

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 950211 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 950211

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 38/17
C07K 14/435

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 18.01.1995

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 18.01.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 20.07.1995

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

19.01.1994 US 184097

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, NY 10017, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •NPS Pharmaceuticals Inc., 420 Chipeta Way Salt Lake City, Utah, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Kelbaugh, Paul R., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Volkmann, Robert Alfred, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Saccomano, Nicholas A., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Huokosia muodostavia peptidejä Geolycosa riograndesta

Porbildande peptider från Geolycosa riogrande

Huokosia muodostavia peptidejä *Geolycosa riograndesta*

Tämä keksintö koskee *Geolycosa riogrande* -hämähäkin myrkyssä tavattavia polypeptidejä ja polypeptidejä, joilla on oleellisesti sama aminohapposekvenssi ja oleellisesti sama aktiivisuus kuin mainituilla polypeptideillä. Nämä polypeptidit ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat muodostavat huokosia solujen plasmamembraaniin ja ne ovat tehokkaita solujen solunsisäisten kalsiumionien mobilisoinniksi.

Yhdisteillä, jotka ovat huokostenmuodostajia, on erilaisia käyttöjä. Esimerkiksi huokosia muodostaville yhdisteille voi löytyä kliinistä käyttöä lääkkeiden kuljetuksessa, syövän kemoterapiassa (esim. immunokonjugaatit) ja immunoterapiassa (esim. immunokonjugaatit; komplementti- ja soluvälitteinen lyysi). Yhdisteillä, jotka mobilisoivat solunsisäisiä kalsiumioneja, on erilaisia käyttöjä, esimerkiksi solujen, kuten hermo- ja lihassolujen, fysiologian tutkimuksessa.

Tämä keksintö koskee polypeptidejä, joita tavataan *Geolycosa riogrande* -hämähäkin myrkyssä. Tämän keksinnön mukaiset polypeptidit ja fraktiot, joissa niitä esiintyy tämän keksinnön mukaan, ovat seuraavat.

Geolycosa-peptidillä 15a on aminohapposekvenssi, sekvenssi tunnusnro 1. *Geolycosa*-peptidillä 15b on aminohapposekvenssi tunnusnro 2. *Geolycosa*-peptidillä 17 on aminohapposekvenssi tunnusnro 3.

Tämän keksinnön mukaiset polypeptidit muodostavat huokosia solujen plasmamembraaniin ja mobilisoivat solujen solunsisäisiä Ca^{2+} -ioneja. Huokosmuodostuksen pääasiallinen biologinen seuraus on solulyysi. Täten tätä vaikutusta käyttävät terapeutit voivat löytää käyttöä sellaisilla alueilla kuten lääkkeen kuljetus, syövän kemoterapia (esim. immunokonjugaatit) ja immunoterapiassa (esim. immunokonjugaatit; komplementti- ja soluvälitteinen lyysi).

Samoin tämän keksinnön piiriin kuuluvat polypeptidit, joilla on oleellisesti sama aminohapposekvenssi ja oleellisesti sama huokosia muodostava ja/tai Ca^{2+} -ioneja mobilisoiva aktiivisuus kuin edellä kuvatuilla polypeptideillä.

Tämä keksintö koskee myös farmaseuttisia koostumuksia, jotka käsittävät mainittuja polypeptidejä, ja menetelmiä mainittujen polypeptidien antamiseksi.

Myrkkyä saadaan *Geolycosa riogrande* -hämähäkistä lypsämismenetelmällä sähköisesti stimuloimalla tavantomaisten menetelmien mukaan, jotka ovat alan ammattilaisille tuttuja. Edullisesti käytetty menetelmä on menetelmä, joka suojaa kokonaismyrkkyä kontaminaatiolta vatsan takaisin virtaamisella tai veri- ja imusuonistolla. Tällaiset menetelmät ovat alan ammattilaisille tuttuja. Näin saatu kokonaismyrkky varastoidaan jäädytettynä noin $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen käyttöönsä asti puhdistuksessa alla kuvatun mukaisesti. Kokonaismyrkyn aineosien puhdistaminen suoritetaan käänteisfaasikorkeapainenestekromatografisesti (HPLC) käyttäen erilaisia preparatiivisia ja puolipreparatiivisia kolonneja kuten C-4 ja C-18 Vydac[®] -kolonnit (Rainin Instrument Co. Inc., Mack Road, Woburn Massachusetts 01801). Piikkien detektio suoritetaan monokromattisesti 220 - 230 nm:ssä. Fraktioiden jatkoanalyysi voidaan suorittaa esimerkiksi polykromi-UV-tiedoilla, jotka kerätään Waters 990 -diodijärjestelydetektorilla (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757). Fraktiot kolonneista kerätään tunnetuilla menetelmillä kuten käyttämällä ISCO/"FOXY"-fraktiokerääjää ja ISCO 2159 -piikkidetektoria (ISCO, 4700 Superior, Lincoln, Nebraska 68504). Fraktiot kerätään sopivan kokoisiin astioihin, kuten steriilit polyetyleeniset laboratoriotarvikkeet. Fraktiot konsentroidaan sitten kylmäkuivaamalla eluaatista ja sitten kylmäkuivaamalla vedestä. Saatujen aineosafraktioiden puhtaus

voidaan sitten määrittää kromatografisella analyysillä käyttäen analyyttistä kolonnia, jossa on gradienttisysteemi, joka on isokraattisempi kuin fraktioiden lopullisessa puhdistuksessa käytetty systeemi.

5 Keksinnön mukaiset polypeptidit voidaan sekventoida tunnetuilla menetelmillä. Yleisstrategia primaarisen rakenteen määrittämiseksi sisältää esimerkiksi seuraavat vaiheet. 1) Peptidin kontrolloitu pilkkominen yksi- tai monivaiheisella entsymaattisella pilkkomisella/kemiallisella pilkkomisella. 2) Peptidifragmenttien eristäminen ja puhdistaminen käänteisfaasikorkeapainenestekromatografi-
10 sesti (HPLC). 3) Peptidifragmenttien karakterisointi N-pääsekventoinnilla ja ionisuihkumassaspektrometrisesti.

 Ottaen huomioon edun, joka saadaan tässä julkistetuilla peptideillä, joita tavataan *Geolycosa riogrande*-myrkyn fraktioissa 15a, 15b ja 17, on nyt mahdollista saada mainittuja peptidejä muilla menetelmillä kuin eristämällä/puhdistamalla kokonaismyrkkyä. Tämän keksinnön mukaiset polypeptidit voidaan tuottaa käyttämällä yhdistelmä-DNA-tekniikoita kloonamalla mainittujen polypeptidien koodaussekvenssi tai osia siitä. Esimerkiksi hybridisaatiokoettimia, jotka hyödyntävät mainittujen polypeptidien nyt tunnettua aminohapposekvenssi-informaatiota, voidaan käyttää alan ammattilaisille tutuilla menetelmillä
20 koodaussekvenssin polypeptidille kokonaisuudessaan kloonamiseksi. Yhdistelmä-DNA-tekniikoiden ja proteiinisynteesin *in vitro* -yhdistelmää voidaan myös käyttää tämän keksinnön mukaisten polypeptidien tuottamiseksi. Tällaisia *in vitro* -proteiinisynteesimenetelmiä ovat mainittuihin
25 kuitenkaan rajoittumatta ABI 430A- tai 433-kiinteäfaasipeptidisyntetisaattorin (Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, Kalifornia 94404) käyttö käyttäen tavanomaista Merrifield-kemialla tai muita alan ammattilaisille tuttuja kiinteäfaasikemioita.
30

Alalla tiedetään hyvin, että polypeptideihin voidaan tehdä tiettyjä aminohapposubstituutioita, jotka eivät vaikuta tai jotka oleellisesti eivät vaikuta mainittujen polypeptidien toimintaan. Mahdolliset täsmälliset substituutiot vaihtelevat polypeptidistä toiseen. Sallittujen substituutioiden määritys suoritetaan alan taitajille tutuilla menettelyillä. Täten kaikki polypeptidit, joilla on oleellisesti sama aminohapposekvenssi ja oleellisesti sama aktiivisuus, ovat tämän keksinnön piirissä.

10 Samoin tämän keksinnön piiriin kuuluvat tämän keksinnön mukaisten polypeptidin farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat. Tällaisia suoloja muodostetaan alan taitajille tutuilla menetelmillä. Esimerkiksi polypeptidien emässuoloja voidaan valmistaa tavanomaisilla menetelmillä.

15 Jos tämän keksinnön mukaista polypeptidiä on määrä antaa nisäkkäälle, se voidaan antaa yksinään tai yhdistettynä farmaseuttisesti hyväksyttäviin kantajiin tai laimentimiin farmaseuttisessa koostumuksessa tavanomaisen farmaseuttisen käytännön mukaan. Polypeptidit voidaan antaa
20 suun kautta tai ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti, jolloin polypeptideille edullinen antotie on ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti. Ruoansulatuskanavan ulkopuolinen anto käsittää laskimonsisäisen, lihaksensisäisen, vatsaontelon sisäisen, ihonalaisen ja paikallisen annon.

25 Tämän keksinnön mukaisen polypeptidin käyttämiseksi oraalisesti yhdiste voidaan antaa esimerkiksi tablettien tai kapselien muodossa, tai vesiliuoksena tai -suspensiona. Kun kyseessä ovat tabletit oraaliseen käyttöön, tavanomaisesti käytettyjä kantajia ovat laktoosi ja maissitärkkelys, ja voiteluaineita, kuten magnesiumstearaatti, lisätään tavanomaisesti. Oraalisen antoon kapselimuodossa
30 käyttökelpoisia laimentimia ovat laktoosi ja kuivattu maissitärkkelys. Tarvittaessa vesisuspensioita oraaliseen käyttöön aktiivinen aineosa yhdistetään emulgoiviin ja

suspendoiviin aineisiin. Haluttaessa voidaan lisätä tiettyjä makeutus- ja/tai flavoriaineita.

Lihaksensisäiseen, vatsaontelon sisäiseen, ihonalaiseen ja laskimonsisäiseen käyttöön valmistetaan tavallisesti aktiivisen ainesosan steriilejä liuoksia, ja liuosten pH tulisi sopivasti säätää ja puskuroida. Laskimonsisäiseen käyttöön liuenneiden aineiden kokonaispitoisuutta tulisi säädellä valmisteen tekemiseksi isotooniseksi.

Kun tämän keksinnön mukaista polypeptidiä tai sen suolaa käytetään ihmiskohteessa, hoitava lääkäri normaalisti määrää päivittäisen annostuksen. Lisäksi annostus vaihtelee yksittäisen potilaan iän, painon ja vasteen mukaan sekä potilaan oireiden vakavuuden ja annettavan nimenomaisen yhdisteen tehon mukaan.

Käytettäessä tämän keksinnön mukaista polypeptidiä tai sen suolaa solujen fysiologisessa tutkimisessa, mainittua polypeptidiä lisätään soluihin alan taitajille tuttujen menetelmien mukaan. Esimerkiksi mainittua polypeptidiä voidaan lisätä soluihin sopivassa fysiologisessa puskurissa. Tämän keksinnön mukaisen polypeptidin sopiva pitoisuus käyttöön tällaisissa tutkimuksissa on 1 μM . Kuitenkin mainitun polypeptidin pitoisuus tällaisissa tutkimuksissa voi olla suurempi tai paljon vähemmän kuin 1 μM . Lisättävän polypeptidimäärän määrittää alan taitaja hänelle tutuilla menetelmillä.

Geolycosa-peptidien 15a, 15b ja 17 kaksi biologista vaikutusta ovat (1) solujen lyysi huokosten muodostumisen plasmamembraaniin johdosta, ja (2) solunsisäisten Ca^{2+} -ionien mobilisaatio G-proteiinien aktivaation johdosta. Nämä molemmat vaikutukset ovat yhteisiä muille pienille emäksisille peptideille, kuten mastoparaani ja melittiini. Viimemainittujen peptidien tiedetään ottavan α -heeliksraakenteen membraaneissa ja arvellaan, että tämä sekundaarinen rakenteellinen konformaatio myötävaikuttaa suuresti

näiden proteiinien kykyyn muodostaa huokosia ja aktivoida G-proteiineja. *Geolycosa*-peptidien mahdollinen terapeut-
tinen merkitys seuraa näistä kahdesta vaikutuksesta.

Geolycosa riogrande -hämähäkin myrkystä eristetyt
5 esillä olevan keksinnön mukaiset kolme peptidiä nimeltä
Geolycosa 17, 15a ja 15b sisältävät lineaariset 25:n
(*Geolycosa* 17) tai 27:n (*Geolycosa* 15a ja 15b) aminohapon
sekvenssit, niistä puuttuu kysteiini ja ne sisältävät
runsaasti lysiiniä. Näiden peptidien kykyä mobilisoida
10 solunsisäistä Ca^{2+} :aa arvioitiin HL-60-soluissa, jotka oli
differentioitu dibutyryyli-cAMP:llä ja panostettu fura-
2:lla. Testattuina pitoisuuksina 0,5 - 2 μM kaikki kolme
peptidiä aiheuttivat nopeita ja ohimeneviä nousuja
[Ca^{2+}]_i:ssä, jotka säilyivät solunulkoisen Ca^{2+} :n puuttuessa
15 mutta salpautuivat, kun solujen Ca^{2+} -varannot tyhjennettiin
esikäsittelemällä ionomysiinillä. *Geolycosa* 15a, 15b ja 17
mobilisoivat siten solunsisäisiä Ca^{2+} -ioneja HL-60-soluis-
sa.

Hymenoptera-myrkystä eristettyjen pienten emäksis-
20 ten peptidien, kuten mastoparaani ja melittiini, on osoi-
tettu mobilisoivan solunsisäisiä Ca^{2+} -ioneja eri soluissa
vaikutuksella, johon saattaisi liittyä fosfolipaasi-C:hen
kytkettyjen yhden tai useamman G-proteiinin suora akti-
vaatio. Kuten mastoparaani ja melittiini *Geolycosa*-pepti-
25 dit 15a, 15b ja 17 samoin tekivät soluista läpäiseviä,
mikä todettiin etidymbromidin (EB) otosta. Kuten monien
muidenkin huokosten muodostajien vaikutus näiden peptidien
vaikutukset EB:n ottoon lisääntyivät, kun solunulkoisen
kaksivalenssisen kationin kokonaispitoisuus laski 0,1
30 nM:ään, ja inhiboituivat, kun solunulkoisen Mg^{2+} -pitoisuus
nostettiin 1:stä 5:een mM. Tehon suuruusjärjestys HL-60-
solujen läpäisevyyden aiheuttamisessa oli melittiini >
Geolycosa 15b > *Geolycosa* 17 = *Geolycosa* 15a > mastoparaa-
ni.

Geolycosa 17:n kykyä muodostaa huokosia membraaneissa testattiin T3-sidekudosmuodostussoluissa, lisäkilpirauhassoluissa ja differentioiduissa ja ei-differentioiduissa HL-60-soluissa. Huokosmuodostus määritettiin mittaamalla solujen läpäisevyys etidiumbromidille (EB, mp. 394). Geolycosa 17 -pitoisuudet yli 7,5 μM nostivat EB:n ottoa kaikissa testatuissa soluissa.

Solunsisäisten Ca^{2+} -ionien mobilisaatiosta johtuvat nousut $[\text{Ca}^{2+}]_i$:ssä inhiboi 20 tunnin esikäsitteily 100 ng:lla/ml hinkuyskätoksiinia (PTx). Aiempi altistuminen PTx:lle samoin salpasi solunulkoisen ATP:n indusoiman solunsisäisten Ca^{2+} -ionien mobilisaation.

Alhaiset Geolycosa 17 -pitoisuudet (1 - 3 μM), vaikkakin olivat tehokkaita solunsisäisten Ca^{2+} -ionien mobilisoinnissa, eivät aiheuttaneet suuria nousuja EB:n otossa 10 minuutin jälkeenkään. Sitä vastoin korkeampi Geolycosa 17 -pitoisuus (> 10 mM) aiheutti täydellisen läpäisevyyden 5 minuutissa.

Kaikissa suhteissa Geolycosa 15a käyttäytyi samoin kuin Geolycosa 17. Geolycosa 15a oli vielä vähemmän taipuvainen aiheuttamaan nousuja EB:n otossa solunsisäisten Ca^{2+} -ionien mobilisoinnissa tehokkaina pitoisuuksina.

Geolycosa 15b käyttäytyi samoin kuin Geolycosa 17 ja Geolycosa 15a ja aiheutti solusisäisen Ca^{2+} :n mobilisaation. Tapahtui vain vähän EB:n ottoa pitoisuuksissa, jotka todettiin tehokkaiksi solunsisäisen Ca^{2+} :n mobilisoinnissa, vaikka suuri EB:n otto saatiin hieman korkeammilla pitoisuuksilla. Geolycosa 15b vaikuttaa olevan noin kaksi kertaa niin tehokas kuin Geolycosa 15a ja Geolycosa 17, jotka ovat puolestaan noin kaksi kertaan tehokkaampia kuin mastoparaani. Pääasiallisen eron Geolycosa 15b:n vaikutusmekanismissa verrattuna kahteen muuhun Geolycosa-peptidiin paljasti PTx; esikäsitteily PTx:llä ei vaikuttanut Geolycosa 15b:llä indusoituun solunsisäisen Ca^{2+} :n mobilisaatioon.

Sekä mastoparaani että melittiini tekivät HL-60-soluista (ja erilaisista muista solutyypeistä) läpäiseviä EB:n otosta määritettynä. Melittiini on tehokkain (EC_{50} noin 250 nM) huokosmuodostuksen aiheuttamisessa. Sekä mastoparaani että melittiini aiheuttivat solunsisäisen Ca^{2+} :n mobilisaation differentioiduissa HL-60-soluissa. Mastoparaanilla indusoidun inhiboi esikäsittely PTx:llä, kun melittiinillä indusoitua se ei inhiboinut. Solunsisäistä Ca^{2+} :aa mobilisoivat mastoparaani- tai melittiinipitoisuudet aiheuttivat huomattavaa huokosmuodostusta. Täten vastoin kuin *Geolycosa*-peptideillä näillä peptideillä ei ollut mitään pitoisuusikkunaa, joka aiheuttaisi Ca^{2+} :n mobilisaatiota merkittävän huokosmuodostuksen puuttuessa.

Geolycosa-peptidit käyttäytyvät samalla tavalla kuin muut pienet emäksiset peptidit kyetessään aiheuttamaan huokosmuodostusta ja solunsisäisen Ca^{2+} :n mobilisaatiota. Kuitenkin kun mastoparaanin tai melittiinin synnyttämään solunsisäisen Ca^{2+} :n mobilisaatioon liittyy väistämättä merkittävä huokosmuodostus, *Geolycosa*-peptideillä synnytettyyn ei liity. Tämä viittaa siihen, että näiden peptidien kyky aiheuttaa Ca^{2+} :n mobilisaatiota ei suoraan liity niiden huokosia muodostavaan kapasiteettiin. Itse asiassa vaikka PTx salpaa *Geolycosa* 17:n, *Geolycosa* 15a:n ja mastoparaanin vaikutukset Ca^{2+} :n mobilisaatioon, se on vailla vaikutusta näiden peptidien indusoimaan huokosmuodostukseen.

Esimerkki 1

Geolycosa 17

Geolycosa riogrande -kokonaismyrkyn alustava fraktiointi suoritettiin seuraavasti.

Geolycosa riogrande -kokonaismyrkky, joka saatiin taholta NPS Pharmaceuticals, Inc., Salt Lake City, Utah 84108 ja joka oli varastoitu jäädytettynä noin -78 °C:ssa, sulatettiin ja siitä otettiin 10 - 60 µl:n määriä, jotka laimennettiin 200 µl:ksi ja panostettiin C-18 Vydac[®] -ko-

lonniin (22 mm x 250 mm, 300 Å:n huokoskoko, 10 µ:n partikkelikoko) ja eluoitiin käyttäen 15 ml:n/min virtausnopeutta ja liuotinsysteemiä käyttäen lineaarinen gradienttiohjelmaa 80 → 60 % A:ta ja 20 → 40 % B:tä 80 minuutissa, jolloin A on 0,1-%:inen trifluorietikkahapon (TFA) vesiliuos ja B on asetonitriili. Piikkien detektointi suoritettiin monokromaattisesti 220 - 230 nm:ssä ja fraktiot kerättiin ISCO/"FOXY"-fraktiokerääjällä ja käyttäen ISCO 2159 -piikkidetektoria. Fraktioita kerättiin aikavälillä 0 - 60 minuuttia. Fraktio 15 kerättiin noin 33,5 minuutin kohdalla ja fraktio 17 37,9 minuutin kohdalla.

Fraktion 17 aminohapposekvenssi identifioitiin (H-)-sekvenssiksi tunnusnro 3-(-NH₂) ja nimettiin *Geolycosa* 17:ksi, massaspektri m/z = 2 883.

Esimerkit 2 ja 3

Geolycosa 15a ja *Geolycosa* 15b

Fraktio 15 esimerkistä 1 edellä alافرaktioitiin seuraavasti.

Esimerkissä 1 kuvatus mukaisesti saatu fraktio 15 panostettiin Baker Bond Wide Pore Octadecyl -kolonniin (C-18, 4,6 mm x 250 mm, 300 Å:n huokoskoko, 5 µ:n partikkelikoko) ja eluoitiin siitä käyttäen virtausnopeutta 1,0 ml/min ja isokraattista liuotinsysteemiä 75 % A:ta, 25 % B:tä, jossa A on TFA:n 0,1-%:inen vesiliuos ja B on asetonitriili. Piikkidetektio suoritettiin käyttäen Waters 990 -diodijärjestelydetektoria ja fraktiokeräys suoritettiin kuten esimerkissä 1. Saatiin kaksi fraktiota; fraktio 15a kerättiin noin 30 minuutin kohdalla ja fraktio 15b kerättiin noin 32 minuutin kohdalla. Fraktiot 15a ja 15b, jotka käsittivät polypeptidejä, preparoitiin sitten sekventointia varten kylmäkuivaamalla eluaatista ja sitten kylmäkuivaamalla vedestä hyvin tunnettujen menettelyjen mukaan.

Fraktioiden 15a ja 15b alkyloidun polypeptidin aminohappoanalyysi saatiin käyttäen Waters Pico-Tag -me-

netelmää valmistajan spesifikaatioiden mukaan. Sekvenssi-
tiedot kerättiin valmistajan Applied Biosystems malli 470A
-proteiini/peptidisekventoijalla (Applied Biosystems,
Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, Kalifornia
5 94404) käyttäen vesi-TFA-konversiota. Saadut fenyyli-
tiohydantoiiniaminohapot analysoitiin on line Applied
Biosystems sin malli 120A PTH -analysaattorilla tai off line
käyttäen DuPont Zorbax PTH -kolonnia (Biomedical Product
Department Chromatography Products, E.I. duPont de Nemours
10 and Co., Inc., 1007 Market Street, Wilmington, Delaware
19898). Fraktion 15a aminohapposekvenssiksi identifioitiin
(H-)-sekvenssi tunnusno 1-(-OH) ja se nimettiin *Geolycosa*
15a:ksi, massaspektri $m/z = 3\ 142$. Fraktion 15b aminohap-
posekvenssiksi identifioitiin (H-)-sekvenssi tunnusno
15 2-(-OH) ja se nimettiin *Geolycosa* 15b:ksi, massaspektri
 $m/z = 3\ 279$.

Sekvenssiluettelo

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Pfizer Inc (non-U.S.)

NPS Pharmaceuticals, Inc. (non-U.S.)

5 Volkmann, Robert A. (U.S. only)

Kelbaugh, Paul R. (U.S. only)

Saccomano, Nicholas A. (U.S. only)

(ii) TITLE OF INVENTION: PORE FORMING PEPTIDES FROM GEOLYCOSA
RIOGRANDE

10 (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Pfizer Inc Patent Department (20th Fl)

(B) STREET: 235 East 42nd Street

(C) CITY: New York

15 (D) STATE: NY

(E) COUNTRY: USA

(F) ZIP: 10017-5755

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

20 (B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(vi) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US 08/184097

25 (B) FILING DATE: 19-JAN-1994

(vii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Zielinski, Bryan C.

(B) REGISTRATION NUMBER: 34,462

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: PC8167ABCD

30 (iix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (212) 573-4585

(B) TELEFAX: (212) 573-1939

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

35 (A) LENGTH: 27 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

40 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Geolycosa riogrande

(F) TISSUE TYPE: venom

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

Lys Ile Lys Trp Leu Lys Ala Met Lys Ser Ile Ala Lys Phe Ile Ala
 1 5 10 15
 Lys Lys Gln Met Lys Lys His Leu Gly Gly Glu
 5 20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 27 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Geolycosa riogrande*

(F) TISSUE TYPE: venom

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

Lys Ile Lys Trp Phe Lys Thr Met Lys Ser Ile Ala Lys Phe Ile Ala
 1 5 10 15
 Lys Glu Gln Met Lys Lys His Leu Lys Gly Glu
 20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 25 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Geolycosa riogrande*

(F) TISSUE TYPE: venom

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

Ile Trp Leu Thr Ala Leu Lys Phe Leu Gly Lys Asn Ala Ala Lys His
 1 5 10 15
 Phe Ala Lys Arg Gln Leu Ser Lys Leu
 35 20 25

Patenttivaatimukset:

1. Oleellisesti puhdas polypeptidi, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää aminohapposekvenssin, sek-
5 venssi tunnusnro 1, tai polypeptidi, jolla on oleellisesti
sama aminohapposekvenssi ja oleellisesti sama huokosia
muodostava aktiivisuus kuin mainitulla polypeptidillä, tai
mainittujen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen oleellisesti
10 puhdas polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että sen
aminohapposekvenssi on sekvenssi tunnusnro 1, tai sen
farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

3. Menetelmä huokosten muodostamiseksi soluun,
t u n n e t t u siitä, että mainittuun soluun lisätään
15 huokosia muodostava määrä patenttivaatimuksen 1 mukaista
polypeptidiä.

4. Oleellisesti puhdas polypeptidi, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää aminohapposekvenssin, sek-
venssi tunnusnro 2, tai polypeptidi, jolla on oleellisesti
20 sama aminohapposekvenssi ja oleellisesti sama huokosia
muodostava aktiivisuus kuin mainitulla polypeptidillä, tai
mainittujen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen oleellisesti
puhdas polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että sen
25 aminohapposekvenssi on sekvenssi tunnusnro 2, tai sen
farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

6. Menetelmä huokosten muodostamiseksi soluun,
t u n n e t t u siitä, että mainittuun soluun lisätään
huokosia muodostava määrä patenttivaatimuksen 4 mukaista
30 polypeptidiä.

7. Oleellisesti puhdas polypeptidi, t u n n e t t u
siitä, että se käsittää aminohapposekvenssin, sekvenssi
tunnusnro 3, tai polypeptidi, jolla on oleellisesti sama
aminohapposekvenssi ja oleellisesti sama huokosia muodos-

tava aktiivisuus kuin mainitulla polypeptidillä, tai mainittujen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

5 8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen oleellisesti puhdas polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että sen aminohapposekvenssi on sekvenssi tunnusro 3, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

10 9. Menetelmä huokosten muodostamiseksi soluun, t u n n e t t u siitä, että mainittuun soluun lisätään huokosia muodostava määrä patenttivaatimuksen 7 mukaista polypeptidiä.



Missing part