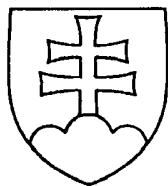


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

103-95

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/435,
A 61 K 38/17

- (22) Dátum podania: 10.06.93
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 07/919 538
(32) Dátum priority: 27.07.92
(33) Krajina priority: US
(43) Dátum zverejnenia: 07.06.95
(86) Číslo PCT: PCT/US93/05392, 10.06.93

(71) Prihlasovateľ: PFIZER Inc., New York, NY, US;
NPS Pharmaceuticals, Inc, Salt Lake City, UT, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Volkmann Robert A., Mystic, CT, US;
Saccomano Nicholas A., Ledyard, CT, US;
Phillips Douglas, Cales Ferry, CT, US;
Kelly Mary E., Groton, CT, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Polypeptid a jeho použitie**

(57) Anotácia:
Polypeptid so sekvenciou aminokyselín zodpovedajúci SEQ ID NO: 1 H₂N-Glu-Ala-Cys-Ala-Gly-Ala-Tyr-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys-Val-Lys-Cys-Cys-His-Asp-Arg-Arg-Cys-Arg-Cys-Asn-Ile-Ala-Met-Asp-Asn-Cys-Val-Cys-Lys-Leu-Phe-Tyr-Cys-Glu-Leu-Phe-Gly-Thr-Cys-Asp-Arg-Leu-Lys-Pro a farmaceuticky vhodné soli blokujú vápnikové kanáliky v bunkách, vrátane neurónových a svalových buniek rôznych organizmov vrátane bezstavcov a stavovcov. Opísaná je izolácia uvedeného polypeptidu z jedu pavúka *Agelenopsis aperta* a sekvenovanie polypeptidu.

Polypeptid a jeho použitie

Oblasť techniky

Vynález sa týka polypeptidu, ktorý je obsiahnutý v jedu pavúka *Agelenopsis aperta* a polypeptidu, ktorý má v podstate rovnakú sekvenciu aminokyselín a v podstate rovnakú účinnosť ako polypeptid uvedený hore. Tieto polypeptidy a ich farmaceuticky vhodné soli blokujú vápnikové kanálky v bunkách, vrátane neurónových a svalových buniek rôznych organizmov vrátane bezstavovcov a stavovcov. Vynález sa tiež týka aplikácie týchto polypeptidov a ich solí pre blokovanie vápnikových kanálikov v bunkách, ako sú bunky nervového a svalového systému organizmov a ďalej tiež využitia tejto aplikácie pri liečbe chorôb a stavov cicavcov, ktoré sú sprostredkované vápnikovými kanálkami a pri potlačovaní bezstavcových škodcov. Vynález sa tiež týka prostriedkov obsahujúcich tieto polypeptidy a ich soli.

Doterajší stav techniky

Zlúčeniny, ktoré sú účinné ako antagonisti vápnika, nachádzajú rôzne aplikácie. Dajú sa použiť pri liečbe takých stavov a chorôb, ako je mi. angína, hypertenzia, kardiomyopatia, supraventrikulárna arytmia, aesophogeálna achalázia, predčasná príprava k pôrodu a Raynaudova choroba (viď W. G. Nayler, *Calcium Antagonists*, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, New York, NY 1988). Hore uvedená publikácia je tu uvedená náhradou za prenesenie celého jej obsahu do popisu tohto vynálezu. Tieto zlúčeniny sú ďalej užitočné pri štúdiu fyziológie takých buniek, ako sú neuróny a svalové bunky.

Iné polypeptidy izolované z *Agelenopsis aperta* sú zverejnené v US patente č. 5 122 596.

Podstata vynálezu

Ako už bolo uvedené hore, týka sa vynález poly-peptidu, ktorý je obsiahnutý v jedu pavúka *Agelenopsis aperta*. Polypeptid a frakcia, v ktorej je prítomný, podľa vynálezu, sú charakterizované ďalej.

Peptid J₂ *Agelenopsis* má nasledujúcu sekvenciu aminokyselín (SEQ ID NO: 1)

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

Polypeptid podľa vynálezu blokuje vápnikové kanálky v bunkách. V dôsledku toho je tento polypeptid užitočný pri blokovaní vápnikových kanálikov v bunkách, ako takom, a tiež je užitočný pri potlačovaní bezstavcových škodcov a pri liečbe chorôb a stavov cicavcov, ktoré sú sprostredkované funkciou vápnikových kanálikov v bunkách.

Do rozsahu vynálezu spadajú tiež polypeptidy, ktoré majú v podstate rovnakú sekvenciu aminokyselín a v podstate rovnakú účinnosť pri blokovaní vápnikových kanálikov, ako polypeptid opísaný hore.

Predmetom vynálezu sú tiež farmaceutické prostriedky obsahujúce hore uvedené polypeptidy a spôsoby podávania týchto polypeptidov.

Nasleduje podrobný popis tohto vynálezu.

Jed sa získava odberom z pavúka *Agelenopsis aperta* po jeho elektrickej stimulácii v zhode s štandardnými

postupmi, ktoré sú odborníkom v tomto odbore známe. Prednostne sa používajú postupy, ktoré zaručujú, že nedôjde ku kontaminácii jedu abdominálnym regurgitantom (vratným prúdom) alebo hemolymfou. Také postupy sú odborníkom v tomto odbore dobre známe. Takto získaný celý jed sa uskladňuje v zmrazenom stave pri teplote asi -78°C až do jeho použitia pri purifikácii opísanej ďalej. Purifikácia zložiek z celého jedu sa vykonáva vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) s reverznými fázami na rôznych preparatívnych alebo semipreparatívnych stĺpcoch, ako je stĺpec C-4 a C-18 Vydac^(R) (Rainin Instrument Co. Inc., Mack Road, Woburn, Massachusetts 01801, USA). Detekcia pikov sa vykonáva monochromaticky pri 220 až 230 nm. Ďalšia analýza frakcií sa napríklad môže uskutočniť na základe polychrómnych UV dát získaných pomocou detektoru so sústavou diód (Waters 990) (Millipore Corporation Waters Chromatography Division, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757, USA). Frakcie zo stĺpcov sa zberajú známymi postupmi, ako napríklad pri použití zberače frakcií ISCO/"FOXY" a pikového detektoru ISCO 2159 (ISCO, 4700 Superior, Lincoln, Nebraska, 68504, USA). Frakcie sa zberajú do nádob vhodnej veľkosti, napríklad do sterilných polyetylénových laboratórnych nádob. Skoncentrovanie frakcií sa potom vykoná lyofilizáciou z eluátu, po ktorej nasleduje lyofilizácia z vody. Čistota výsledných zložkových frakcií sa potom môže stanoviť chromatografickou analýzou pri použití analytického stĺpca s gradientovým systémom, ktorý je izokratičtejší než systém použitý pri finálnej purifikácii týchto frakcií.

Polypeptid podľa vynálezu je možné známymi metódami sekvenovať. Všeobecná stratégia pre stanovenie základnej štruktúry zahŕňa napríklad tieto stupne:

- 1) Redukcia a S-pyridylácia disulfidom premostených

cysteínových zvyškov za účelom zvýšenia susceptibility substrátu k enzymatickému napadnutiu,

2) Regulované jednostupňové alebo viacstupňové štiepenie peptidu enzýmom.

3) Izolácia a purifikácia fragmentov peptidu vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) s reverznými fázami.

4) Charakterizácia fragmentov peptidu pomocou N-terminálneho sekvenovania a hmotnostnej spektrometrie "ion-spray".

S-pyridyletylácia cysteínových zvyškov študovaných polypeptidov sa napríklad môže vykonávať v roztoku a po tejto operácii nasleduje sekvenovanie polypeptidov. Jeden zo spôsobov S-pyridyletylácie, ktorý je možné použiť, je opísaný ďalej.

Asi 1 až 10 μg polypeptidu sa rozpustí v 50 μl tlmivého roztoku pripraveného zmiešaním 1 dielu 1M TrisHCl s pH 8,5 s obsahom EDTA (4mM) a 3 dielov 8M hydrochloridu guanidínu, alebo sa týmto tlmivým roztokom na objem 50 μl zriedi. Pridá sa 2,5 μl 10% vodného 2-merkaptoetanolu a zmes sa inkubuje pri teplote miestnosti v temne pod argónovou atmosférou 2 hodiny. Po inkubácii sa pridajú 2 μl 4-vinylpyridínu (čerstvé reakčné činidlo skladované pod argónovou atmosférou pri -20°C) a výsledná zmes sa ďalšie 2 hodiny inkubuje pri teplote miestnosti v temne pod argónovou atmosférou. Potom sa zmes odsolí, prednostne chromatograficky na krátkom stĺpci s reverznými fázami. Získaný alkylovaný polypeptid sa potom známymi metódami sekvenuje.

Vďaka vynálezu, ktorý je charakterizovaný v tomto popise, sa peptid prítomný vo frakcii J₂ jedu z *Agelenopsis aperta* môže získať tiež inými metódami ako izoláciou a purifikáciou z celého jedu. Polypeptidy podľa vynálezu je teda tiež možné vyrobiť pri použití rekombinantných DNA techník pomocou klonovania kódujúcej sekvencie pre tieto polypeptidy alebo ich časti. Tak napríklad je možné, s využitím informácie so známou sekvenciou aminokyselín týchto polypeptidov, použiť hybridizačné sondy pre klonovanie kódujúcej sekvencie pre celý polypeptid, čo sa vykonáva spôsobmi dobre známymi odborníkom v tomto odbore. Pri výrobe polypeptidov podľa vynálezu sa tiež môžu použiť kombinácie rekombinantných DNA techník s in vitro syntézou proteínu. Ako neobmedzujúci príklad metódy in vitro syntézy proteínu je možné uviesť metódu uskutočňovanú v syntetizátore peptidov v pevnej fáze ABI 430A (Applied Biosystems Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404, USA), pri ktorej sa používa štandardná Merrifieldova chémia alebo iné chémie pre postup v pevnej fáze, ktoré sú dobre známe odborníkom v tomto odbore.

V tomto odbore je dobre známe, že v polypeptidoch je možné vykonávať určité substitúcie aminokyselín, ktoré neovplyvňujú alebo v podstate neovplyvňujú funkcie týchto polypeptidov. Špecifické substitúcie, ktoré sú možné, sa menia od polypeptidu k polypeptidu. Stanovenie prípustných substitúcií sa uskutočňuje postupmi, ktoré sú v tomto odbore dobre známe. Do rozsahu tohto vynálezu teda spadajú všetky polypeptidy, ktoré majú v podstate rovnakú sekvenciu aminokyselín a v podstate rovnakú účinnosť pri blokovaní vápnikových kanálikov.

Polypeptidy podľa vynálezu blokujú vápnikové kanálky obsiahnuté v rôznych bunkách, ako sú napríklad bunky nervového systému a svalového systému bezstavovcov a stavovcov.

Schopnosť polypeptidov podľa vynálezu blokovať vápnikové kanálky je možné demonštrovať nasledujúcim postupom. Z cerebela osem denných potkanov sa získajú cerebelárne granulórné bunky (Wilkin et al., Brain Res., 115, 181 až 199, 1976). Štvorce (1 cm^2) z Aclaru (Proplastics Inc., 5033 Industrial Ave., Wall, NJ, 07719, USA) sa potiahnu poly-L-lyzínom a umiestnia do 12-jamkových misiek obsahujúcich 1 ml Eaglova bazálneho média. Bunky sa disociujú a do každej jamky obsahujúcej štvorec Aclaru sa pridá alikvótna časť obsahujúca $6,25 \times 10^6$ buniek. Po 24 hodinách sa pridá cytozín-beta-D-arabínofuranozid (koncová koncentrácia $10\mu\text{M}$). Bunky sa používajú pre fura2 analýzu u 6-, 7- a 8-dennej kultúry. Bunky (pripojené k Aclarovým štvorcom) sa prevedú do 12-jamkovej misky obsahujúcej 1 ml $2\mu\text{M}$ fura2/AM (Molecular Probes Inc., Eugene, OR 97402, USA) v tlmivom roztoku HEPES (s obsahom hovädzieho sérového albumínu 0,01 % a dextrózy 0,01 %; pH 7,4, bez horčíka). Bunky sa inkubujú počas 40 minút pri 37°C a potom sa tlmivý roztok obsahujúci fura2/AM odstráni a nahradí 1 ml rovnakého tlmivého roztoku bez fura2/AM. Do kyvety z kremenného skla sa predloží 2,0 ml predhriateho (37°C) tlmivého roztoku. Do kyvety sa pridajú bunky na Aclaru, kyveta sa vloží do termostatovaného (37°C) držiaku vybaveného magnetickým miešadlom a pomocou fluorescenčného spektrofotometru (Biomedical Instrument Group, University of Pennsylvania, USA) sa merí fluorescencia. Fluorescenčný signál sa nechá stabilizovať asi 2 minúty. Potom sa do kyvety pridá 5 až 20 μl rezervného roztoku študovanej zlúčeniny v roztoku chloridu sodného tlmeného fosforečnanom (PBS, pH 7,4) s vhodnou koncentráciou. Kalibrácia fluorescenčných signálov a oprava úniku fura2/AM sa vykonáva zavedenými postupmi (Nemeth et al., J. Biol. Chem. 262, 5188 (1987)) na záver každej skúšky. Maximálna hodnota fluorescencie (F_{max}) sa stanoví prídavkom iónomycínu ($35\mu\text{M}$) a minimálna hodnota (F_{min}) sa stanoví nasledujúcim prídavkom EGTA ($12\mu\text{M}$) za účelom chelatizácie vápnika. Pri použití hore opísaného

postupu sa zistí, že dochádza k blokovaniu vápnikových kanálikov študovaným polypeptidom, čo sa prejaví poklesom fluorescencie po pridaní tohto polypeptidu. Pri tejto skúške vykazuje polypeptid podľa tohto vynálezu nízke hodnoty IC_{50} , pod 200 nm, pri blokovanií vápnikových kanálikov.

Pre porovnanie je možné uviesť, že dva známe obchodne dostupné antagonisti vápnikových kanálikov, Nifedipine a Verapamil, vykazujú hodnotu IC_{50} 33 nm a 4 800 nm.

Polypeptidy podľa tohto vynálezu sú užitočné pri blokovanií vápnikových kanálikov v bunkách, ako takom. Vďaka tomu sú polypeptidy tiež užitočné pri potlačovaní bezstavcových škodcov a pri liečbe chorôb a stavov sprostredkovaných funkciou vápnikových kanálikov v bunkách cicavcov, ako je mi. angína, hypertenzia, kardiomyopatia, supraventrikulárna arytmia, aesophageálna achalázia, predčasná príprava k pôrodu a Raynaudova choroba. Ďalej sú tieto polypeptidy užitočné pri štúdiu fyziológie buniek, pričom ako neobmedzujúce príklady buniek prichádzajúcich do úvahy, je možné uviesť bunky nervového a muskulárneho systému.

Do rozsahu tohto vynálezu spadajú tiež farmaceuticky vhodné soli polypeptidov podľa vynálezu. Tieto soli sa vyrábajú spôsobmi, ktoré sú v tomto odbore známe. Tak napríklad soli polypeptidov s bázami je možné vyrobiť konvenčnými metódami.

Pri podávaní polypeptidov podľa vynálezu cicavcom je možné tieto látky podávať buď samotné alebo v kombinácii s farmaceuticky vhodnými nosičmi alebo riedidlami, v podobe farmaceutických prostriedkov, ako je to obvyklé v štandardnej farmaceutickej praxi. Polypeptidy je možné podávať orálne alebo parenterálne, pričom parenterálnemu spôsobu podávania sa venuje prednosť. Parenterálne podávanie zahŕňa

intravenózne, intramuskulárne, intraperitoneálne, subkutánne a topické podávanie.

Pokiaľ sa polypeptidy podľa vynálezu podávajú orálne, môžu sa na tieto účely používať prostriedky vo forme tabliet alebo kapsúl alebo vodných roztokov alebo suspenzií. Ako vhodné nosiče, ktoré sa obyčajne používajú v tabletách pre orálne podávanie, je možné uviesť laktózu a kukuričný škrob. Ďalej sa k takým tabletám pridávajú obyčajne lubrikačné činidlá, ako je stearan horečnatý. Ako vhodné riedidlá pre prípravky v podobe kapsúl je možné uviesť laktózu a sušený kukuričný škrob. Pokiaľ sa majú vyrobiť vodné suspenzie pre orálne podávanie, mieša sa účinná prísada s emulgačnými a suspenznými činidlami. Keď je to žiadúce, môžu sa tiež pridávať určité sladidlá a/alebo aromatizačné látky.

Pre intramuskulárne, intraperitoneálne, subkutánne a intravenózne podávanie sa môžu vyrábať sterilné roztoky účinnej príslady. Hodnota pH týchto roztokov sa účelne nastavuje alebo tlmí. Pri roztokoch určených pre intravenózne podávanie je potrebné dbať o nastavenie celkovej koncentrácie rozpustených látok, aby bol prípravok izotonický.

Pokiaľ sa polypeptid alebo jeho soľ podľa vynálezu bude podávať humánnemu pacientovi, stanoví dennú dávku obyčajne ošetrojúci lekár. Dávkovanie bude závislé od veku, hmotnosti a odpovedi konkrétneho pacienta a od závažnosti symptómov choroby a účinnosti podávanej zlúčeniny.

Pokiaľ sa polypeptid alebo jeho soľ podľa vynálezu bude používať pri potlačovaní bezstavových škodcov, bude sa týmto bezstavovcom podávať polypeptid priamo alebo sa bude aplikovať na prostredie, v ktorom sa bezstavovci vyskytujú. Tak napríklad sa môže zlúčenina podľa vynálezu aplikovať na bezstavovce vo forme postreku roztokom tejto zlúčeniny.

Množstvo zlúčeniny potrebné pre potlačenie bezstavovcov sa bude meniť v závislosti od druhu bezstavovcov a podmienok prostredia. Toto množstvo stanoví osoba vykonávajúca aplikáciu.

Pokiaľ sa polypeptid alebo jeho soli podľa vynálezu budú používať pri štúdiu fyziológie buniek, bude sa tento polypeptid podávať bunkám metódami, ktoré sú známe odborníkom v tomto odbore. Polypeptid je napríklad možné bunkám podávať vo vhodnom fyziologickom tlmivom roztoku. Vhodná koncentrácia polypeptidu podľa vynálezu pri použití v takých štúdiách je $200\mu\text{M}$. Koncentrácia polypeptidu pri týchto štúdiách však môže byť i vyššia alebo podstatne nižšia než $200\mu\text{M}$. Množstvo podávaného polypeptidu stanoví odborník v tomto odbore známymi metódami.

Vynález je bližšie objasnený v nasledujúcich príkladoch uskutočňovania. Tieto príklady majú výhradne ilustratívny charakter a rozsah vynálezu v žiadnom ohľade neobmedzujú.

Príklady predvedenia vynálezu

P r í k l a d 1

A. Surový jed z *Agelenopsis aperta* (asi $40\mu\text{l}$) sa nanesie na stĺpec HPLC s reverznými fázami [VYDAC^(R) C-18, $300\text{ \AA}$ (30 nm), $22 \times 250\text{ mm}$], ktorý sa uskutočňuje pri použití programu s dvojfázovým lineárnym gradientom od zloženia 95 % zložky A a 5 % zložky B do zloženia 80 % zložky A a 20 % zložky B (30 minút) a ďalej do zloženia 30 % zložky A a 70 % zložky B (25 minút), kde zložkou A je 0,1% kyselina tri-fluóroctová a zložkou B je acetonitril, pričom detekcia sa vykonáva pri 220 nm a prietoková rýchlosť je 15 ml/min . Požadovaná frakcia sa zberá v dobe v rozmedzí od 38,3 do 38,7 minúty. Rovnaké frakcie z rôznych pokusov sa spoja a skoncentrujú lyofilizáciou.

B. Látka získaná frakcionáciou podľa stupňa A. (z 100 μ l surového jedu) sa nanesie na stĺpec HPLC s reverznými fázami [VYDAC^(R) C-18, 300 Å (30 nm), 22 x 250 mm], ktorý sa uskutočňuje pri použití programu s lineárnym gradientom od zloženia 77 % zložky A a 23 % zložky B do zloženia 70 % zložky A a 30 % zložky B (25 minút), kde zložkou A je 0,1% kyselina trifluóroctová a zložkou B je acetonitril, pričom detekcia sa vykonáva pri 220 nm a prietoková rýchlosť je 12 ml/min. Požadovaná frakcia sa zberá v dobe v rozmedzí od 17,3 do 17,7 minúty. Rovnaké frakcie z rôznych pokusov sa spoja a skoncentrujú lyofilizáciou.

Štruktúra peptidu J₂ sa stanoví a overí nasledujúcimi metódami. Vykoná sa analýza aminokyselín PTC pri použití 1 až 10 nmol (3 x) pomocou systému Waters Pico-Tag. N-terminálne sekvenovanie sa vykoná v pulznom kvapalinovom sekvenátore (ABI) ako na natívnom, tak na redukovanom/pyridyletylovanom peptide. Základná štruktúra polypeptidu sa zistí pri použití automatizovaného pulzného kvapalinového sekvenátora (Applied Biosystems, model 473A). Údaje hmotnostnej spektrálnej analýzy sa získajú z hodnôt doby desorpcie plazmy BIO-ION pri použití hmotnostného spektrometru (flight mass).

Pyridyletylovaný derivát peptidu J₂, ktorý sa hodí pre N-terminálne sekvenovanie, sa vyrobí nasledujúcim spôsobom. Peptid J₂ (50 mg) sa rozpustí v 10 μ l tlmivého roztoku (zmes 1M Tris, pH 8,4, 4 μ M EDTA-dvojsýtnej a 8M hydrochloridu guanidínu v pomere 1 : 3) a k vzniknutému roztoku sa pridajú 2 μ l 0,454M (10% - objemovo) roztoku 2-merkaptoetanolu v tlmivom roztoku, potom sa vzniknutá zmes 3 hodiny udržiava pri teplote miestnosti v temne. Potom sa k reakčnej zmesi pridajú 2 μ l 0,456M roztoku 4-vinylpyridínu v tlmivom roztoku a zmes sa 18 hodín udržiava v temne pri teplote mies-

tnosti. Vzniknutá reakčná zmes sa zriedi 90 µl vody a 40 µl acetonitrilu a naniesie na stípec HPLC (Baker WPC-18, 4,6 x 250 mm), ktorý sa uskutočňuje pri použití programu s dvoj-fázovým lineárnym gradientom. Najprv sa pracuje pri zložení 80 % zložky A a 20 % zložky B (5 minút), potom sa zloženie mení od zloženia 80 % zložky A a 20 % zložky B do zloženia 50 % zložky A a 50 % zložky B (30 minút), kde zložkou A je 0,1% kyselina trifluóroctová a zložkou B je acetonitril, pričom detekcia sa vykonáva pri 220 nm a prietoková rýchlosť je 1,0 ml/min. Požadovaná frakcia sa zberá v dobe v rozmedzí od 20,8 do 21,3 minúty a skoncentruje sa lyofilizáciou.

Zistené údaje spoločne potvrdzujú štruktúru peptidu J₂, ktorá je charakterizovaná ďalej.

SEQ ID NO: 1, 48 zvyškov, 10 cysteínov, 5 disulfidových väzieb
Vypočítaná molekulová hmotnosť = 5474,4
Nalezená molekulová hmotnosť = 5474
Odhadnutý pI = 7,98

Záznam o sekvencii

(1) Všeobecné informácie

(i) PRIHLASOVATEĽ

- (A) MENO: Pfizer Inc.
- (B) ULICA: 235 East 42nd Street
- (C) MESTO: New York
- (D) ŠTÁT: New York
- (E) KRAJINA: USA
- (F) POŠTOVÉ SMEROVACIE ČÍSLO (ZIP): 10017
- (G) TELEFÓN: (203) 441-4905
- (H) TELEFAX: (203) 441-5221

- (A) MENO: NPS Pharmaceuticals, Inc.
- (B) ULICA: 420 Chipeta Way
- (C) MESTO: Salt Lake City
- (D) ŠTÁT: Utah
- (E) KRAJINA: USA
- (F) POŠTOVÉ SMEROVACIE ČÍSLO (ZIP): 84108
- (G) TELEFÓN: (801) 583-4939
- (H) TELEFAX: (801) 583 4961

(ii) NÁZOV VYNÁLEZU: Polypeptid z Agelenopsis
Aperta blokujúci vápnikové kanálky

(iii) POČET SEKVENCII: 1

(iv) STROJNE ČITATEĽNÁ FORMA:

- (A) TYP NOSIČA: floppy disk
- (B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilný
- (C) OPERAČNÝ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0,
verzia # 1.25 (EPO)

(vi) ÚDAJE O PREDOSLEJ PRIHLÁŠKE:

- (A) ČÍSLO PRIHLÁŠKY: US 07/919538
- (B) DÁTUM PODANIA: 27. júli 1992

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 48 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) REĹAZOVOSŤ: jednoduchá
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: proteín

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Agelenopsis aperta

(F) TYP TKANIVA: jed

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 1:

Glu Ala Cys Ala Gly Ala Tyr Lys Ser Cys Asp Lys Val Lys Cys
1 5 10 15

Cys His Asp Arg Arg Cys Arg Cys Asn Ile Ala Met Asp Asn Cys
 20 25 30

Val Cys Lys Leu Phe Tyr Cys Glu Leu Phe Gly Thr Cys Asp Arg
 35 40 45

Leu Lys Pro

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. V podstate čistý polypeptid so sekvenciou aminokyselín zodpovedajúci SEQ ID NO: 1

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

alebo polypeptid s v podstate rovnakou sekvenciou aminokyselín a v podstate rovnakou účinnosťou pri blokovaní vápnikových kanálikov, ako má hore uvedený polypeptid, a ich farmaceuticky vhodné soli.

2. V podstate čistý polypeptid podľa nároku 1 so sekvenciou aminokyselín zodpovedajúci SEQ ID NO: 1 alebo jeho farmaceuticky vhodná soľ.

3. Spôsob blokovania vápnikových kanálikov v bunke, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa tejto bunke podá polypeptid podľa nároku 1 v množstve blokujúcom vápnikové kanálky.

4. Spôsob podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že bunka sa nachádza v nervovom systéme cicavca.