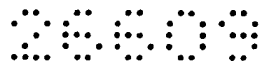


6575/88



/89

49.006/SZE

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

50494--

NS20<sub>h</sub> C12N15/11  
C12N15/16  
C12P19/3h

K I V O N A T

Eljárás nagyszámu peptid analóg, továbbá új típusu  
peptid analógok előállítására

MTA Szegedi Biológiai Központja, SZEGED

Bejelentés napja: 1988. 12. 22.

Elsőbbsége: 1987. 12. 23. (8705139-7),

SVÉDORSZÁG

A találmány tárgya eljárás egy adott peptid  
nagyszámu analógjának előállítására. Ugy járnak el,  
hogy

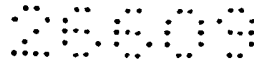
- kémiai szintézissel azonos hosszúságu,  
néhány meghatározott helyen egymástól  
különböző, a 3'-vég felöli szakaszon pedig  
néhány azonos nukleotidot tartalmazó oligo-  
nukleotidok két különböző keverékét állitják  
elő;
- a nevezett két oligonukleotid-elegyet ösz-  
szekeverve részlegesen kettősszálu, azonos  
hosszuságu DNS molekulák keverékét állitják  
elő, ezeket azután enzimatis uton teljes  
egészükben kettősszálu DNS molekulákká alakitják;



- a kettősszálu DNS molekulák keverékét két különböző enzimmel hasítva a hasonló módon hasított DNS vektorral ligálható DNS molekulákat állítanak elő;
- a DNS molekulákat ligálással a DNS vektorba építve DNS vektorok keverékét nyerik, e DNS vektorokkal azután DNS-befogadó gazdaszervezeteket transzformálnak, önmagában ismert módon;
- a transzformánsokat tenyésztik, és az így nyert telepeket egyenként vizsgálva meghatározzák az egy-egy fehérjét kódoló DNS molekulák nukleotid-sorrendjét;
- a nagyszámu transzformánst az expresszió szempontjából előnyös körülmények között, külön-külön tenyésztve az adott peptid nagyszámu analógját állítják elő.

A találmány tárgya továbbá eljárás új vazóaktív intesztinális polipeptid analógok, valamint az új vazóaktív intesztinális polipeptid analógok egyikét kódoló gént hordozó plazmid-DNS előállítására.

6575/88



NO. C 12 N 15 / 11

C 12 N 15 / 16

C 12 P 19 / 34

A

49.006/SZE

BUDAPESTI NEMZETKÖZI  
ÜGYVÉDI MUNKAKÖZÖSSÉG  
SZABADALMI IRODA  
DALSZINHÁZ U 10 1533-73

26609 / 89

50494--

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

Eljárás nagyszámu peptid analóg, továbbá új típusu  
peptid analógok előállítására

MTA Szegedi Biológiai Központja, SZEGED

Feltalálók:

BÁRTFAI Tamás, STOCKSUND, SVÉDORSZÁG ,  
TJÖRNHAMMAR Marie-Louise, STOCKHOLM, SVÉDORSZÁG,  
SIMONCSITS András, STOCKHOLM, SVÉDORSZÁG,  
KÁLMÁN Miklós, SZEGED,  
CSERPÁN Imre, SZEGED

Bejelentés napja: 1988. 12. 22.

Elsőbbsége: 1987. 12. 23. (8705139-7),  
SVÉDORSZÁG



A találmány tárgya eljárás nagyszámu peptid analóg, továbbá új típusu peptid analógok előállítására.

A találmány tárgya elsődlegesen eljárás a vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP) nagyszámu analógjának, illetve új típusu analógjainak, valamint a találmány szerinti vazóaktív intesztinális polipeptid analógokat kódoló DNS szakaszokból felépülő géneket hordozó plazmid DNS-eknek az előállítására.

A gyógyszeripar, valamint a független kutatók egyaránt folyamatosan vizsgálják az ismert, hasznos vegyületektől kismértékben különböző, új vegyületeket, hogy hatékonyabb, specifikusabb, stb. származékokat állítsanak így elő. Ha a szóbanforgó ismert vegyület egy peptid vagy polipeptid, akkor e vegyület aminosav-szekvenciájában egy vagy néhány aminosavat más, természetes vagy nem-természetes aminosavra cserélhetünk.

A hatástani szűrővizsgálatok szempontjából kívánatos lenne, hogy a kiválasztott peptid számos analógját egyidejűleg állíthassuk elő, pénzt és időt egyaránt megtakarítva ezzel.

A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi egy kiválasztott fehérje számos, kizárólag L konfigurációjú aminosavat tartalmazó analógjának egyidejű előállítását. A találmányban leírtak szerint eljárva előállítjuk a vazóaktív intesztinális polipeptid analógjait.

A vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP) a glükagon-szekretin fehérjecsaládba tartozó, erősen bázikus, 28 aminosavból álló, a C-terminális végen amidcsoportot tartalmazó peptid. A vazóaktív intesztinális polipeptidet elsőként S. Said és V. Mutt különítette el 1970-ben sertés felső bélszakaszból származó szövetekből [Said, S. I.; Mutt, V., Science, 169, 1217 - 1218. (1970)], később azonban kimutatták idegszövetben, és belső elválasztású mirigysejtekben is [Said, S. I., Vasoactive Intestinal Peptide, Raven Press, N. Y. (1982), valamint Said, S. I., Peptides, 5, 143 - 150. (1984)]. A vazóaktív intesztinális polipeptid biológiai hatásai közé tartozik az agyi vérerek tágítása, a prolaktin-felszabadulás serkentése, a hasnyálmirigy exokrin kiválasztásának serkentése, hatása a pénisz erekciójára [Said, S. I., Vasoactive Intestinal Peptide, Raven Press, N. Y. (1982); Rosténe, W. H., Progress in Neurobiology, 22, 103 - 129. (1984); Mutt, V., Brain Peptides, eds. Krieger, D. T. és munkatársai (1983)], valamint a kolinergikusan serkentett

nyálfolyás erősítése [Lundberg, J. M. és munkatársai, *Acta Physiol. Scand.*, 114, 329 - 337. (1982)]; a vazó-aktív intesztinális polipeptid továbbá részt vesz a felületaktív folyadékfilm kialakításában a tüdőben [Barnes, P. J., *TIPS*, 8, 24 - 27. (1987)].

Az emberi vazóaktív intesztinális polipeptidet kódoló prekursor gént nemrégiben elkülönítették, és nukleotid sorrendjét meghatározták [Bodner, M. és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82, 3548 - 3551. (1985); Lindner, S. és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 605 - 609. (1987)].

A nukleotid sorrend-adatok szerint a vazóaktív intesztinális polipeptidet kódoló gén 3'-végén további tripletek találhatóak: ezek egy glicin-lizin-arginin tripeptidet kódolnak. Bizonyítható, hogy a C-terminális vég felőli glicin-lizin-arginin tripeptid, sőt, a glicin egymagában is szubsztrátja lehet a különféle szövetekben kimutatott, C-terminális amidálást katalizáló peptidil-glicin- $\alpha$ -amidáló monooxigenáz enzimnek (PAMáz) [Bradbury, A. F. és munkatársai, *Nature*, 298, 686 - 688. (1982); Eipper, B. A. és munkatársai, *Peptides*, 4, 921 - 928. (1983); Glembiski, C. C. és munkatársai, *J. Biol. Chem.*, 259, 6385 - 6392. (1984); Gomez, S. és munkatársai, *FEBS Lett.*, 167, 160 - 164. (1984); Eipper, B. A. és munkatársai, *Endocrinology*,

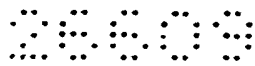
116, 2497 - 2504. (1985) és Ouafik, H. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 261 - 264 (1987)].

Nyilvánvaló, hogy az igen sokféle biológiai hatással rendelkező peptidhormont, a vazóaktív intesztinális polipeptidet génszintézeti eljárásokat alkalmazva lenne előnyös nagy mennyiségben előállítani. Habár az emberi vazóaktív intesztinális polipeptid prekursor génjét már korábban elkülönítették, és jellemezték [Bodner, M. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 3548 - 3551. (1985); Linder, S. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 605 - 609. (1987)], a gén más organizmusban való kifejezéséről mindeddig nem jelent meg közlemény.

A találmány szerinti vazóaktív intesztinális polipeptid-analógokat E. Coli sejtekben állítjuk elő.

A találmány tárgya eljárás egy adott peptid nagyszámu analógjának előállítására, azzal jellemezve, hogy:

- kémiai szintézissel azonos hosszúságu oligonukleotidokból álló elegyet állítunk elő úgy, hogy az oligonukleotidok néhány meghatározott helyen egymástól eltérő, a 3'-vég felőli szakaszon pedig néhány azonos bázist hordozzanak;



- 6 -

- a fenti oligonukleotid-elegyet összekeverjük egy hasonló módon előállított másik oligonukleotid-eleggyel úgy, hogy az első elegy oligonukleotidjainak a 3' felőli végén található néhány bázisa komplementer legyen a másik elegy oligonukleotidjainak a 3' felőli végén elhelyezkedő néhány bázisával; a komplementer bázisok összekapcsolódása után nyert, részlegesen kettősszálu, azonos hosszúságu DNS szakaszok keverékéből azután enzimatis uton teljes egészében kettősszálu DNS molekulák keverékét állítjuk elő;
- a kettősszálu, 3'-végükön egy adott restrikciós endonukleáz, 5' felőli végükön pedig egy másik restrikciós endonukleáz enzim hasítóhelyét kódoló DNS molekulák elegyét a fenti két enzimmel egyidőben, vagy egymást követően hasítjuk, a hasonló módon hasított DNS vektor 5'- és 3'-végeivel ligálható 3'- és 5'-végü DNS molekulákat állítva így elő;
- a fenti módon hasítva nyert DNS molekulákat ligálással a fentiek szerint hasított DNS vektorokba inszertáljuk, és az így nyert



DNS vektor elegyet, önmagában ismert módon, DNS-befogadó gazdasejtekbe transzformáljuk;

- a transzformáns sejteket tenyésztjük, és az így nyert telepeket egyenként vizsgálva meghatározzuk a DNS molekulák nukleotid sorrendjeit: ezek egy-egy fehérjét kódolnak;
- az egyes azonosított fehérje-kódoló szekvenciákat tartalmazó DNS vektorokat hordozó nagyszámu transzformánst az expresszió szempontjából megfelelő körülmények között, külön-külön tenyésztjük, az adott peptid nagyszámu analógját állítva így elő.

A találmány szerinti, fentebb vázolt eljárás kivitelezése során felhasználható DNS-befogadó gazdasejtek közé tartoznak például a baktériumok, így a *Bacillus* nemzetségbe tartozó fajok, vagy az *Escherichia coli*; valamint az élesztők, így a *Saccharomyces cerevisiae*. Az eljárás kivitelezése során felhasználható DNS vektorok például a bakteriofágok és a plazmidok.

ahol

X treonint, szerint, prolint vagy alanint;  
 Y treonint, lizint, izoleucint vagy alanint;  
 Z treonint, lizint, izoleucint vagy arginint; és  
 W amino- vagy karboxil-csoportot vagy glicint,  
 vagy glicin-lizin-arginin tripeptidet

jelöl (ezeket az analógokat a találmány szerinti eljárás szerint eljárva nyerjük: ezeket az analógokat kívántuk eredetileg előállítani); vagy

a nevezett vazóaktív intesztinális polipeptid analógok aminosav-sorrendje a fenti aminosav-sorrenddel lényegében azonos, ám:

- az 1-es helyzetben levő hisztidint aszparaginsavval helyettesítjük, ha az X = alanin, az Y = izoleucin és a Z = treonin;
- az 1-es helyzetben levő hisztidint tirozinnal helyettesítjük, ha az X = prolin, az Y = treonin és a Z = lizin;
- a 2-es helyzetben levő szerint tirozinnal, és a 8-as helyzetben levő aszparaginsavat tirozinnal helyettesítjük, ha az X = treonin, az Y = treonin és a Z = treonin;