程中的应答,而灰线代表在灌流 5 μ M 肽 C 的过程中的应答。

[0325] 图 9G 显示总结了如在图 9F 所描述的条件下去进行的几个实验的条形图。

[0326] 图 9H 显示了在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线的实例。动作电位自发且规则地发出,并且它们的频率和幅度在以下图中绘制。条形图代表化合物在指定浓度下灌流的时间。如所示出的,该制剂中的低浓度即 300 nM 和高浓度即 3 μ M 的 TTX 的影响均非常明显。

[0327] 图 9I 显示总结了其中 5 μ M 肽 C 和 3 μ M TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0328] 图 10A-I 显示了肽 D 的体外活性。

[0329] 图 10A 显示了在灌流 0.1 μ M 纯肽 D 之前和期间, $rNa_v1.3$ 通道响应于电压阶梯刺激 (参见方法) 的叠加迹线的实例。如图 10A-10D 的每一个中所示,对照浓度由黑线表示并在灌流前测定。相反,灰线代表在灌流过程中测得的电压。

[0330] 图 10B 显示了在灌流 0.5 μ M 纯肽 D 之前 (黑色,对照) 和过程中 $hNa_v1.3$ 通道 (在爪蟾卵母细胞中表达) 响应于电压斜坡刺激 (参见方法) 的叠加迹线的实例。

[0331] 图 10C 显示了在灌流 0.48 μ M 纯肽 D 之前和期间, $rNa_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激 (参见方法) 的叠加迹线的实例。

[0332] 图 10D 显示在灌流 1 μ M 纯肽 D 之前和过程中, $hK_v11.1$ ($hERG$) 通道响应于电压阶梯刺激 (参见方法) 的叠加迹线的实例。图 10D 还显示在确定的 $hERG$ 阻断剂 (200 nM BeKM-1) 灌流过程中的应答,如由细黑线所表示的。

[0333] 图 10E 显示了剂量应答曲线,其总结了针对每个通道的至少 3 个实验 (插图中符号)。在表 3 中给出了表观 IC_{50} 。

[0334] 图 10F 显示了在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的实例。在对照条件下,在灌流 600 nM TTX 过程中和灌流 0.75 μ M 肽 D 的过程中进行跟踪。如图 10F 所示,较粗的黑线代表在对照条件下的应答,细黑线代表在灌流 600 nM TTX 过程中的应答,而灰线代表在灌流 0.75 μ M 肽 D 的过程中的应答。

[0335] 图 10G 显示总结了如在图 10F 所描述的条件下去进行的几个实验的条形图。

[0336] 图 10H 显示了在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线的实例。动作电位自发且规则地发出,并且它们的频率和幅度在以下图中绘制。条形图代表化合物在指定浓度下灌流的时间。

[0337] 图 10I 显示总结了其中 0.75 μ M 肽 D 和 3 μ M TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0338] 图 11A-I 显示了肽 E 的体外活性。

[0339] 图 11A 显示了在灌流 0.3 μ M 纯肽 E 之前和期间, $rNa_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激 (参见方法) 的叠加迹线的实例。如图 11A-11D 的每一个中所示,对照浓度由黑线表示并在灌流前测定。相反,灰线代表在灌流过程中测得的电压。

[0340] 图 11B 显示了在灌流 $0.93\ \mu\text{M}$ 纯肽 E 之前和期间 $\text{hNa}_v1.3$ 通道（在爪蟾卵母细胞中表达）响应于电压阶梯刺激（参见方法）的叠加迹线的实例。

[0341] 图 11C 显示了在灌流 $0.93\ \mu\text{M}$ 纯肽 E 之前和期间 $\text{rNa}_v1.8$ 通道响应于电压阶梯刺激（参见方法）的叠加迹线的实例。

[0342] 图 11D 显示在灌流 $0.93\ \mu\text{M}$ 纯肽 E 之前和过程中, $\text{hK}_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激（参见方法）的叠加迹线的实例。图 11D 还显示在确定的 hERG 阻断剂 ($200\ \text{nM}$ BeKM-1) 灌流过程中的应答, 如由细黑线所表示的。

[0343] 图 11E 显示了剂量应答曲线, 其总结了针对每个通道的至少 3 个实验（插图中符号）。在表 3 中给出了表观 IC_{50} 。

[0344] 图 11F 显示了在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的实例。在对照条件下, 在灌流 600nM TTX 过程中和灌流 $0.83\ \mu\text{M}$ 肽 E（灰色, 给定的浓度）的过程中进行跟踪。如图 11F 所示, 较粗的黑线代表在对照条件下的应答, 细黑线代表在灌流 600nM TTX 过程中的应答, 而灰线代表在灌流 $0.83\ \mu\text{M}$ 肽 E 的过程中的应答。

[0345] 图 11G 显示总结了如在图 11F 所描述的条件下去进行的几个实验的条形图。

[0346] 图 11H 显示了在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线的实例。动作电位自发且规则地发出, 并且其频率和幅度在以下图中绘制。条形图代表化合物在指定浓度下灌流的时间。

[0347] 图 11I 显示总结了其中 $0.83\ \mu\text{M}$ 肽 E 和 $3\ \mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0348] 图 12A-I 显示了肽 F 的体外活性。

[0349] 图 12A 显示了在灌流 $0.1\ \mu\text{M}$ 纯肽 F 之前和过程中 $\text{rNa}_v1.3$ 通道响应于电压斜坡刺激（参见方法）的叠加迹线的实例。如图 12A-12D 的每一个中所示, 对照浓度由黑线表示并在灌流前测定。相反, 灰线代表在灌流过程中测得的电压。

[0350] 图 12B 显示了在灌流 $0.52\ \mu\text{M}$ 纯肽 F 之前和过程中 $\text{hNa}_v1.3$ 通道（在爪蟾卵母细胞中表达）响应于电压斜坡刺激（参见方法）的叠加迹线的实例。

[0351] 图 12C 显示了在灌流 $0.5\ \mu\text{M}$ 纯肽 F 之前和过程中 $\text{rNa}_v1.8$ 通道响应于电压斜坡刺激（参见方法）的叠加迹线的实例。

[0352] 图 12D 显示在灌流 $0.92\ \mu\text{M}$ 纯肽 F 之前和过程中, $\text{hK}_v11.1$ (hERG) 通道响应于电压阶梯刺激（参见方法）的叠加迹线的实例。图 12D 还显示在确定的 hERG 阻断剂 ($200\ \text{nM}$ BeKM-1) 灌流过程中的应答, 如由细黑线所示出的。

[0353] 图 12E 显示了剂量应答曲线, 其总结了针对每个通道的至少 3 个实验（插图中符号）。在表 3 中给出了表观 IC_{50} 。

[0354] 图 12F 显示了在急性分离的大鼠 DRG 神经元中电压响应于电流刺激的叠加迹线的实例。在对照条件下（黑色）, 在灌流 $600\ \text{nM}$ TTX 过程中和灌流 $1\ \mu\text{M}$ 肽 F 的过程中进行跟踪。如图 12F 所示, 较粗的黑线代表在对照条件下的应答, 细黑线代表在灌流 $600\ \text{nM}$ TTX 过程中的应答, 而灰线代表在灌流 $1\ \mu\text{M}$ 肽 F 的过程中的应答。

[0355] 图 12G 显示总结了如在图 12F 所描述的条件下去进行的几个实验的条形图。

[0356] 图 12H 显示了在小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞 (mES-CM) 中所记录的膜电压的持续迹线。动作电位自发且规则地发出, 并且其频率和幅度在以下图中绘制。条形图代表

化合物在指定浓度下灌流的时间。

[0357] 图 12I 显示总结了其中 $1\ \mu\text{M}$ 肽 F 和 $3\ \mu\text{M}$ TTX 的作用影响 AP 频率的几个实验的条形图。

[0358] 表 3

[0359]

毒液	名称	M.W.	IC ₅₀ Na _v 1.3 (μM)	IC ₅₀ Na _v 1.8 (μM)	在浓度 X10 下 Na _v 1.3 的 IC ₅₀ 下 的 hERG 的抑制 % (平均值 $\pm$ S.D)	rDRG 中 AP 的抑制% (平 均值 $\pm$ S.D)和 [浓度(μM)]	mES-CM 中 AP 频率的抑制% (平均值 $\pm$ S.D) 和[浓度(μM)]
Psp	A	3966.7	1.75	2.50	2 $\pm$ 2	17 $\pm$ 10 [5.00]	1 $\pm$ 11 [3.75]
Psp	B	3636.6	0.23	-	25 $\pm$ 7.5	28 $\pm$ 25 [0.70]	35 $\pm$ 36 [9.00]
Hv	C	3917.8	1.20	-	2 $\pm$ 14	38 $\pm$ 14 [5.00]	16 $\pm$ 8 [5.00]
Hv	D	3705.6	0.16	-	25 $\pm$ 25	48 $\pm$ 37 [0.75]	11 $\pm$ 7 [0.75]
RMG	E	4070.8	0.31	-	2 $\pm$ 2	44 $\pm$ 16 [0.83]	-4 $\pm$ 5 [0.83]
RMG	F	4168.8	0.13	0.17	6 $\pm$ 7	46 $\pm$ 24 [1.00]	25 $\pm$ 23 [1.00]

[0360] 如以上所列举的六种狼蛛毒液肽的体外生物活性表明肽对于神经性疼痛治疗的疗效及其假定的心脏安全性。

[0361] 在该适应症中的目标为抑制 DRG 感觉神经元中电活动的传输（以动作电位的形式）。DRG 神经元内的动作电位的发生和传递取决于 TTX 敏感型（其中为 Na_v1.3）和 TTX 耐受型（主要为 Na_v1.8）通道（Devor, 2006 ; Cummins 等人, 2007）的激活。因此，疗效由针对一个或两个靶通道 Na_v1.3（图 7A、B、E- 图 12A、B、E）和 Na_v1.8（参见图 7C-12C）的电流和针对 DRG 神经元中诱发的动作电位（参见图 7F-12F）的抑制作用所产生。

[0362] 肽 A 和 F 为 Na_v1.3 和 Na_v1.8 通道的抑制剂（图 7E 和 12E）。这在体内会是一个优势，由于尚未完全确定为用于神经性疼痛治疗而靶向的最佳 Na_v1 通道的具体特性（Devor, 2006 ; Cummins 等人, 2007）。此外，在抑制靶通道中最强的肽为亚纳摩尔范围内的 F，之后是 D、B 和 E，然后为微摩尔范围内的 C 和 A（参见表 3）。所有六种肽抑制 DRG 神经元内动作电位的生成。在每种细胞中以比针对靶通道和抵抗 TTX 作用的表观 IC₅₀ 高约三倍的浓度测量每种毒素。然而，肽 A 的抑制作用显著低于 600 nMTTX 的影响（参见图 7F、G-12F、G）。

[0363] 该方法是通过可能不穿越血脑屏障（BBB）进入 CNS 的肽来靶向外周中的 Na_v1 通道。因此，关于假定的安全性主要关心的是避免对心脏功能的调节作用。根据该观念，通过其对人类心脏钾 hERG (K_v11.1) 通道电流（Redfern 等人, 2003）（图 7D、E-12D、E）和针对心肌细胞模型中的自发动作电位模式（参见图 7H、I-12H、I）的调节作用来提供关于这些肽的假定安全性的指示。

[0364] 在 hERG 测定中，以比针对靶通道和抵抗 BeKM-1 作用的 IC₅₀ 高约十倍的浓度测量每种毒素（参见图 7D、E-12D、E）。仅有肽 B 和 D 在这些高浓度下显示轻微对该通道的抑制

作用（参见图 8E 和 10E）。在心脏活动的综合模型（小鼠 ES-CM）中，虽然肽 B 和 F 影响动作电位频率，但所有肽均未显示对动作电位幅度和频率的显著抑制作用，尤其与 3 μ MTTX 的显著作用相比（参见图 7H、I-12H、I）。因此，在可抑制靶通道活性的有效浓度下，肽似乎均未以显著方式阻断假定的正常心脏活动。

[0365] 实施例 4

[0366] 天然和合成肽活性的比较

[0367] 根据实施例 3 中的程序和方法部分，对合成和天然肽的阻滞活性之间的比较进行了测试。

[0368] 获得了天然和合成肽抑制在 HEK 细胞中表达的 rNa_v1.3 通道的相似剂量应答曲线，每个数据点为 3-5 个实验的平均值。

[0369] 肽 A、B、C、D、E 和 F 的剂量应答曲线完全重叠，因此天然和合成肽的活性相同。通道对合成性肽 D 和 E 的应答似乎大于天然肽，但该差异在所记录的应答范围内。由于合成和天然肽在质谱和 HPLC 分析中看起来相同，并且其作为 Na_v1.3 通道阻断剂的活性非常相似，因此我们推断合成程序可成功地提供与纯化自毒液的肽相同的肽。

[0370] 实施例 5

[0371] 在大鼠模型中化合物 C 用于镇痛指征的评价

[0372] 该研究旨在使用大鼠中神经性疼痛的 Chung 模型来评价化合物 C 的镇痛指征。该研究在 PsychoGenics, Inc. 进行，其总部位于纽约塔利顿的 7650ld Saw Mill River 路。

[0373] 材料和方法

[0374] 动物

[0375] 该研究使用来自哈伦（印第安纳波利斯，IN）的雄性 SD 大鼠（100-125g）。接收后，大鼠被分配唯一的标识号并分组安置在具有微分离器过滤盖的聚碳酸酯笼中，每笼 3 只大鼠。在开始研究之前对所有大鼠进行检查，管理并称重，以确保足够健康和合适。在研究期间，保持 12/12 亮 / 暗循环，其中 EST 上午 7:00 开始光照。室温保持在 20 至 23℃ 之间，其中相对湿度保持在 50% 左右。在研究过程中随意提供食物和水。

[0376] 药物

[0377] 所有化合物均以 5 ml/kg 的剂量体积给予，一天一次，给予 5 天（术后第 17-21 天）。参比化合物：将加巴喷丁（100 mg/kg；TRC, Lot No. 1-SWM-154-1）溶于 0.5% 羧甲基纤维素（CMC）的水溶液中并口服给予。测试化合物：将化合物 C（0.25, 0.625, 和 1.25 mg/kg；Lot n/a）溶于蒸馏 H₂O 中至储备浓度（20X），分为单次使用的等份并冷冻。在每次测试当天，将一等份解冻并使用 PBS（pH 7.2）稀释 20 倍，并且用作测试剂量的制剂的储备液。皮下给予化合物 C。

[0378] 方法

[0379] 用于神经性疼痛的 Chung 模型（脊神经结扎）

[0380] 通过持续吸入异氟烷进行全身麻醉后，通过无菌程序在手术单元中进行手术。对大鼠的下腰椎和骶骨水平区域的皮肤进行剃毛并使用聚维酮碘和乙醇消毒。使用无菌眼用软膏来润滑眼睛。持续观察动物的麻醉水平，测试动物对夹尾或夹爪的反射性反应并密切监视动物的呼吸。当动物从麻醉中恢复时，使用加热垫将体温维持在 37℃。在脊柱旁的水平左侧进行纵向切口并分离左侧椎旁肌。去除 L6 的横突并清理附近的结缔组织以暴露 L5

和 L6 脊神经。在神经分离并清晰可见后,使用 4-0 丝线来结扎左侧 L5。使用 4-0 丝线缝合肌肉并通过钉来闭合伤口。所有大鼠在术前和术后 6 小时内接受镇痛(丁丙诺啡,0.05 mg/kg, s. c.)。监测每只大鼠直到苏醒并在恢复室中自由移动。然后在研究期间将动物单独安置。手术后到测试前,允许大鼠恢复 2 周。

[0381] 对触觉刺激的足底超敏性的评估(Von Frey 试验)

[0382] 通过对后爪的足底表面(同侧和对侧)施加弯曲力上升的 von Frey (VF) 丝来测量从机械刺激中的缩回。阳性反应定义为从 von Frey 丝中缩回。通过评估对上述丝的反应和以下的缩回反应测试了缩足阈值(PWT)的确认。

[0383] 将大鼠带回实验室并允许其在测试前习惯该房间一小时,并在进行 PWT 测量前适应观察室 15 分钟。

[0384] 术前的基线测试:手术前,使用 VF 测试对所有大鼠进行测试。将同侧 PWT 小于 12g 的大鼠从研究中排除(排除了 1 只大鼠)。

[0385] 术后的基线测试:术后第 14 天,从所有手术操作的大鼠中获得基线反应,并且将大于 4.5g 的同侧 PWT 用作排除标准(排除了 13 只大鼠)。随后称量大鼠并根据其术后 PWT 值分配至治疗组中(每组 $n = 10$)。

[0386] 急性和慢性测试:在术后第 17 天,对大鼠注射载体、加巴喷丁或测试化合物,并在给予后 1 和 3 小时进行测试。给予测试化合物 5 天,并且在第 5 天再次测试大鼠(术后第 21 天)。

[0387] 统计分析

[0388] 通过反复测量或单向方差分析(ANOVA)并接着进行 Fisher PLSD 事后比较来分析 Von Frey 数据。如果 $p < 0.05$,则认为效果显著。数据表示为平均值 $\pm$ 平均标准误差(S. E. M.)。

[0389] 结果

[0390] 基线 von Frey 测试(VF)-结扎前和结扎后

[0391] 如通过明显的结扎 X 爪的相互作用效果所示出的,脊神经结扎导致同侧而非对侧后爪对损伤的缩足阈值的显著下降(参见图 20)。

[0392] 急性和慢性 VF 测试

[0393] 表 4 示出了药物给予之前的同侧和对侧缩足阈值(平均值 $\pm$ SEM)。

[0394] 表 4

[0395]

治疗	同侧	对侧
载体	2.99 ± 0.26	30.60 ± 5.10
加巴喷丁 100 mg/kg	2.94 ± 0.29	48.70 ± 5.83
化合物 C 0.25 mg/kg	2.94 ± 0.29	38.50 ± 5.95
化合物 C 0.625 mg/kg	2.94 ± 0.29	48.70 ± 5.83

化合物 C 1.25 mg/kg	2.99±0.26	39.60±5.55
------------------	-----------	------------

[0396] 在脊神经结扎大鼠中急性和慢性给予加巴喷丁和化合物 C 对触觉刺激反应的影响在图 21 中所示。在预处理或测试过程中未观察到镇静或毒性迹象。

[0397] 急性 - 同侧

[0398] 在第 17 天,双向重复测量 ANOVA 产生显著的主要治疗作用,和接近主要时间作用的非显著趋势 ($p = 0.09$)。事后检验表明与载体相比,急性给予加巴喷丁和化合物 C (0.625 和 1.25 mg/kg) 显著增强同侧缩足阈值,由于在两个时间点处均发生数据折叠。

[0399] 慢性 - 同侧

[0400] 在第 21 天,双向重复测量 ANOVA 产生显著的治疗 X 时间的相互作用效果,以及显著的治疗和时间的相互作用。事后检验表明与载体相比,加巴喷丁和化合物 C (0.625 和 1.25 mg/kg) 在慢性治疗方案之后的所有时间点均显著增加同侧缩足阈值。加巴喷丁的作用在给予后 1 小时比给予后 3 小时明显更高。

[0401] 对侧

[0402] 所有治疗对对侧缩足阈值的影响在图 22 中示出。在第 17 天 (急性) 或第 21 天 (慢性),双向重复测量 ANOVA 没有发现显著的治疗 X 时间相互作用效果或显著的主要治疗作用。

[0403] 总结

[0404] 在两个时间点处 (给予后 1 小时和 3 小时),急性或 5 天给予加巴喷丁 (100 mg/kg) 和化合物 C (0.625 和 1.25 mg/kg) 显著提高同侧缩足阈值 (PWT)。任何测试化合物对对侧缩足阈值均无显著作用。

[0405] 实施例 6

[0406] 患者患有神经性疼痛。将如本文所述的药物组合物全身性给予该患者。预计患者将改善他 / 她的病症或康复。

[0407] 实施例 7

[0408] 在双盲多中心安慰剂对照试验中评价给予包括如本文所述的任意肽的药物组合物以评估在神经性疼痛中的疗效和安全性的预期临床试验研究设计

[0409] 采用随机、双盲、多中心、安慰剂对照,平行组设计 12 周研究,以评价每周两次可变 (50-200 μ g 本文所述的任意肽 / 周) 或固定剂量 (200 μ g 本文所述的任意肽 / 周) 在患有慢性神经性疼痛的患者中的疗效和安全性。该研究在几个国家的多中心进行。

[0410] 研究遵循来自赫尔辛基宣言的伦理原则。

[0411] 受试者

[0412] 合格的患者为年龄 ≥ 18 岁的男性和非妊娠、非哺乳期妇女,其中初步诊断为疼痛的糖尿病性神经病变 (DPN) (1 型或 2 型糖尿病,其中血红蛋白糖基化为 [HbA1c] % ≥ 11 % 并且疼痛、远端、对称、感觉运动多神经病变 ≥ 6 个月) 或疱疹后神经痛 (PHN) (带状疱疹的皮疹治愈后疼痛存在 ≥ 3 个月)。还要求患者在基线和随机化的简化 McGill 疼痛调查表 (SF-MPQ) 的视觉模拟评分 (VAS) 中得分 ≥ 40 mm (0 mm = ‘无疼痛’,并且 100 mm = ‘可能最剧烈的疼痛’)。

[0413] 如果患者具有任何临床显著或不稳定的医学或精神病症,则将其排除。在过去 2

年内患有恶性疾病或预期在研究中需要手术的患者,以及具有异常心电图 (ECG),肌酐清除率! 60 ml/min,或异常血液学的患者也被排除。在过去 2 年内滥用违禁药品或酒精的患者也被排除。参加过先前的普瑞巴林的临床试验或在筛选前 30 天内服用任何研究药物或药剂的那些患者也被排除。在研究过程中禁用的药物,以及在基线随访前至少 7 天应清脱的药物包括以下:常用于治疗神经性疼痛的药物(例如,苯二氮杂䓬类、骨骼肌松弛药、辣椒素、局部麻醉剂、阿片类药物、美金刚);抗癫痫药物(例如,卡马西平、氯硝西泮、苯妥英、丙戊酸、拉莫三嗪、托吡酯、加巴喷丁),非 SSRI 类抗抑郁药(例如,三环类抗抑郁剂、文拉法辛),和潜在的视网膜毒素(例如,羟氯喹、去铁胺、甲硫哒嗪、氨己烯酸)。

[0414] 在未清脱至少 1 天的情况下,具有 DPN 的患者也被禁止服用 NSAIDS(包括 COX-2 抑制剂)和右美沙芬。先前暴露于加巴喷丁的患者,不论剂量和疗程,均允许进入研究。用于治疗抑郁的 SSRI,用于预防心肌梗塞和中风的阿司匹林,用于失眠的短效苯二氮杂䓬类,和作为急救药品的扑热息痛等是在研究期间允许的药物。如果患者具有 B 型或 C 型肝炎或 HIV 感染,神经障碍,可能混淆神经性疼痛的评估的与 DPN 或 PHN 的初步诊断无关的严重疼痛,或在受损的皮肤或神经性损害区域的任何潜在的感觉改变性皮肤病症的病史,则其也被排除。最后,患有 DPN 和具有恶性贫血史,未治愈的甲状腺功能减退,或除脚趾外截肢的患者,以及为治疗病症而进行了神经毁损术或神经外科治疗的 PHN 患者也被排除。

[0415] 治疗

[0416] 该研究具有两个阶段:1 星期的观察阶段,以建立基线疼痛得分,和 12 星期的双盲治疗阶段,其中在一个治疗组中应用响应于患者的需要的盲适应性。以 1 : 2 : 2 的比率将患者随机分为安慰剂 ($n = 65$),可变剂量组合物 ($50\text{--}200\ \mu\text{g}$ 本文所述的任意肽 / 周) ($n = 135$),或固定剂量组合物 ($200\ \mu\text{g}$ 本文所述的任意肽 / 周) ($n = 140$)。

[0417] 随机分配至组合物可变剂量组的患者接受逐步升高的剂量 (50 、 100 、 150 和 $200\ \mu\text{g}$ 本文所述的任意肽 / 周),根据反应和耐受性隔周进行滴定。在第 1 周后或在第 2、3 或 4 周或之后,允许进行单一的下调剂量滴定。如果发生这种情况,则在其余的研究中患者将保持在该剂量。该新型研究设计的优势是更加接近治疗程序,其中在所述治疗程序中医生根据个体患者的反应对方药的剂量进行调整。随机分配包括 $200\ \mu\text{g}$ 本文所述的任意肽的组合物 / 周的固定剂量组的患者开始时服用 1 周包括 $100\ \mu\text{g}$ 本文所述的任意肽的组合物 / 周,随后在双盲治疗的其余 11 周服用包括 $200\ \mu\text{g}$ 本文所述的任意肽的组合物 / 周。所有患者接受活性药物或配伍的安慰剂胶囊并遵循相同的每周两次皮下注射日程(每周剂量分为两个相等的剂量,在 3-4 天间隔内给予)。通过药品入库管理和在每次研究随访时审查剂量程序来评估遵从性。患者可在双盲试验的任何时间自由中止并进入开放标记延长研究。

[0418] 评估和终点

[0419] 在基线阶段(无活性治疗),患者使用 11 点数字 ($0 =$ ‘无疼痛’ 至 $10 =$ ‘可能最剧烈的疼痛’; $0 =$ ‘疼痛未干扰睡眠’ 至 $10 =$ ‘疼痛完全干扰睡眠’) 数字评分法 (NRS) 每日记录疼痛和与疼痛相关的睡眠干扰事项。在该阶段末期仍然符合所有纳入 / 排除标准的患者随机分配双盲研究药物并在六次随机后随访中评价。主要疗效参数为基于患者在其每日疼痛日记中所记录的 NRS 分数的终点平均疼痛分数。每天早晨醒来时,患者使用 NRS 在其日记中记录先前 24 小时期间它们的神经性疼痛强度。次要疗效参数包括每日睡眠干扰

日记（与疼痛日记类似）和医学结果研究（MOS）-睡眠评分（Hays and Stewart, 1992），以及患者总体感觉改善情况（PGIC）。MOS睡眠评分为已验证的12项患者完成的调查问卷，其用于测量睡眠对与健康相关的生活质量的影响。

[0420] 安全性

[0421] 安全性评估包括不良事件的总结（AE、事件、性质、强度、以及与研究药物的关系），临床实验室试验结果，和身体和神经检查结果以及12-导联ECG。

[0422] 预计接受了包括任意本文所述肽的组合物患者的疼痛、炎症和其它与慢性神经性疼痛有关的症状会减轻。

[0423] 本发明主题所属领域的技术人员将理解，在不背离本发明的必要本质的情况下，可以进行各种更改。其旨在涵盖所有在所附权利要求范围内的这样的更改。

[0001]

P54556序列表.txt

序列表

<110> 阿洛莫恩临床有限公司

<120> 从蜘蛛毒液中分离的新型肽及其应用

<130> P54556WEBB

<140> PCT/IB2010/002275

<141> 2010-9-13

<150> US 61/272,336

<151> 2009-09-15

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> Pterinochilus spp. Usambara (Psp)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34).. (34)

<223> 在该位置可以发生或者可以不发生酰胺化

<400> 1

Asp Asp Cys Leu Gly Met Phe Ser Ser Cys Asp Pro Asp Asn Asp Lys
1 5 10 15

Cys Cys Glu Gly Arg Lys Cys Asn Arg Lys Asp Lys Trp Cys Lys Tyr
20 25 30

Val Leu

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Pterinochilus spp. Usambara (Psp)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29).. (29)

<223> 在该位置可以发生或者可以不发生酰胺化

<400> 2

Tyr Cys Gln Glu Phe Leu Trp Thr Cys Asp Glu Glu Arg Lys Cys Cys
1 5 10 15

Gly Asp Met Val Cys Arg Leu Trp Cys Lys Lys Arg Leu
20 25

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> 金属蓝蜘蛛 (Hv)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35).. (35)

<223> 在该位置可以发生或者可以不发生酰胺化

[0002]

<400> 3

Ala Cys Leu Gly Phe Gly Glu Lys Cys Asn Pro Ser Asn Asp Lys Cys
1 5 10 15

Cys Lys Ser Ser Ser Leu Val Cys Ser Gln Lys His Lys Trp Cys Lys
20 25 30

Tyr Gly Trp
35

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> 金属蓝蜘蛛 (Hv)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33).. (33)

<223> 在该位置可以发生或者可以不发生酰胺化

<400> 4

Ala Cys Lys Gly Leu Phe Val Thr Cys Thr Pro Gly Lys Asp Glu Cys
1 5 10 15

Cys Pro Asn His Val Cys Ser Ser Lys His Lys Trp Cys Lys Tyr Lys
20 25 30

Thr

<210> 5

<211> 34

<212> PRT

<213> Red Morph Grammostola (RMG)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34).. (34)

<223> 在该位置可以发生或者可以不发生酰胺化

<400> 5

Asp Cys Leu Gly Phe Met Arg Lys Cys Ile Pro Asp Asn Asp Lys Cys
1 5 10 15

Cys Arg Pro Asn Leu Val Cys Ser Arg Thr His Lys Trp Cys Lys Tyr
20 25 30

Val Phe

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> Red Morph Grammostola (RMG)

<400> 6

Asp Cys Leu Gly Trp Phe Lys Gly Cys Asp Pro Asp Asn Asp Lys Cys
1 5 10 15

[0003]

Cys Glu Gly Tyr Lys Cys Asn Arg Arg Asp Lys Trp Cys Lys Tyr Lys
20 25 30

Leu Trp

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 例如，可通过使用BOC（叔丁氧基羰基）、Fmoc（9-芴基甲氧基羰基）固相肽合成的化学合成的固相合成程序或任何其他已知方法可获得的蜘蛛毒液的合成构建物

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Xaa是氨基酸 M 或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6).. (6)
<223> Xaa 是氨基酸 M 或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Xaa 是氨基酸 R 或 S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (8)
<223> Xaa 是氨基酸 K 或 S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> Xaa 是氨基酸 D 或 I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> 在该位置可以发生或者可以不发生酰胺化

<400> 7

Asp Cys Leu Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Pro Asp Asn Asp Lys Cys
1 5 10 15

Cys

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 例如，可通过使用BOC（叔丁氧基羰基）、Fmoc（9-芴基甲氧基羰基）固相肽合成的化学合成的固相合成程序或任何其他已知方法可获得的蜘蛛毒液的合成构建物

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3).. (3)
<223> Xaa是氨基酸 K 或 L

<220>
<221> MISC_FEATURE

[0004]

<222> (5).. (5)
<223> Xaa是氨基酸 L 或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6).. (6)
<223> Xaa是氨基酸 G 或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Xaa是氨基酸 E 或 V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (8)
<223> Xaa是氨基酸 K 或 T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> Xaa是氨基酸 N 或 T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> Xaa是氨基酸 S 或 G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13).. (13)
<223> Xaa是氨基酸 N 或 K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15).. (15)
<223> Xaa是氨基酸 K 或 E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17).. (17)
<223> 在该位置可以发生或者可以不发生酰胺化

<400> 8

Ala Cys Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Pro Xaa Xaa Asp Xaa Cys
1 5 10 15

Cys

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 例如, 可通过使用BOC(叔丁氧基羰基)、Fmoc(9-芴基甲氧基羰基)固相肽合成的化学合成的固相合成程序或任何其他已知方法可获得的蜘蛛毒液的合成构建物

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> Xaa是氨基酸 L 或 H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Xaa是氨基酸Q, S, 或 R

<220>
<221> MISC_FEATURE

[0005]

<222> (6)..(6)
<223> Xaa是氨基酸 K 或 T

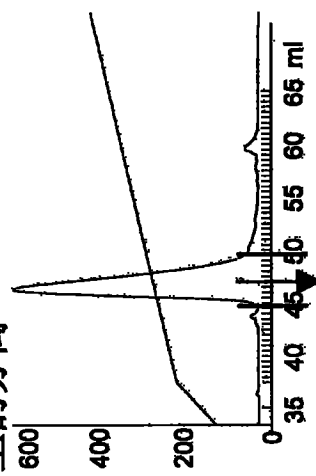
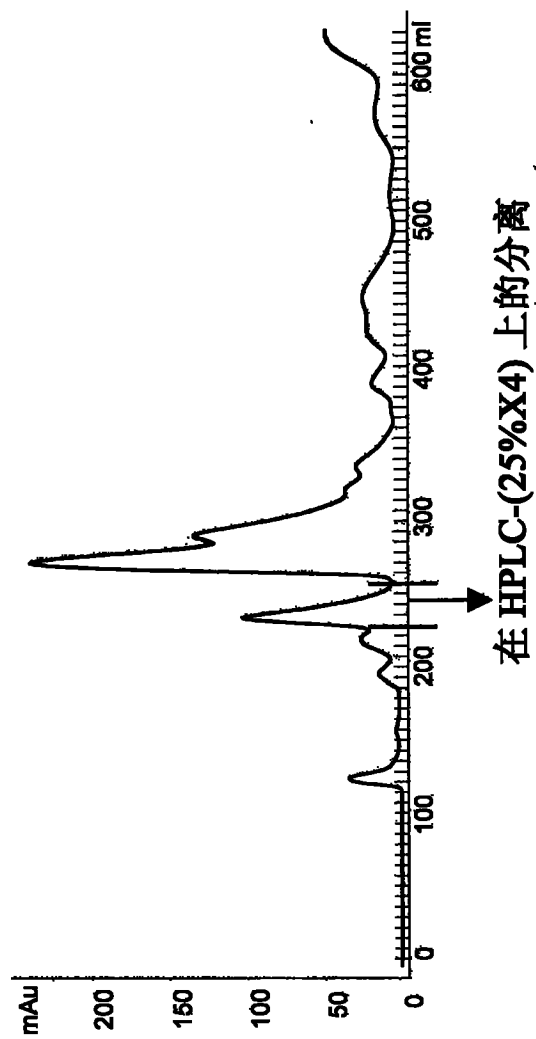
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> 在该位置可以发生或者可以不发生酰胺化

<400> 9

Xaa Val Cys Ser Xaa Xaa His Lys Trp Cys Lys Tyr
1 5 10

图 1A

在凝胶过滤 S-30 柱上的分离

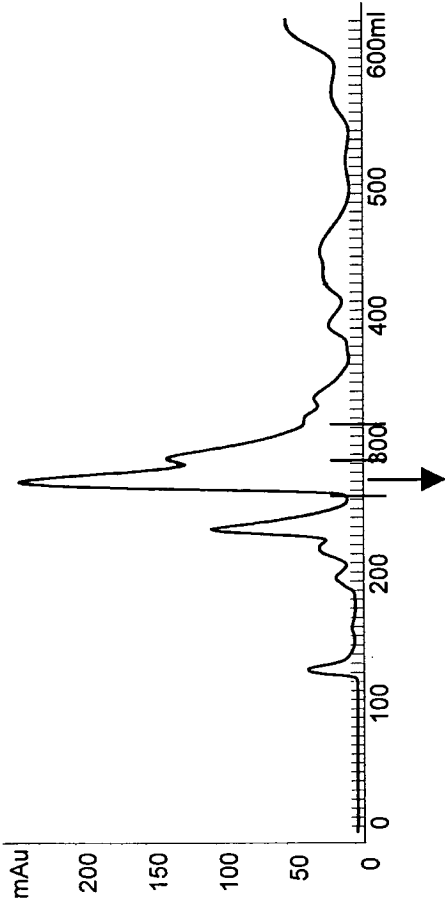


肽 A 的 MS 确认 3963 Da / 2.6mg

图 1B

图 2A

在凝胶过滤 S-30 柱上的分离



在 SP CEx (5 mL) 上的分离

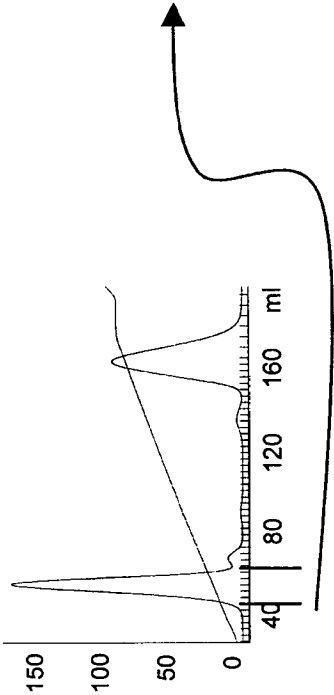


图 2B

在 HPLC-(50%X2) 上的分离

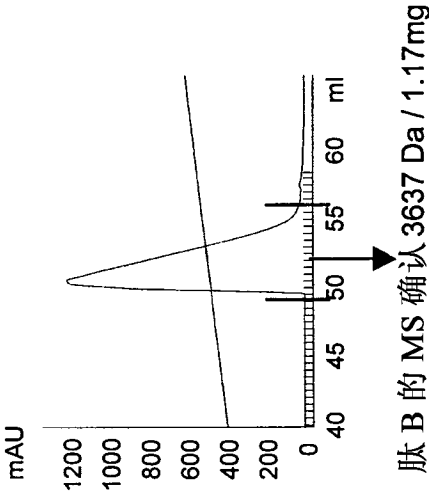
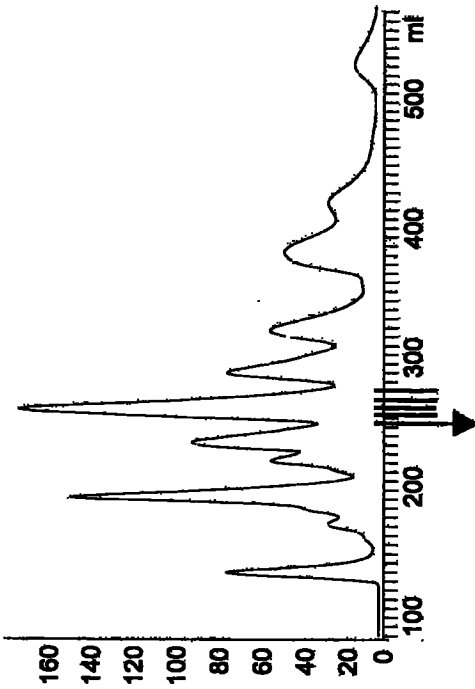


图 2C

图 3A

在凝胶过滤 S-30 柱上的分离



在 SP CEx (5 mL) 上的分离

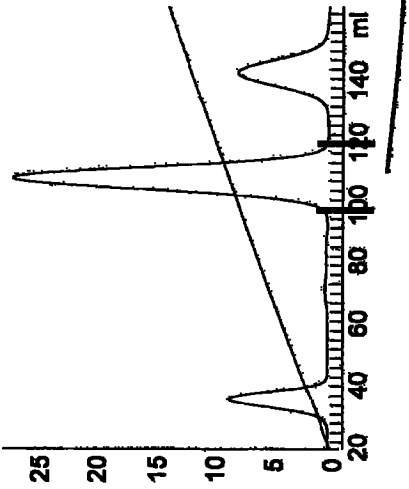
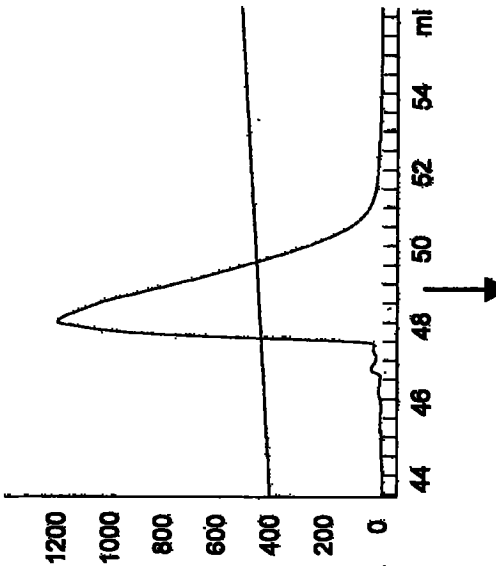


图 3B

在 HPLC-(半制备性柱) 上的分离

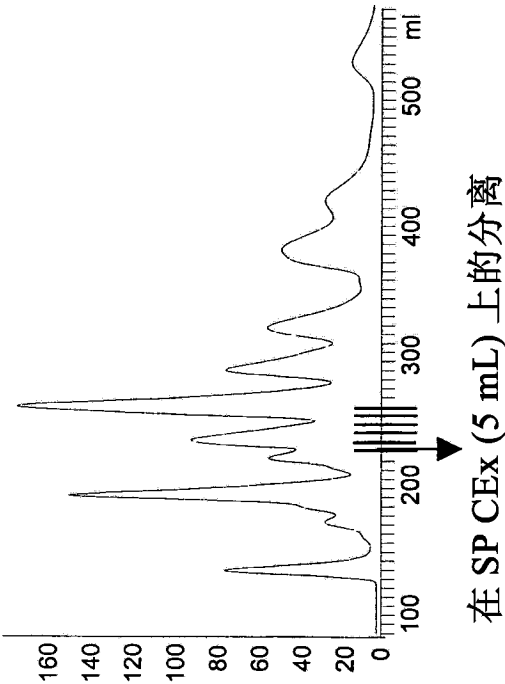


肽 C 的 MS 确认 3918 Da / 1.56mg

图 3C

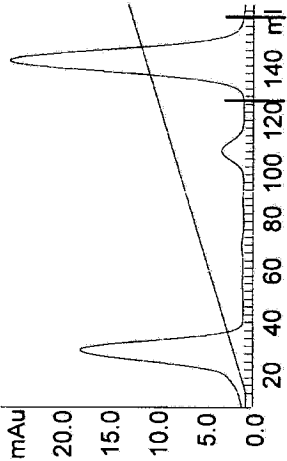
图 4A

在凝胶过滤 S-30 柱上的分离

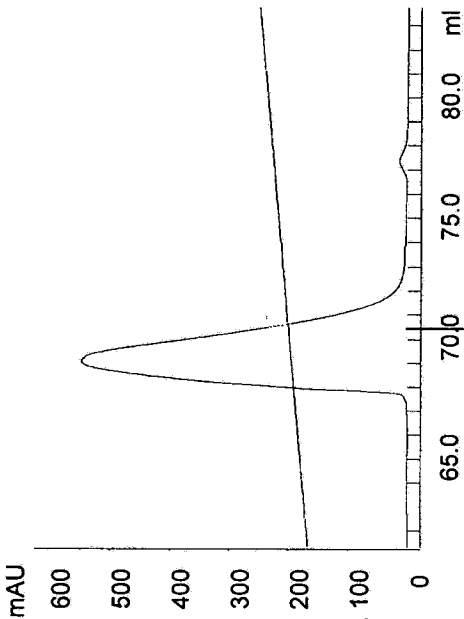


在 SP CEx (5 mL) 上的分离

图 4B



在 HPLC-(半制备性柱) 上的分离



肽 D 的 MS 确认 3706 Da / 1.58mg

图 4C

图 5A
在凝胶过滤 S-30 柱上的分离

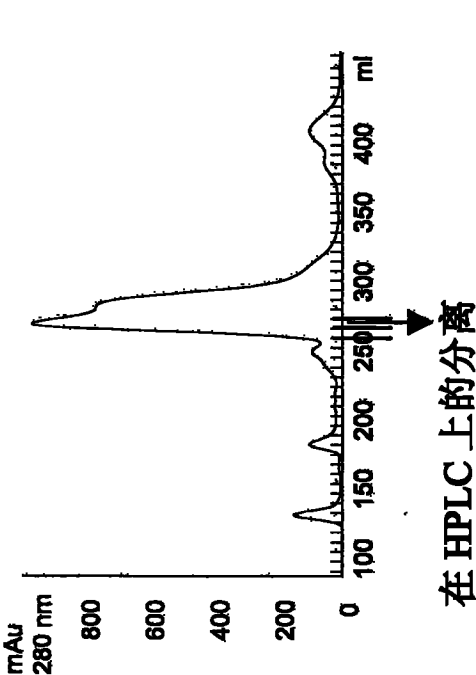


图 5C
在 SP CEx (1 mL) 上的分离

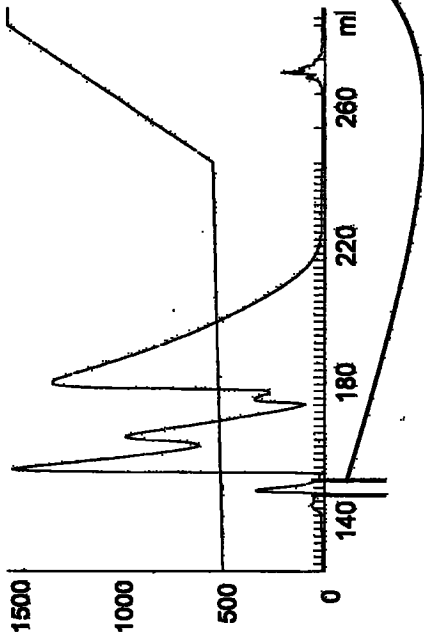
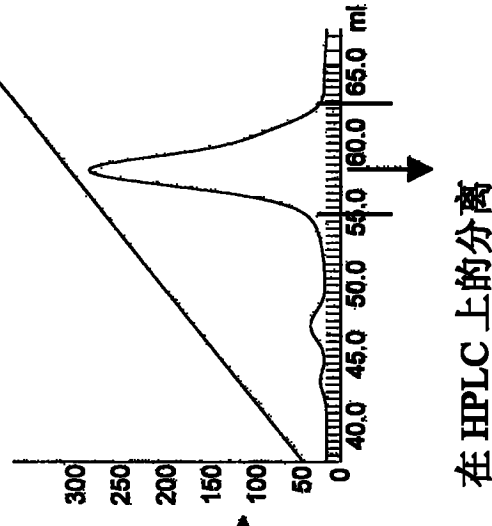
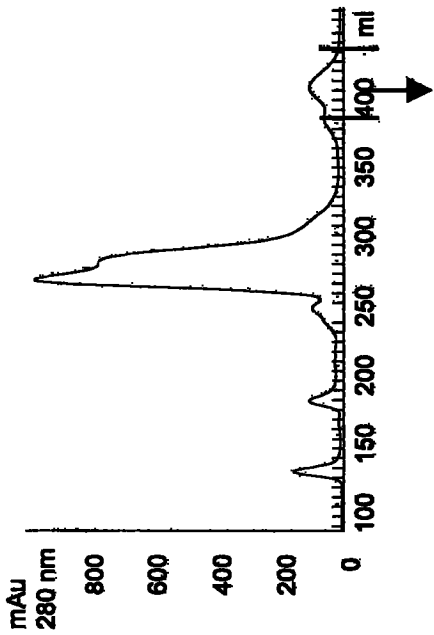


图 5B

图 5D

图 6A

在凝胶过滤 S-30 柱上的分离



在 SP CEx (5 mL) 上的分离

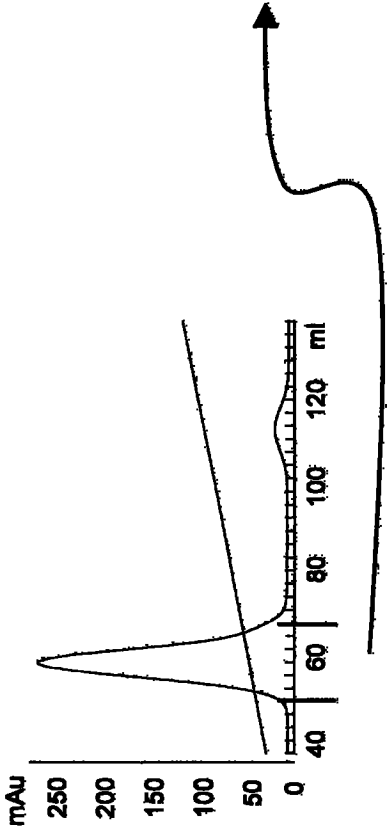
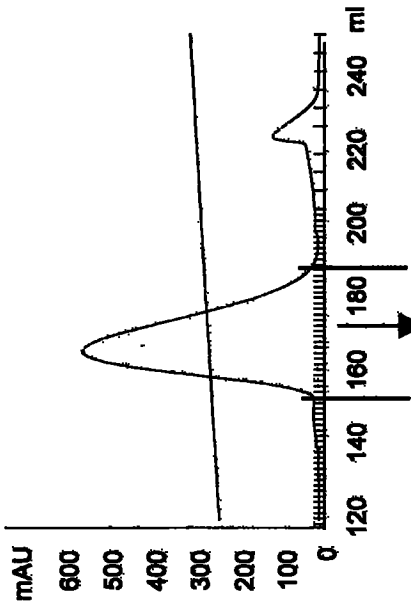


图 6B

在 HPLC-(半制备性柱) 上的分离



肽 F 的 MS 确认 4169 Da / 1.92mg

图 6C

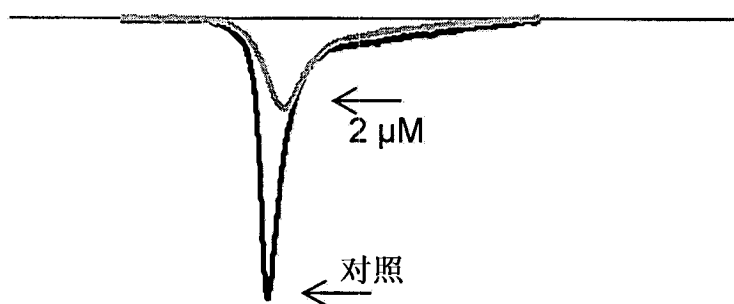
rNa_v1.3

图 7A

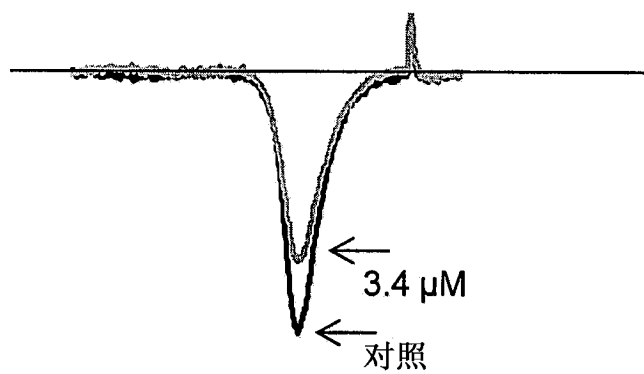
hNa_v1.3

图 7B

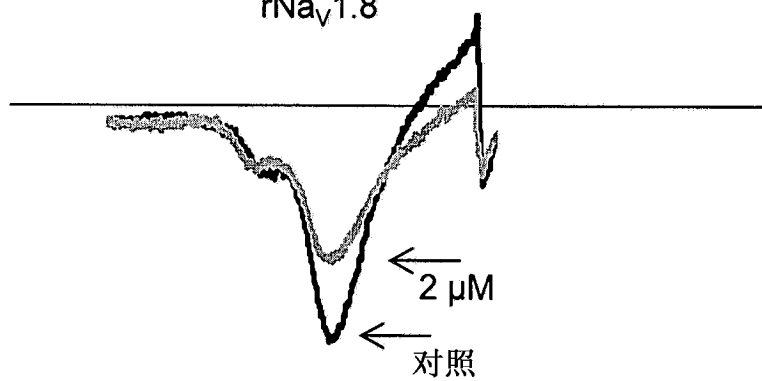
rNa_v1.8

图 7C

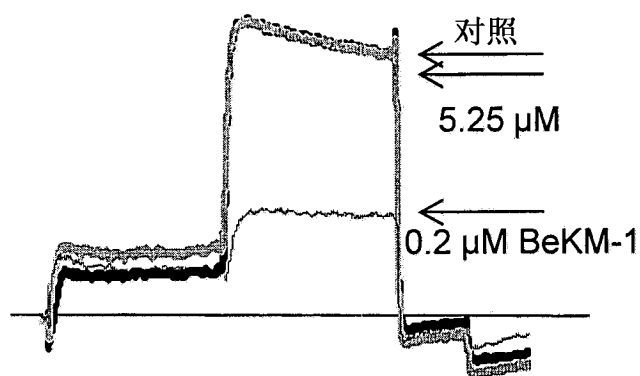
hK_v11.1

图 7D

剂量反应 (剂量应答)

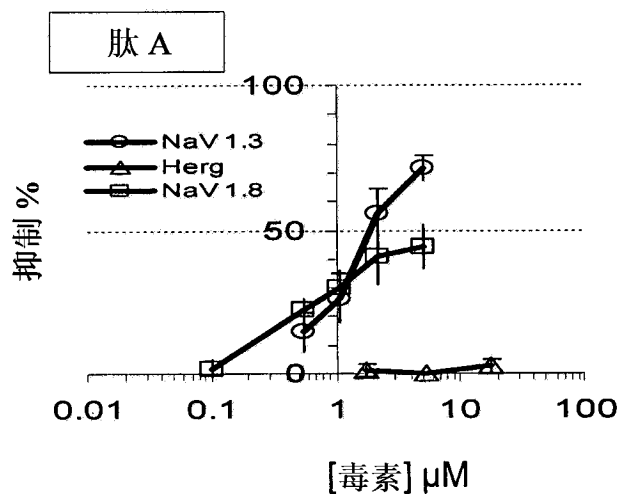


图 7E

rDRG 中的 AP

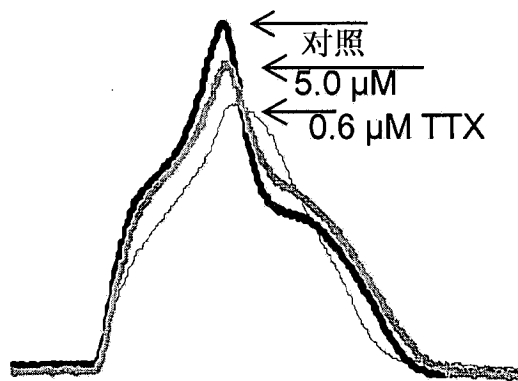


图 7F

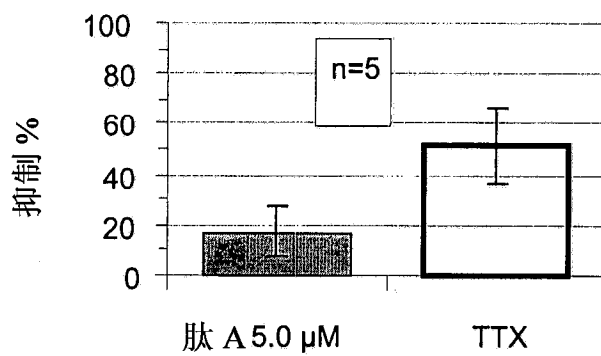


图 7G

mES 心肌细胞中的 AP

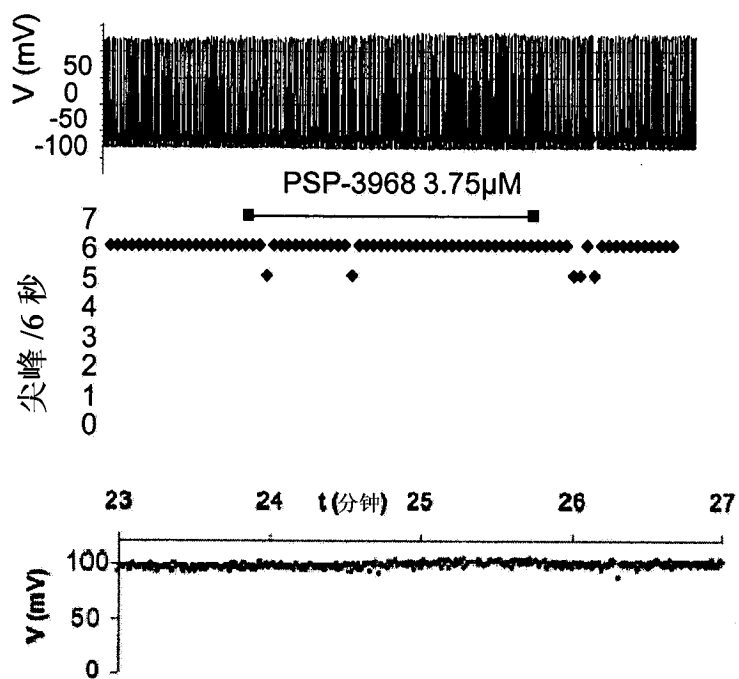


图 7H

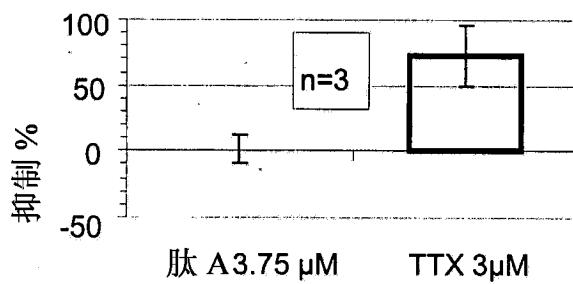


图 7I

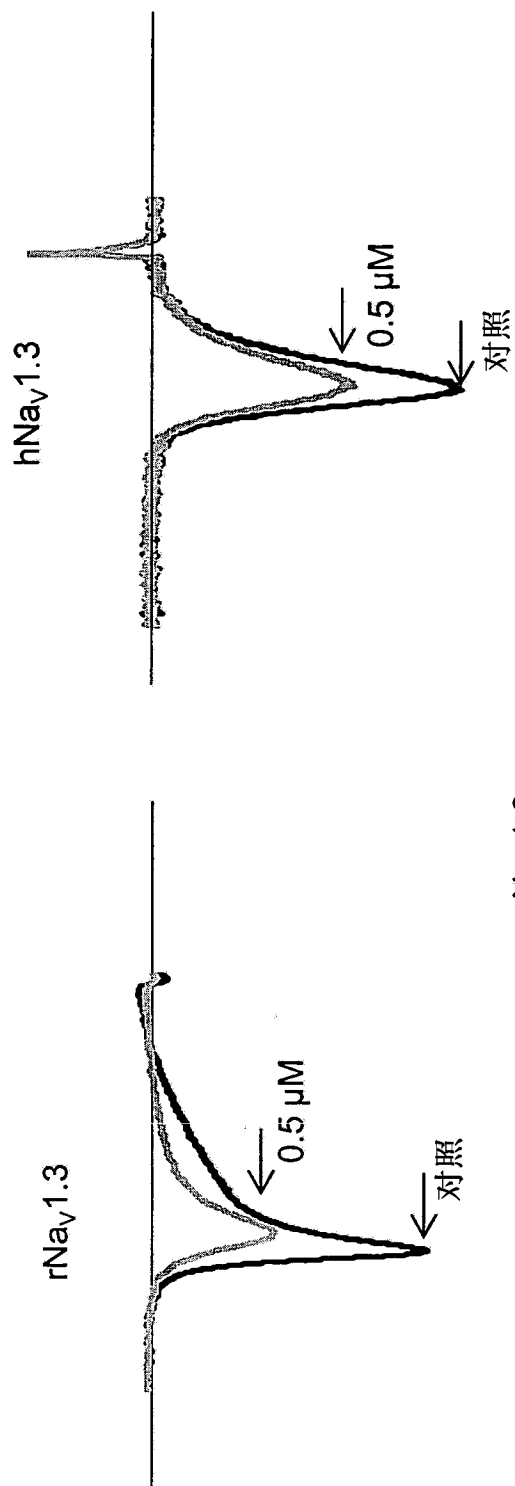
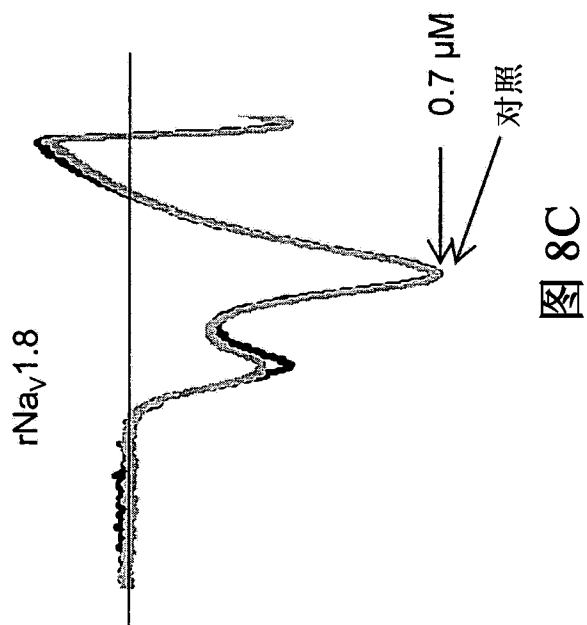


图 8B



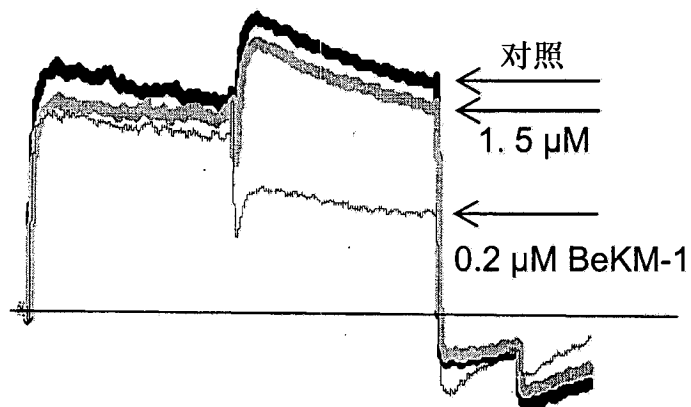
hK_v11.1

图 8D

剂量反应

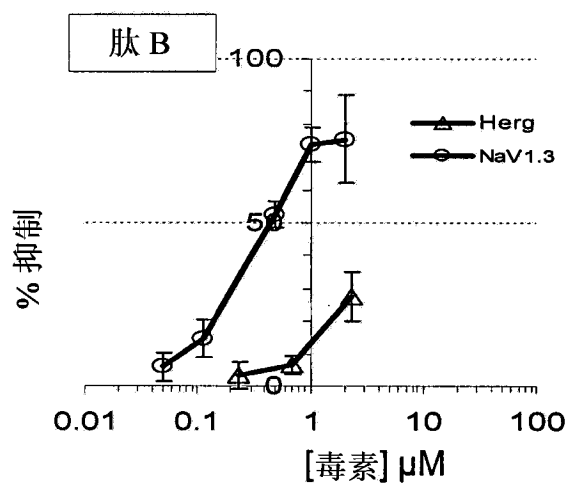


图 8E

rDRG 中的 AP

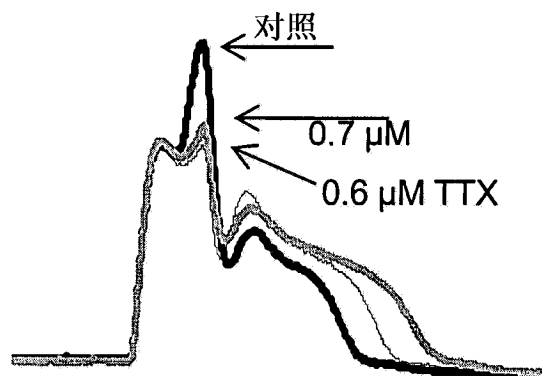


图 8F

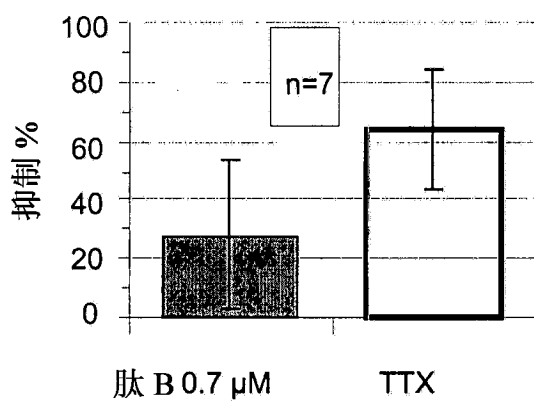


图 8G

mES 心肌细胞中的 AP

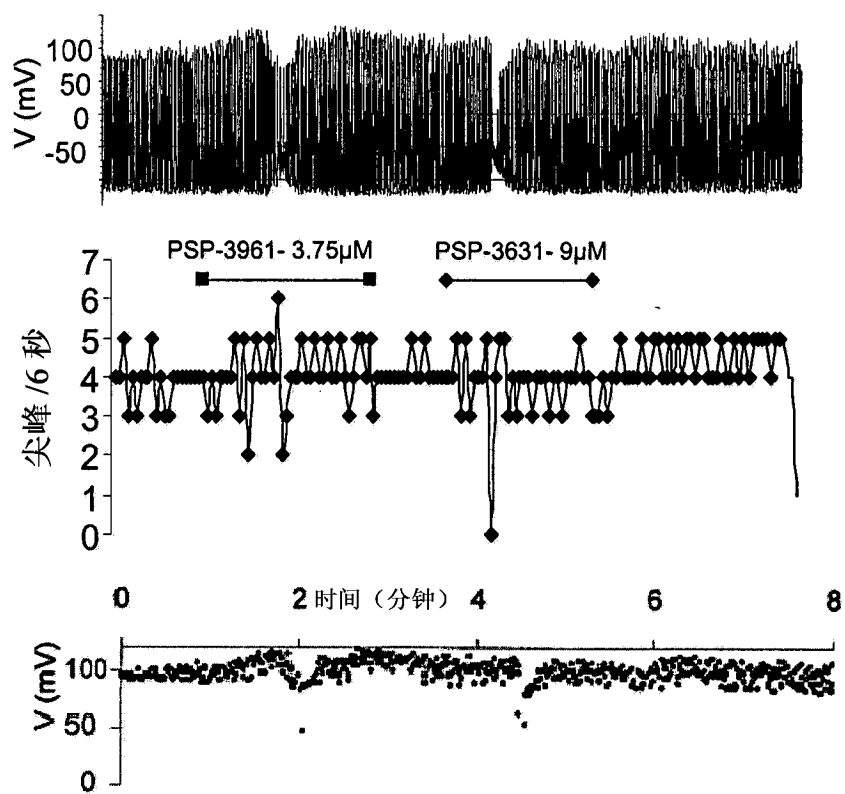


图 8H

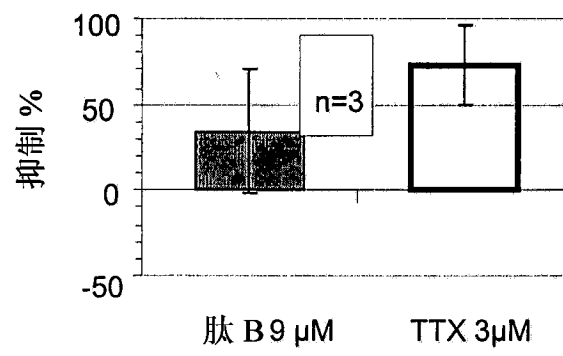
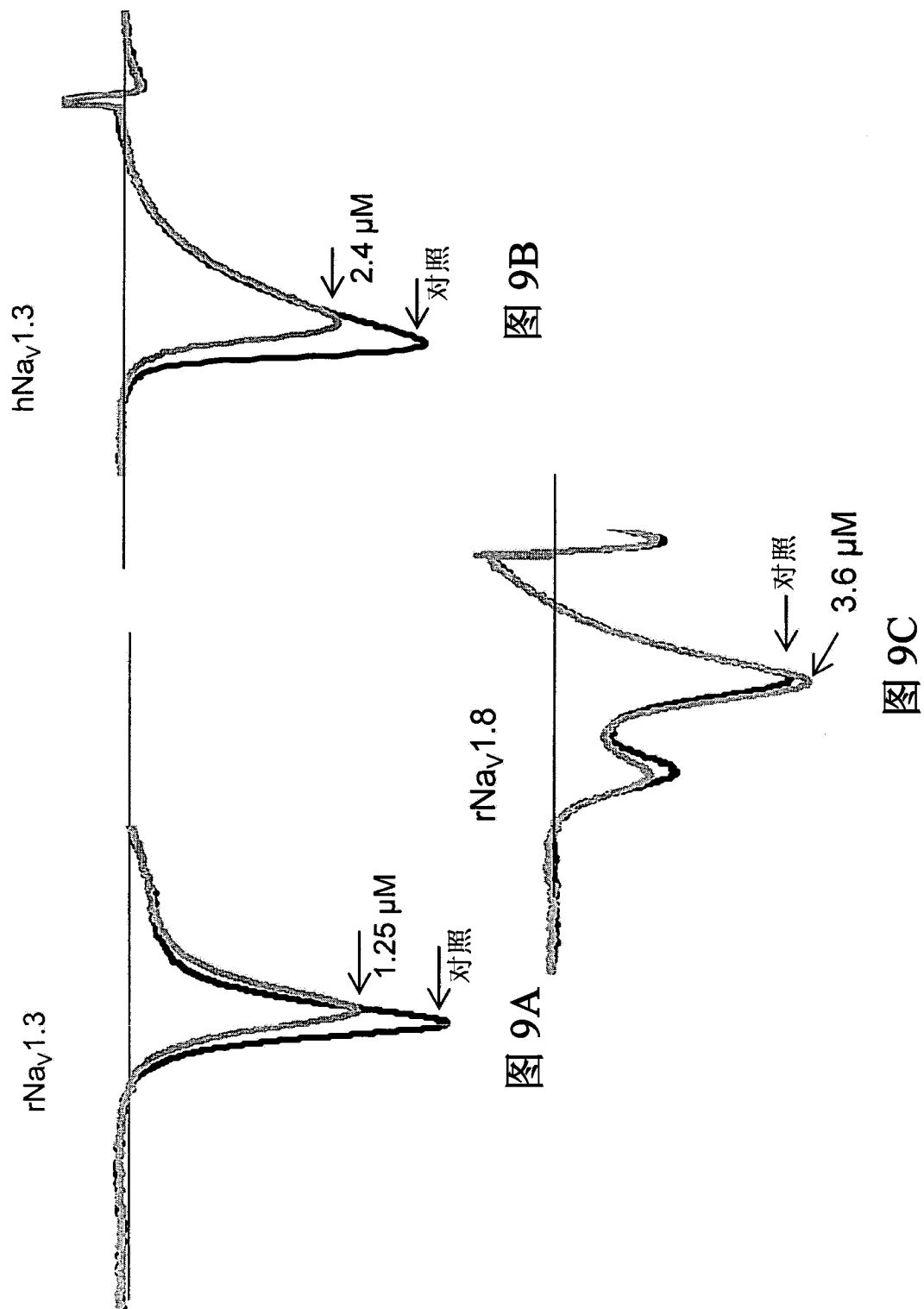
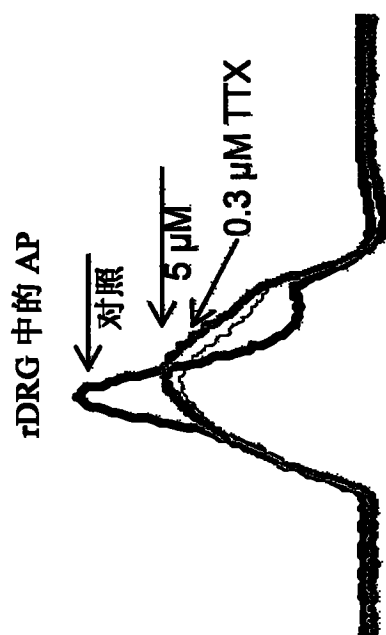
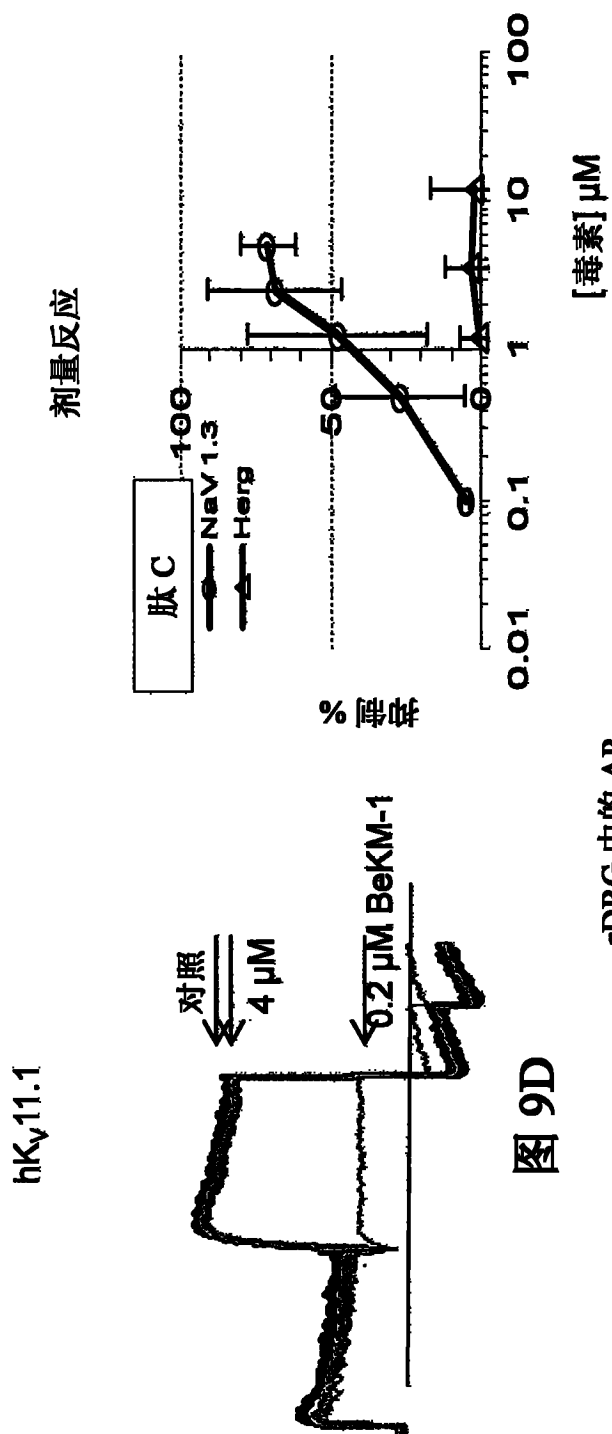


图 8I





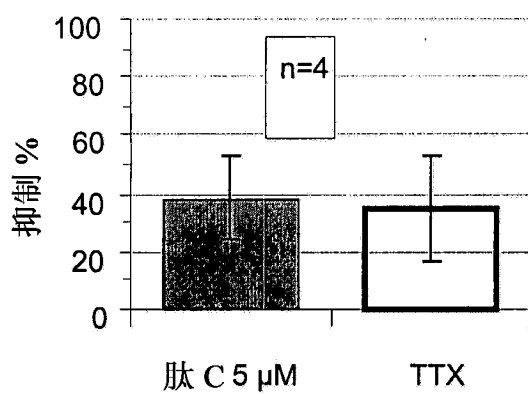


图 9G

mES 心肌细胞中的 AP

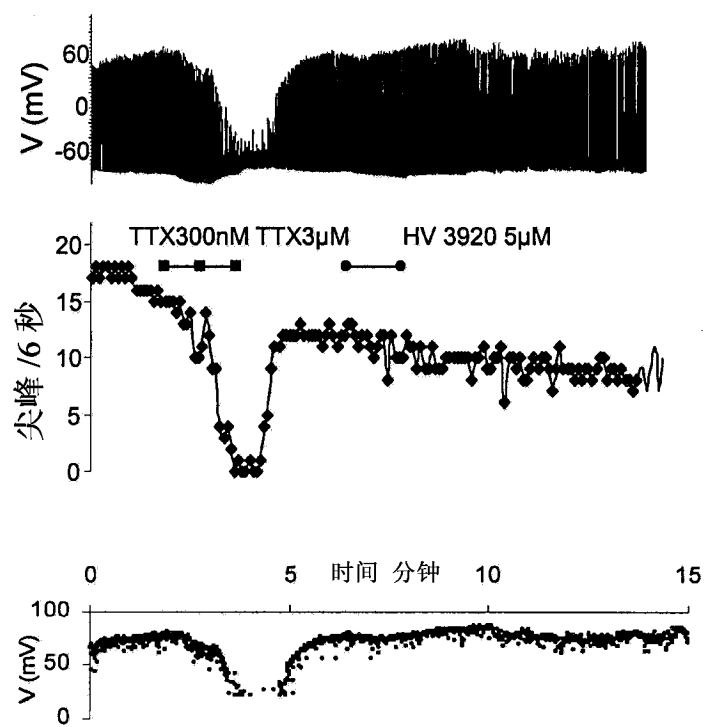


图 9H

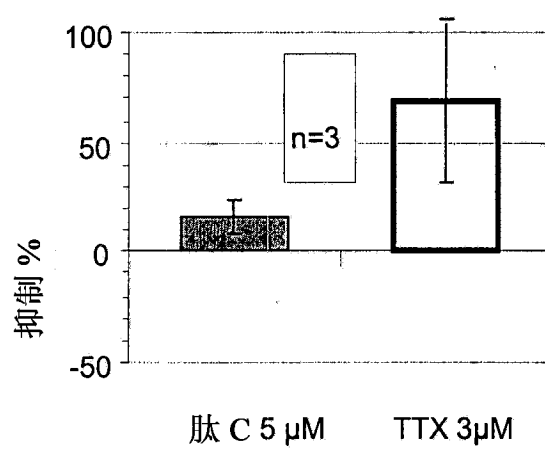
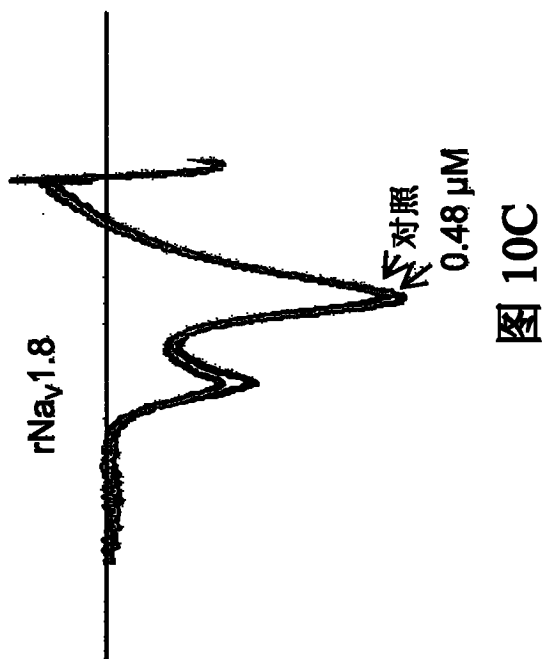
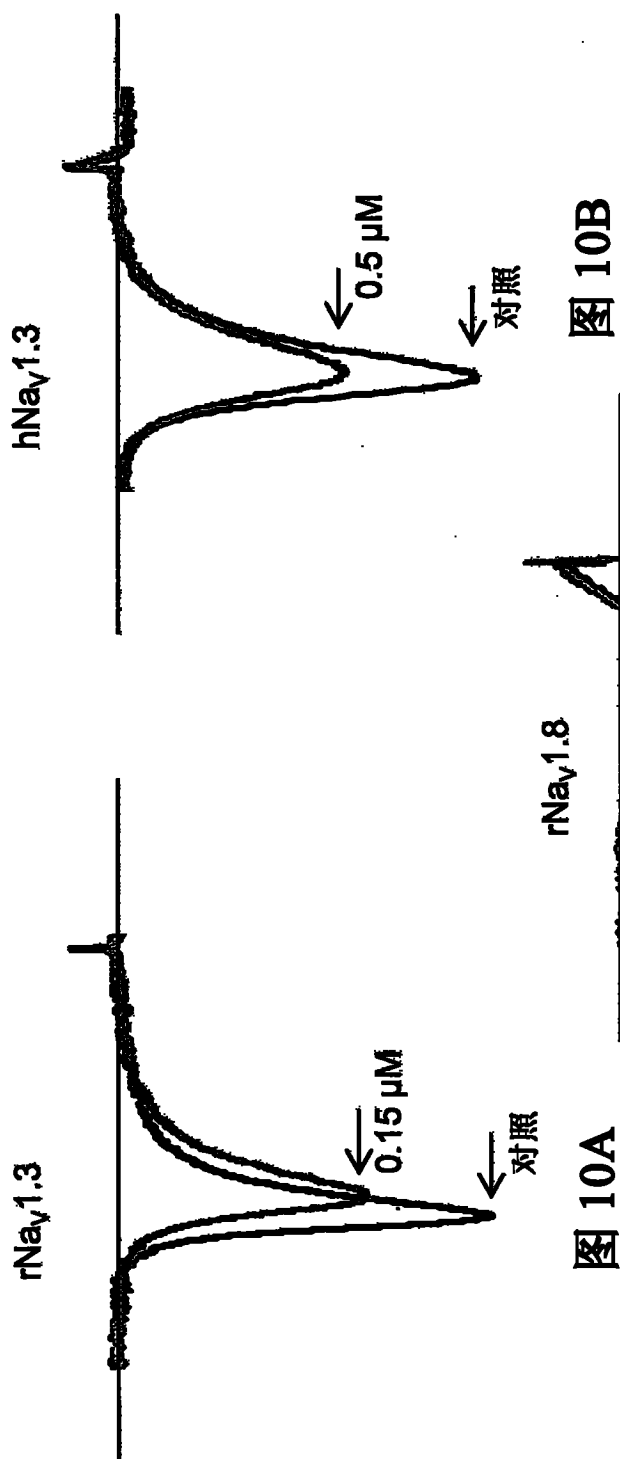


图 9I



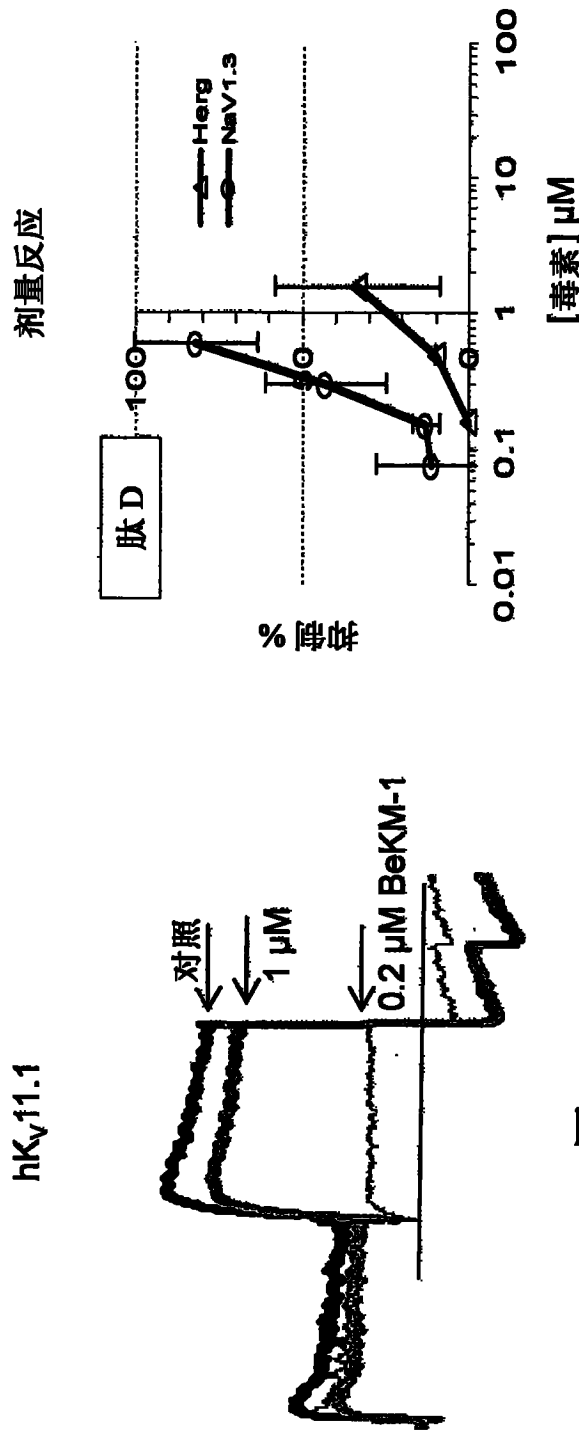


图 10D

图 10E

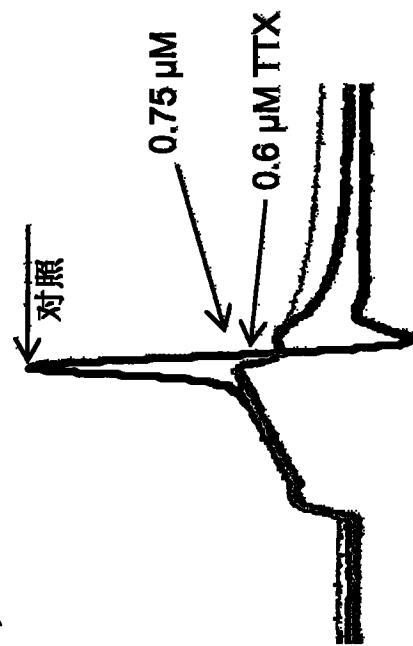


图 10F

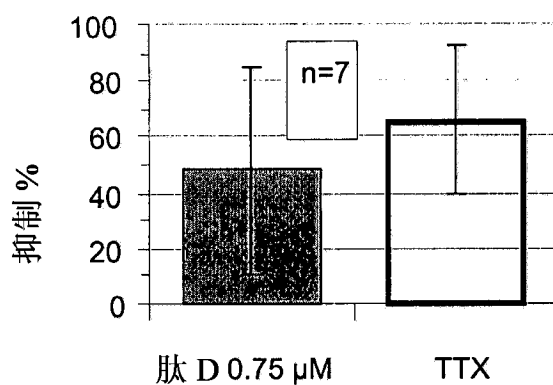


图 10G

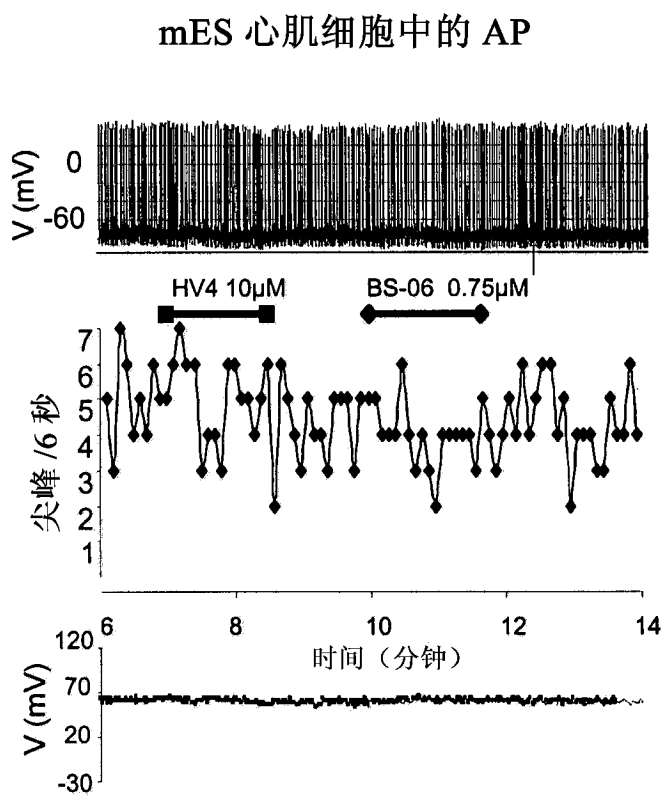


图 10H

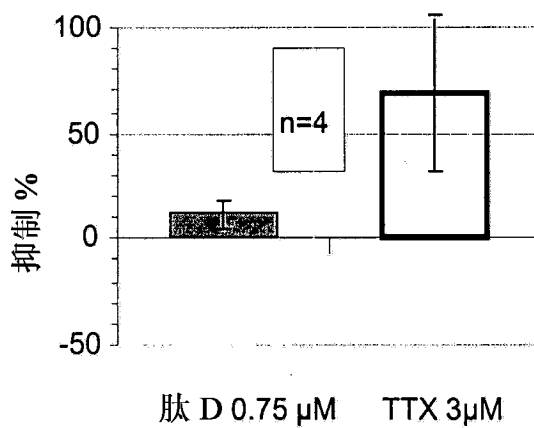


图 10I

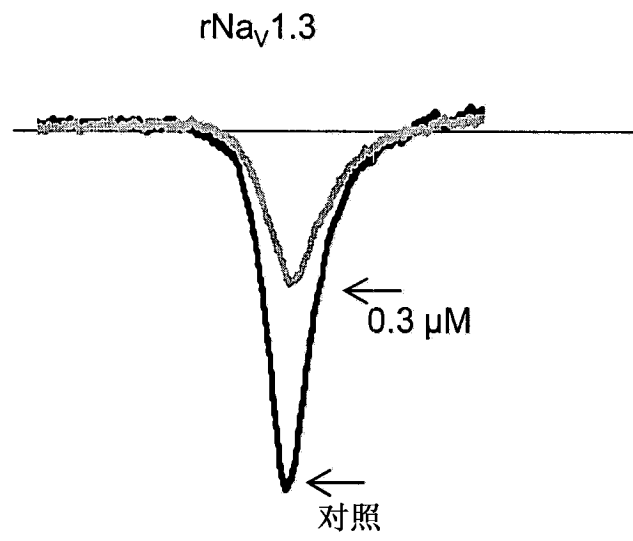


图 11A

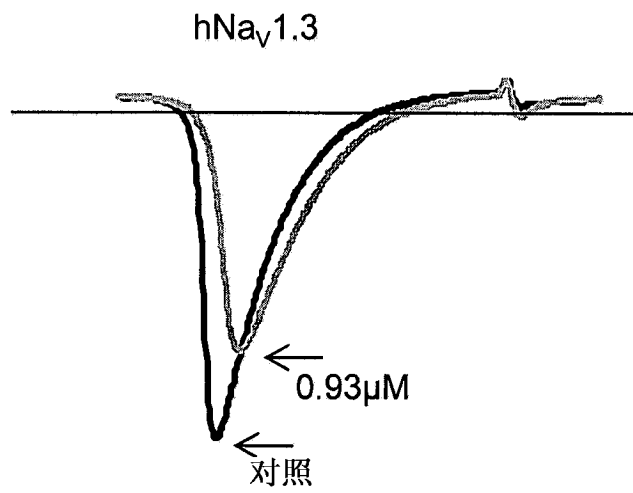


图 11B

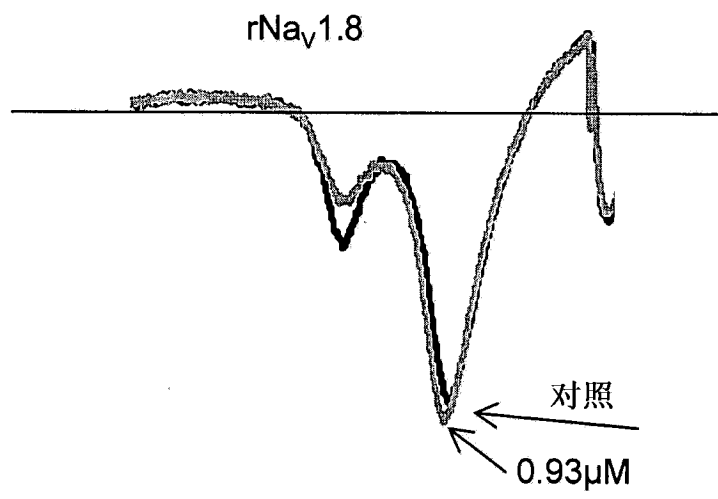


图 11C

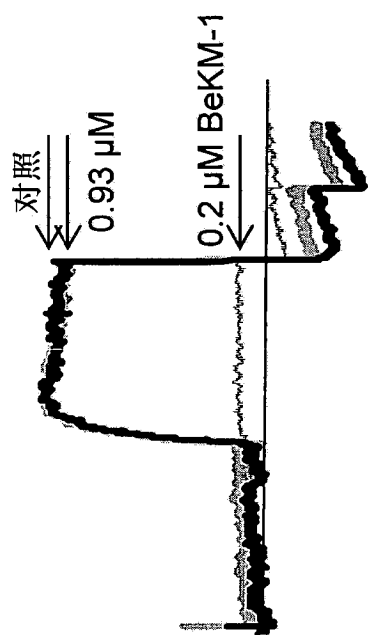
hK_v11.1

图 11D

剂量反应

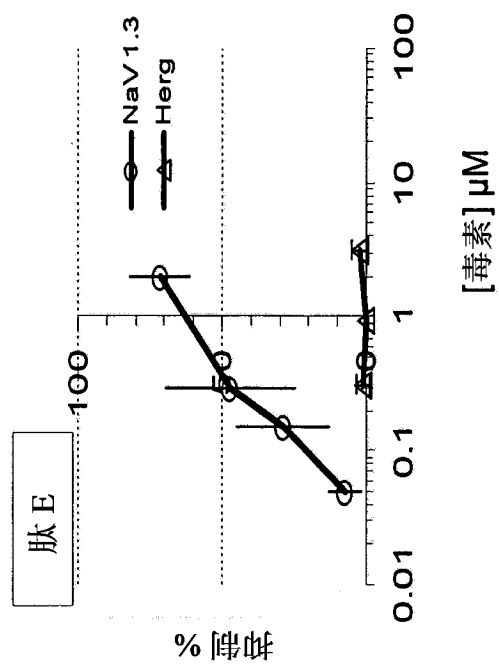


图 11E

rDRG 中的 AP

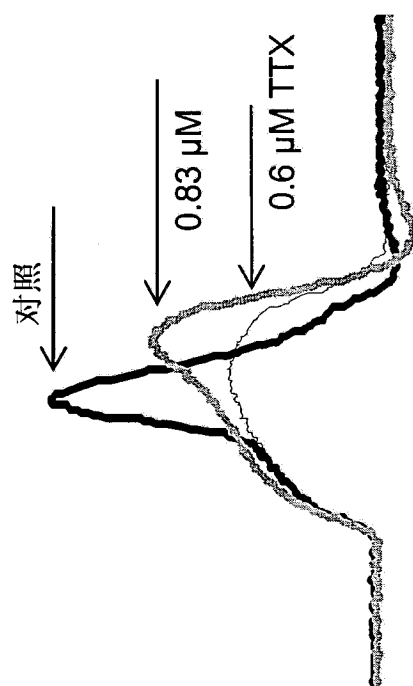


图 11F

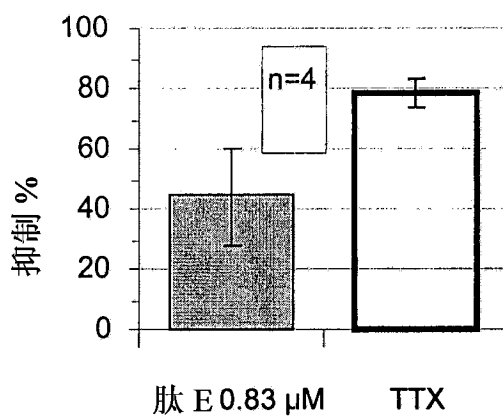


图 11G

mES 心肌细胞中的 AP

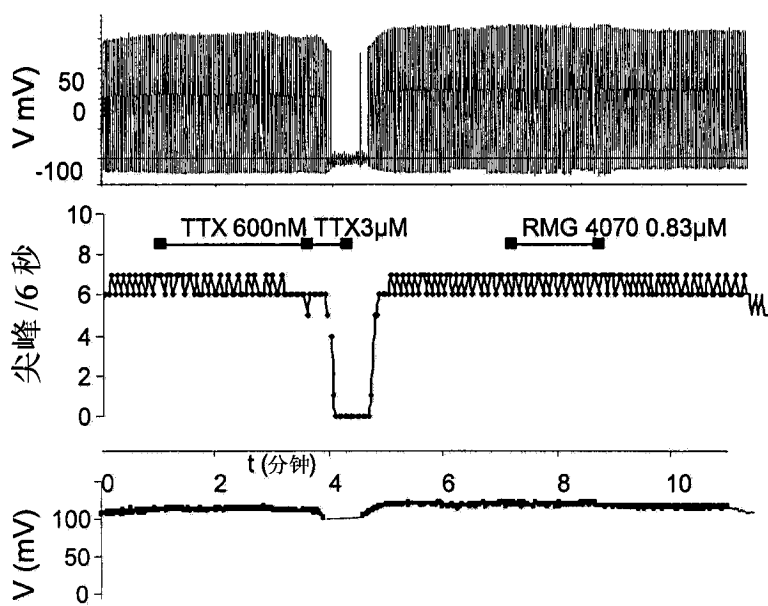


图 11H

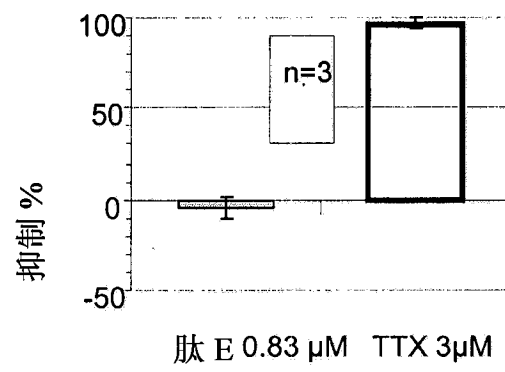
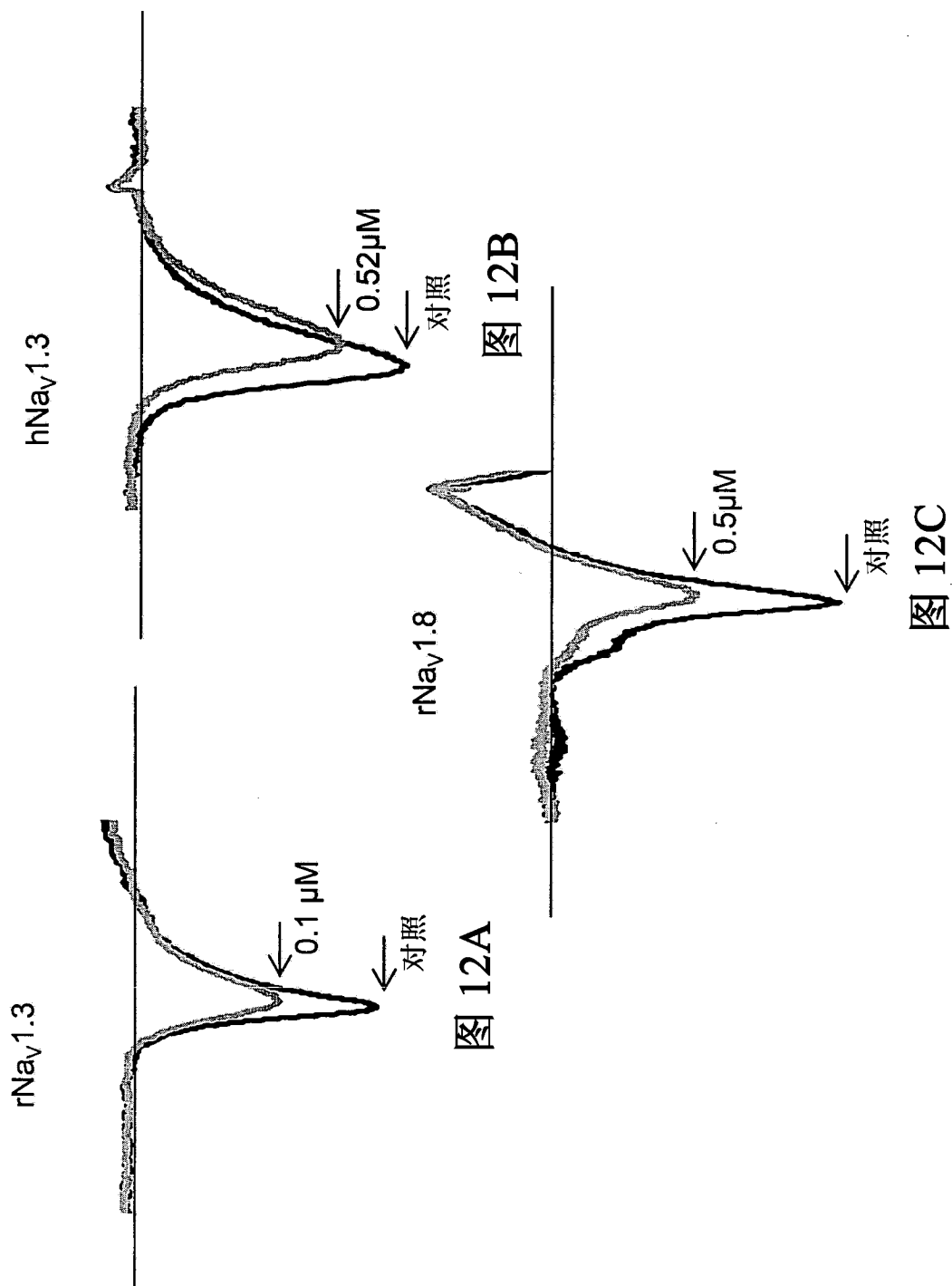


图 11I



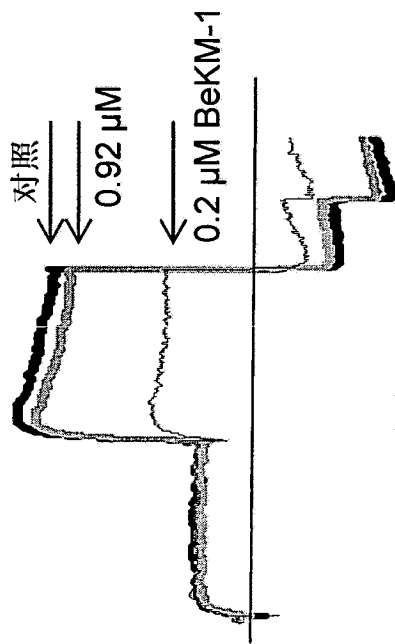
hK_v11.1

图 12D

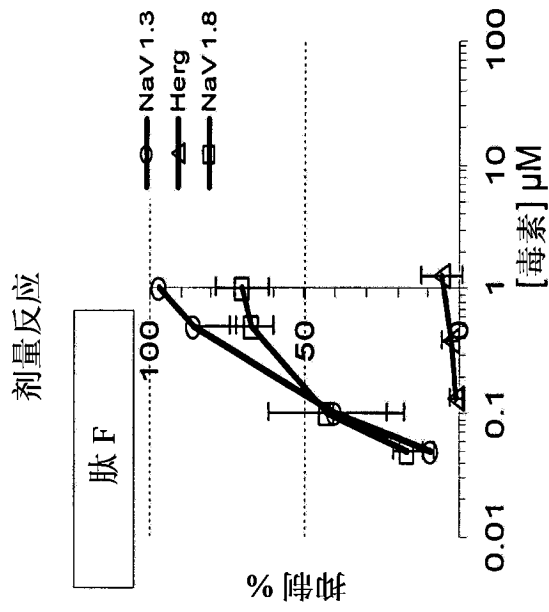


图 12E

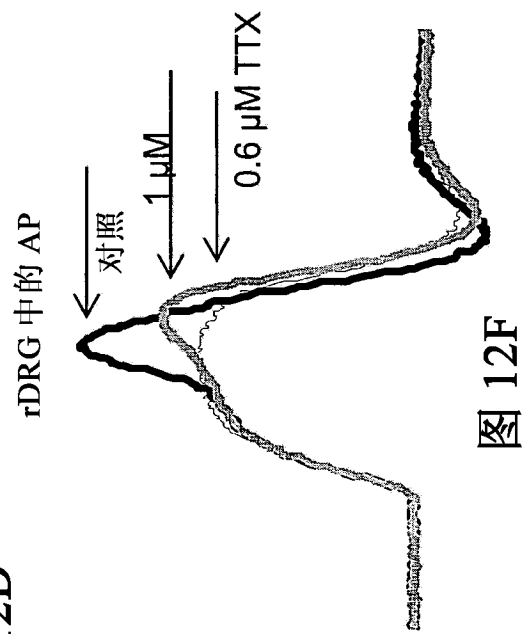


图 12F

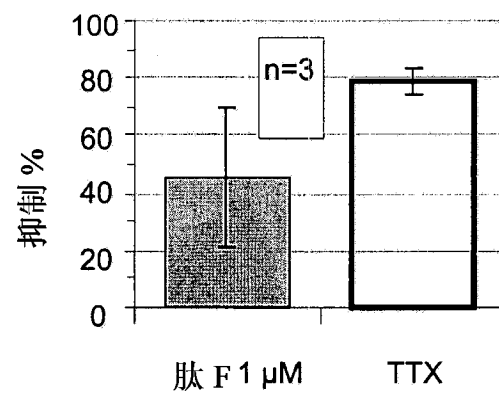


图 12G

mES 心肌细胞中的 AP

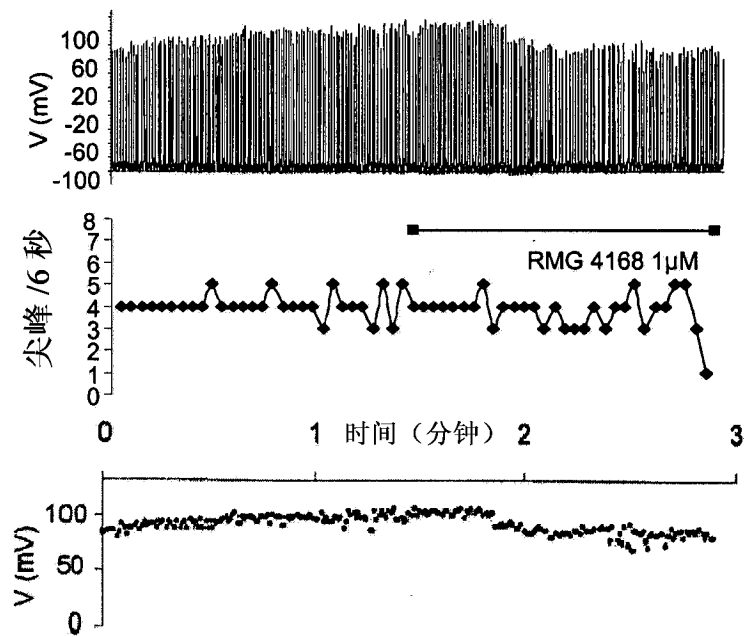


图 12H

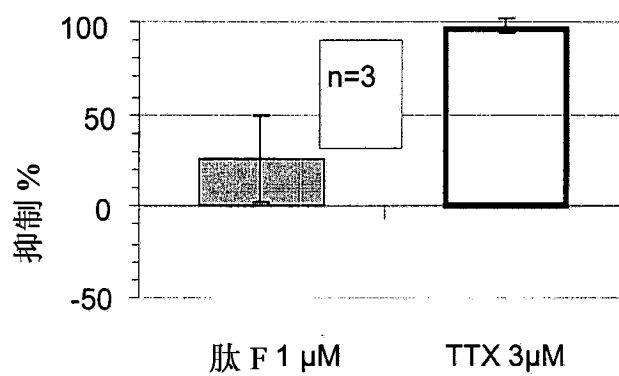


图 12I

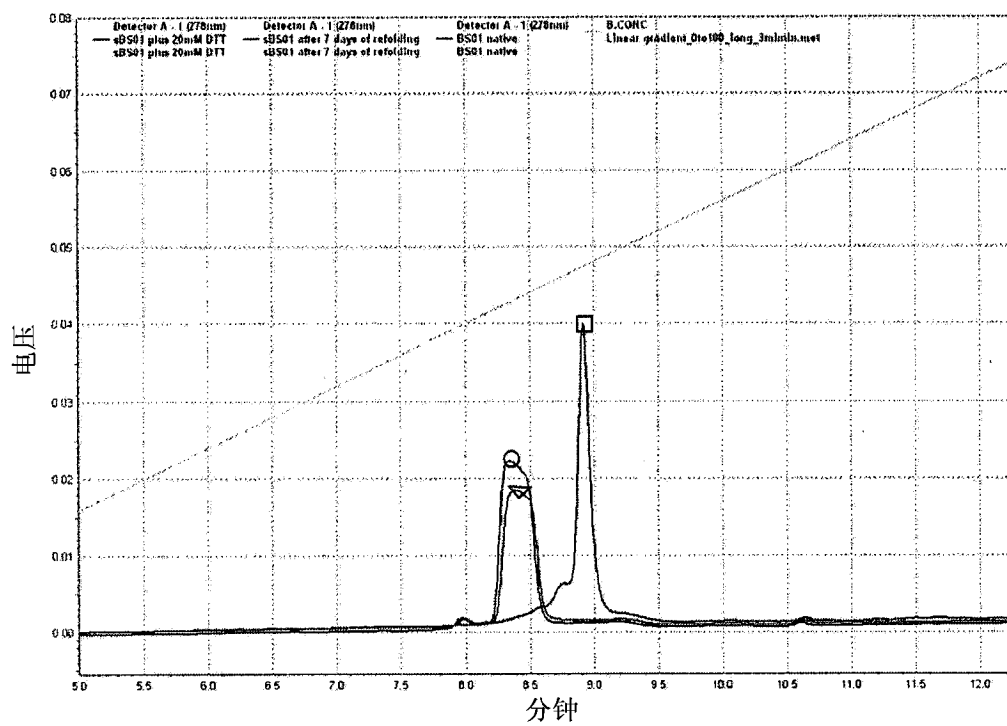


图 13

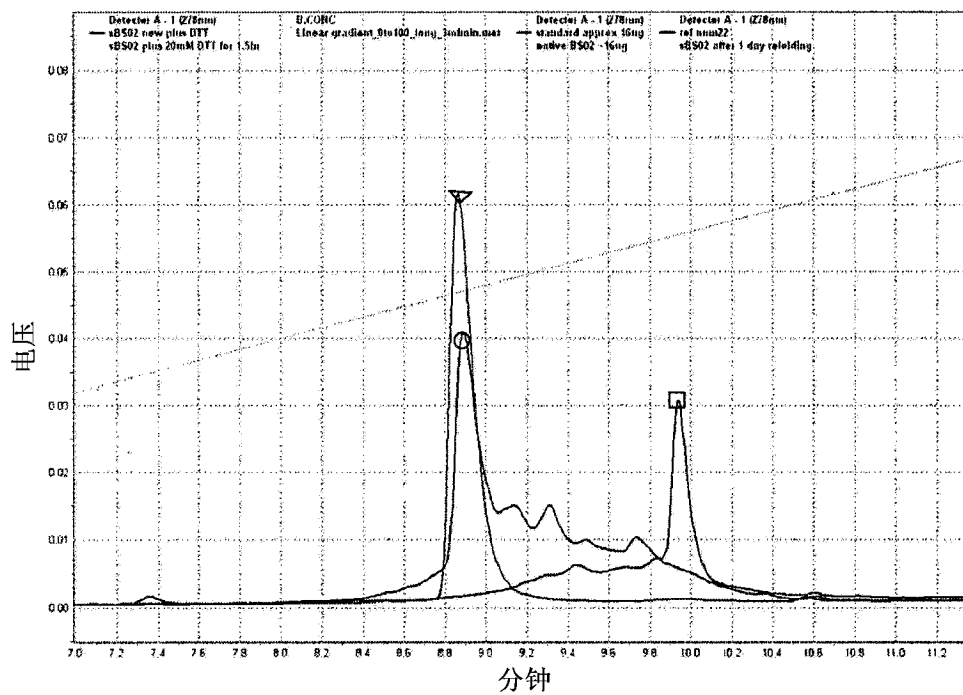


图 14

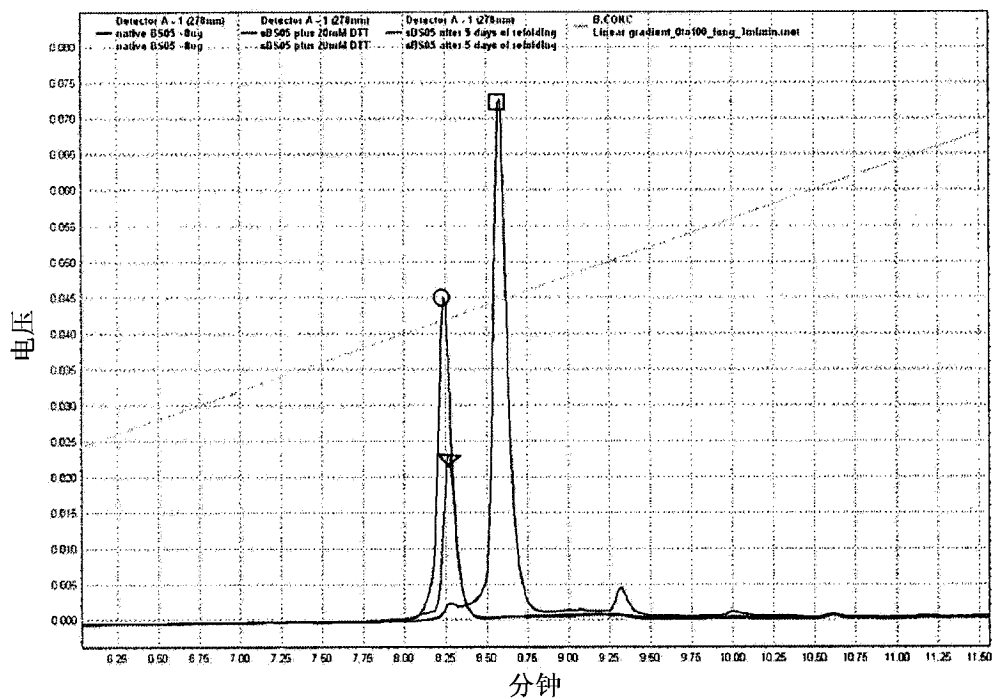


图 15

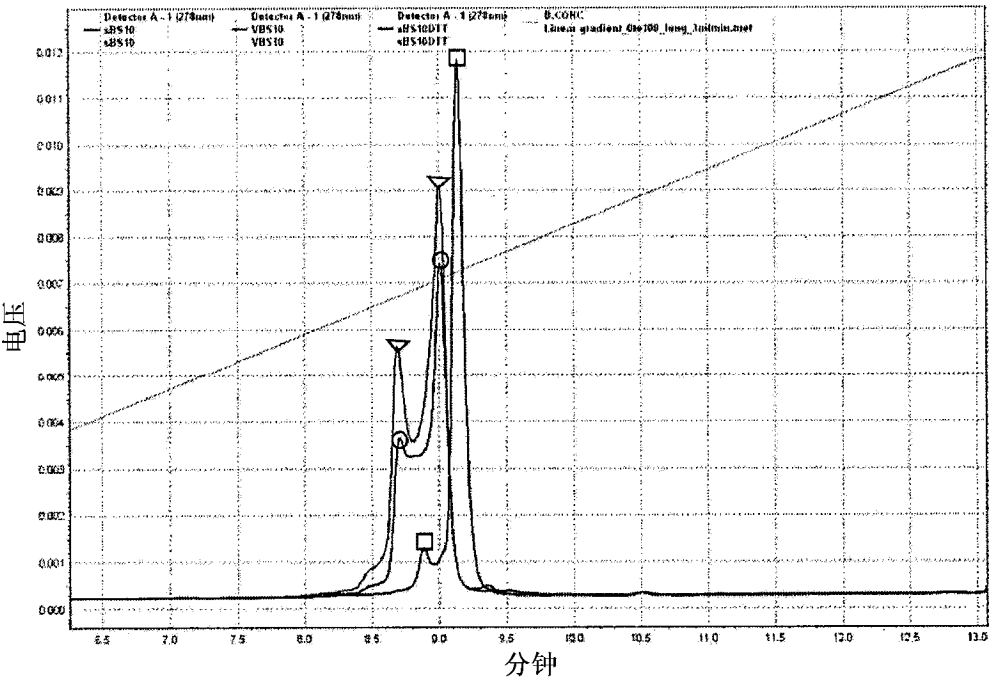


图 18

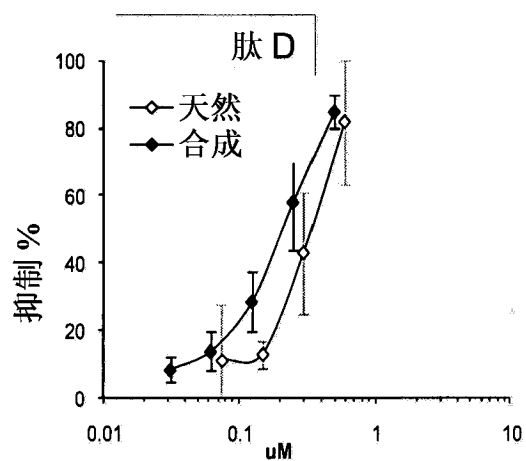
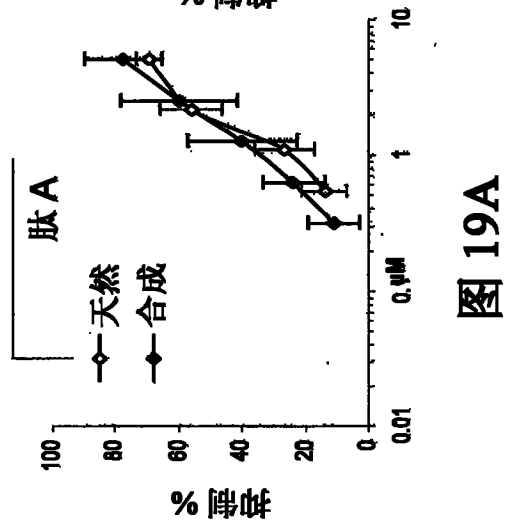
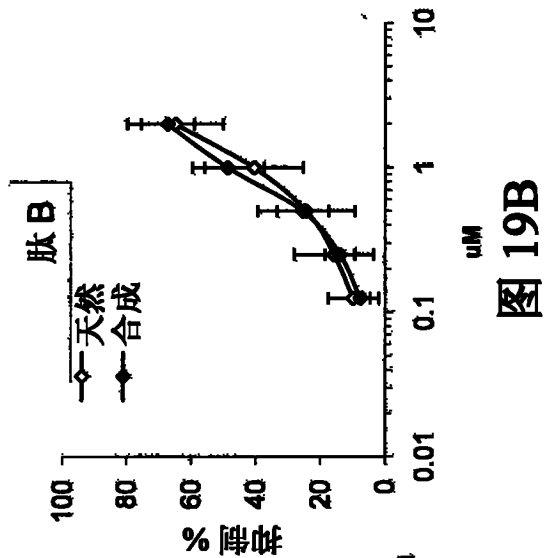
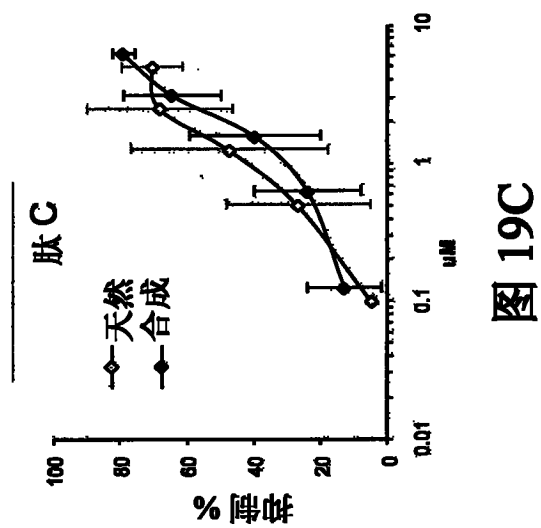


图 19D

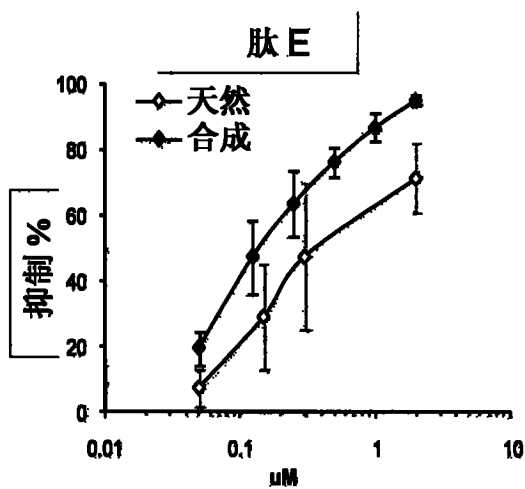


图 19E

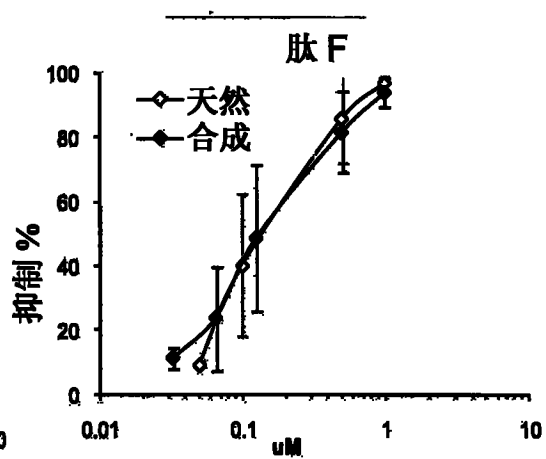


图 19F

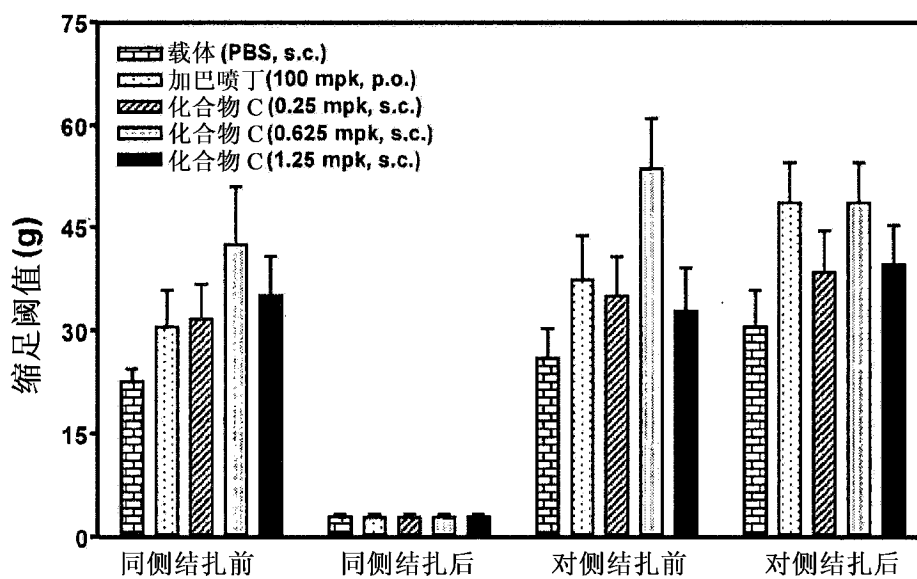


图 20

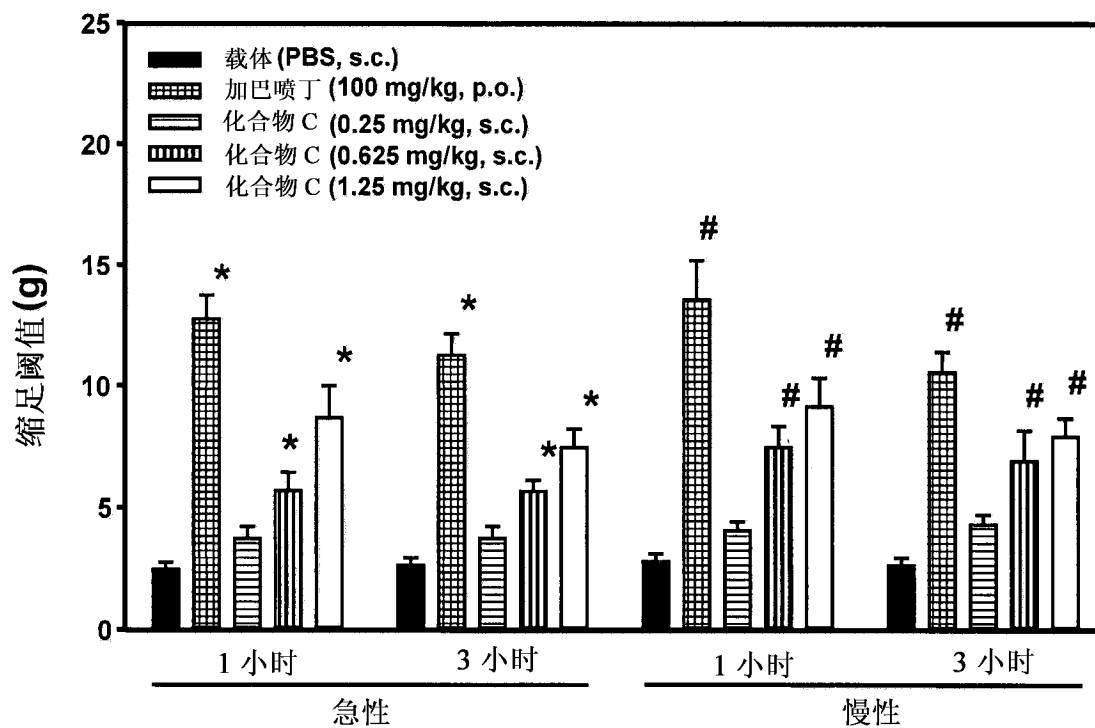


图 21

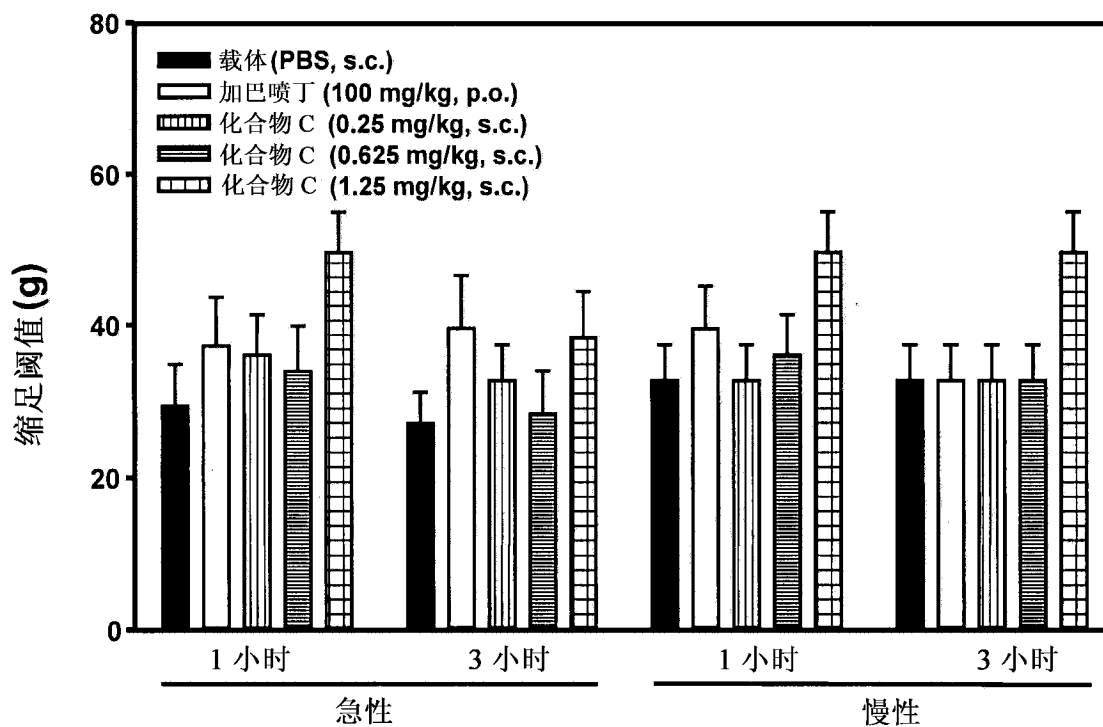


图 22