

3117 / 93

KÖZZÉTETELI PÉLDANY

1335

RK MÉRGESEN TALÁLHATÓ

ELIARASA THERAPHOSIDAE APHONOPELMA ~~BREDET~~ KALCIUMCSATORNA GÁTLÓ

POLYPEPTIDEK ~~ELKÉPZÉSE~~

6075

Pfizer Inc., New York, N.Y. és

NPS Pharmaceuticals, Inc., Salt Lake City, Utah;

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1993. 11. 02.

Elsőbbsége: 1992. 11. 03.

ST
(973,323)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

K I V O N A T

A Theraphosidae aphonopelma pók mérgéből izolált polipeptidek különböző organizmusok sejtjeiben kalciumcsatorna gátló hatással bírnak, alkalmasak önmagukban sejtben kalciumcsatorna gátlásra, valamint kalciumcsatorna által közvetített betegségek és állapotok kezelésére, továbbá gerinctelen rovarok szabályozására. A találmány tárgyát a fenti, és azzal lényegében azonos aminosavszekvenciával és lényegében azonos aktivitással bíró polipeptidek ^{előállítására} képezik.

Gwald

13335

A

65075

Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

~~B u d a p e s t~~

3117/93 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

NSZOK 15100
A61K 37102

PLK NIPRUBEN TALLHAT

ELIARAS A

THERAPHOSIDAE APHONOPELMA EREDETI KALCIUMCSATORNA GÁTLÓ

POLIPEPTIDEK FOLYKONTHATÓ

Pfizer Inc., New York, N.Y. és

NPS Pharmaceuticals, Inc., Salt Lake City, Utah,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók:

VOLKMANN, Robert A., Mystic, Conn.,

SACCOMANO, Nicholas A., Ledyard, Conn.,

NASON II, Deane M., Norwich, Conn.,

PHILLIPS, Douglas, Gales Ferry, Conn.,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1993. 11. 02.

Elsőbbsége: 1992. 11. 03. (973,323)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány tárgyát a Theraphosidae aphonopelma pók mérgében található polipeptidek képezik, valamint olyan polipeptidek, amelyek ezzel lényegében azonos aminosavszekvenciával bírnak, és lényegében ezzel azonos aktivitásúak. Ezek a polipeptidek és gyógyászati szempontból megfelelő sóik kalciumcsatorna gátló hatással bírnak sejtekben, köztük különböző szervezetek, köztük gerincesek és gerinctelenek ideg- és izomsejtjeiben. A találmány tárgyát képezi ezen polipeptidek és sóik alkalmazása sejtekben, például egy szervezet ideg- és izomsejtjeiben kalciumcsatorna gátlására, és kalciumcsatornával kapcsolatos betegségek és állapotok kezelésére emlősökben. Továbbá, a találmány tárgyát képezik a fenti polipeptideket és sóikat tartalmazó készítmények is.

A kalcium antagonisták vegyületek számos felhasználási területtel bírnak. Kalcium antagonisták klinikai alkalmazásra kerülhetnek olyan állapotok kezelésében, mint például az angina, magas vérnyomás, kardiomiopátia, szupraventrikuláris arritmia, nyelőcső záróizomgörcs, koraszülés és Raynaud-féle betegség. Lásd a W. G. Nayler, Calcium Antagonists, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, New York, NY 1988 szakirodalmi helyet, amelyet leírásunkba referenciaként építünk be. Továbbá, ezek a vegyületek alkalmasak a sejtek, például ideg- és izomsejtek fiziológiájának tanulmányozására.

A találmány a Theraphosidae aphonopelma pók mérgében található polipeptidekre vonatkozik. A találmány szerinti polipeptidek, és azok a frakciók, amelyekben ezek a talál-

mány szerint jelen vannak, a következők:

- Az Aphonopelma 6-6 peptid aminosavszekvenciája: 1. szekven-
cia azonosítási szám,
Az Aphonopelma 6-8 peptid aminosavszekvenciája: 2. szekven-
cia azonosítási szám,
Az Aphonopelma 7-6.1 peptid aminosavszekvenciája: 3. szekven-
cia azonosítási szám,
Az Aphonopelma 7-13.1 peptid aminosavszekvenciája: 4. szekven-
cia azonosítási szám,
Az Aphonopelma 7-13.2 peptid aminosavszekvenciája: 5. szekven-
cia azonosítási szám,
Az Aphonopelma 7-15.2 peptid aminosavszekvenciája: 6. szekven-
cia azonosítási szám,
Az Aphonopelma 7-17.1 peptid aminosavszekvenciája: 7. szekven-
cia azonosítási szám,
Az Aphonopelma 7-17.3 peptid aminosavszekvenciája: 8. szekven-
cia azonosítási szám,
Az Aphonopelma 7-17.4 peptid aminosavszekvenciája: 9. szekven-
cia azonosítási szám.

A találmány szerinti polipeptidek sejtekben kalciumcsatorna gátló hatással bírnak. Ennek megfelelően ezek a polipeptidek önmaguk sejtekben kalciumcsatorna gátlásra használhatók. Használhatók ezek a polipeptidek továbbá gerinctelen rovarok szabályozására, valamint emlősökben sejtek kalciumcsatorna funkciója által közvetített betegségek és állapotok kezelésére.

A találmány körébe tartoznak azok a polipeptidek is, amelyek aminosavszekvenciája és kalciumcsatorna gátló hatá-

sa lényegében azonos az előzőekben leírt peptidekével.

A találmány tárgyát képezik továbbá a fenti polipeptidek, és ezen polipeptidek adagolására szolgáló eljárás.

Az alábbiakban a találmányt részletesen ismertetjük.

Theraphosidae *aphonopelma* pókból mérget nyerünk szakember számára ismert, szokásos eljárással, elektromos ingerléssel végzett fejtés révén. Előnyös, ha olyan eljárást alkalmazunk, amely védelmet nyújt a teljes méregnek hasi visszaáramlás révén vagy vér-nyirokkal való szennyeződés ellen. Az ilyen eljárások szakember számára jól ismertek. Az így nyert teljes mérget -78°C hőmérsékleten fagyasztott állapotban tároljuk az alábbiakban ismertetésre kerülő tisztítás megkezdéséig. A teljes méregből az összetevők tisztítását fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) végezzük különféle preparatív és szemipreparatív oszlopokon, például C-4 és C-18 Vydac^R oszlopokon (Rainin Instrument Co., Inc., Woburn, Massachusetts, USA). A csúcs-detektálást monokromatikusan végezzük 220-230 nm-nél. A frakciók további elemzését például Waters 990 diódás detektor (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, Milford, Massachusetts, USA) révén nyert polikróm UV adatokkal végezhetjük. Az oszlopról lejövő frakciókat ismert módon, például egy ISCO/"FOXY" frakciókollektor alkalmazásával gyűjtjük, és ISCO 2159 csúcsdetektor (ISCO, 4700 Superior, Lincoln, Nebraska, USA) alkalmazásával detektáljuk. A frakciókat megfelelő méretű edényben, például steril polietilén laboratóriumi eszközökben gyűjtjük. Ezt követően a frakciók besűrítését liofilezéssel

végezzük az eluensből, majd ezt követően vízből liofilizáljuk. A kapott összetevő-frakciók tisztaságát kromatográfiás elemzéssel határozzuk meg gradiens típusú analitikai oszlop alkalmazásával, amely izokratikusabb, mint a frakciók végső tisztítására alkalmazott rendszer.

A találmány szerinti polipeptideket ismert módon szekvenálhatjuk. A primer szerkezet meghatározásának általános stratégiája magában foglalja például a következő lépéseket. 1) A diszulfid-hidakat tartalmazó cisztein egységek redukálása és S-piridilezése a szubsztrát enzimés hatásnak való érzékenyebbé tételére. 2) A peptidnek egy egy lépéses vagy többlépéses enzimés emésztéssel való hasítása. 3) A peptid fragmentumok izolálása és tisztítása fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással. 4) A peptid fragmentumok jellemzése N-terminális szekvenálással és ion-szórásos tömegspektrometriás eljárással.

A vizsgált polipeptidek cisztein egységeinek S-piridil-etilálása végrehajtható például oldatban a polipeptid aminosavszekvenálását követően. Egy ilyen S-piridil-etilálási eljárás végrehajtását írjuk le az alábbiakban.

Mintegy 1-10 μg polipeptidet oldunk vagy hígítunk 50 μl -re egy olyan pufferben, amelyet egyrészt 1 mól/l-es, pH = 8,5, 4 mmól/l EDTA-tartalmú trisz-HCl puffer és három rész 8 mól/l-es guanidin/HCl elegyítésével állítunk elő. Az elegyhez 2,5 μl 10 %-os vizes 2-merkapto-etanol adunk, és szobahőmérsékleten, sötétben, argongáz atmoszférában 2 órán át inkubáljuk. Az inkubálást követően 2 μl 4-vinil-piridint (a friss reagenst argongáz atmoszférában tároljuk $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

hőmérsékleten) adunk hozzá, és az elegyet további 2 órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten, sötétben, argongáz atmoszférában. Az elegyet ezután sómentesítjük, ezt előnyösen rövid, fordított fázisú oszlopon való kromatografálással végezzük. A kapott alkilát polipeptidet ezután ismert eljárással szekvenáljuk.

Azoknak az ismereteknek köszönhetően, amelyeket a Theraphosidae aphonopelma méreg a 6-6, 6-8, 7-6.1, 7-13.1, 7-13.2, 7-15.2, 7-17.1, 7-17.3 és 7-17.4 frakcióiban található peptidekről itt leírnunk, lehetővé válik ezen peptidek kígyóméregből való izolálás/tisztítástól eltérő más módszerekkel való nyérése is. A találmány szerinti polipeptidek előállíthatók rekombináns DNS eljárásokkal az említett polipeptidek vagy egy részük kódoló szekvenciájának klónozásával. Például a fenti polipeptidek aminosav szekvenciájára vonatkozó információk felhasználásával ismert módon hibridizációs próbákat végezhetünk a teljes polipeptidet kódoló szekvencia klónozására. Használhatjuk továbbá a rekombináns DNS eljárások és az in vitro proteinszintézis kombinációját a találmány szerinti polipeptidek előállítására. Az ilyen in vitro proteinszintézis eljárások körébe tartoznak többek között például az ABI 430A szilárd fázisú peptid szintetizátor (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA) alkalmazásával, Merrifield szerinti vagy más szilárd fázisú, szakember számára jól ismert eljárások alkalmazásával végzett szintézisek.

Szakember számára jól ismert, hogy a polipeptidekben bizonyos aminosav-helyettesítések végrehajthatók anélkül,

hogy az adott polipeptid funkcióját befolyásolnák vagy lényegesen befolyásolnák. A lehetséges helyettesítések polipeptidről polipeptidre változnak. A lehetséges helyettesítések meghatározása szakember számára ismert módon elvégezhető. Így azok a polipeptidek, amelyeknek aminosav szekvenciája lényegében a fentivel azonos, és kalciumcsatorna gátló hatásuk lényegében a találmány szerintivel azonos, a találmány oltalmi körébe tartoznak.

A találmány szerinti polipeptidek gerincesek és gerinctelenek különféle sejtjeiben, például ideg- és izomsejtjeiben gátolják a kalciumcsatornát.

A találmány szerinti polipeptidek kalciumcsatorna gátló képességét az alábbi eljárással mutattuk ki. 8 napos patkányok kisagyából kisagyi granulasejteket készítünk [Wilkin és munkatársai, Brain Res., 115, 181-199 (1976)]. Aclar (Proplastics Inc., Wall, NJ, USA) négyzeteket (1 cm²-esek) poli-(L-lizin)-nel vonunk be, és 1 ml Eagle-féle alaptápot tartalmazó 12 lyukú tálakba helyezzük. A sejtek disszociáltak, és az Aclar négyzeteket tartalmazó lyukak mindegyikébe $6,25 \times 10^6$ sejtet tartalmazó alikvotot adunk. Szélesztést követően 24 órával $10 \mu\text{mol/l}$ végkoncentrációig citozin- β -D-arabinofuranozidot adagolunk. A sejteket fura2 analízisre a tenyésztés 6., 7. és 8. napján használjuk. Az Aclar négyzetekhez tapadt sejteket 1 ml HEPES pufferben (amely 0,01 % marha szérum-albumint, 0,01 % dextrózt tartalmaz, pH = 7,4, magnéziummentes) lévő $2 \mu\text{mol/l}$ -es fura2/AM (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) tartalmú 12 lyukú lemezre visszük át. A sejteket 40 percig 37 °C hőmér-

sékleten inkubáljuk, majd a fura2/AM tartalmú puffert eltávolítjuk, és olyan pufferrel helyettesítjük, amely fura2/AM-t nem tartalmaz, egyébként az előzővel azonos. Kvarcküvettába 2,0 ml 37 °C-ra előmelegített puffert adunk. Az Aclaron lévő sejteket a küvettába visszük, és a küvettát egy 37 °C hőmérsékleten termosztált, mágneses keverővel ellátott tartóba helyezzük, és a fluoreszcenciát fluoreszcens spektrofotométerrel (Biomedical Instrument Group, University of Pennsylvania, USA) mérjük. A fluoreszcencia jelet mintegy 2 percig hagyjuk stabilizálódni. Ezután a vizsgálandó vegyület törzsoldatából foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS, pH = 7,4) megfelelő koncentrációra hígított 5-20 μ l mintát adjuk a küvettába. Minden egyes vizsgálat kiegészítéseként ismert módon elvégezzük a fluoreszcens szignálok kalibrálását és a fura2/AM veszteség korrekcióit [Nemeth és munkatársai, J. Biol., Chem., 262, 5188 (1987)]. A maximális fluoreszcencia értéket ($F_{\max}$) 35 μ mól/l ionomicin hozzáadásával határozzuk meg, a fluoreszcencia minimum érték ($F_{\min}$) meghatározására ezt követően 12 mmól/l EGTA-t adunk a kalcium keláttá alakítására. Az előbbi eljárás alkalmazásakor egy adott polipeptid kalciumcsatorna gátló hatása úgy nyilvánul meg, hogy a polipeptid adagolásakor a fluoreszcencia csökken. A találmány szerinti polipeptidek alacsony IC_{50} értékekkel bírnak, ez az érték 200 nmól/l alatti a fenti vizsgálat szerinti kalciumcsatorna gátlás alkalmazásával. Összehasonlításképpen két kereskedelmi forgalomban lévő ismert kalciumcsatorna antagonistát, a Nifedipint és a Verapamilt IC_{50} értékei 33 nmól/l, illetve 4800

nmól/l.

A találmány szerinti polipeptidek önmagukban hasznos kalciumcsatorna gátlók sejtekben. Ugyancsak önmagukban hasznosak ezek a polipeptidek gerinctelen rovarok szabályozására, valamint emlősök olyan betegségeinek és állapotainak kezelésében, amelyet a sejtekben valamely kalciumcsatorna funkció közvetít, például angina, magas vérnyomás, kardiomiopátia, szupraventikuláris arritmia, nyelőcső zárógörcs, koraszülés és Raynaud-féle betegség kezelésére. Továbbá, hasznosak ezek a polipeptidek sejtek, köztük többek között idegsejtek, izomsejtek és a kardiovaszkuláris rendszer fiziológiájának tanulmányozására.

A találmány körébe tartoznak a találmány szerinti polipeptidek gyógyászati szempontból elfogadható sói is. Ezek a sók szakember számára jól ismert eljárással állíthatók elő. Előállíthatók például szokásos módon ezen polipeptidek savakkal alkotott sói.

Ha egy találmány szerinti polipeptidet egy emlősnek adagolunk, beadhatjuk ezt a polipeptidet önmagában vagy gyógyászati szempontból elfogadható hordozó- vagy hígítóanyagokkal kombináltan gyógyászati készítmény formájában a szokásos gyógyszerészeti gyakorlatnak megfelelően. A polipeptidek adagolhatók orálisan vagy parenterálisan, előnyös a parenterális adagolás. A parenterális adagolás körébe tartozik az intravénás, intramuszkuláris, intraperitoneális, szubkután és helyi adagolás.

Orális adagolás céljára a találmány szerinti polipeptideket például tabletták, kapszulák, **vizes** oldatok vagy

szuszpenziók formájában alkalmazzuk. Orális adagolásra szolgáló tabletták esetén például szokásosan használt hordozóanyagokat, köztük laktózt és kukoricakeményítőt és csúsztatószeret, például magnézium-sztearátot alkalmazunk. A kapszula formában történő orális adagolás esetén megfelelő hígítóanyagok például a laktóz és a szárított kukoricakeményítő. Ha orális adagolásra vizes szuszpenziókat alkalmazunk, a hatóanyagot emulgeálószerrel és szuszpendálószerrel elegyítjük. Kívánt esetben adagolhatunk édesítő- és/vagy ízesítőszereket is.

Intramuszkuláris, intraperitoneális, szubkután és intravénás felhasználásra a hatóanyagból általában steril oldatokat készítünk, és az oldatok pH-ját megfelelően beállítjuk, az oldatokat pufferoljuk. Intravénás alkalmazásra a készítmény oldott anyag össz-koncentrációját az oldat izotóniás voltának biztosítására szabályozzuk.

Ha egy találmány szerinti polipeptidet vagy sóját embernek adagoljuk, a napi dózist szokásosan a kezelőorvos határozza meg. A dózis az adott személy korától, testtömegétől és a gyógyszerre adott válaszából függően, ezen kívül a beteg tüneteinek súlyosságától függően és az adott esetben alkalmazott vegyület hatásosságától függően változó.

Ha egy találmány szerinti polipeptidet vagy sóját gerinctelen rovarok szabályozására használjuk, ezt a polipeptidet közvetlenül a gerinctelenre vagy környezetére visszük ki. Például egy találmány szerinti vegyület kipermetezhető oldat formájában a gerinctelenre. A vegyületnek az a mennyisége, amely gerinctelenek szabályozására szüksé-

ges, a gerinctelentől magától, valamint a környezeti körülményektől függően változó, az alkalmazandó mennyiséget a vegyületet felhasználó személy határozza meg.

Ha egy találmány szerinti polipeptidet vagy sóját sejtek fiziológiájának vizsgálatára alkalmazzuk, a polipeptidet a sejtbe szakember számára ismert módon adagoljuk. Adagolhatjuk például a polipeptidet a sejtbe megfelelő fiziológiás pufferben. A találmány szerinti polipeptidek megfelelő koncentrációja ilyen vizsgálatokban $200 \mu\text{ml/l}$. Azonban a polipeptid koncentráció ezekben a vizsgálatokban a $200 \mu\text{mol/l}$ értéknél kisebb vagy nagyobb is lehet. A polipeptid szükséges mennyiségét szakember a szakterületen ismert eljárásokkal képes meghatározni.

Az alábbiakban a találmányt példákban mutatjuk be a korlátozás szándéka nélkül.

I. lépés

Nyers Aphonopelma Venom méreg frakcionálása

Mintegy $40 \mu\text{l}$ nyers Theraphosidae aphonopelma mérget fordított fázisú HPLC oszlopra (Vydac^R, C-18, $300 \text{ \AA}$, $22 \times 250 \text{ mm}$) viszünk, és a kromatografálást bifázisos lineáris gradiens program szerint végezzük 30 percen át 95 % A és 5 % B eluens elegytől 80 % A és 20 % B eluens elegyig változó lineáris gradiens, majd 25 percen át 80 % A és 20 % B eluens elegytől 30 % A és 70 % B eluens elegyig terjedő gradiens program szerint [A = 0,1 % trifluor-ecetsav (TFA), B = acetonitril], a detektálást 220 nm-nél végezzük 15 ml/perc áramlási sebesség mellett. A frakciókat az 1. táblázatban bemutatott módon szedjük.

1. táblázat

6. frakció	35,9-37,3 perc
7. frakció	37,3-39,5 perc
8. frakció	39,5-40,1 perc
9. frakció	40,1-40,9 perc
10. frakció	40,9-41,8 perc.

Több futtatásból összegyűjtött azonos frakciókat bepárolunk, és liofilizálunk. A további frakcionálást a következőkben mutatjuk be.

II. lépésAz I. lépés frakcióinak további frakcionálásaA) A 6. frakció további frakcionálása

A fenti, I. lépésből származó 6. frakció anyagát, amely mintegy 60 μ l nyers méregből származik, fordított fázisú HPLC oszlopra visszük (Baker WP C-18, 4,6 x 250 mm), és 85 % A és 15 % B oldószerkelettel 65 % A és 35 % B oldószerkeletig terjedő gradienst alkalmazunk 45 percen át (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük 1,0 ml/perc áramlási sebesség mellett. A frakciókat a 2. táblázatban bemutatott rend szerint szedjük.

2. táblázat

6-6. frakció	24,0-24,8 perc
6-7. frakció	25,0-25,4 perc
6-8. frakció	25,6-26,5 perc
6-9. frakció	27,0-28,7 perc
6-13. frakció	33,5-34,3 perc
6-14. frakció	34,4-35,4 perc.

Több futtatásból származó azonos frakciókat egymással egyesítve liofilezéssel sűrítünk be.

B) A 7. frakció további frakcionálása

A fenti I. lépésben kapott, mintegy 60 μ l nyers méregből származó 7. frakciót erős kationcserélő oszlopra [szulfoetil-aszpartamid (The Nest Group, Southborough, MA, USA)] visszük, és 45 percen át 100 % A és 0 % B eluens elegytől 0 % A és 100 % B eluens elegyig terjedő lineáris gradiens programot alkalmazunk (A = 5 mmól/l H_3PO_4 /20 % acetonitril, B = 5 mmól/l H_3PO_4 , 1,0 mól/l NaCl/ 20 % acetonitril), a detektálást 230 nm-nél végezzük, 1,0 ml/perc áramlási sebességet alkalmazva. A frakciókat a 3. táblázatban bemutatott rend szerint gyűjtjük.

3. táblázat

7-6. frakció	21,9-22,3 perc
7-9. frakció	24,8-25,5 perc
7-11. frakció	26,1-26,7 perc
7-12. frakció	27,1-27,6 perc
7-13. frakció	27,6-28,9 perc
7-14. frakció	29,7-30,8 perc
7-15. frakció	31,0-32,3 perc
7-16. frakció	32,5-33,1 perc
7-17. frakció	34,2-36,0 perc.

A több futtatásból összegyűjtött egyes frakciókat liofilezéssel sűrítjük be.

C) A 8. frakció további frakcionálása

Az I. lépés szerint kapott, mintegy 100 μ l nyers méregből származó 8. frakciót fordított fázisú HPLC oszlopra

(Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 80 % A és 20 % B eluens elegytől 71 % A és 29 % B eluens elegyig tartó lineáris gradiens programot alkalmazunk 35 percen át, majd 71 % A és 29 % B eluens elegyet alkalmazunk 10 percen át (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 6,0 ml/perc. A frakciókat a 4. táblázatban bemutatott rend szerint szedjük.

4. táblázat

8-5. frakció	19,2-21,2 perc
8-6. frakció	21,3-22,5 perc
8-7. frakció	25,9-26,5 perc
8-8. frakció	27,4-28,3 perc.

Több futtatásból származó egyesített azonos frakciókat liofilezéssel sűrítünk be.

III. lépés

A II. lépés frakcióinak további frakcionálása

A) A 7-6. frakció további frakcionálása

A II-B lépés szerint kapott, mintegy 70 µl nyers méregből származó 7-6. frakciót fordított fázisú HPLC oszlop-ra (Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 90 % A és 10 % B eluens elegy lineáris gradiens programot alkalmazunk 10 percen át, majd 90 % A és 10 % B eluens elegytől 60 % A és 40 % B eluens elegyig tartó lineáris gradienst alkalmazunk 40 percen át (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 3,5 ml/perc. A frakciókat az 5. táblázatban bemutatott rend szerint szedjük.

5. táblázat

7-6.1 frakció	32,2-34,3 perc
7-6.2 frakció	35,5-36,2 perc.

Több futtatásból származó egyesített azonos frakciókat liofilezéssel sűrítünk be.

B) A 7-9. frakció további frakcionálása

A II-B lépés szerint kapott, mintegy 300 μ l nyers méregből származó 7-9. frakciót fordított fázisú HPLC oszlopra (Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 90 % A és 10 % B eluens elegyet alkalmazunk 10 percen át, majd 90 % A és 10 % B eluens elegytől 65 % A és 35 % B eluens elegyig tartó lineáris gradiens programot alkalmazunk 40 percen át (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 3,5 ml/perc. A 7-9.1 frakciókat több futtatásból szedjük, és gyűjtjük a 33. és 35. perc közötti elúciós időben.

C) A 7-11. frakció további frakcionálása

A II-B lépésben kapott, mintegy 600 μ l nyers méregből származó 7-11. frakciót fordított fázisú HPLC oszlopra (Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 10 percig 90 % A és 10 % B eluens elegyet alkalmazunk, majd 90 % A és 10 % B eluens elegytől 65 % A és 35 % B eluens elegyig tartó lineáris gradiens programot alkalmazunk 60 percen át (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 3,5 ml/perc. A 7-11.1 frakciókat több futtatásból szedjük, és gyűjtjük a 34,2 és 35,5 perc közötti elúciós időben.

D) A 7-12. frakció további frakcionálása

A II-B lépésben kapott, mintegy 600 μ l nyers méregből származó 7-12. frakciót fordított fázisú HPLC oszlopra (Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 90 % A és 10 % B eluens elegyet alkalmazunk 10 percen át, majd 90 % A és 10 % B eluens elegytől 65 % A és 35 % B eluens elegyig tartó lineáris gradiens programot alkalmazunk 60 percen át, (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 3,5 ml/perc. A frakciókat az előzőekben leírt rend szerint szedjük.

6. táblázat

7-12.1 frakció	28,0-29,1 perc
7-12.2 frakció	38,4-39,6 perc.

E) A 7-13. frakció további frakcionálása

A II-B lépésben kapott, mintegy 200 μ l nyers méregből származó 7-13. frakciót fordított fázisú HPLC oszlopra (Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 90 % A és 10 % B eluens elegyet alkalmazunk 10 percen át, majd 90 % A és 10 % B eluens elegytől 60 % A és 40 % B eluens elegyig tartó lineáris gradiens programot alkalmazunk 40 percen át, (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 3,5 ml/perc. A frakciókat a 7. táblázatban bemutatott rend szerint szedjük.

7. táblázat

7-13.1 frakció	33,0-34,5 perc
7-13.2 frakció	35,1-36,5 perc.

Több futtatásból származó egyesített azonos frakciókat liofilezéssel sűrítünk be.

F) A 7-15. frakció további frakcionálása

A II-B lépésben kapott, mintegy 200 μ l nyers méregből származó 7-15. frakciót fordított fázisú HPLC oszlopra (Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 90 % A és 10 % B eluens elegyet alkalmazunk 10 percen át, majd 90 % A és 10 % B eluens elegytől 60 % A és 40 % B eluens elegyig tartó lineáris gradiens programot alkalmazunk 40 percen át, (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 3,5 ml/perc. A frakciókat az előzőekben leírt rend szerint szedjük.

8. táblázat

7-15.1 frakció	33,1-33,6 perc
7-15.2 frakció	34,5-36,2 perc.
7-15.3 frakció	37,7-39,1 perc.

Több futtatásból származó egyesített azonos frakciókat liofilezéssel sűrítünk be.

G) A 7-16. frakció további frakcionálása

A II-B lépésben kapott, mintegy 600 μ l nyers méregből származó 7-16. frakciót fordított fázisú HPLC oszlopra (Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 90 % A és 10 % B eluens elegyet alkalmazunk 10 percen át, majd 90 % A és 10 % B eluens elegytől 65 % A és 35 % B eluens elegyig tartó lineáris gradiens programot alkalmazunk 60 percen át, (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 3,5 ml/perc. A 7-16.1 frak-

ciót, amelynek elúciós ideje 31,8-33,0 perc, több futtatásból szedjük, és gyűjtjük.

H) A 7-17. frakció további frakcionálása

A II-B. lépésben kapott, mintegy 25 μ l nyers mérgeből származó 7-17. frakciót fordított fázisú HPLC oszlopra (Vydac^R, C-18, 300 Å, 10 x 250 mm) visszük, és 90 % A és 10 % B eluens elegyet alkalmazunk 10 percen át, majd 90 % A és 10 % B eluens elegytől 60 % A és 40 % B eluens elegyig tartó lineáris gradiens programot alkalmazunk 40 percen át, (A = 0,1 % TFA, B = acetonitril), a detektálást 220 nm-nél végezzük, az áramlási sebesség 3,5 ml/perc. A frakciókat az előzőekben leírt rend szerint szedjük.

9. táblázat

7-17.1 frakció	15,6-18,4 perc
7-17.2 frakció	18,5-19,4 perc.
7-17.3 frakció	27,1-28,6 perc.
7-17.4 frakció	28,6-30,1 perc.
7-17.5 frakció	30,1-31,9 perc.
7-17.6 frakció	31,9-33,5 perc.

Több futtatásból származó egyesített azonos frakciókat liofilezéssel sűrítünk be.

1. példa

Aphonopelma 6-6 peptid

A II-A lépés szerint előállított 6-6 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters

Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 6-6 peptid alábbi szerketét erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 1., 39 egység, 6 cisztein, 3 diszulfid kötés.

Számított tömeg = 4382,3,

Észlelt tömeg = $4382,16 \pm 0,54$ (ionszórásos tömegspektrográfiával).

2. példa

Aphonopelma 6-8 peptid

A II-A lépés szerint előállított 6-8 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 6-6 peptid alábbi szerketét erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 2., 39 egység, 6 cisztein, 3 diszulfid kötés.

Számított tömeg = 4369,2,

Észlelt tömeg = $4368,26 \pm 0,27$ (ionszórásos tömegspektro-

gráfiával).

3. példa

Aphonopelma 7-6.1 peptid

A III-A lépés szerint előállított 7-6.1 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 7-6.1 peptid alábbi szerkezetét erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 3., 33 egység, 6 cisztein, 3 diszulfid kötés.

Számított tömeg = 3786,2,

Észlelt tömeg = 3784,54 (ionszórásos tömegspektrográfiával).

4. példa

Aphonopelma 7-13.1 peptid

A III-E lépés szerint előállított 7-13.1 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 7-13.1 peptid alábbi szerketét erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 4., 34 egység, 6 cisztein, 3 diszulfid kötés.

Számított tömeg = 3814,32

Észlelt tömeg = 3813,67 $\pm$ 0,27 (ionszórásos tömegspektrográfiával).

5. példa

Aphonopelma 7-13.2 peptid

A III-E lépés szerint előállított 7-13.2 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 7-13.2 peptid alábbi szerketét erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 5., 42 egység, 6 cisztein, 3 diszulfid kötés.

Számított tömeg = 4844,45

Észlelt tömeg = 4844,66 (ionszórásos tömegspektrográfiával).

6. példa

Aphonopelma 7-15.2 peptid

A III-F lépés szerint előállított 7-15.2 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-

10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 7-15.2 peptid alábbi szerketét erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 6., 39 egység, 6 cisztein, 3 diszulfid kötés.

Számított tömeg = 4342,19

Észlelt tömeg = 4341,84 ± 0,33 (ionszórásos tömegspektrográfiával).

7. példa

Aphonopelma 7-17.1 peptid

A III-H lépés szerint előállított 7-17.1 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 7-17.1 peptid alábbi szerketét erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 7., 39 egység, 6 cisztein, 3 diszulfid kötés.

Számított tömeg = 4383,28,

Észlelt tömeg = $4382,33 \pm 0,52$ (ionszórásos tömegspektrográfiával).

8. példa

Aphonopelma 7-17.3 peptid

A III-H lépés szerint előállított 7-17.3 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 7-17.3 peptid alábbi szerkezetét erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 8.

Észlelt tömeg = $4368,23 \pm 0,47$ (ionszórásos tömegspektrográfiával).

9. példa

Aphonopelma 7-17.4 peptid

A III-H lépés szerint előállított 7-17.4 peptid szerkezetét az alábbi módon határoztuk meg és igazoltuk. 1-10 nmól mennyiségű mintákon, 3 párhuzamos készítésével, Waters Pico-Tag rendszer alkalmazásával PTC aminosav-analízist végzünk. N-terminális szekvenálást végzünk mind a natív, mind a redukált/piridil-etilált peptiden impulzus-folyadék-szekvenátoron (ABI). Tömegspektrum-analízist SCI-EX API III ionszórásos tömegspektrométeren végzünk.

A kapott adatok a 7-17.4 peptid alábbi szerkezetét

erősítik meg.

Szekvencia azonosítási szám: 9., 39 egység, 6 cisztein, 3 diszulfid kötés.

Számított tömeg = 4383,23,

Észlelt tömeg = 4382,19 $\pm$ 0,38 (ionszórásos tömegspektrográfiával).

A következőkben összefoglalóan a 9 szekvencia jellemző adatait ismertetjük.

A szekvenciák száma: 9

Az 1. azonosítási számú szekvencia adatai

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossza: 39 aminosav

(B) Típusa: aminosav

(C) Szál: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típus: peptid

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Anti-szenz: nem

(vi) Eredeti forrása:

(A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma

(F) Szövet típus: méreg

(xi) A szekvencia leírása:

Leu Phe Glu Cys Val Leu Ser Cys Asp Ile Lys Lys Asn Gly Lys Pro

1 5 10 15

Cys Lys Pro Lys Gly Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly Trp Arg Cys Lys

20 25 30

Ile Asn Phe Cys Leu Lys Val

A 2. azonosítási számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossza: 39 aminosav
 - (B) Típusa: aminosav
 - (C) Szál: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekula típus: peptid
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iv) Anti-szenz: nem
- (vi) Eredeti forrása:
- (A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma
 - (F) Szövet típus: méreg
- (xi) A szekvencia leírása:

Leu	Phe	Glu	Cys	Ala	Leu	Ser	Cys	Asp	Ile	Lys	Lys	Asn	Gly	Lys	Pro
1				5					10					15	
Cys	Lys	Pro	Lys	Gly	Glu	Lys	Lys	Cys	Ser	Gly	Gly	Trp	Arg	Cys	Lys
				20				25						30	
Ile	Asn	Phe	Cys	Leu	Lys	Ile									
															35

A 3. azonosítási számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossza: 33 aminosav
 - (B) Típusa: aminosav
 - (C) Szál: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekula típus: peptid
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iv) Anti-szenz: nem

- 26 -

(vi) Eredeti forrása:

(A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma

(F) Szövet típus: méreg

(xi) A szekvencia leírása:

Cys Ala Glu Phe Gln Ser Lys Cys Lys Lys Asp Ser Glu Cys Cys Gly

1 5 10 15

Thr Leu Glu Cys Ser Pro The Trp Lys Trp Cys Val Tyr Pro Ser Pro

20 25 30

Phe

A 4. azonosítási számú szekvencia adatai

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossza: 34 aminosav

(B) Típusa: aminosav

(C) Szál: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típus: peptid

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Anti-szenz: nem

(vi) Eredeti forrása:

(A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma

(F) Szövet típus: méreg

(xi) A szekvencia leírása:

Ser Cys Gly His Val Gly Thr Pro Cys Glu Lys Asn Trp Asp Cys Cys

1 5 10 15

Lys Gly Lys Val Cys Ser Pro Arg Trp Lys Leu Cys Ala Tyr Glu Ser

20 25 30

Pro Phe

Az 5. azonosítási számú szekvencia adatai

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossza: 42 aminosav

(B) Típusa: aminosav

(C) Szál: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típus: peptid

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Anti-szenz: nem

(vi) Eredeti forrása:

(A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma

(F) Szövet típus: méreg

(xi) A szekvencia leírása:

Cys Leu Gly Glu Asn Val Pro Cys Asp Lys Asp Arg Pro Asn Cys Cys

1 5 10 15

Ser Lys Tyr Glu Cys Leu Glu Pro Thr Gly Tyr Gly Arg Cys Tyr Ala

20 25 30

Ser Tyr Tyr Ser Tyr Lys Lys Lys Thr Leu

35 40

A 6. azonosítási számú szekvencia adatai

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossza: 39 aminosav

(B) Típusa: aminosav

(C) Szál: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típus: peptid

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Anti-szenz: nem

(vi) Eredeti forrása:

(A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma

(F) Szövet típus: méreg

(xi) A szekvencia leírása:

Leu Ile Glu Cys Ala Phe Ser Cys Asp Ile Thr Lys Asn Gly Lys Pro

1 5 10 15

Cys Lys Pro Lys Gly Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly Trp Arg Cys Lys

20 25 30

Ile Asn Phe Cys Leu Lys Ile

35

A 7. azonosítási számú szekvencia adatai

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossza: 39 aminosav

(B) Típusa: aminosav

(C) Szál: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típus: peptid

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Anti-szenz: nem

(vi) Eredeti forrása:

(A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma

(F) Szövet típus: méreg

(xi) A szekvencia leírása:

Leu Phe Glu Cys Val Leu Ser Cys Asp Ile Lys Lys Asn Gly Lys Pro

1 5 10 15

Cys Lys Pro Lys Gly Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly Trp Arg Cys Lys

20 25 30

Ile Asn Phe Cys Leu Lys Val

35

A 8. azonosítási számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossza: 35 aminosav
 - (B) Típusa: aminosav
 - (C) Szál: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekula típus: peptid
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iv) Anti-szenz: nem
- (vi) Eredeti forrása:
 - (A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma
 - (F) Szövet típus: mérge
- (xi) A szekvencia leírása:

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

Cys Lys Pro Xaa Gly Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly Xaa Arg Xaa Xaa
 20 25 30

Ile Asn Phe
 35

A 9. azonosítási számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossza: 39 aminosav
 - (B) Típusa: aminosav
 - (C) Szál: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekula típus: peptid

- 30 -

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Anti-szenz: nem

(vi) Eredeti forrása:

(A) Organizmus: Theraphosidae aphonopelma

(F) Szövet típus: méreg

(xi) A szekvencia leírása:

Leu Phe Glu Cys Val Leu Ser Cys Asp Ile Lys Lys Asn Gly Lys Pro

1

5

10

15

Cys Lys Pro Lys Gly Glu Lys Lys Cys Ser Gly Gly Trp Arg Cys Lys

20

25

30

Ile Asn Phe Cys Leu Lys Val

35

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy lényegében tiszta polipeptid, amely az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. és 9. azonosítási számú szekvenciákat tartalmazza vagy egy ezzel lényegében azonos aminosavszekvenciával bíró és lényegében azonos kalciumcsatorna gátló aktivitású polipeptid vagy gyógyászati szempontból elfogadható sója.

2. Az 1. igénypont szerinti lényegében tiszta polipeptid, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. és 9. azonosítási számú aminosav szekvenciákat tartalmazza, vagy ezen vegyület gyógyászati szempontjából elfogadható sói.

3. Eljárás egy sejtben kalciumcsatorna gátlására, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy a sejtbe az 1. igénypont szerinti polipeptid kalciumcsatornát gátló mennyiségét adagoljuk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy a sejt egy emlős idegrendszerének része.

A meghatalmazott: