

SLANGENGIF IN DE MEDISCHE WETENSCHAP

SNAKE VENOM IN MEDICAL SCIENCES

Freek Vonk
Instituut van Biologie
Departement van Integratieve Zoölogie
Universiteit van Leiden
<http://www.slangengif.nl>

Introductie

Per jaar overlijden er wereldwijd tussen de 150.000 en 500.000 mensen aan gifslangenbeten (Chippaux 1998). Het precieze aantal is moeilijk vast te stellen, want veel van de slangenbeten die in arme landen plaatsvinden, blijven helaas ongeregistreerd. Lokale bewoners verkiezen hier vaak de traditionele behandelmethodes boven het bezoek aan een ziekenhuis, als dat al aanwezig is.

Gifslangenbeten zijn recentelijk in een artikel in het prestigieuze *PloS Medicine* dan ook geclassificeerd tot de categorie 'major neglected diseases' van de 21^e eeuw (Gutierrez et al. 2006), en zijn dus zeker een serieus probleem. In een bepaald jaar in het oosten van Nepal bijvoorbeeld, overleden er 162 mensen per 100.000 inwoners aan een gifslangenbeet (Sharma et al. 2004). Omdat veel beten in dit gebied 's nachts tijdens de slaap plaatsvinden, stellen dezelfde auteurs later op basis van onderzoek voor dat het gebruik van een klamboe de bevolking beschermt tegen slangenbeten (Chappuis et al. 2007). Afgezien van de vernietigende eigenschappen van slangengif waar mensen soms

Freek Vonk
Institute of Biology
Department of Integrative Zoology
University of Leiden
<http://www.slangengif.nl>

Introduction

Every year, between 150.000 and 500.000 people die from snake bites (Chippaux 1998). The exact number is difficult to specify, as a lot of the bites in third world countries unfortunately remain unregistered. The inhabitants of such countries often prefer traditional healing methods to orthodox medicine, if available.

In a recent paper in the prestigious journal *PloS Medicine*, snake bites were categorized as one of the 'major neglected diseases' of the 21st century (Gutierrez et al. 2006), and are thus a serious problem. For example, in a given year in the east of Nepal, 162 people per 100,000 inhabitants died from a snake bite (Sharma et al. 2004). Because many of these bites take place when the people are asleep at night, the same authors proposed in a subsequent paper that a bed net would help tremendously in the snake bite problems in this area (Chappuis et al. 2007).

Although snake venom can be very toxic to people, some of these toxic components can be used in developing new drugs.





mee te maken hebben, zitten er echter ook verbazingwekkende eigenschappen in het gif verborgen die verwerkt kunnen worden in medicijnen. Slangengif als medicijn? Sommigen zal dit erg vreemd in de oren klinken. Deze gedachte is niet alleen van deze tijd. Aristoteles (384 v. Chr. - 322 v. Chr.) veronderstelde al, dat diverse producten van slangen - gif, maar ook bloed en organen - gebruikt zouden kunnen worden in toenmalige medische behandelingen (Chippaux 2006). Hij veronderstelde dit op basis van de symptomen die hij observeerde bij slangenbeten. Een voorbeeld van zo'n primitief medicijn is wat toentertijd bekend was onder de naam *theriac*: een mengsel van opium en vlees van een adder, met wat andere ingrediënten. In 1831 gebruikte Dr. Cayol in Parijs het gif van de *Vipera aspis* als behandeling tegen rabiës (Physalix 1922). De behandeling faalde. Begin 1900 werd het gif van verschillende cobra's en groefkopadders gebruikt bij behandeling van epilepsie (Calmette and Mezie 1914) en in 1935 werd addergif gebruikt om bloedingen te stoppen (Laignel-Lavastine et al. 1935). Met uitzondering van de laatste, worden geen van deze therapieën nog gebruikt, omdat ze niet werken, soms zelfs gevaarlijk zijn, en de actieve stof niet werd geïsoleerd. Pijnstillers, gemaakt van het gif van de cobra (*Naja*) en de Zuid-Amerikaanse ratelslang de cascaval (*Crotalus durissus terrificus*), die in 1930 op de markt zijn gekomen, zijn in 1960 weer van de markt gehaald vanwege hun vele, vaak gevaarlijke bijeffecten.

Eén van de belangrijkste redenen dat de laatste jaren een hoop nieuwe medicijnen zijn ontwikkeld op basis van slangengif, en er een hoop in de pijplijn zitten, is de geweldige toename aan nieuwe, moderne

Snake venom as a drug? To some this might sound very strange. However, it was already mentioned in old references. Aristotle already assumed that several products obtained from snakes - venom, but also blood and organs - could be used for medical purposes (Chippaux 2006). He based this assumption on the clinical signs he observed in snake bite victims. An example of such a primitive drug is what the Ancients call *theriac*: a mixture of opium and flesh of a viper, with some other ingredients. In 1831 in Paris, Dr. Cayol used the venom of *Vipera aspis* as a treatment against rabies (Physalix 1922). The treatment failed. Early in 1900 the venom of several cobras and pitvipers was used to treat epilepsy (Calmette and Mezie 1914) and in 1935 viper venom was used to stop hemorrhages (Laignel-Lavastine et al. 1935). With the exception of the latter, none of these treatments are still in use, because they are ineffective and sometimes even dangerous and the active components were not isolated. Some painkillers, based on the venom of cobras (*Naja*) and the south-American rattlesnake the cascabel (*Crotalus durissus terrificus*), which appeared on the market in 1930, were withdrawn again in 1960 because of many, often dangerous, side effects.

One of the most important reasons for the recent increase in the development of drugs based on snake venoms is the enormous surge in new, molecular research techniques. Moreover, snake venoms serve not only as a basis for new drugs, but also as laboratory agents. The *Human Genome Project* (HGP) made a major indirect contribution to this evolution. The HGP was initiated in the beginning of the nineties and finished in 2005. As the name

molculaire technieken, die onderzoekers nu ter beschikking staan. Bovendien zijn het niet alleen medicijnen waarin slangengif wordt verwerkt, maar ook als laboratorium-hulpmiddel bewijst het gif goede diensten. Het *Human Genome Project* (HGP) heeft hier onbewust een belangrijke bijdrage aangeleverd. Het HGP is begin jaren 90 gestart en eind 2005 afgerond. De enorme grote bedragen die voor dit project ter beschikking stonden, stelden onderzoekers in staat nieuwe molculaire technieken te ontwikkelen en oude te verbeteren. Het primaire doel hiervan was het versnellen van het ontrafelen van het menselijk genoom¹. Andere onderzoeksvelden profiteerden daar gigantisch van. Ik wil in dit artikel beschrijven waarom slangengif zo'n goudmijn is voor de farmaceutische industrie en behandel een aantal medicijnen dat al op de markt is, evenals een aantal dat nog in de pijplijn zit.

Slangengif

Slangengif bestaat uit een mengsel van vele stoffen, over het algemeen eiwitten en enzymen, die allemaal geëvolueerd zijn met het doel prooien snel te kunnen immobiliseren (Li et al. 2005). Het is een algemeen misverstand, dat slangen hun gif gebruiken om hun prooi zo snel mogelijk te doden; de prooi gaat uiteindelijk toch wel dood. Het is vele malen belangrijker voor de slang om ervoor te zorgen, dat de prooi zo snel mogelijk geïmmobiliseerd raakt. Ook is de claim dat slangengif geëvolueerd zou zijn om de prooi buiten het lichaam te verteren, nog nooit wetenschappelijk bewezen. Recentelijk onderzoek heeft zelfs het tegenovergestelde uitgewezen: ratelslangen blijken prooien met geïnjecteerd gif net

implicies, the goal was to unravel the human genome¹. The huge amounts of money that was poured into this project led to the development of new molecular techniques, and to the improvement of old ones. Other research fields have been able to benefit from this.

In this paper, I would like to describe why snake venom is such a goldmine for the pharmaceutical industry. I will deal with ongoing research, and will describe a number of drugs that are already available and some others that are in the pipeline.

Snake venom

Snake venom consists of numerous components, generally proteins and enzymes, which all evolved in order to immobilize prey items quickly (Li et al. 2005). It is a general misconception that snakes use their venom to kill their prey as rapid as possible; the prey eventually dies anyway. It is far more important to make sure that the prey is immobilized quickly. The claim that snake venom has evolved to digest, or partly digest, prey outside the body, has also never been proven scientifically. Recent research even showed the opposite, rattlesnakes appear to digest their prey with injected venom as fast as their prey without injected venom (McCue 2007).

Immobilization can be achieved, for example, by inhibiting the function of certain vital organs, or by blocking the nervous system. Based on the clinical signs caused by a bite, one can already get an idea of the type of venom a certain species has. If, after a bite, the blood keeps flowing out of the wound, this might be an indication that

¹ <http://www.ensembl.org>

¹ <http://www.ensembl.org>





zo snel te verteren als prooien zonder geïnjecteerd gif (McCue 2007).

Immobilisatie van de prooi wordt bijvoorbeeld bereikt door bepaalde vitale organen plat te leggen, of het zenuwstelsel te blokkeren, waardoor zenuwimpulsen niet meer doorgegeven kunnen worden. Aan de hand van de symptomen die optreden bij een beet, kan al een inschatting gemaakt worden wat voor type gif de slang bezit. Blijft na een beet het bloed uit de wond stromen, dan kan dat een teken zijn dat er in het gif een stofje zit dat ervoor zorgt dat het bloed niet meer stolt. Dat stofje noemen we dan een zogenaamde anti-coagulator (coagulatie = bloedstolling). Wanneer na een beet het bloed onaangetast lijkt, maar de prooi vrij snel verlamningsverschijnselen vertoont, is het mogelijk dat er in het gif stoffen zitten die het zenuwstelsel lamleggen, en dus de overgang van zenuwimpulsen belemmeren (neurotoxines). Onderzoekers kunnen van deze symptomen handig gebruik maken om een keuze te maken om een bepaald gif te onderzoeken. Is een onderzoeker op zoek naar nieuwe pijnstillers, dan gaat deze vooral neurotoxisch gif onderzoeken. Toch is deze methode zeker niet zonder meer zaligmakend. Het maakt voor de medische wetenschap namelijk niet uit of een stofje door middel van een symptoom al dan niet tot uiting komt bij een beet. Het kan best zijn, dat een stofje in zo'n lage concentratie voorkomt in het gif, dat het uit de symptomen niet te herkennen valt. Dat betekent echter niet dat het stofje geen potentiële therapeutische waarde bezit. En dit is direct ook de belangrijkste reden dat biomedische wetenschappers zich niet alleen moeten concentreren op de gevaarlijke soorten (cobra's, ratelslangen en adders bijvoorbeeld), ook de (voor de mens) ongevaarlijke en tóch

the venom contains a component that prevents the blood from clotting, called an anti-coagulant. If a bite leads to normal bleeding, but the prey item quickly shows paralysis, it is possible that the venom contains components blocking the conduction of nervous signals (neurotoxins). The decision of researchers to examine a certain type of venom can be based on these clinical signs. Suppose a researcher wants to find a new painkiller, then the main focus will be on neurotoxic venom. However, this method is not ideal. For biomedical sciences, it does not matter at all whether a certain component leads to a symptom in envenomation. It is quite possible that a component occurs in such low concentrations that it does not lead to recognizable clinical signs, but still has therapeutic properties. This is the main reason why biomedical researchers should focus not only on dangerous species (like cobras, rattlesnakes and vipers) but also on less dangerous venomous snakes and lizards (also see 'Future', below).

The most important reason why snake venom is such a goldmine for the pharmaceutical industry and drug development, is its origin and evolution. It is a general misconception that all the components in snake venom are derived from saliva proteins. Actually, almost all of the components are mutated body proteins of snakes (Fry 2005). Those body proteins often play a crucial role in physiological processes like regulation of blood pressure; conduction of nerve impulses; the immune response (complement system); regulating the rhythm of the heart beat, and others. (Fry 2005) These mutant proteins are being generated by gene duplication followed by gene recruitment events. Every cell (except for gametes) contain the complete

giftige slangen en hagedissen zijn veelbelovend (zie ook onder 'Toekomst', onder).

De belangrijkste reden dat slangengif zo'n goudmijn is voor de farmaceutische industrie en medicijnontwikkeling, ligt in de evolutie en oorsprong van het gif. Een algemeen misverstand is dat alle stoffen in het slangengif afkomstig zijn van speekselwitten. Het merendeel van de stoffen zijn namelijk gemuteerde lichaamseiwitten van een slang (Fry 2005). En die lichaamseiwitten zijn vaak betrokken bij cruciale fysiologische processen, bijvoorbeeld bij het in stand houden van de bloeddruk, het doorgeven van de zenuwimpulsen, de immunrespons (het complementsysteem), het regelen van het hartritme (Fry 2005). Dit vindt plaats via genduplicatie, gevolgd door genrecrutatie. Elke cel in het lichaam (behalve geslachtscellen) bevat het complete genoom. Op dit genoom, dat al het DNA omvat, zitten duizenden en duizenden genen. Niet al deze genen komen tot expressie. In elke ander type cel staat op verschillende momenten in het leven van een dier een verschillend aantal genen 'aan', van het moment van bevruchting tot het uitblazen van de laatste adem. In het hart bijvoorbeeld, komt een ander set genen tot expressie dan in de hersens. Deze genen produceren RNA, die de informatie bevat over hoe het eiwit eruit zal gaan zien. En elk RNA-molecuul produceert een ander eiwit. Wat er nu gebeurt in de gifklier van een slang, is een zeer bijzondere staaltje evolutie. Op sommige momenten in de evolutie van slangen vinden er genduplicaties gevolgd door genrecrutaties plaats in de gifklier. Op zo'n moment kan bijvoorbeeld een gen dat normaal gesproken alleen in de hartspier tot expressie komt, ineens ook in de gifklier tot expressie komen. Stel, dat dit eiwit de

genome. This genome contains thousands and thousands of genes. Not all these genes are expressed. The genes that are expressed or "switched on" are different for every other type of cell, but are also depending on time, from conception to death. For example, in the heart a different set of genes is expressed than in the brain. These expressed genes produce RNA, which is involved in the formation of proteins. Every different RNA molecule leads to a different kind of protein. The things going on in the venom glands of snakes are a very nice example of what evolution can do. During evolution, gene duplication followed by gene recruitment may take place in the venom gland. At such times, a gene which normally is only expressed in - for example - the heart muscle, can suddenly also become expressed in the venom gland. Suppose that the resulting protein regulates the heart beat of the snake, and that it leads to a heart attack in the prey when it is injected. This would be evolutionary beneficial for the snake, since the new component in the venom causes rapid immobilization of the prey item. Natural selection favors such a component and this gene will be fixed in the venom of a population of snakes. Subsequently, years of evolution and mutations may lead to the gene, and the resulting protein, getting more and more potent. Then less is needed to result in a heart attack in the prey. Moreover, it might have evolved in a powerful tool to treat certain heart conditions in humans. This is a continuous process in evolution, which is not limited to only one component but is applicable for a lot of proteins which, together, form a deadly cocktail. It is also likely that the components in the venom behave synergistically, meaning that the cocktail altogether would





samentrekking van de hartspier regelt in de slang, en dat deze slang deze stof injecteert in haar prooi, met als gevolg dat deze een hartaanval krijgt. Dat is evolutionair voordelig voor de slang, daar de prooi snel geïmmobiliseerd raakt. Natuurlijke selectie zorgt er dan voor, dat dit nieuwe gen opgenomen wordt in het gif van deze populatie slangen. Vervolgens kan, door jaren van evolutie en mutaties, dat gen, en dus dat eiwit, vele malen sterker worden dan het voorheen was. Nu is er minder nodig om de prooi sneller een hartaanval te laten krijgen, en is het bovendien een krachtig middel dat bij mensen bijvoorbeeld een slecht werkende hartspier kan behandelen. In dit voorbeeld gaat het om één gifstof, maar het gaat in de evolutie niet om één gifstof, heel veel gifstoffen evolueren op deze manier parallel aan elkaar in een continu proces en vormen samen het dodelijk goedje. Het is ook zeer waarschijnlijk dat de stoffen in het gif synergistisch werken, waarmee wordt bedoeld dat het effect van het geheel groter is dan het effect van alle stoffen apart bij elkaar opgeteld.

'Giftige' medicijnen

Als u iemand kent die medicijnen slikt tegen verhoogde bloeddruk of hartkwalen, dan is de kans heel groot dat deze een medicijn slikt uit de klasse der ACE-remmers (Angiotensin Converting Enzyme remmers). De ACE-remmers zijn toch wel hét beroemdste voorbeeld van het succesvol gebruik van slangengif (of wat voor een dierlijk gif dan ook) in medicijnen. In 1975 hebben drie onderzoekers in de VS een stof ontdekt in het gif van de Zuid-Amerikaanse lanspuntslang (*Bothrops jararaca*) dat de bloeddruk verlaagt (Cushman et al. 1979). Het mechanisme waarmee deze stof dat deed, was in die tijd compleet

have much more effect than the sum of the effect of all isolated components.

'Venomous' drugs

If you know somebody who takes drugs against high blood pressure or heart failure, then chances are high that he or she takes a product from the drug class of ACE-inhibitors (Angiotensin Converting Enzyme inhibitors). These inhibitors are the most famous example of the successful use of snake venom (indeed, any venom of animal origin) in medicine. In 1975, three scientists from the US found a component in the venom of the south-American lancehead (*Bothrops jararaca*), that was able to decrease blood pressure (Cushman et al. 1979). The mode of action was completely new and amazingly revolutionary. As the name implies, this component inhibits the enzyme ACE, an enzyme that fulfills a crucial role in the maintenance of blood pressure. ACE converts oligopeptide angiotensin-I into angiotensin-II. The latter is a vasoconstrictor - it leads to narrowing of blood vessels - resulting in lower arterial pressure and a higher venous capacity, which results in a lower blood pressure. ACE-inhibitors also help in the excretion of sodium in the urine, which also leads to a lower blood pressure. At present, ACE-inhibitors are being prescribed for the treatment of:

- High blood pressure
- Heart failure
- Cardiac arrest
- Renal insufficiency

Meanwhile, this class of medicines has become a true billion dollar industry, as ACE-inhibitors are used and prescribed worldwide. In 2002, their turn-over was around 7.8 billion dollars. However, these

nieuw en waanzinnig revolutionair. Zoals de naam al zegt, remt deze gifstof het enzym ACE, een enzym dat bij ons een cruciale functie vervult bij het in stand houden van de bloeddruk. ACE zet de oligopeptide angiotensin-I om in angiotensin-II. Deze laatste is een vasoconstrictor - het vernauwt de bloedvaten - wat resulteert in een lagere arteriële druk en een vergrote veneuze capaciteit, wat weer resulteert in een lagere bloeddruk. Ook helpen ACE-remmers bij de uitscheiding van natrium met de urine, wat ook de bloeddruk verlaagt. Tegenwoordig worden ACE-remmers door artsen voorgeschreven bij behandeling van:

- verhoogde bloeddruk
- hartfalen
- hartinfarct
- nierziekten

Het is een echte miljardenindustrie, want de ACE-remmers worden wereldwijd voorgeschreven en gebruikt. In 2002 was de wereldwijde omzet ongeveer \$ 7.8 miljard. Ze hebben echter ook een aantal nadelen. Eén van die nadelen is de halfwaardetijd, die behoorlijk kort is. Patiënten moeten dan ook vaak drie keer per dag tabletten slikken. Wellicht dat er ooit nog een betere ACE-remmer wordt gevonden in het gif van andere dieren.

Sinds de goedkeuring van de FDA (Food and Drug Administration) in mei 1998 worden ook het gif van de dwergratelslang (*Sistrurus milliaris barbouri*) en dat van de zaagschubadder, (*Echis carinatus*) gebruikt als basis voor nieuwe medicijnen. Van het gif van de eerste is Integrillin® gemaakt, en van de tweede Aggrastat® (Adgey 1998). Beide voorkomen de vorming van bloedplaatjes en zijn daarmee dus anti-coagulantia. Op de bloedplaatjes zit een celop-

products also have a number of disadvantages. One of these is their short half-life. Therefore patients often have to take their drug three times a day. Maybe once a new and better ACE inhibitor will be found in the venom of other animals.

Since receiving FDA (Food and Drug Administration) approval in May 1998, the venoms of the pygmy rattlesnake (*Sistrurus milliaris barbouri*), and that of the saw-scaled viper (*Echis carinatus*), have also been used in the development of drugs. The venom of the former is the basis of Integrillin®, the venom of the latter of Aggrastat® (Adgey 1998). Both prevent the clotting of thrombocytes and thus are anti-coagulants. They do so by attaching to a thrombocyte cell-surface receptor protein, called glycoprotein IIb/IIIa. This attachment results in thrombocytes not sticking together anymore (Adgey 1998). Both of these drugs are used mostly in treatment of heart diseases like *angina pectoris*, where the coronary artery (the artery providing oxygenated blood to the heart) is narrowed. The possible side effects of these drugs are serious hemorrhages and hypotension (abnormally low blood pressure). In 2001, Integrillin® had a turnover of 230.8 million dollars.

Ancrod (Viprinex®) is currently under evaluation as a drug to treat thromboses (for example strokes). This evaluation is currently in phase III of the drug discovery process. Before, ancrod was used under its commercial name Arvin® to treat blocked blood vessels due to heavy smoking (Leube et al. 1972). Arvin® has been used for some decades in Germany and Austria, but the licenses were withdrawn sometime in the eighties. Ancrod is a component isolated from the venom of the Malayan pitviper, *Calloselasma rhodos-*





pervlaktereceptoreiwit, genaamd glycoproteïne IIb/IIa, waaraan deze gifstoffen hechten. Deze aanhechting zorgt er vervolgens voor, dat de bloedplaatjes niet meer aan elkaar vast kunnen plakken (Adgey 1998). Deze medicijnen worden momenteel gebruikt bij de behandeling van hartziekten als *angina pectoris*, waarbij de kransslagader (de slagader die uit de aorta ontspringt en het hart zelf van bloed voorziet) vernauwd is. Er kunnen echter wel ernstige bijeffecten optreden bij behandeling met deze medicijnen, zoals flinke bloedingen en hypotensie (abnormale lage bloeddruk). Deze medicijnen leverden de farmaceutische industrieën een omzet van \$230.8 miljoen op in 2001 voor Integrilin®.

Ancrod (Viprinex®) wordt momenteel onderzocht als medicijn bij de behandeling van tromboses (bijvoorbeeld beroertes). Het onderzoek bevindt zich momenteel in fase III van de medicijnontwikkeling. Vroeger werd ancrod ook gebruikt om dichtgeslibde aderen ten gevolge van bijvoorbeeld zwaar roken te behandelen, toentertijd onder de naam Arvin® (Leube et al. 1972). Het was al enkele tientallen jaren in gebruik in Duitsland en Oostenrijk, toen de licenties ergens in de jaren 80 werden ingetrokken. Ancrod is een stof afkomstig uit het gif van de Maleise grondadder (*Calloselasma rhodostoma*) een soort die in Azië voor veel beetincidenten zorgt, vaak gevolgd door amputaties. Ancrod is ook te vinden in het gif van veel andere soorten gifslangen (groefkopadders, cobra's en adders). De Maleise grondadder is echter het meest geschikt voor dit onderzoek, omdat ze de hoogste concentratie van ancrod in haar gif heeft. Deze stof haalt fibrinogeen uit het bloed, een eiwit dat betrokken is bij de bloedstolling (Lathan and Staggers 1996). Fibrinogeen is vaak in

toma, a species responsible for a lot of snakebites, often followed by amputations, in Asia. Ancrod can also be found in the venom of other venomous snakes (pitvipers, vipers and cobras), but the highest concentration can be found in the venom of the Malayan pitviper. This component takes fibrinogen, a protein involved in blood coagulation, out of the blood (Lathan and Staggers 1996). Fibrinogen can often be found in elevated concentrations in clogged blood vessels. In Germany, two pharmaceutical companies (Neurobiological Technologies Inc. and Nordmark) acquired 1500 Malayan pitvipers last year for this research. The centre where these snakes are housed, cost around € 4.5 million and the snakes will be milked every month.

Multiple sclerosis (MS) is a very dangerous disease, affecting the central nervous system. It can lead to weak muscles, difficulties with speech and vision, depression, ataxia, overheating, pain and perhaps eventually death. It is caused by the breakdown of the myelin sheath - a fatty layer covering nerves and ensuring optimal transfer of signals - in the spinal cord and brain. This breakdown eventually leads to an inhibition of signal transfer in the nerves. At present, scientists think that the myelin sheath is broken down by the attack of the patient's own immune cells. That is why MS is considered an auto-immune disorder nowadays. However, opinions on this matter are somewhat conflicting. The venom of the Asian monocled cobra (*Naja kaouthia*) is now being examined as a potential medicine to treat MS, as it seems that the venom blocks the attack of immune cells against the myelin sheath (Mohamed et al. 2006). This examination is currently in phase II of the drug discovery process.

verhoogde concentraties te vinden in aderen die dichtgeslibd zijn. In Duitsland hebben twee farmaceutische bedrijven (Neurobiological Technologies Inc. en Nordmark) vorig jaar 1500 Maleise grondadders ten behoeve van dit onderzoek aangeschaft. Het opzetten van het centrum waar deze slangen worden gehouden, heeft € 4.5 miljoen gekost. De slangen zullen iedere maand worden gemolken ten behoeve van dit onderzoek.

Multiple sclerosis (MS) is een zeer gevaarlijke ziekte, waarbij het centrale zenuwstelsel wordt aangetast. Dit kan resulteren in verzwakte spieren, moeilijkheden met spraak en zicht, depressie, disbalans, oververhitheid, pijn en uiteindelijk, eventueel, de dood. De ziekte wordt gekenmerkt door de afbraak van de myelinschede in het ruggenmerg en hersenen - een vettig laagje dat om zenuwen heen ligt en zorg draagt voor de overdracht van elektrische prikkels. Deze afbraak zorgt er uiteindelijk voor dat zenuwprikkels niet meer doorgegeven kunnen worden. Vandaag de dag wordt gedacht dat de afbraak van de myelinschede een gevolg is van een aanval van de patient's eigen immuuncellen hierop, en daarom wordt MS nu een auto-immuunziekte genoemd. Hier zijn de meningen echter nog over verdeeld. Het gif van de Thaise monoclecobra (*Naja kaouthia*) wordt momenteel onderzocht als potentieel medicijn tegen deze ernstige ziekte (Mohamed et al. 2006). Het schijnt namelijk dat stoffen uit dit gif de aanval van de lichaamseigen cellen tegen de myelinschede zouden blokkeren. Momenteel verkeert dit onderzoek in fase II van medicijnontwikkeling.

Bloedpropjes kunnen in het menselijk lichaam voor veel problemen zorgen. Ze zorgen ervoor, dat er in een bepaald deel

In the human body, blood clots can lead to a lot of trouble. They deprive certain parts of the body from oxygen, leading to possible necrosis. When this happens in the brain, this is called a stroke. In the US about 100.000 people per year suffer from blood clots in the legs. A common consequence hereof is amputation of the leg. The venom of the north-American copperhead (*Agkistrodon contortrix*), contains a component called fibrolase. This component may lead to degradation of blood clots (Deitcher et al. 2006). A US-based company, Nuvelo, reproduced this component using DNA recombination and patented it under the name alfineprase (Moll et al. 2006). This company is currently examining this component to treat blood clots in the legs. Their goal is to inject alfineprase locally, at the site of a blood clot, via a catheter, leading to its dissolution. Blood clots use the blood clotting factor fibrin, a threadlike protein. In a clot, fibrin proteins are attached to each other in threads. Alfineprase works directly on the fibrin, which causes degradation of this blood clotting factor. It also works well on the place where it is injected, near the blood clot. Afterwards, it will be quickly inactivated by a protein in our blood called alpha-2 macroglobulin (Deitcher et al. 2006).

There is a venom component that is 2700 times more powerful than morphine, without the additional side-effects (Pu et al. 1995). Currently this component is being evaluated as a potential new painkiller. It was isolated from the venom of the largest venomous snake in the world, the beautiful King Cobra, *Ophiophagus hannah*. The goal is to make an oral drug out of it. Currently, this component is in phase II of the drug discovery process.





van het lichaam geen zuurstof meer kan komen, waardoor dat deel dreigt af te sterven. Wanneer dit in de hersenen gebeurt, spreken we van een beroerte. In de VS hebben ongeveer 100.000 mensen per jaar last van bloedpropjes in de benen. Een veel voorkomend gevolg hiervan is een beenamputatie. Het gif van de Noord-Amerikaanse copperhead (*Agkistrodon contortrix*) bevat een gifstof dat fibrolase genoemd wordt en de potentie heeft deze bloedpropjes op te lossen (Deitcher et al. 2006). Een bedrijf uit de VS, Nuvelo, heeft deze stof nagemaakt met behulp van DNA-recombinantie en gepatenteerd onder de naam alfimeprase (Moll et al. 2006). Momenteel onderzoekt dit bedrijf het gebruik van alfimeprase in de behandeling van de bloedpropjes in de benen. De bedoeling is om in de toekomst alfimeprase via een katheter lokaal in te spuiten op de plek van de bloedprop waarbij deze direct zal worden opgelost. Bloed stolt met behulp van het bloedstollings-eiwit fibrine. Fibrine is een draadvormig eiwit en bij een bloedprop zijn de fibrine-eiwitten aan elkaar geplakt tot draden. Alfimeprase werkt direct in op de fibrine, waarbij de fibrine-eiwitten worden gedegradieerd. Ook werkt het heel goed op de plek waar het in de bloedbaan (vlakbij de prop) wordt ingespoten, waarna het daarna snel geïnactiveerd wordt door een ander eiwit dat in ons bloed voorkomt, genaamd alpha-2 macroglobulin (Deitcher et al. 2006). Er is een gifstof dat 2700 keren sterker dan morfine is, en niet de verslavende bijwerking heeft (Pu et al. 1995). De stof is afkomstig uit het gif van de grootste gifslang ter wereld, de prachtige koningscobra, *Ophiophagus hannah*. Momenteel wordt deze stof onderzocht als potentieel nieuwe pijnstiller. De bedoeling is, dat dit medicijn oraal ingenomen zal gaan worden. Mo-

Science

There is a number of methods available for selecting a certain type of snake venom for scientific research. One of these methods is literature study. For example, when reading that a certain type of venom leads to specific clinical signs in prey items or in humans, this may be a reason to start specific research. A good example is the venom of the black widow spider, (*Latrodectus mactans*), a component of which is currently under evaluation to treat impotency and to improve fertility (Romero et al. 2007). This research program started after stories of erections of exceptionally long duration and exceptional fertility in man bitten by these spiders. A nice example of how these things can go.

Research can also be based on chromatographic analyses of different kinds of snake venom (Fry et al. 2003). With this method, venom components are characterized based on their molecular weight or electrical charge. It leads to a specific readout with values of the different components in the venom. These patterns can be very complex. They can subsequently be compared with pre-existing patterns used as signatures, leading to the identification of yet unknown components. If such an unknown component is present, it can be isolated and looked at its structure, function and mechanism. Choices can also be based on cDNA libraries (Pung et al. 2006). These are databases containing many nucleotide sequences of components expressed in the venom gland. If a certain unknown sequence is found, it can be examined further.

Once an unknown component has been identified, it can be investigated further to elaborate its structure, function and mech-

menteel bevindt deze stof zich in fase II van de medicijnontwikkeling.

Wetenschap

Er is een aantal manieren om een bepaald type slangengif te selecteren voor onderzoek. Een van deze manieren is literatuurstudie. Onderzoekers lezen bijvoorbeeld, dat het gif van een bepaalde soort interessante symptomen veroorzaakt in een proef of mens, en besluit daar onderzoek naar te doen. Een goed voorbeeld is het gif van de zwarte weduwe (*Latrodectus mactans*), dat momenteel wordt onderzocht als een middel tegen impotentie en ter verbetering van de mannelijke vruchtbaarheid (Romero et al. 2007). Dit onderzoek is gestart naar aanleiding van verhalen van mannen die gebeten waren door deze spinnen en die ongevoelbaar langdurende erecties kregen en buitengewoon vruchtbaar bleken te zijn geworden. Een schitterend voorbeeld van hoe zo iets lopen kan.

Onderzoekers kunnen ook diverse soorten slangengif gebruiken om chromatografieanalyses uit te voeren (Fry et al. 2003). Hiermee worden de stoffen uit het slangengif opgesplitst op basis van bijvoorbeeld moleculair gewicht of elektrische lading. Hier komt dan een bepaalde readout uit. Deze patronen kunnen heel complex zijn. Vervolgens kunnen deze worden vergeleken met al bekende patronen. De stoffen die nog niet bekend zijn, kunnen er vervolgens uitgehaald worden. Zit er een stof tussen die nog niet is beschreven, dan kan deze worden geïsoleerd en vervolgens verder worden verwerkt in het structuur-, functie- en mechanismeonderzoek. Ook kunnen onderzoekers kiezen op basis van een cDNA-bibliotheek, gemaakt van de gifklier (Pung et al. 2006). Dit is een database met de nucleotide sequenties van stoffen

anisms of action (Kini 2005). This is always important for knowing what the component exactly does, and whether or not it can be used as therapy. A protein has a very complex structure and fits like a key in a lock (receptor), which is extremely important in its mode of action. Actually, proteins are even more specific than a key, as there is no master key in the protein world. A protein has a primary, a secondary, a tertiary and sometimes a quaternary structure. Eventually, the complete 3D structure has to be known. The primary structure is the sequence of the amino acids of the protein. This can be resolved using a cDNA library, Edman's degradation technique and mass spectrometry. The latter technique is used most often. It is based on cutting the protein into small pieces called peptides. Subsequently, a certain amount of energy is added, leading to the breakdown of the peptides in predictable pieces. This is caused by the fact that not every bond between amino acids is equal, the one being stronger than the other. With a specific amount of energy, only specific bonds are broken. This can be repeated with different energy levels, and eventually a software program can put the amino acids in a sequence, sort of like a puzzle. The secondary structure reflects the spatial structure of such an amino acid sequence, for example a helix or a zigzag chain. The tertiary structure reflects the arrangement of the chains with respect to each other. If a given protein consists of different subunits, the quaternary structure reflects their arrangement.

In practice, the secondary, tertiary and quaternary structures are often predicted from the primary amino acid sequence of a protein using specialized software. However, this is always an hypothesis.





die in de gifklier worden uitgescheiden. Deze kunnen vervolgens worden gebruikt om via grote, elektronische databases te kijken wat voor gifstoffen het zouden kunnen zijn. Als er een tussen zit die nog niet bekend is, of die kennelijk nergens aan verwant is, kan deze verder onderzocht worden.

Het structuur-, functie- en mechanismeonderzoek vindt plaats, nadat een ongeïdentificeerde stof is gevonden die de onderzoeker verder wil onderzoeken (Kini 2005). Dit is altijd heel belangrijk om te achterhalen wat het stofje precies doet, en of het gebruikt kan worden als medicijn tegen een of andere ziekte. De structuur van een stof is heel belangrijk om erachter te komen wat de stof doet. Een eiwit heeft namelijk een heel complexe structuur, die zeer belangrijk is in het mechanisme waarmee het eiwit werkt. Die structuur zorgt er namelijk voor, net als een sleutel in een slot (receptor), dat het eiwit zijn werk kan doen. Eigenlijk zijn eiwitten nog specifiekker dan een sleutel in een slot, er bestaat namelijk geen looper in de eiwitwereld. Een eiwit heeft een primaire, secundaire, tertiaire en soms een quaternaire structuur. Het uiteindelijke doel is het oplossen van de complete 3D-structuur van zo'n eiwit. De primaire structuur is de volgorde van de aminozuren van het eiwit. Dit kan worden opgelost met behulp van een cDNA-bibliotheek, Edman's degradatietechniek en massaspectrometrie. De massaspectrometrie is de meest toegepaste techniek hiervoor. Hierbij wordt het eiwit in kleinere stukjes geknipt, die we peptiden noemen. Daarna wordt er bepaalde energie aan toegevoegd, waardoor de peptiden in voorspelbare stukjes uiteenvallen. Dit komt, omdat niet iedere binding tussen aminozuren gelijk is, de een is sterker dan de ander. Wanneer dan alleen een bepaalde energie wordt toegevoegd, worden er

When aiming on new drugs based on snake venom components, it is important to know the exact structure with certainty. Therefore two techniques are available: X-ray crystallography (Lok et al. 2005) and NMR (Nuclear Magnetic Resonance) (Torres et al. 2001). Although they are expensive and require a lot of work, they are often used in the determination of the structure of snake venom proteins.

X-ray crystallography is based on the diffraction of X-rays by crystals, the breaking indexes of which reveal the structure of the protein. So when a protein from snake venom has to be examined using this method, this protein has to be crystallized first. This is because naturally proteins do not occur as crystals. This can only be achieved when it occurs in such high concentrations in a solution, that super-saturation is reached. This is mostly performed by leaving a drop solution of the protein in water in a closed system. At first, the protein has not yet reached a super-saturated state. However, in the closed system there is also reservoir containing a solution that is very hygroscopic (attracting water). Thus, the water in the drop slowly diffuses to the reservoir, leading to a rise in the concentration of the protein, which reached the super-saturated state and slowly crystallizes. This can take days, weeks or even months.

To know the exact biological function of a component, it must be injected in experimental animals like mice (Pung et al. 2005). Of course in very low numbers, and never more than needed! Some symptoms can be spotted immediately, for instance when the component affects the heart, causes hemorrhages or leads to neurotoxic signs in the central or the peripheral nervous sys-

alleen vooraf bepaalde verbindingen verbroken. Dit kan dan worden herhaald met het toevoegen van verschillende energieniveaus, en uiteindelijk kan een computerprogramma de gevonden aminozuren als puzzelstukjes achter elkaar zetten. De secundaire structuur is de ruimtelijke structuur van de aminozuurketen, bijvoorbeeld een helix of zigzagketen. De tertiaire structuur geeft de ordening van de ketens ten opzichte van elkaar weer. De quaternaire structuur geeft de ordening van de verschillende subeenheden van een eiwit weer, *mits* deze uit verschillende subeenheden bestaat.

In de praktijk worden de secundaire, tertiaire en quaternaire structuren vaak via computer programma's afgeleid van de primaire aminozuurvolgorde van een eiwit. Dit is dus echter altijd een hypothese, en geen wetenschappelijke vaststelling. Bij onderzoek naar nieuwe medicijnen, zal de structuur van het eiwit met zekerheid moeten worden vast gesteld. Hiervoor zijn er twee technieken beschikbaar. Dit zijn X-ray crystallografie (Lok et al. 2005) en NMR (Nuclear Magnetic Resonance) (Torres et al. 2001). Deze technieken zijn wel duur en tijdsintensief, maar worden veel gebruikt in het bepalen van een structuur van een slangengeiwit.

X-ray crystallografie werkt als volgt. Een kristal breekt röntgenlicht op een bepaalde manier, en uit de brekingen van het licht kan worden afgeleid wat de structuur is van het kristal. Wanneer een eiwit uit het slangengif wordt gebruikt, zal deze eerst moeten worden gekristalliseerd, want eiwitten komen van nature niet voor als kristallen. Een eiwit kristalliseert, wanneer het in een bepaalde oplossing in zó'n hoge concentratie voorkomt, dat het 'super-gesatureerd' is. Meestal doet men dit door een

tem. If the target organ of a component is known, its effects can also be examined in an organ bath system (Lumsden et al. 2004). In such a system, a particular component is tested on - for example - isolated muscles, an isolated aorta, diaphragm or heart. Further investigations then are needed to get to know what the component does on cellular level, which receptor or ion channel or protein it binds with or affects. Therefore mutations are generated in the DNA-sequence encoding the protein, creating mutant proteins. This can be performed via a specific method (*site-directed mutagenesis*), leading to a specific mutation site, or via a method where the mutation is inserted ad random (*random mutagenesis*). In both cases, the created mutant proteins are compared to the original, eventually leading to an exact knowledge of the function of every part of the protein. Based on this functional analysis, it is possible to estimate the possible therapeutic value of a component. As a rule of thumb, one can say the smaller the protein is, the better it is suitable for drug development. This has to do with our own immune system, that may react badly on foreign proteins. So, if it is possible to delete parts of the molecule without affecting its function, that will be done.

Future

A shortcoming of biomedical scientists screening reptile venom to develop potentially new drugs is that they are mainly examining species that are dangerous to man (Lumsden et al. 2007). However, there are many non-dangerous venomous species whose venoms have never been investigated for therapeutic properties. For biomedical sciences, it does not matter at all if a species is dangerous for man.





druppel oplossing van het eiwit in water in een gesloten systeem te laten staan. In het begin is het eiwit nog niet in 'super-gesatureerde' staat. In het gesloten systeem zit verder een reservoir met een oplossing die sterk hygroscopisch is (water aantrekt). Het water in de druppel difundeert langzaam naar het reservoir, en op deze manier stijgt de concentratie van het eiwit dat hierdoor in 'super-gesatureerde' staat komt en langzaam maar zeker kristalliseert. Dit kan dagen, weken of zelfs maanden duren.

Wat is de precieze biologische functie van een stof? Hiervoor wordt de stof in proefdieren, bijvoorbeeld muizen, geïnjecteerd (Pung et al. 2005). Natuurlijk alleen in heel kleine aantallen, en nooit meer dan nodig is! Sommige symptomen kun je direct zien. Bijvoorbeeld als de stof het hart beïnvloedt, bloedingen of neurotoxische symptomen veroorzaakt, en of het in het centrale of het perifere zenuwstelsel werkt. Wanneer duidelijk is waar de stof werkt, kan de stof in een orgaanbadstelsel onderzocht worden (Lumsden et al. 2004). Hierbij wordt de stof getest op bijvoorbeeld geïsoleerde spieren, aorta, diafragma of een hart.

Vervolgens is het belangrijk erachter te komen wat het doel is van dit stofje, welke receptor, ion-kanaal of eiwit hecht de gifstof aan? Wat is het mechanisme, waarmee dit stofje werkt? Hierbij wordt een mutatie aangebracht in de DNA-basenpaarvolgorde van het gen dat voor het eiwit codeert. Dit kan via een specifieke methode (*site-directed mutagenesis*), waarbij de mutatie vooraf wordt vastgesteld, of via een methode waarbij de mutatie random wordt aangebracht (*random mutagenesis*). In beide gevallen worden de uiteindelijk geproduceerde mutante eiwitten vergeleken met het origineel, waarbij op den duur

Some of the readers will probably have heard that Gila monsters and other *Helodermatidae* are no longer the only venomous lizards (Fry et al. 2006). In 2005, fourteen biologists, including myself, published a paper in *Nature* regarding this subject. The core of the story is that monitors and Iguania lizards also possess venom glands. However, they remain harmless for humans! This has consequences for biochemical research, as these unknown venoms can harbor potentially new drugs. The venom of the Gila monster has already led to a new drug to treat diabetes type II.

Future research will have to be directed towards the further screening of several kinds of reptile venom. Because of the enormous variation in venom composition (Daltry et al. 1996; Menezes et al. 2006) one never knows when and where a new wonder drug may be found. A lot of time can be saved by developing a model system to test different kinds of venom and isolated components quickly and efficiently for possible therapeutic properties. Michael Richardson, professor in Integrative Zoology and my supervisor at Leiden University, got a Smart Mix grant of 14 million euro this year. The grant, called *A new generation of high-efficiency screens for drugs against major human illnesses*, will cover my PhD and research expenses to develop such a model. Together with colleagues, we will develop a model system based on the zebrafish, which are six times cheaper and less time consuming to keep than mice. Zebrafish lay - on average - 5000 eggs per year. Their genome is similar to the human genome. Also, a lot of diseases behave in the same way in zebrafish as in man. It is thus an ideal first screening system for snake venom. If a positive result would be achieved with a certain venom, it

van elk deel van het eiwit de precieze functie duidelijk wordt. En uiteindelijk, gebaseerd op deze functionele kant, kan een inschatting worden gemaakt over de therapeutische waarde van de onderzochte gifstof. Als regel geldt, hoe kleiner het eiwit, hoe beter te gebruiken als medicijn. Dit heeft te maken met ons eigen immuunsysteem, dat soms slecht kan reageren op grotere lichaamsvreemde stoffen. Als er dus delen van het eiwit afgehaald kunnen worden en dit niet de werking beïnvloedt, wordt dat ook gedaan.

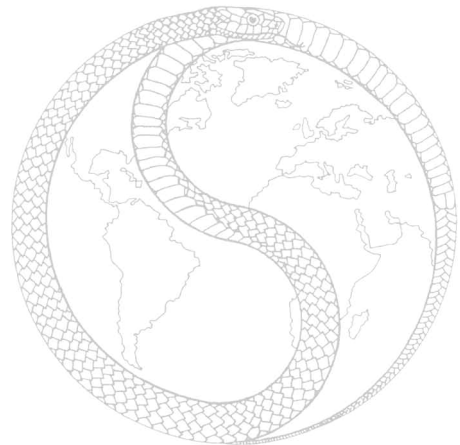
Toekomst

Een tekortkoming van de biomedische wetenschap waarbij reptielengif wordt onderzocht op potentiële therapeutische waarde, is dat deze zich voornamelijk richt op de soorten die gevaarlijk zijn voor de mens (Lumsden et al. 2007). En dat terwijl er zo veel ongevaarlijke soorten zijn, waarbij het gif nog niet is onderzocht op therapeutische eigenschappen. Voor de therapeutische waarde van een gifstof maakt het absoluut niet uit of een dier gevaarlijk is voor de mens of niet.

Een aantal lezers zal wellicht opgevangen hebben, dat gilamonsters (*Heloderma suspectum*) en Mexicaanse korsthagedissen (*Heloderma horridum*) niet meer worden beschouwd als de enige giftige hagedissen (Fry et al. 2006). In 2005 hebben veertien biologen, waaronder ikzelf, hierover een artikel gepubliceerd in *Nature*. De kern van het verhaal is dat varanen en Iguania (leguaanachtigen) ook gifklieren bezitten. Al zijn deze dieren voor mensen (nog steeds) ongevaarlijk! Deze ontdekking heeft consequenties voor biomedisch onderzoek en medicijnontwikkeling, want het gif van deze vele soorten is nog nooit onderzocht en kan wellicht potentiële nieuwe medicijnen

can go further down the pipeline and eventually also be tested in warm-blooded animals like mice and rats. This system will make sure that a lot of different venoms and isolated components can be screened quickly for medical properties.

Translation from Dutch
by Dieter Vancraeynest.





opleveren. Het gif van de gilamonster wordt al gebruikt als medicijn tegen diabetes type II.

Toekomstig onderzoek zal zich moeten richten op het verder screenen van de verschillende soorten gif van reptielen. Mede vanwege de enorme variatie in gifsamenstelling (Daltry et al. 1996; Menezes et al. 2006) weet je nooit wanneer je het volgende nieuwe wondermedicijn tegenkomt. Wij kunnen veel tijd besparen door een modelstelsel te ontwikkelen, waarbij snel en efficiënt allerlei verschillende gifstoffen kunnen worden getest op eventuele medicinale eigenschappen. Michael Richardson, professor van integratieve zoölogie en mijn begeleider aan de Universiteit van Leiden, heeft dit jaar een Smart Mix beurs toegekend gekregen ter waarde van 14 miljoen euro. De beurs, genaamd *A new generation of high-efficiency screens for drugs against major human illnesses*, zal mijn promotie- en onderzoekskosten betalen.

Samen met collega's gaan wij een modelstelsel ontwikkelen, waarbij wij in korte tijd veel verschillende soorten gifstoffen kunnen testen op eventuele medicinale eigenschappen tegen een bepaalde ziekte. En dit modelstelsel wordt gebaseerd op de zebravis. Zebravissen zijn zes keer goedkoper in onderhoud dan muizen. Zebravissen leggen gemiddeld 5000 eitjes per jaar. Bovendien vertoont het genoom veel overeenkomsten met dat van de mens. Veel ziektes gedragen zich in zebravissen hetzelfde als in de mens. Het is dus een ideale eerste screen voor slangengif. Mocht er een positief resultaat uitkomen, dan gaat de gifstof verder in de pijplijn en wordt het ook uiteindelijk getest in warmbloedige dieren als muizen en ratten. Dit stelsel zal ervoor zorgen, dat er veel verschillende gifstoffen gescreend kunnen worden op medicinale eigenschappen, en dat geeft ons de kans om nieuwe medicijnen te vinden.

Literature

- Adgey, A. A. 1998. An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Eur Heart J* 19 Suppl D:D10-D21.
- Calmette, A. and A. Mezie. 1914. Essai de traitement de lépilepsie dite essentielle par le venin de crotale. *C.R.Acad.Sc.Paris* 158:846-850.
- Chappuis, F., S. K. Sharma, N. Jha, L. Loutan, and P. A. Bovier. 2007. Protection against snake bites by sleeping under a bed net in southeastern Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 77:197-199.
- Chippaux, J. P. 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ* 76:515-524.
- Chippaux, J. P. 2006. *Snake Venoms and Envenomations*. Krieger Publishing Company, Florida.
- Cushman, D. W., H. S. Cheung, E. F. Sabo, B. Rubin, and M. A. Ondetti. 1979. Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme (kininase II). *Fed.Proc* 38:2778-2782.
- Daltry, J. C., W. Wuster, and R. S. Thorpe. 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature* 379:537-540.
- Deitcher, S. R., W. D. Funk, J. Buchanan, S. Liu, M. D. Levy, and C. F. Toombs. 2006.

- Alfimeprase: a novel recombinant direct-acting fibrinolytic. *Expert Opin Biol Ther* 6:1361-1369.
- Fry, B. G. 2005. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res* 15:403-420.
- Fry, B. G., N. Vidal, J. A. Norman, F. J. Vonk, H. Scheib, S. F. Ramjan, S. Kuruppu, K. Fung, S. B. Hedges, M. K. Richardson, W. C. Hodgson, V. Ignjatovic, R. Summerhayes, and E. Kochva. 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439:584-588.
- Fry, B. G., W. Wuster, S. F. Ryan Ramjan, T. Jackson, P. Martelli, and R. M. Kini. 2003. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxicological implications. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:2047-2062.
- Gutierrez, J. M., R. D. Theakston, and D. A. Warrell. 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med* 3:e150.
- Kini, R. M. 2005. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon* 45:1147-1161.
- Laignel-Lavastine, M. M., P. C. Huët, and N. T. Koressios. 1935. Sur les propriétés coagulantes du venin de vipère *Daboia*. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp.* 59:1529-1533.
- Lathan, L. O. and S. L. Staggers. 1996. Ancrod: the use of snake venom in the treatment of patients with heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis undergoing coronary artery bypass grafting: nursing management. *Heart Lung* 25:451-460.
- Leube, G., J. J. Kuehn, and H. Hartert. 1972. [Initial results with Arvin, a clotting inducing fraction of a snake venom]. *Med Welt* 23:601-605.
- Li, M., B. G. Fry, and R. M. Kini. 2005. Eggs-only diet: its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). *J Mol Evol* 60:81-89.
- Lok, S. M., R. Gao, M. Rouault, G. Lambeau, P. Gopalakrishnakone, and K. Swaminathan. 2005. Structure and function comparison of *Micropechis ikaheka* snake venom phospholipase A2 isoenzymes. *Febs J* 272:1211-1220.
- Lumsden, N. G., Y. Banerjee, R. M. Kini, S. Kuruppu, and W. C. Hodgson. 2007. Isolation and characterization of rufoxin, a novel protein exhibiting neurotoxicity from venom of the psammophiine, *Rhamphiophis oxyrhynchus* (Rufous beaked snake). *Neuropharmacology* 52:1065-1070.
- Lumsden, N. G., B. G. Fry, S. Ventura, R. M. Kini, and W. C. Hodgson. 2004. The in vitro and in vivo pharmacological activity of *Boiga dendrophila* (mangrove catsnake) venom. *Auton. Autacoid. Pharmacol* 24:107-113.
- McCue, M. D. 2007. Prey envenomation does not improve digestive performance in western diamondback rattlesnakes (*Crotalus atrox*). *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* 307:568-577.
- Menezes, M. C., M. F. Furtado, S. R. Travaglia-Cardoso, A. C. Camargo, and S. M. Serrano. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47:304-312.
- Mohamed, A., P. F. Reid, L. Raymond, and T. Dufan. 2006. Amelioration of acute and relapsing stages of the experimental allergic encephalomyelitis by cobra toxins. *Biomed Sci Instrum.* 42:399-404.





- Moll, S., P. Kenyon, L. Bertoli, M. J. De, H. Homesley, and S. R. Deitcher. 2006. Phase II trial of alfimeprase, a novel-acting fibrin degradation agent, for occluded central venous access devices. *J Clin Oncol.* 24:3056-3060.
- Physalix, M. 1922. *Animaux venimeux et venins*. Paris.
- Pu, X. C., P. T. Wong, and P. Gopalakrishnakone. 1995. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* 33:1425-1431.
- Pung, Y. F., S. V. Kumar, N. Rajagopalan, B. G. Fry, P. P. Kumar, and R. M. Kini. 2006. Ohanin, a novel protein from king cobra venom: its cDNA and genomic organization. *Gene* 371:246-256.
- Pung, Y. F., P. T. Wong, P. P. Kumar, W. C. Hodgson, and R. M. Kini. 2005. Ohanin, a novel protein from king cobra venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. *J Biol Chem* 280:13137-13147.
- Romero, F., M. A. Cunha, R. Sanchez, A. T. Ferreira, N. Schor, and M. E. Oshiro. 2007. Effects of arachnotoxin on intracellular pH and calcium in human spermatozoa. *Fertil.Steril.* 87:1345-1349.
- Sharma, S. K., F. Chappuis, N. Jha, P. A. Bovier, L. Loutan, and S. Koirala. 2004. Impact of snake bites and determinants of fatal outcomes in southeastern Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 71:234-238.
- Torres, A. M., R. M. Kini, N. Selvanayagam, and P. W. Kuchel. 2001. NMR structure of bucandin, a neurotoxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Biochem J* 360:539-548.

