

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C07K 14/435

A61K 38/17



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93106216.0

[45]授权公告日 1997年2月26日

[11] 授权公告号 CN 1034123C

[22]申请日 93.5.20 [24]颁证日 96.8.24

[21]申请号 93106216.0

[30]优先权

[32]92.5.21 [33]US[31]887,073

[73]专利权人 美国辉瑞有限公司

地址 美国纽约州

共同专利权人 NPS药物有限公司

[72]发明人 S·D·赫克 D·M·内森

R·T·朗瑞 N·A·萨科曼诺

R·A·福克曼

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成 杨九昌

审查员 周 莉

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 得自冬季管网蛛的钙离子通道阻断性多肽

[57]摘要

从冬季管网蛛的毒液中分离出的一些多肽能阻断各种生物细胞中的钙离子通道，可用于阻断细胞本身的所述钙离子通道、治疗由钙离子通道介导的病症以及控制有害无脊椎动物。

权利要求书

1. 一种基本纯净的多肽或其可药用盐，所述多肽包含如下氨基酸顺序：1号顺序、2号顺序、3号顺序、4号顺序、5号顺序、6号顺序或7号顺序。

说明书

得自冬季管网蛛的钙离子 通道阻断性多肽

本发明涉及在冬季管网蛛 (*Filistata hibernalis*) 的毒液中发现的一些多肽, 以及与所述多肽具有基本相同的氨基酸顺序和基本相同的活性的多肽。这些多肽及其可药用盐, 能阻断各种生物 (包括无脊椎动物和脊椎动物) 的包括神经细胞和肌肉细胞在内的各种细胞中的钙离子通道。本发明还涉及所述多肽及其盐在阻断生物体的细胞 (如神经和肌肉系统的细胞) 本身中的钙离子通道中的应用, 以及在哺乳动物的由钙离子通道介导的病症治疗中的应用。另外, 本发明还涉及包含所述多肽及其盐的组合物。

钙离子拮抗剂化合物有多种用途。钙离子拮抗剂可临床应用于诸如心绞痛、高血压、心肌病、室上心律不齐、食管弛缓不能、早产和雷诺病等症状的治疗。参阅 W. G. Nayler 编的《钙离子拮抗剂》一书 (Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, New York, NY 1988), 该书的内容在此列为参考。另外, 这些化合物可用于诸如神经细胞和肌肉细胞等细胞的生理学研究。

本发明涉及存在于冬季管网蛛毒液中的多肽。本发明的多肽和含有这些多肽的各部分如下。

I. 管网蛛肽 10 具有下列 N 末端氨基酸顺序 (1 号顺序):

H₂N-Ala-Glu-Cys-Val-Asn-Ile-Tyr-Gln-Pro-Cys-Ser-Thr-Ile-Gly-Leu-Arg-Cys-Cys-Tyr-Gly-Ala-Arg-Cys-Tyr-Cys-Lys-Glu-Lys-Leu-Asn-Cys-Arg-Tyr-Asn-Arg-Ser-Thr-Arg-Lys-Arg-Asp-Cys-Gly-Trp-Ser-Ser-Tyr-Asp-Cys-Lys-Cys-Asp-Tyr-Thr-Trp-Met-His-Arg-Ile-Asp-Asp-Trp-Arg-Glu-Gly-Tyr-Ser-Cys-Tyr-Cys-Lys-Glu-CO₂H

II. 管网蛛肽 12 具有下列 N 末端氨基酸顺序(2 号顺序):

H₂N-Ala-Glu-Cys-Leu-Met-Val-Gly-Asp-Thr-Ser-Cys-Val-Pro-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Cys-Cys-Tyr-Gly-Ala-Trp-Cys-Tyr-Cys-Asp-Gln-Gln-Leu-Ser-Cys-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Lys-Gln-Gln-Cys-Gly-Trp-Arg-Glu-Val-Asn-Cys-Lys-Cys-Asp-Trp-Ser-Trp-Ser-Gln-Arg-Ile-Asp-Asp-Trp-Arg-Ala-Asp-Tyr-Ser-Cys-Lys-Cys-Pro-Glu-Asp-Gln-CO₂H

III. 管网蛛肽 13 - 1 具有下列 N 末端氨基酸顺序(3 号顺序):

H₂N-Ala-Glu-Cys-Leu-Met-Val-Gly-Asp-Thr-Ser-Cys-Val-Pro-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Cys-Cys-Tyr-Gly-Ala-Trp-Cys-Tyr-Cys-Asp-Gln-Gln-Leu-Ser-Cys-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Lys-Arg-Glu-Cys-Gly-Trp-Val-Glu-Val-Asn-Cys-Lys-Cys-Gly-Trp-Ser-Trp-Ser-Gln-Arg-Ile-Asp-Asp-Trp-Arg-Ala-Asp-Tyr-Ser-Cys-Lys-Cys-Pro-Glu-Asp-Gln-CO₂H

IV. 管网蛛肽 13 - 2 具有下列 N 末端氨基酸顺序(4 号顺序):

H₂N-Ala-Glu-Cys-Leu-Met-Val-Gly-Asp-Thr-Ser-Cys-Val-Pro-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Cys-Cys-Tyr-Gly-Ala-Trp-Cys-Tyr-Cys-Asp-Gln-Gln-Leu-Ser-Cys-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Lys-Arg-Glu-Cys-Gly-Trp-Val-Glu-Val-Asn-Cys-Lys-Cys-Gly-Trp-Ser-Trp-Ser-Gln-Arg-Ile-Asp-Asp-Trp-Arg-Ala-Asp-Tyr-Asn-Cys-Lys-Cys-Pro-Glu-Asp-Gln-CO₂H

V. 管网蛛肽 13 - 3 具有下列 N 末端氨基酸顺序(5 号顺序):

H₂N-Ala-Glu-Cys-Leu-Met-Ile-Gly-Asp-Thr-Ser-Cys-Val-Pro-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Cys-Cys-Tyr-Gly-Ala-Trp-Cys-Tyr-Cys-Asp-Gln-Gln-Leu-Ser-Cys-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Lys-Arg-Glu-Cys-Gly-Trp-Val-Glu-Val-Asn-Cys-Lys-Cys-Gly-Trp-Ser-Trp-Ser-Gln-Arg-Ile-Asp-Asp-Trp-Arg-Ala-Asp-Tyr-Ser-Cys-Lys-Cys-Pro-Glu-Asp-Gln-CO₂H

VI. 管网蛛肽 13 - 4 具有下列 N 末端氨基酸顺序(6 号顺序):

H₂N-Ala-Glu-Cys-Val-Asn-Ile-Tyr-Gln-Pro-Cys-Ser-Asn-Ile-Gly-Leu-Arg-Cys-Cys-Tyr-Gly-Ala-Arg-Cys-Tyr-Cys-Lys-Glu-Lys-Leu-Ser-Cys-Arg-Tyr-Asn-Arg-Val-Thr-Arg-Lys-Arg-Asp-Cys-Gly-Trp-Ser-Ser-Tyr-Asp-Cys-Lys-Cys-Asp-Tyr-Thr-Trp-Met-His-Arg-Ile-Asp-Asp-Trp-Leu-Asp-Gly-Tyr-Ser-Cys-Tyr-Cys-Lys-Glu-CO₂H

VII. 管网蛛肽 14-1 具有下列 N 末端氨基酸顺序(7 号顺序):

H₂N-Glu-Glu-Lys-Lys-Cys-Lys-Leu-Ile-Asp-Glu-Pro-Cys-Ser-Asn-Lys-Asp-Pro-Ile-Ile-Cys-Cys-Lys-Gly-Ala-Arg-Cys-Val-Cys-Asn-Asp-Val-Arg-Ser-Gly-Thr-Ser-Lys-Asp-Tyr-Leu-Gly-Arg-Asn-Ile-Pro-Ala-Phe-Val-Arg-Val-Cys-Lys-Cys-Asp-Trp-Ser-Tyr-Pro-Ala-Tyr-Leu-Lys-Asp-Leu-Ala-Thr-Phe-Phe-Asn-Cys-Asn-Cys-Arg-CO₂H

本发明的多肽能阻断细胞中的钙离子通道。因此, 这些多肽可用于阻断细胞本身中的钙离子通道。这些多肽还可用于控制有害无脊椎动物, 以及用于哺乳动物的由细胞中的钙离子通道功能介导的病症的治疗。

具有与上述多肽基本相同的氨基酸顺序和基本相同的钙离子通道阻断活性的多肽, 也在本发明的范围内。

本发明还涉及包含所述多肽的药物组合物和施用所述多肽的方法。

按本领域技术人员公知的标准方法, 通过电刺激抽取法从冬季管网蛛中制取毒液。所用方法最好能确保全毒液不被腹部回流液或血淋巴污染。这类方法是本领域技术人员公知的。所制得的全毒液在约 -78°C 下在冰冻状态下保存备用, 供如下所述进行纯化。全毒液中各组成成分的纯化, 用反相高效液相色谱法 (HPLC) 在各种不同的制备和半制备柱如 C-4 和 C-18 Vydac[®] 柱 (Rainin Instrument Co. Inc., Mack Road, Woburn Massachusetts 01801) 上进行。在

220-230nm 处进行单色峰检测。各部分的进一步分析可以借助(例如)用 Waters 990 二级管阵列检测器 (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757) 收集的多色紫外数据来进行。从色谱柱中流出的各部分用已知方法来收集, 例如使用 ISCO/“FOXY”部分收集器和 ISCO 2159 峰检测器 (ISCO, 4700 Superior, Lincoln, Nebraska 68504)。将各部分收集在适当大小的容器如无菌聚乙烯实验室用具中。然后浓缩各部分, 先从流出液中冰冻干燥, 然后从水中冰冻干燥。然后可以用分析柱以色谱分析法测定所得各组成部分的纯度, 分析柱所用的梯度系统的溶剂成分, 要比各部分的最终纯化中所用的系统更为恒定。

本发明多肽的顺序按已知方法来测定。测定一级结构的一般做法包括如下步骤: 1) 将由二硫键连接的半胱氨酸残基还原并 S-吡啶基化, 以增加底物对酶攻击的敏感性。2) 通过一步或多步酶解对肽进行受控切割。3) 通过反相高效液相色谱法 (HPLC) 对肽片段进行分离纯化。4) 通过 N 末端顺序测定和离子束质谱对肽片段进行定性鉴定。

所研究多肽中的半胱氨酸残基的 S-吡啶基化可以在溶液中进行, 然后测定多肽的氨基酸顺序。有一种这样的 S-吡啶基化方法可以如下所述进行。

将约 1-10 μg 多肽溶解或稀释在至多 50 μl 的缓冲液中 (缓冲液的制备方法是, 将 1 份含有 4mM EDTA 的 1M Tris-HCl pH8.5 与 3 份 8M 盐酸胍混合)。加入 2.5 μl 10% 2-巯基乙醇水溶液, 在室温和氩气下于暗处将混合物保温 2 小时。保温后加入 2 μl 4-乙

烯基吡啶(于 -20°C 贮存在氩气中,新鲜试剂),在室温和氩气下于暗处将混合物再保温2小时。然后使该混合物脱盐,最好用色谱法在短的反相柱上脱盐。然后按已知方法测定所回收的烷基化多肽的顺序。

在实施本发明及使用上述一般方法的过程中发现,适于对毒液进行初步分级分离的柱是半制备性聚磺乙基 α -氨基丁二酸单酰胺柱(PolyLC $9.4 \times 200\text{mm}$, 5μ)。使用三相线性梯度程序,以 3.5ml/分 的流速洗脱该柱45分钟,在 220nm 处检测。所述梯度程序以20% B、80% C和0% D起始,以20% B、0% C和80% D结束(B = CH_3CN , C = $5\text{mM H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ pH4.5, D = C + 1M NaCl)。然后可以进一步纯化所要的各部分,例如,将各部分加到反相HPLC柱如Vydac[®] C-18 (300\AA , $22 \times 250\text{mm}$)上,用0.1%三氟乙酸和 CH_3CN 的双相线性梯度程序以 15ml/分 的流速洗脱,如实施例中所述。

这里公开了冬季管网蛛毒液的10、12、13-1、13-2、13-3、13-4和14-1各部分中所含的肽(1至7号顺序)。前面已描述了这些公开内容的优点。现已有可能用不同于从全毒液中分离纯化的方法来制取所述的肽。本发明的多肽可以用重组DNA技术,通过所述多肽或其各部分的编码顺序的克隆来制备。例如,可以按本领域技术人员公知的方法,使用杂交探针来克隆整个多肽的编码顺序,这些杂交探针利用了所述多肽目前已知的氨基酸顺序信息。也可以结合使用重组DNA技术和体外蛋白质合成法来制备本发明的多肽。这类体外蛋白质合成法包括(但不限于)使用ABI 430A型固相肽合成仪(Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404),并采用本领域技术人员公知的标准

Merrifield 化学原理或其他固相化学原理。

本领域公知，多肽中可以进行某些氨基酸置换而不影响或基本不影响所述多肽的功能。可能发生的具体置换随多肽的不同而不同。允许置换的确定，是按照本领域技术人员公知的方法进行的。因此，具有基本相同的氨基酸顺序和基本相同的钙离子通道阻断活性的所有多肽，都在本发明的范围内。

本发明的多肽不可逆地阻断存在于多种细胞（如无脊椎动物和脊椎动物神经和肌肉系统中的细胞）中的钙离子通道。

本发明多肽阻断钙离子通道的能力是用下列方法证实的。由 8 日龄大鼠的小脑制备小脑粒细胞 (Wilkin 等, Brain Res, 115: 181-199, 1976)。取若干 Aclar 方块 (1cm^2 , Proplastics Inc., 5033 Industrial Ave., Wall, NJ07719), 用多聚 L-赖氨酸涂布, 放入装有 1ml 伊格耳氏基本培养基的 12 孔培养皿中。将细胞打散, 在每个装有 Aclar 方块的小孔中加入含有 6.25×10^6 个细胞的各等份试样。培养 24 小时后加入胞嘧啶- β -D-阿拉伯呋喃糖苷 (终浓度为 10^{-6}M)。在培养过程的第 6、7 和 8 天, 用上述细胞进行 fura2 分析。将细胞 (附着在 Aclar 方块上) 转移到另一些 12 孔培养皿中, 这些培养皿中装有 1ml $2\mu\text{M}$ fura2/AM (Molecular Probes Inc., Eugene, OR 97402) 在 HEPES 缓冲液 (含有 0.01% 牛血清清蛋白、0.01% 右旋糖, pH7.4, 不含镁) 中的溶液。将细胞在 37°C 下培养 40 分钟, 移出含 fura2/AM 的缓冲液, 换上 1ml 不含 fura2/AM 的相同缓冲液。在一个石英杯中加入 2.0ml 经过预热的 (37°C) 缓冲液。将 Aclar 上的细胞放入该杯中, 并将该杯插在配有磁力搅拌器的恒温 (37°C) 架上, 用荧光分光光度计 (Biomedical Instrument Group,

University of Pennsylvania) 测荧光。令荧光信号稳定约 2 分钟。然后在该杯中以适当的浓度加入 5 - 20 μ l 受试化合物在磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH7.4) 中的贮液。每次试验结束后, 用 Nemeth 等人建立的方法 (J. Biol. Chem., 262: 5188, 1987) 进行荧光信号校准和 fura2 / AM 漏失校正。加入伊屋诺霉素 (35 μ M) 测定最大荧光值 (Fmax), 随后加入螯合钙离子的 EGTA (12mM) 测定最小荧光值 (Fmin)。采用上述方法, 由加入主题多肽后荧光的减弱, 证实了主题多肽具有钙离子通道阻断作用。采用这种测定法时, 本发明多肽阻断钙离子通道的 IC₅₀ 值较低, 有些数值在 0.3nM 以下。相比之下, 两种已知的商品钙离子通道拮抗剂即硝苯吡啶和戊脉安的 IC₅₀ 值分别为 33nM 和 4800nM。

本发明的多肽可以作为细胞本身的钙离子通道阻断剂使用。因此, 这些化合物还可用于控制有害无脊椎动物及治疗哺乳动物的由细胞中的钙离子通道功能介导的病症, 如心绞痛、高血压、心肌病、室上心律不齐、食管弛缓不能、早产和雷诺病。另外, 这些化合物可用于包括(但不限于)神经和肌肉系统的细胞在内的各种细胞的生理学研究。

本发明多肽的可药用盐也在本发明范围内。这些盐是用本领域技术人员公知的方法制成的。例如, 这些多肽的碱成盐可按常规方法来制备。

本发明多肽准备给予哺乳动物时, 既可以单独给药, 也可以按标准药学实践与可药用载体或稀释剂混合而以药物组合物的形式给药。这些多肽可以口服或肠胃外给药, 对多肽来说优选肠胃外给药。肠胃外给药包括静脉给药、肌肉给药、腹膜内给药、皮下给药和局部

给药。

口服本发明多肽时，该化合物可以以片剂或胶囊剂形式给药，也可以水溶液或水悬浮剂形式给药。在口服片剂的场合，常用的载体包括乳糖和玉米淀粉，并通常加入润滑剂如硬脂酸镁。口服胶囊剂时，可用的稀释剂有乳糖和干玉米淀粉。需要口服水悬浮剂时，将活性成分与乳化剂和助悬剂混合。需要时可加入某些甜味剂和/或调味剂。

肌肉、腹膜内、皮下和静脉用药时，通常制成活性成分的无菌溶液，溶液的pH应进行适当调整和缓冲。静脉用药时，溶质的总浓度应加以控制以使制备物等渗。

本发明多肽或其盐用于人体时，其日剂量通常由处方医生来确定。另外，该剂量将随以下因素而变化：个体患者的年龄、体重和身体反应，以及患者症状的严重程度和所给予的特定化合物的效力。

本发明多肽或其盐用于控制有害无脊椎动物时，可将所述多肽直接施用于所述无脊椎动物，也可施用于所述无脊椎动物的生活环境中。例如，可将本发明化合物以溶液形式喷到所述无脊椎动物上。控制所述无脊椎动物所需的化合物量将随无脊椎动物和环境条件的不同而不同，这一数量将由使用该化合物的人来确定。

本发明多肽或其盐用于细胞的生理学研究时，所述多肽按本领域技术人员公知的方法施用于细胞。例如，所述多肽可以在适当生理缓冲液中的溶液形式施用于细胞。用于这类研究时，本发明化合物的适当浓度是 $100\mu\text{M}$ ，但在这类研究中所述多肽的浓度可以高于或大大低于 $100\mu\text{M}$ 。化合物的施用量将由本领域技术人员按公知方法来确定。

下列实施例是说明性的，不应误认为是限制本发明的范围。

实施例 1: 肽 10

A. 将粗制冬季管网蛛 (DW) 毒液 ($\sim 80 \mu\text{l}$) 加到半制备性聚磺乙基 α -氨基丁二酸单酰胺柱 (PolyLC $9.4 \times 200\text{mm}$, 5μ) 上, 用从 20% B、80% C 和 0% D 到 20% B、0% C 和 80% D 的三相线性梯度程序操作 45 分钟 ($B = \text{CH}_3\text{CN}$, $C = 5\text{mM H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH} 4.5$, $D = C + 1\text{M NaCl}$), 220nm 检测, 流速为 3.5ml/分。从 38.5 至 40 分钟收集所要的部分。各部分合并后不经浓缩而脱盐。

B. 将由 $3360 \mu\text{l}$ 粗制毒液经上述步骤 A 的分级分离得到的物质, 加到反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300\AA , $22 \times 250\text{mm}$) 上, 用从 80% A 和 20% B 到 56% A 和 44% B 的双相线性梯度程序操作 42 分钟 ($A = 0.1\%$ 三氟乙酸, $B = \text{CH}_3\text{CN}$), 220nm 检测, 流速为 15ml/分。从 13 到 14 分收集所要的部分。合并各次操作得到的相同部分, 用冰冻干燥法浓缩。

用下列方法测定和确认肽 10 的结构。用 Waters Pico-Tag 体系对 1-10 纳摩尔样品进行三次平行的 PTC 氨基酸分析。用脉冲液体测序仪 (pulse-liquid sequenator) (ABI) 对天然肽和经过还原/吡啶乙基化的肽进行 N 末端顺序测定。用 SCI-EX API III 型离子束质谱仪获得质谱分析数据。

总的的数据证实了肽 10 具有下示结构。

1 号顺序: 72 个残基, 12 个半胱氨酸, 6 个二硫键。

计算分子量 = 8699.18

实测分子量 = 8698.36 (离子束质谱)

估算 pI = 8.05

实施例 2: 肽 12

A. 将粗制冬季管网蛛 (DW) 毒液 ($\sim 80 \mu\text{l}$) 加到半制备性聚磺乙基 α -氨基丁二酸单酰胺柱 (PolyLC $9.4 \times 200\text{mm}$, 5μ) 上, 用从 20% B、80% C 和 0% D 到 20% B、0% C 和 80% D 的三相线性梯度程序操作 45 分钟 (B = CH_3CN , C = $5\text{mM H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$, pH 4.5, D = C + 1M NaCl), 220nm 检测, 流速为 3.5ml/分 。从 32 至 33 分钟收集所要的部分。各部分合并后不经浓缩而脱盐。

B. 将由 $3360 \mu\text{l}$ 粗制毒液经上述步骤 A 的分级分离得到的物质, 加到反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300\AA , $22 \times 250\text{mm}$) 上, 用从 80% A 和 20% B 到 56% A 和 44% B 的双相线性梯度程序操作 42 分钟 (A = 0.1% 三氟乙酸, B = CH_3CN), 220nm 检测, 流速为 15ml/分 。从 16 到 17 分收集所要的部分。合并各次操作得到的相同部分, 用冰冻干燥法浓缩。

用下列方法测定和确认肽 12 的结构。用 Waters Pico-Tag 体系对 1-10 纳摩尔样品进行三次平行的 PTC 氨基酸分析。用脉冲液体测序仪 (ABI) 对天然肽和经过还原/吡啶乙基化的肽进行 N 末端顺序测定。用 SCI-EX API III 型离子束质谱仪获得质谱分析数据。

以下列方式制备适于 N 末端顺序测定的肽 12 的吡啶乙基化衍生物。将肽 12 ($100 \mu\text{g}$) 溶于 $10 \mu\text{l}$ 缓冲液 (比例为 1:3 的 1M Tris pH 8.4、 $4 \mu\text{M}$ 二碱价 EDTA 和 8M 盐酸胍), 用 $2.4 \mu\text{l}$ 1.41M (10% V/V) 2-巯基乙醇的缓冲溶液处理, 并在室温下于暗处保持 3 小时。然后将反应混合物用 $3.7 \mu\text{l}$ 0.93M 4-乙烯基吡啶的缓冲溶液处理, 并在室温下于暗处保持 18 小时。将反应混合物用 $184 \mu\text{l}$ 10% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 稀释, 并加到 HPLC 柱 (Baker WPC-18, $4.6 \times 250\text{mm}$) 上, 先用 100-65% A 和 0-35% B 的双相线性梯度程

序操作 30 分钟, 再用 65 - 40% A 和 35 - 60% B 的双相线性梯度程序操作 15 分钟 (A = 0.1% 三氟乙酸, B = CH₃CN), 220nm 检测, 流速为 1.0ml/分。于 32.5 - 33.5 分收集所要的部分, 用冰冻干燥法浓缩。近似得量 (按氨基酸分析结果计算) 为 82.36 μg。

总的的数据证实了肽 12 具有下示结构。

2 号顺序: 74 个残基, 12 个半胱氨酸, 6 个二硫键。

计算分子量 = 8739.38 (酸)

实测分子量 = 8738.47 ± 0.98 (离子束质谱)

估算 pI = 8.20

实施例 3: 肽 13 - 1

A. 将粗制冬季管网蛛 (DW) 毒液 (~80 μl) 加到半制备性聚磺乙基 α - 氨基丁二酸单酰胺柱 (PolyLC 9.4 × 200mm, 5 μ) 上, 用从 20% B、80% C 和 0% D 到 20% B、0% C 和 80% D 的三相线性梯度程序操作 45 分钟 (B = CH₃CN, C = 5mM H₃PO₄/H₂O, pH4.5, D = C + 1M NaCl), 220nm 检测, 流速为 3.5ml/分。从 34 至 35.5 分钟收集所要的部分。各部分合并后不经浓缩而脱盐。

B. 将由 3360 μl 粗制毒液经上述步骤 A 的分级分离得到的物质, 加到反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300Å, 22 × 250mm) 上, 用从 75% A 和 25% B 到 70% A 和 30% B 的双相线性梯度程序操作 60 分钟 (A = 0.1% 三氟乙酸, B = CH₃CN), 220nm 检测, 流速为 15ml/分。从 25.5 到 28.5 分收集所要的部分。合并各次操作得到的相同部分, 用冰冻干燥法浓缩, 得到肽 13 - 1 和 13 - 2 的混合物。

用下列方法测定和确认肽 13 - 1 的结构。用 Waters Pico - Tag 体系对 1 - 10 纳摩尔样品进行三次平行的 PTC 氨基酸分析。用脉冲

液体测序仪 (ABI) 对天然肽和经过还原/吡啶乙基化的肽进行 N 末端顺序测定。用 SCI-EX API III 型离子束质谱仪获得质谱分析数据。

以下列方式制备适于 N 末端顺序测定的肽 13-1 的吡啶乙基化衍生物。将肽 13-1 (150 μ g) 溶于 10 μ l 缓冲液 (比例为 1:3 的 1M Tris pH8.4、4 μ M 二碱价 EDTA 和 8M 盐酸胍), 用 3.65 μ l 1.41M (10% V/V) 2-巯基乙醇的缓冲溶液处理, 并在室温下于暗处保持 3 小时。然后将反应混合物用 5.91 μ l 0.93M 4-乙基吡啶的缓冲溶液处理, 并在室温下于暗处保持 18 小时。将反应混合物用 280 μ l 10% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 稀释, 并加到 HPLC 柱 (Baker WPC-18, 4.6 \times 250mm) 上, 先用 100-65% A 和 0-35% B 的双相线性梯度程序操作 30 分钟, 再用 65-40% A 和 35-60% B 的双相线性梯度程序操作 15 分钟 (A=0.1% 三氟乙酸, B= CH_3CN), 220nm 检测, 流速为 1.0ml/分。于 33-34.5 分收集所要的部分, 用冰冻干燥法浓缩。近似得量 (按氨基酸分析结果计算) 为 79.4 μ g。

由于肽 13-1 和 13-2 具有同源性, 这两个肽在进行离子交换色谱或反相色谱时未分开。对该混合物进行初步顺序测定发现, 头 50 个氨基酸是相同的, 提示可用肽降解法来完全阐明其结构。用 Glu-C 消化该混合物, 然后对所得的各部分进行顺序测定, 再用胰蛋白酶在 0.1M Tris-HCl、1M 盐酸胍 (pH8.5) 中进一步消化, 然后进行质谱分析和顺序测定, 证实了肽 13-1 具有下示结构。

3 号顺序: 74 个残基, 12 个半胱氨酸, 6 个二硫键。

计算分子量 = 8653.26

实测分子量 = 8652.57 \pm 0.87 (离子束质谱)

估算 $pI = 7.65$

实施例 4: 肽 13-2

如前面实施例 3 所述证实了 13-2 部分的结构。

4 号顺序: 74 个残基, 12 个半胱氨酸, 6 个二硫键。

计算分子量 = 8680.29

实测分子量 = 8678.64 ± 1.64 (离子束质谱)

估算 $pI = 7.65$

实施例 5: 肽 13-3

A. 将粗制冬季管网蛛 (DW) 毒液 ($\sim 80 \mu\text{l}$) 加到半制备性聚磺乙基 α -氨基丁二酸单酰胺柱 (PolyLC $9.4 \times 200\text{mm}$, 5μ) 上, 用从 20% B、80% C 和 0% D 到 20% B、0% C 和 80% D 的三相线性梯度程序操作 45 分钟 (B = CH_3CN , C = $5\text{mM H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH} 4.5$, D = C + 1M NaCl), 220nm 检测, 流速为 $3.5\text{ml}/\text{分}$ 。从 34 至 35.5 分钟收集所要的部分。各部分合并后不经浓缩而脱盐。

B. 将由 $3360 \mu\text{l}$ 粗制毒液经上述步骤 A 的分级分离得到的物质, 加到反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300\AA , $22 \times 250\text{mm}$) 上, 用从 75% A 和 25% B 到 70% A 和 30% B 的双相线性梯度程序操作 60 分钟 (A = 0.1% 三氟乙酸, B = CH_3CN), 220nm 检测, 流速为 $15\text{ml}/\text{分}$ 。从 29 到 31 分收集所要的部分。合并各次操作得到的相同部分, 用冰冻干燥法浓缩。

用下列方法测定和确认肽 13-3 的结构。用 Waters Pico-Tag 体系对 1-10 纳摩尔样品进行三次平行的 PTC 氨基酸分析。用脉冲液体测序仪 (ABI) 对天然肽和经过还原/吡啶乙基化的肽进行 N 末端顺序测定。用 SCI-EX API III 型离子束质谱仪获得质谱分析数

据。

以下列方式制备适于 N 末端顺序测定的肽 13-3 的吡啶乙基化衍生物。将肽 13-3 (300 μ g) 溶于 20 μ l 缓冲液 (比例为 1:3 的 1M Tris pH8.4、4 μ M 二碱价 EDTA 和 8M 盐酸胍), 用 7.28 μ l 1.41M (10% V/V) 2-巯基乙醇的缓冲溶液处理, 并在室温下于暗处保持 3 小时。然后将反应混合物用 11.19 μ l 10% V/V 4-乙烯基吡啶的缓冲溶液处理, 并在室温下于暗处保持 18 小时。将反应混合物用 1% TFA/H₂O 稀释至 600 μ l, 并加到 HPLC 柱 (Baker WPC-18, 4.6 \times 250mm) 上, 先用 100-65% A 和 0-35% B 的双相线性梯度程序操作 30 分钟, 再用 65-40% A 和 35-60% B 的双相线性梯度程序操作 15 分钟 (A = 0.1% 三氟乙酸, B = CH₃CN), 220nm 检测, 流速为 1.0ml/分。于 34-35 分收集所要的部分, 用冰冻干燥法浓缩。近似得量 (按氨基酸分析结果计算) 为 194 μ g。

总的的数据证实了肽 13-3 具有下示结构。

5 号顺序: 74 个残基, 12 个半胱氨酸, 6 个二硫键。

计算分子量 = 8668.29

实测分子量 = 8668 (离子束质谱)

估算 pI = 7.65

实施例 6: 肽 13-4

A. 将粗制冬季管网蛛 (DW) 毒液 (~80 μ l) 加到半制备性聚磺乙基 α -氨基丁二酸单酰胺柱 (PolyLC 9.4 \times 200mm; 5 μ) 上, 用从 20% B、80% C 和 0% D 到 20% B、0% C 和 80% D 的三相线性梯度程序操作 45 分钟 (B = CH₃CN, C = 5mM H₃PO₄/H₂O, pH4.5, D = C + 1M NaCl), 220nm 检测, 流速为 3.5ml/分。从 34 至 35.5 分

钟收集所要的部分。各部分合并后不经浓缩而脱盐。

B. 将由 3360 μ l 粗制毒液经上述步骤 A 的分级分离得到的物质, 加到反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300 \AA , 22 \times 250mm) 上, 用从 75% A 和 25% B 到 70% A 和 30% B 的双相线性梯度程序操作 60 分钟 (A = 0.1% 三氟乙酸, B = CH₃CN), 220nm 检测, 流速为 15ml/分。从 22 到 22.5 分收集所要的部分。合并各次操作得到的相同部分, 用冰冻干燥法浓缩。

用下列方法测定和确认肽 13-4 的结构。用 Waters Pico-Tag 体系对 1-10 纳摩尔样品进行三次平行的 PTC 氨基酸分析。用脉冲液体测序仪 (ABI) 对天然肽和经过还原/吡啶乙基化的肽进行 N 末端顺序测定。用 SCI-EX API III 型离子束质谱仪获得质谱分析数据。

总的的数据证实了肽 13-4 具有下示结构。

6 号顺序: 72 个残基, 12 个半胱氨酸, 6 个二硫键。

计算分子量 = 8640.15

实测分子量 = 8640 (离子束质谱)

估算 pI = 7.87

实施例 7: 肽 14-1

A. 将粗制冬季管网蛛 (DW) 毒液 (\sim 80 μ l) 加到半制备性聚磺乙基 α -氨基丁二酸单酰胺柱 (PolyLC 9.4 \times 200mm, 5 μ) 上, 用从 20% B、80% C 和 0% D 到 20% B、0% C 和 80% D 的三相线性梯度程序操作 45 分钟 (B = CH₃CN, C = 5mM H₃PO₄/H₂O, pH4.5, D = C + 1M NaCl), 220nm 检测, 流速为 3.5ml/分。从 28 至 29 分钟收集所要的部分。各部分合并后不经浓缩而脱盐。

B. 将由 3360 μ l 粗制毒液经上述步骤 A 的分级分离得到的物质, 加到反相 HPLC 柱 (Vydac[®], C-18, 300 \AA , 22 \times 250mm) 上, 用从 80% A 和 20% B 到 56% A 和 44% B 的双相线性梯度程序操作 42 分钟 (A = 0.1% 三氟乙酸, B = CH₃CN), 220nm 检测, 流速为 15ml/分。从 18 到 19.5 分收集所要的部分。合并各次操作得到的相同部分, 用冰冻干燥法浓缩。

用下列方法测定和确认肽 14-1 的结构。用 Waters Pico-Tag 体系对 1-10 纳摩尔样品进行三次平行的 PTC 氨基酸分析。用脉冲液体测序仪 (ABI) 对天然肽和经过还原/吡啶乙基化的肽进行 N 末端顺序测定。用 SCI-EX API III 型离子束质谱仪获得质谱分析数据。

以下列方式制备适于 N 末端顺序测定的肽 14-1 的吡啶乙基化衍生物。将肽 14-1 (150 μ g) 溶于 10 μ l 缓冲液 (比例为 1:3 的 1M Tris pH8.4、4 μ M 二碱价 EDTA 和 8M 盐酸胍), 用 3.65 μ l 1.41M (10% V/V) 2-巯基乙醇的缓冲溶液处理, 并在室温下于暗处保持 3 小时。然后将反应混合物用 5.91 μ l 0.93M 4-乙烯基吡啶的缓冲溶液处理, 并在室温下于暗处保持 18 小时。将反应混合物用 280 μ l 10% CH₃CN/H₂O 稀释, 并加到 HPLC 柱 (Baker WPC-18, 4.6 \times 250mm) 上, 先用 100-65% A 和 0-35% B 的双相线性梯度程序操作 30 分钟, 再用 65-40% A 和 35-60% B 的双相线性梯度程序操作 15 分钟 (A = 0.1% 三氟乙酸, B = CH₃CN), 220nm 检测, 流速为 1.0ml/分。于 33-34.5 分收集所要的部分, 用冰冻干燥法浓缩。

该肽直到第 52 个残基的顺序已准确测出。在 25mM

Tris - HCl、1mM EDTA (pH8.5) 中, 用 2 μ g 蛋白内切酶 Lys - C 消化 20 μ g 经过还原和吡啶乙基化的肽。通过顺序测定和离子束质谱进行鉴定, 得到了如下所示的肽 14 - 1 完整一级结构。

7 号顺序: 73 个残基, 10 个半胱氨酸, 5 个二硫键。

计算分子量 = 8308.05

实测分子量 = 8307.67 \pm 0.55 (离子束质谱)

估算 pI = 8.17

顺序表

(1) 概况

(i) 申请人: R. A. 福克曼

N. A. 萨科曼诺

D. M. 内森

S. D. 赫克

R. T. 朗璠

(ii) 发明名称: 得自冬季管网蛛的钙离子通道阻断性多肽

(iii) 顺序数: 7

(iv) 通信地址:

(A) 收信人: 辉瑞有限公司专利部

(B) 街道: 东点路

(C) 城市: 格罗顿

(D) 州: 康涅狄格

(E) 国家: 美国

(F) 邮政编码: 06340

(V) 计算机可读形式:

- (A) 介质类型: 软盘
- (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
- (vi) 本申请资料:
 - (A) 申请号:
 - (B) 申请日:
 - (C) 分类:
- (viii) 代理人资料:
 - (A) 姓名: McFarlin, D. Stuart
 - (B) 登记号: 33, 736
 - (C) 案号: PC8175ADSM
- (ix) 电讯资料:
 - (A) 电话: (603) 441 - 4905
 - (B) 传真: (603) 441 - 5221
 - (C) 电传: 420440 IIT
- (2) 1 号顺序资料:
 - (i) 顺序特性:
 - (A) 长度: 72 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 成链性: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性
 - (ii) 分子类型: 蛋白质

Cys Arg Arg Val Gly Arg Lys Arg Glu Cys Gly Trp Val Glu Val Asn
35 40 45

Cys Lys Cys Gly Trp Ser Trp Ser Gln Arg Ile Asp Asp Trp Arg Ala
50 55 60

Asp Tyr Asn Cys Lys Cys Pro Glu Asp Gln
65 70

(2) 5号顺序资料:

(i) 顺序特性:

(A) 长度: 74 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 成链性: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 无

(iv) 反意: 无

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 冬季管网蛛

(F) 组织类型: 毒液

(xi) 顺序描述: 5号顺序:

Ala Glu Cys Leu Met Ile Gly Asp Thr Ser Cys Val Pro Arg Leu Gly
1 5 10 15

Arg Arg Cys Cys Tyr Gly Ala Trp Cys Tyr Cys Asp Gln Gln Leu Ser
20 25 30

Cys Arg Arg Val Gly Arg Lys Arg Glu Cys Gly Trp Val Glu Val Asn
35 40 45

Cys Lys Cys Gly Trp Ser Trp Ser Gln Arg Ile Asp Asp Trp Arg Ala
50 55 60

Asp Tyr Ser Cys Lys Cys Pro Glu Asp Gln
65 70

(2) 6号顺序资料:

(i) 顺序特性:

(A) 长度: 72个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 成链性: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 无

(iv) 反意: 无

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 冬季管网蛛

(F) 组织类型: 毒液

(xi) 顺序描述: 6号顺序:

Ala Glu Cys Val Asn Ile Tyr Gln Pro Cys Ser Asn Ile Gly Leu Arg
1 5 10 15

Cys Cys Tyr Gly Ala Arg Cys Tyr Cys Lys Glu Lys Leu Ser Cys Arg
20 25 30

Tyr Asn Arg Val Thr Arg Lys Arg Asp Cys Gly Trp Ser Ser Tyr Asp
35 40 45

Cys Lys Cys Asp Tyr Thr Trp Met His Arg Ile Asp Asp Trp Leu Asp
50 55 60

Gly Tyr Ser Cys Tyr Cys Lys Glu
65 70

(2) 7号顺序资料:

(i) 顺序特性:

(A) 长度: 73 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 成链性: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 无

(iv) 反意: 无

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 冬季管网蛛

(F) 组织类型: 毒液

(xi) 顺序描述: 7 号顺序:

```
Glu Glu Lys Lys Cys Lys Leu Ile Asp Glu Pro Cys Ser Asn Lys Asp
1          5          10          15
Pro Ile Ile Cys Cys Lys Gly Ala Arg Cys Val Cys Asn Asp Val Arg
          20          25          30
Ser Gly Thr Ser Lys Asp Tyr Leu Gly Arg Asn Ile Pro Ala Phe Val
          35          40          45
Arg Val Cys Lys Cys Asp Trp Ser Tyr Pro Ala Tyr Leu Lys Asp Leu
          50          55          60
Ala Thr Phe Phe Asn Cys Asn Cys Arg
65          70
```