

Fúziós fehérjék immunogenitásának csökkentése**K I V O N A T**

5

A találmány tárgyát képezi eljárás fúziós fehérje immunogenitásának csökkentésére, amely szerint a fúziós fehérje fúziós kapcsolódását átívelő kapocsrégióban T-sejt-epitóp-jelöltet azonosítanak és a kapocsrégióban aminosav megváltoztatásával csökkentik a T-sejt-epitóp-jelöltnak T-sejt-receptorhoz való kölcsönhatási képességét. A találmány tárgyát képezik továbbá az eljárásban előállított, csökkent immunogenitású fúziós fehérjék és az ezeket kódoló nukleinsavak.

A találmány tárgyát képező eljárások alkalmazhatóak a humán gyógyászatban alkalmazható fúziós fehérjék tervezésében.

15

Feldm.

Fúziós fehérjék immunogenitásának csökkentése

A találmány tárgyát képezi általában olyan módosított fúziós fehérjék előállítására és alkalmazására szolgáló eljárások és készítmények, amely fúziós fehérjék csökkentett immunogenitásúak vagy nem immunogének. Specifikusabban a találmány tárgyát képezik fúziós fehérjék, amelyek immunogenitását csökkentettük a lehetséges T-sejt-epitópok-jelöltek azonosításával és az ilyen epitópok eltávolítása céljából az aminosav-szekvencia módosításával.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány hátterét.

Sok terápiás fehérje normál, humán eredetű fehérje. Például az interleukin-2, az eritropoietin és a növekedési hormon közül mindegyik humán eredetű fehérje, amelyeket embereknek adnak be, akik az ilyen fehérjéket endogén szinteken előállítják. Általában a normál, teljes mértékben humán eredetű fehérjék elleni immunválasz ritka, ha ezeket a fehérjéket terápiás szerként alkalmazzák.

Az utóbbi időben nyilvánvalóvá vált, hogy sok, mesterséges aktivitással rendelkező fúziós fehérje alkalmazható terápiás fehérjeként. Például az *Enbrel* a TNF-receptor extracelluláris doménjének és az IgG1 Fc-régiójának fúziója. Az *Enbrel*-t alkalmazzák *rheumatoid arthritis* kezelésére, és feltételezések szerint úgy működik, hogy a TNF-et titrálja, és megakadályozza a TNF hatásának kifejtését. Az *Enbrel*-elleni antitestek jelentős előfordulását figyelték meg azonban az *Enbrel*-lel kezelt betegek esetében.

A terápiásan alkalmazható fúziós fehérjék osztályának egy másik példjaként említhetjük az immuncitokineket. Ezek a fehérjék tartalmaznak antitest-molekuláriszt és citokin-molekuláriszt, és ezek alkalmazhatóak citokinek kóros sejtekhez, mint például ráksejtekhez történő célba juttatására.

Az ilyen fúziós fehérjék közül sok fehérje terápiás alkalmazása azonban korlátozott az emlősállat, különösen ember esetében mutatott immunogenitása miatt.

Ezáltal szükség van csökkentett immunogenitású fúziós fehérjék előállítására, az ilyen fehérjék terápiában történő alkalmazása céljából.

Az alábbiakban a találmány rövid összefoglalóját adjuk meg.

A találmány tárgyát képezik csökkentett immunogenitású fúziós fehérjék terápiás alkalmazás céljára történő előállítására alkalmas eljárások és készítmények. Például a ta-



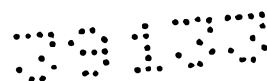
lálomány tárgyát képezik csökkentett immunogenitású immuncitokinek, immunfuzinok, immunligandumok, más antitestek és Fc-fúziós fehérjék, citokin-citokin-fúziósfehérjék és albumin-fúziósfehérjék.

5 A találmány tárgyát képezik részben az a felismerés, hogy a fúziós fehérjék tartalmaznak „nem saját” szekvenciákat. Például akár két, humán eredetű fehérje fúziója esetében a fúziós kapcsolódást körülvevő régió tartalmaz olyan szekvenciát, amely normális esetben nincs jelen az emberi testben. Példaként említhetjük az *Enbrel*-t, amely két, normál, humán fehérjéből, a TNF-receptorból és IgG1-ből származik. A TNF-receptor és az IgG közötti kapcsolódás olyan peptidszekvencia, amely normális esetben nem található
10 meg az emberi testben.

A találmány szerinti előnyös eljárások során többek között fúziós fehérje immunogenitását csökkentjük a kapocsepítőp (kapocspeptid) T-sejt-receptorral való kölcsönhatási képességének csökkentésével úgy, hogy csökkentjük MHC-molekulákhoz való kötődésének képességét (kötési affinitását). A találmány szerint a kapocsepítőp vagy
15 peptid előnyösen „nem saját”. Általában a fehérjék, többek között a terápiás fehérjék immunogének, részben azért, mert a fehérjéket antigén-prezentáló sejtek endocitózison és proteolízisen át feldolgozzák, és ennek eredményeként a peptidek a T-sejteknek prezentáló, fő hisztokompatibilitási komplexnek (MHC) nevezett molekulákhoz kötődnek. Az antigén-prezentáló sejt (APC) felszínén az antigenikus peptid-MHC-komplex aktiválja a T-sejt
20 proliferációját, differenciálódását és citokinfelszabadítását. Ezzel párhuzamosan B-sejt-differenciálódás és antitest-termelés indukálódik, amely tovább korlátozza a terápiás fehérje hatásosságát a (a szervezetből való) tisztulás (*clearance*) miatt. Ezáltal az antigenikus peptid, ha terápiás fehérjéből származik, a nem kívánatos immunválaszok sorozatát indukálhatja. A terápiás fehérje hatásossága korlátozott az antitestek által történő „titrálás” miatt, és a T-sejtek és B-sejtek válaszreakciója indukálása gyakran káros a betegben előidézett
25 gyulladásos és allergiás reakciók miatt.

A találmány tárgyát képezi 1) egy vagy több, T-sejt-epitópjelöltet tartalmazó, új aminosav-szekvencia azonosítása az immunglobulin-célfehérje kapocsrégiójában; és 2) az ilyen aminosav-szekvenciák módosítása abból a célból, hogy a T-sejt-epitópként működő
30 peptidek jelenlétét csökkentjük vagy ezeket megszüntessük.

A találmány tárgyát képezi immunogenitás csökkentésével kapcsolatos készítmények és eljárások két általános osztálya. A találmány egyik megvalósítási módja szerint potenciálisan „nem saját” epitópokat azonosítunk a kapcsolódást átívelő szekvenciákban. Például potenciálisan „nem saját” epitópokat azonosítunk számítógépes eljárásokkal, ame-



lyek peptidek II. osztályú MHC-molekulákhoz való kötődésének számítógépes eljárásokkal történő modellezésen alapulnak. Ezután szubsztitúciókat hajtunk végre úgy, hogy a peptidek kapocsrégiójából eredő, II. osztályú MHC-molekulákhoz való kötődésének képességét csökkentjük vagy megszüntessük. A II. osztályú MHC-molekulákhoz kötődő peptidek azonosításának és módosításának ilyen eljárását „dezimmunizálásnak”, és az eredményül kapott fehérjemolekulákat „dezimmunizáltnak” nevezzük.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint egy vagy több glikozilációs helyet viszünk be a fúziós kapcsolódási helyre. Előnyösen N-kötött glikozilációs helyet alkalmazunk, azonban alkalmazhatunk O-kötött glikozilációs helyet is. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a vad típusú szekvencia fúziós kapcsolódását körülvevő kapocsrégió aminosavait változtatjuk meg úgy, hogy az N-terminális fúziós partner utolsó aminosavát aszparaginra, és a másik fúziós partner első két aminosavát glicinre, azután szerinre vagy treoninra változtatjuk.

A találmány szerinti megoldásban a II. osztályú MHC-molekulákhoz való kötődés megszüntetése előnyös az olyan esetekben, amikor a fehérjét baktériumban vagy olyan organizmusban kívánjuk előállítani, amely nem állít elő az emlőseredetűnek megfelelő glikozilációs mintázatot, például élesztőben vagy rovarsejtekben.

Glikozilációs hely bevitele előnyös lehet akkor, ha a fehérjét emlőseredetű sejtvo-
nalban állítjuk elő, vagy olyan sejtvo-
nalban, amely emlősökre nézve ártalmatlan glikozilációs mintázatot állít elő.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a fúziós fehérje egyik komponense citokin. A „citokin” kifejezéssel olyan, természetes körülmények között előforduló vagy rekombináns fehérjét, azok analógjait és fragmenseit írjuk le, amelyek az adott citokin receptorával rendelkező sejtben specifikus válaszreakciót váltanak ki. Előnyösen, a citokinek olyan fehérjék, amelyek sejtben előállíthatóak, és kiválasztódnak. Előnyösen, citokinek többek között a interleukinok, mint például az interleukin-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16 és IL-18, a hematopoietikus faktorok, mint például granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF), G-CSF és az eritropoietin, a tumornekrózis-faktorok, mint például a $TNF\alpha$, limfokinek, mint például a limfotoxin, metabolikus folyamatok szabályozói, mint a leptin és interferonok, mint például az interferon- α , az interferon- β és interferon- γ és a kemokinek. Előnyösen a találmány tárgyát képező antitest-citokin fúziós fehérje citokinspecifikus biológiai aktivitást mutat.



A találmány egy további, előnyös megvalósítási módja szerint a fúziós fehérje egyik komponense obezitás elleni (elhízásra való hajlam elleni) citokin. Például a komponens leptin, CNTF vagy Acrp30 része.

5 A találmány egy alternatív megvalósítási módja szerint a fúziós fehérje egyik komponense hormon. Például a komponens lehet inzulin, növekedési hormon vagy 1-es glukagonszerű peptid (GLP-1).

A találmány egy alternatív megvalósítási módja szerint a fúziós fehérje komponense biológiai aktivitással rendelkező, ligandkötő fehérje. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint TNF-receptor extracelluláris doménjét alkalmazzuk.

10 A találmány megvalósítási módjai egyik sorozata szerint a találmány szerinti fúziós fehérje tartalmaz nem antitest jellegű molekularészt N-terminális részével antitest-molekularész C-terminális részével fuzionáltatva. A találmány szerinti megoldásban antitest-molekularész lehet intakt immunglobulin vagy intakt immunglobulin része. Immunglobulin része lehet variábilis régió, konstans régió vagy mindkettő. Előnyös immunglobulin többek között az Fc-régiók vagy azok részei. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint IgG1 immunglobulin-izotípust vagy részét alkalmazunk, amely úgy van módosítva, hogy kevésbé immunogén és/vagy féléletideje a szérumban hosszabb legyen. Például előnyös a CH3-citokin-kapcsolódás melletti aminosavakban módosított IgG1. A találmány szerinti megoldás bizonyos alkalmazásai esetében előnyösek az IgG2- vagy IgG4-izotípusokból származó antitest-molekularészek.

20 Az immuncitokinek csak az egyik példája a tumort megcélzó fúziósfehérjeterápiának. Más, tumorra toxikus molekulák szintén célba juttathatók tumorokhoz tumorspecifikus antitestekkel alkotott fúzióban. Ráadásul az antitestfúziós fehérjékkel támadhatunk más típusú kóros sejteket is, mint például vírusfertőzött sejteket. Célba juttató fúziós

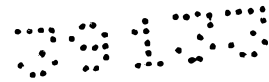
25 fehérjék tervezésnek egy másik megközelítése az Fc-X- és X-Fc-technológiát alkalmazza, ahol X polipeptid. Ezek a technológiák azt az ismeretet alkalmazzák, amely szerint célfehérje termelése és előállítása/kinyerése javítható, ha az adott polipeptidet immunglobulin Fc-részéhez kapcsoljuk. Fc-X-fúziósfehérjék esetében a célfehérje N-terminális fúziós partnere szignálpeptid, amelyet immunglobulingén Fc-fragmense követ. Bizonyos esetekben

30 specifikus módon előnyös a fúziós fehérjét X-Fc-orientációban való tervezése. Az ilyen konstrukciókban a célfehérje az N-terminális fúziós fehérje és ezt követi az Fc-fragmens. Bizonyos fehérjék esetében ez a megközelítés alkalmazható, amint azt a limfocita sejtfelszíni glikoprotein (LHR) [US 5428130. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat] és a glukagonszerű peptid (GLP-1) esetében kimutatták.



Ennek megfelelően a találmány szerinti eljárások és készítmények csökkentett immunogenitású, Fc-X- és X-Fc-formájú fúziós fehérjéket biztosítanak. A találmány szerinti megoldásban fúziós fehérje immunogenitása vizsgálható a technika állása szerinti eljárással vagy az itt feltárt eljárással.

- 5 A találmány szerint eljárások és készítmények csökkentett immunogenitású, albuminnal alkotott fúziós fehérjéket is biztosítanak. A humán eredetű szérumalbumint alkalmazzák hordozóként terápiás peptidek és fehérjék céljaira rendkívül hosszú féléletideje, széleskörű *in vivo* elterjedtsége miatt, valamint azért, mert nem hordoznak enzimátikus vagy immunológiai funkciót [Yeh és mtsai., PNAS 89: 1904-1908 (1992)]. Bioaktív peptid
- 10 HSA-val alkotott genetikai fúziója alkalmazható szekretált, terápiás HSA-származék ki-
nyerésére. A találmány szerinti megoldásban azonban az albumin-fúziósfehérjék, mint
például a HSA-CD4 új kapcsolódást tartalmaz, amely általában tartalmaz egy vagy több,
II. osztályú MHC-molekulán prezentált, egy vagy több T-sejt-epitópot. A találmány vagy
tárgyát képezi az albumin-fúziósfehérjék kevésbé immunogén formái, és az albumin-
15 fúziósfehérjék immunogenitása csökkentésére szolgáló általános eljárások. A találmány
szerinti megoldásban alkalmazható albuminfehérjék többek között az albumin fajtái,
allélikus és mutáns változatai, a fragmenseket is beleértve. Az előnyös albuminfehérjék
megtartják a vad típusú fehérje, mint például a HSA szerkezeti és funkcionális tulajdonsá-
gait.
- 20 A találmány egy másik szempontja szerint a találmány tárgyát képezik
dezimmunizált antitest-fúziósfehérjék, normál, mutáns vagy hibrid izotípusokkal, amelyek
alkalmazható mutációkat tartalmaznak. Ezek a mutációk elhelyezkedhetnek a kapcsolódás
mellett vagy a kapocsrégiótól eltérő pozícióban.
- 25 Például a találmány tárgyát képezi dezimmunizált immuncitokin, a kapcsolódás-
nál módosítva, az IgG és a nem IgG-szerű molekularészek közötti kapcsolódásnál
pontmutációval. A citokin-molekularész lehet bármely citokin, azonban előnyösen IL-2
vagy IL-12. A találmány egyik megvalósítási módja szerint az aminosavcserék lehetnek
többek között: az antitest-molekularész a C-terminális lizinje hidrofób aminosavra, mint
például alaninra vagy leucinra való cseréje. Az ilyen mutációk és a találmány szerinti
30 dezimmunizáló módosítások kombinálásának alapvető előnye az, hogy a mutációk együtt
úgy hatnak, hogy megnövelik a szérum-féléletidőt és csökkentik az immunogenitást. Az itt
leírt, a fúziós kapcsolódás dezimmunizálása és szérum-féléletidőt megváltoztató mutációk
kombinálása alkalmazható az ilyen fúziós fehérjék klinikai hatásossága jelentős mértékű
javítása céljából.



A találmány egy másik szempontja szerint a találmány tárgyát képezik immuncitokinek, amelyek tartalmaznak hibrid antitest-molekularészt, amely különböző Ig-izotípusokból származó doménokat foglal magában, előnyösen IgG1 és IgG2 közül mindkettőből, és tartalmaz dezimmunizáló módosítást a fúziós kapcsolódásnál. Például a találmány tárgyát képezi dezimmunizált, kapcsolódásnál módosított immuncitokin, amelynél IgG2- és IgG2h-hibridet (csuklórégióval IgG1-re módosított IgG2). A találmány egyik előnyös megvalósítási módja szerint a hibrid fúziós fehérje IgG-ből ($\gamma 1$: CH-1-H)($\gamma 2$: CH2-CH3) és citokin-molekularészből álló dezimmunizált immunglobulinból áll.

A találmány egy másik szempontja szerint a találmány tárgyát képezik új nukleinsav-szekvenciák, amelyek csökkentett immunogenitású fúziós fehérjéket kódolnak, vagy csökkentett immunogenitású fúziós fehérjék expresszióját, termelését és szekrécióját lehetővé teszik. Az ilyen nukleinsavakat standard, rekombináns DNS-technikák alkalmazásával állítjuk elő.

A találmány egyik előnyös megvalósítás módja szerinti nukleinsav-molekula immuncitokin-fúziósfehérjét kódol. Előnyös immuncitokin többek között citokin, például interleukin-2 és tumorspecifikus monoklonális antitest, mint például humán eredetű epitélsajt adhéziós molekula, a KSA (EP-CAM)(huKS) elleni antitest.

A találmány egy másik, előnyös megvalósítási módja szerint a nukleinsav-molekula Fc-fúziós fehérjéket kódol különböző konfigurációkban. A nukleinsav-molekula egymást követve, az 5'-3'-irányban tartalmaz 1) szignálszekvenciát, immunglobulin Fc-régióját és célfehérje-szekvenciát, vagy 2) szignálszekvenciát, célfehérjét és immunglobulin Fc-régióját, vagy 3) szignálszekvenciát, egy első célfehérjét és immunglobulin Fc-régióját és egy második célfehérjét. Az eredményül kapott nukleinsav ezáltal Fc-X-, X-Fc- vagy X-Fc-X-szerkezetet kódol, ahol X és Y célfehérjék. A találmány egy alternatív megvalósítási módja szerint a nukleinsav Fc-X-, X-Fc- vagy X-Fc-Y-fehérjét kódol, szignálszekvencia nélkül.

A találmány egy másik, előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti nukleinsav Ig-fúziós fehérjét kódol, mutáns vagy hibrid izotípussal. Specifikusan a nukleinsav hibrid izotípusú antitest-molekularészt, vagy alternatív módon, megváltoztatott kapcsolási régiójú antitest-molekularészt kódol. Például a fúziós fehérje olyan IgG2-ből áll, amelyet úgy módosítottak, hogy kevesebb diszulfidhidat tartalmazzon a kapcsolási régióban, vagy a fúziós fehérje olyan IgG2 CH2- és CH3-régiót tartalmaz, amelyben a kapcsolási régió más antitestből származik, előnyösen normál vagy mutáns IgG1 kapcsolási régiójából.

A találmány tárgyát képező nukleinsavat előnyösen működőképesen replikatív expressziós vektorba illesztjük, amelyet ezután a fúziós fehérje előállítására alkalmas, emlőseredetű gazdasejtbe juttatunk. Az eredményül kapott fúziós fehérje az emlőseredetű gazdasejtben hatékonyan termelődik és szekretálódik. A szekretált fúziós fehérjét ezt követően összegyűjtjük a tenyészközegből az emlőseredetű gazdasejt lízise nélkül. A fehérje-terméket ezután aktivitásra nézve vizsgáljuk és/vagy szükség esetén tisztítjuk hagyományos reagensek alkalmazásával és/vagy a fúziós partnerről lehasítjuk, mindvégig hagyományos eljárásokat alkalmazva.

10 Így a találmány tárgyát képezik csökkentett immunogenitású fúziós fehérjék előállítására szolgáló eljárások is.

A találmány szerinti eljárások és készítmények alkalmasak kevésbé immunogénként fúziós fehérjéket alkalmazó terápiás kezelések biztosítására is. A találmány általános célja olyan eljárások biztosítása, amelyek hatékonyak és olcsók is, valamint kevésbé immunogén fehérjék biztosítása. A találmány szerinti előnyös terápiás készítmények tartalmaznak terápiásan hatásos mennyiségű dezimmunizált fúziós fehérjét. Előnyösen, a dezimmunizált fúziós fehérjét gyógyászatilag elfogadott hordozóval együtt adjuk be.

A találmány eddig említett és más szempontjai, jellegzetességei és előnyei az alább következő, részletes leírás, az ábrák és szabadalmi igénypontok alapján még nyilvánvalóbbá válnak.

20 A jelen bejelentés az 2001. március 30-án benyújtott US 60/280 625 sz. USA-beli előzetes szabadalmi bejelentés elsőbbségét igényli, amely bejelentésben feltártak a kitanítás részét képezik.

Az alábbiakban a találmány részletes leírását adjuk meg.

25 Minden fehérje, többek között az antitestek is, amelyeket betegnek adnak be terápiás célokra, rendelkeznek azzal a lehetőséggel, hogy immunválaszt indukálnak a recipiens gazdában. Ezt az immunválaszt T-limfociták (T-sejtek) közvetítik, amelyek ezután a B-limfocitákat (B-sejteket) indukálják antitestek előállítására. A terápiás hatóanyag elleni antitest-termelés káros, mivel a terápiás hatóanyag még gyorsabb eltávolításához vezet, és allergiás válaszreakciót indíthat be.

30 A találmány tárgyát képezi fúziós fehérjék immunogenitásának csökkentésére szolgáló eljárások. A találmány szerinti egyik eljárásban potenciális T-sejt-epitópokat azonosítunk a fúziós fehérje fúziós kapcsolójában. T-sejt-epitópokat számos, számítógépes és nem számítógépes eljárással azonosítanak, többek között szerkezeti alapú számítógépes

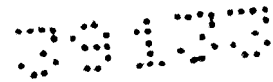


modellezésén alapuló jóslással vagy peptidek szintézisével és II. osztályú MHC-molekulákhoz való specifikus kötással vagy immunogenitási mérési eljárásban történő teszteléssel.

A találmány szerinti megoldásban fúziós kapcsolódásként fúziós fehérjében az első fehérje vagy peptid utolsó (C-terminális) aminosava és a második fehérje vagy peptid első (N-terminális) aminosava közötti pozíciót határozzuk meg. Ennek megfelelően fúziós kapcsolódás magában foglal bármely aminosavat az egyik fehérje utolsó aminosava és a második fehérje első aminosava között. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a fúziós kapcsolódás összekötőt (*linker*) tartalmaz.

A találmány szerinti értelmezésben kapocsrégióként két fehérje közötti fúziós kapcsolódást körülvevő vagy átívelő régiót értünk. Kapocsrégió előnyösen 1 és körülbelül 100 közé eső számú aminosavat, előnyösebben 1 és körülbelül 50 közé eső számú aminosavat, vagy 1 és körülbelül 25 közé eső számú aminosavat, és még előnyösebben 1 és körülbelül 15 közé, vagy 1 és 9 közé eső számú aminosavat tartalmaz. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a kapocsrégió tartalmaz a két fehérje közötti kapcsolódási pontban beillesztett távtartópeptidet (*spacer*) vagy összekötőpeptidet. A találmány szerinti megoldásban a távtartópeptidet vagy kapcsolópeptidet tartalmazó kapocsrégió szintén dezimmunizálható abból a célból, hogy a távtartópeptidet vagy a beteg kapcsolópeptidet tartalmazó fúziós peptiddel szembeni válaszreakcióját minimalizáljuk.

A találmány szerinti megoldásban kapocs-T-sejt-epitópként határozzuk meg azt a peptidszekvenciát, amely képes II. osztályú MHC-hez való kötődésre, és amely tartalmaz a legalább két fúziós partnerfehérje mindegyikéből származó legalább egy aminosavat. Például Paul közleményében [Paul., Fundamental Immunology, 8. fej., 276. old., 8. táblázat (2000, 4. kiad.)] 10 aminosavas szegmenst illusztrál, amely II. osztályú MHC-hez kötődhet. Kapocs-T-sejt-epitópban az ilyen 10 aminosavas peptidek különböző fúziós partnerekből származnak. A találmány szerinti megoldásban fúziós kapcsolódást átívelő potenciális kapocs-T-sejt-epitóp vagy kapocs-T-sejt-epitóp-jelölt (kapocs-T-sejt-epitóp-jelölt) előnyösen a kapocsrégió bármely vagy mindkét oldalából 1-8 aminosavat, előnyösebben 1-10 vagy 1-11 aminosavat tartalmaz. Az epitópjelöltek előnyösen 9, 11 vagy 12 aminosav hosszúságúak. Ennek megfelelően, mivel a találmány szerinti, kapocs-T-sejt-epitóp a kapcsolódás mindkét oldalából legalább egy aminosavat tartalmaz, az előnyös T-sejt-epitóp-jelöltek olyan kapocsepitópok, amelyek 1-8 (vagy 1-1, vagy 11) aminosavat tartalmaznak a kapcsolódás egyik oldaláról, és a kapcsolódás oldaláról szintén komplementer számú aminosavat tartalmaz, olyan epitópot eredményezve, amely 9-12, a legelőnyösebben 9 aminosavat tartalmaz.



A találmány szerinti megoldásban a kapocs-T-sejt-epitópban horgony-amino-savakat változtatunk meg, a II. osztályú MHC-molekulához való kötés megakadályozása céljából. Általában figyelmet fordítunk arra, hogy ne vigyünk be további, potenciális T-sejt-epitópokat, és megőrizzük mindkét fúziós partner funkcióját.

5 A találmány szerinti megoldásban a vad típusú szekvenciák fúziója olyan fúzió, amelyben a fúziós kapcsolódás N-terminális és C-terminális oldala közvetlenül természetes körülmények között előforduló szekvenciákból származik.

A találmány szerinti megoldásban a dezimmunizált fúziós kapcsolódás olyan fúziós szekvencia, amelyben a vad típusú szekvenciákhoz viszonyítva egy vagy több szubsztitúciós mutációt vittünk be. A találmány legelőnyösebb megvalósítási módja szerint a fúziós kapcsolódás dezimmunizálása nem foglalja magában olyan kapcsoló bevitelét, mint a „nem immunogén” Gly-Ser-kapcsoló, és a dezimmunizált fúziós fehérjében a fúziós partnerek között a térbeli viszonyt nem változtatjuk meg. A találmány szerinti megoldás szerint a fúziós kapcsolódásban egy vagy több aminosav helyettesíthető vagy megváltoztatható a fúziós kapcsolódástól akár N-terminális, akár C-terminális irányban, vagy az N-terminális és a C-terminális irányban egyidejűleg.

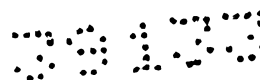
A találmány szerinti értelmezésben potenciális T-sejt-epitóp az olyan szekvencia, amelyet izolált peptidként tekintve, az a II. osztályú MHC-molekulához vagy nem emberi faj esetében azzal ekvivalens molekulához megíósolhatóan kötődik. Potenciális T-sejt-epitóp meghatározásakor nem vesszük figyelembe az antigén-feldolgozás más szempontjait, mint például az antigén-prezentáló sejtek által történő felvétel, az intakt fehérjében a II. osztályú MHC-molekulához kötődésre képes peptidet előállító hasítóhelyeken a hasítás hatékonysága és így tovább. Így potenciális T-sejt-epitóp-készlet az, amely fehérje állatnak (és embernek) történő beadásakor a II. osztályú MHC-molekulákon valójában prezentálva van.

A találmány szerinti értelmezésben T-sejt-epitóp olyan epitóp fehérjén, amely II. osztályú MHC-molekulával kölcsönhatásba lép. Anélkül, hogy bármely elmélet mellett elköteleznénk magunkat, nyilvánvaló, hogy T-sejt-epitóp fehérje vagy fúziós fehérje olyan aminosav-szekvenciája, amely a T-sejt-fejlődés során nem vett részt negatív T-sejt-szelekciós folyamaton, és ezáltal várható, hogy II. osztályú MHC-molekulákon prezentálva lesz és T-sejt-receptor felismeri. A találmány szerint előnyös megvalósítási mód szerint, a nem saját T-sejt-epitópok a fúziós fehérjét alkotó két fehérje fúziós kapcsolódásánál a kapocsrégióban vannak jelen.

A találmány tárgyát képezik olyan, nem számítógépes eljárások, amelyek fúziós fehérje kapcsolódásában a T-sejt-epitópok számának csökkentésére, vagy azok megszüntetésére szolgálnak, anélkül, hogy bonyolult számítógépes szimulációra vagy háromdimenziós fehérjeszerkezetekre lenne szükség. A találmány egyik megoldása szerint a találmány szerinti eljárás azt a tényt használja ki, hogy kilenc aminosavból álló „magszegmens” lép kölcsönhatásba a II. osztályú MHC-molekulával és a T-sejt-receptorral az antigén-prezentáció során. Az N-terminális aminosavat horgonypozíciójú aminosavnak nevezük, és ez a II. osztályú MHC-molekulában egy mély „zsebbe” kötődik. A horgonypozícióban tipikusan jelen levő, a II. osztályú MHC-molekulához való kötődéshez fontos aminosavak a következőkben felsoroltak lehetnek: leucin, valin, izoleucin, metionin, fenilalanin, tirozin és triptofán. A találmány szerinti megoldásban a magot képező 9 aminosavval szomszédos 2-3 további aminosav szintén hatást gyakorol az MHC-molekulákkal való kölcsönhatásra. Ráadásul a fúziós fehérjében az első fehérje C-terminális aminosavát általában helyettesíthetjük. Ez különösen akkor alkalmazható, ha az N-terminális fúziós partner vagy első fehérje ismert módon aktív, ha a C-terminális fúziós partnerrel vagy másodikkal fehérjével van fuzionáltatva C-terminálisan.

A találmány szerinti általános eljárás magában foglalja bármely olyan leucin, valin, izoleucin, metionin, fenilalanin, tirozin vagy triptofán mutációját, amely fúziós fehérje N-terminális fúziós partnere C-terminális nyolc aminosavában található. A találmány egyik megvalósítási módja szerint az ilyen, kapocs-T-sejt-epitóp-jelölt aminosavak közül egyet vagy többet treoninra, alaninra vagy prolinra változtatunk. Ez megtartja a helyettesített aminosav bizonyos mértékű hidrofób természetét. A találmány további megvalósítási módjai szerint a fent említett aminosavak közül egyet vagy többet deletálunk a T-sejt-epitóp-jelöltekből vagy potenciális T-sejt-epitópból, vagy ezeket alkalmas aminosav-analógokkal helyettesítjük. A találmány szerinti megoldásban, ha potenciális T-sejt-epitóp megsemmisítése céljából aminosavakat deletálunk, figyelmet kell fordítanunk arra, hogy ne keletkezzen a deléciónak melletti aminosavakat magában foglaló új T-sejt-epitóp.

A találmány szerinti megoldásban gyakran alkalmazható az olyan, általános expressziósplazmid-konstrukciók intermedier összeállítása, amely tartalmaz az N-terminális fúziós partner kódoló szekvenciájában az utolsó nyolc aminosav egy vagy több hidrofób aminosavára nézve mutációt. Általában az ilyen plazmid tartalmaz egy vagy több, könnyen alkalmazható restrikciós enzimhelyet, az N-terminális fúziós partnert kódoló DNS C-terminálisánál vagy ahhoz közel.



Intermedier plazmidkonstrukció célja expressziós plazmidok szerkesztése, amelyek olyan fúziós fehérjét kódolnak, amelyben az egy vagy több, N-terminális fúziós partner esetében egy vagy több leucin, valin, izoleucin, metionin, fenilalanin, tirozin vagy triptofán más aminosavra van cserélve az utolsó nyolc, C-terminális aminosav esetében.

Az ilyen, végső expressziós plazmidok szerkesztése végrehajtható a technika állása szerinti ismert számos eljárás alkalmazásával, mint például PCR-fragmensek vagy szintetikus nukleinsavak előállítása, majd a fragmensek alkalmas vektorba történő ligálása vagy más szekvenciákkal történő csatlakoztatása jól ismert PCR-technikák alkalmazásával.

A találmány specifikusan előnyös megvalósítási módjai szerint alkalmazunk Fc-X-fúziósplazmidokat, albumin-X-fúziósplazmidokat, scFv-X-fúziósplazmidokat és Fab-X-fúziósplazmidokat. Az Fc(gamma)-X esetében alkalmazható mutációk kódoló szekvenciába történő bevitele az IgG1-, IgG2-, IgG3- vagy IgG4-molekula Fc-régió a C-terminális közelében a leucin-szerin-leucin-szerin-szegmens aminosav-helyettesítése végrehajtása céljából, amint azt az IgG1 esetében bemutatjuk: Az IgG1-ből, IgG2-ből, IgG3-ból és IgG4-ből származó, humán eredetű Fc-régiók szekvenciáit az 1., 2., 3. és 4. azonosító-számú szekvenciák (ezentúl: a. sz.) írják le.

Példaként említve, a KSLSLSPGK (5. a. sz.) szekvenciát a KSATATPGK (6. a. sz.) cseréljük. Ezt a mutációt abból a célból terveztük, hogy megszüntessük a potenciális kapocs-T-sejt-epitópokat, valamint eltávolítsuk azt a T-sejt-epitópot, amelyben az 5'-irányú (*upstream*) fenilalanin vagy tirozin szolgál 1. pozíciójú horgony-aminosavként.

Alternatív módon bizonyos esetekben alkalmazható a kapcsolódási T-sejt-epitóp-jelöltet eltávolító mutációk és olyan mutáció kombinálása, amely kiterjeszti a szérum-féléletidőt. Példaként említhetjük a KSLSLSPGK (5. a. sz.) szekvencia KSATATPGA (7. a. sz.) szekvenciára történő változtatását.

A találmány más megvalósítási módjai szerint többek között az LSLS-szegmensben más aminosavakra, mint például glicinre vagy prolinra történő helyettesítéseket hajtunk végre.

IgA-fúziósfehérjék előállítására alkalmazott expressziós vektorok esetében alkalmazható bizonyos C-terminális aminosavak delécioja úgy, hogy az IgA oligomerizációjában szerepet játszó, C-terminálishoz közeli ciszteint deletáljuk. Például tizenöt aminosavat deletálhatunk egy másik fehérjével történő fuzionáltatás előtt, úgy, hogy az IgA nehézlánc-szekvenciája végződése prolin-treonin-hisztidin legyen. Ráadásul alkalmazható a következő változások bevitele az IgA Fc-régiójában, a CH3-doménjában, a C-terminális

közelében: a QKTIDRLAGKPTH (8. a. sz.) szekvenciát a QKTADRTAGKPTH (9. a. sz.) szekvenciára cseréljük. Az IgG-X-fúziófehérjében további, dezimmunizáló szekvenciák:

QKTPTRTAGKPTH (10. a. sz.)

QKTPTRPAGKPTH (11. a. sz.)

5 QKTATRPAGKPTH (12. a. sz.)

Albumin-X-fúzió esetében alkalmazhatók a következő változtatások albumin-X-expressziós plazmidba történő bevitele úgy, hogy az albumin C-terminálisát a következők szerint módosítjuk:

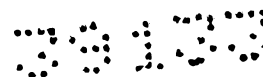
10 a KKLVAASQAALGL (13. a. sz.) szekvenciát a KKLVAASQAATTA (14. a. sz.) változtatjuk.

Így a találmány tárgyát képezik nukleinsav-szekvenciák és fehérjék, amelyek alkalmasak kevésbé immunogén fúziós fehérjék tervezésében. Specifikusan a találmány tárgyát képezik az utolsó nyolc aminosavban bármely leucin, valin, izoleucint, metionint, fenilalanint, tirozint vagy triptofánt érintő mutációkkal. A fehérjék előnyösen humán eredetű fehérjék olyan szekvenciákkal, amelyek az általában az emberi testben található szekvenciákkal egyeznek meg. A találmány tárgyát képezik ezen felül az ilyen fehérjéket kódoló nukleinsav-szekvenciák. A találmány ilyen szempontja szerint a nukleinsav-szekvenciák lehetnek plazmidok, PCR által előállított fragmensek vagy kémiai szintézissel előállított nukleinsav formájában.

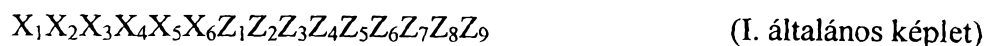
20 A találmány tárgyát képezik továbbá fúziós fehérjéket kódoló expressziós plazmidok, amelyekben egy vagy több N-terminális fúziós partnerben a nyolc C-terminális aminosavban leucin, valin, izoleucint, metionint, fenilalanint, tirozint vagy triptofánt más aminosavra cserélő, egy vagy több mutáció van.

25 Például a találmány tárgyát képezi Fc-IL2-t kódoló plazmid vagy a teljes antitest-IL2-fúziós fehérjét kódoló plazmid, ahol az Fc-régió a fentiek szerint mutációt hajtottunk végre. Ráadásul a találmány tárgyát képezi a fentiek szerinti mutációt hordozó Fc-régió és az eritropoietin normál vagy mutált formáit, mint például a WO 01/36489. sz. nemzetközi közzétételi iratban leírt formákat tartalmazó fúziók.

30 A találmány tárgyát képezi továbbá fúziós fehérje immunogenitását csökkentő eljárás, amely során a fúziós kapcsolódás közelében, vagy előnyösen a fúziós kapcsolódásnál N-kötött vagy O-kötött glikozilációs helyeket viszünk be. Például aszparagint, szerint vagy treonin és egy harmadik aminosavat viszünk be a következőképpen. Vegyünk például egy



szekvenciát, amelyben X az N-terminális fúziós partner aminosavait, és Z a C-terminális fúziós partner aminosavait képviseli:



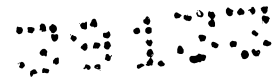
5

Az ilyen eljárás szerint kapcsolópeptid kötése nem szükségszerűen blokkolódik glikozilációs hely bevitelével. Bármely peptid azonban, amely a II. osztályú MHC-árokba kötődik és a horgony-aminosav mellett közvetlenül C-terminális vagy N-terminális, glikozilált aszparagint tartalmaz, nem működik T-sejt-epitópként. A nagy, glikozilációs molekularész térben gátolja a II. osztályú MHC – peptidkomplex felismerését. Az előnyös glikozilációs hely magában foglalja az Asn-X-Ser vagy Asn-X-Thr szekvenciákat, ahol X előnyösen Gly, azonban lehet bármely aminosav.

Ráadásul glicin- és szerin-aminosavakat bejuttató mutációk nem hoznak létre új T-sejt-epitópokat. A glicin és szerin közül egyik sem lehet horgony-aminosav. Az antigénfeldolgozás során a fúziós fehérje elvileg a glikozilált aszparagin és a glicin, vagy a glicin és a szerin között hasad. Mindkét esetben az eredményül kapott peptidekben a horgony-aminosavtól N-terminális irányban a mutáns glicin és/vagy szerin aminosav lesz, és így a mutáns glicin és/vagy szerin aminosavat T-sejt-receptor nem ismeri fel, mivel horgony-aminosavtól N-terminális irányban elhelyezkedő aminosavakat a TCR nem ismeri fel.

Az eljárás egyik változata szerint a fúziós kapocsrégió eleve tartalmaz szerint vagy treonint, amelyet olyan aminosavak előznek meg, mint a glicin, szerin, alanin stb. Előnyösen a második eljárást alkalmazzuk akkor, ha a kapocsrégió flexibilis és mindegyik fúziós partner hidrofób magjától eltávolodik úgy, hogy az új N-kötött glikoziláció nem interferál egyik fúziós partner feltekeredésével (*folding*) vagy funkciójával sem.

A fehérjetervezési technikában jártas szakember számára nyilvánvaló annak meghatározása, hogy mikor hajtható végre glikozilációs hely bevitele. Például ismert lehet mindegyik fúziós partner vagy közeli homológjaik háromdimenziós szerkezete. Gyakran előfordul, hogy egy fehérje N-terminális vagy C-terminális részén néhány aminosav a röntgenkristallográfiai szerkezetben nincs megoldva, vagy az NMR-szerkezeten több, lehetséges konformációt mutat. Olyan esetekben, ha egy glikozilációs helytől bármelyik irányban három vagy több aminosav rendezetlen, van valamekkora valószínűsége annak, hogy az eredményül kapott fúziós fehérje megfelelően tekeredik fel és mindkét partner aktív lesz.



Bizonyos rutinszerű kísérleti munka szükséges annak meghatározására, hogy az adott fúziós fehérje működőképes lesz-e.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a fúziós fehérje N-terminális és C-terminális partnere közül mindkettő humán eredetű fehérje. Az ilyen fúziós fehérjékben
5 potenciális T-sejt-epitópokat hozunk létre az N-terminális partner (első fehérje) utolsó nyolc aminosavától, a C-terminális partner (második partner) első nyolc aminosavával kombinálva. Ez 8 hibrid, 9 tagú szekvenciát ad, amelyeket az első és a második fehérjéből hoztunk létre. Az első fehérje utolsó nyolc aminosava között alifás vagy aromás aminosav (leucin, izoleucin, metionin, fenilalanin, triptofán vagy tirozin) jelenléte megnöveli annak
10 veszélyét, hogy olyan MHC-kötő peptidet hozunk létre, amelynek első pozíciójában (horgonypozíció) MHC-molekula zsebébe kötő aminosav van.

Ezáltal a fenti aminosavak bármely, nem a fenti aminosavakra, előnyösen alaninra, prolinra vagy treoninra helyettesítő szubsztitúciói megszüntetik a T-sejt-epitóp-jelöltet.

15 Például a következő szekvenciát tartalmazó, Fc-fúziósfehérje esetében:

HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGS (15. a. sz.) a leucin-aminosav két potenciális epitópot hoz létre. Ezáltal a szekvencia dezimmunizálható a következőképpen:

20 HNHYTQKSATATPGKGGGGSGGGGSGGGGS (16. a. sz.), az L-t A-ra és az S-t T-re cserélve. Ezek a cserék eltávolítják az epitópokat, ahol az MHC-kötőzsebben az első aminosav leucin illetve a tirozin.

Humán fehérjék esetében ezek a szubsztitúciók Fc-fúziósfehérjék esetében dezimmunizálási célokra működnek, kapcsolsszekvenciákkal és anélkül is, előnyösen akkor, ha 1) a fúziós fehérjében mindkét fehérje humán eredetű fehérje, 2) mindkét fehérje természetes szekvenciáiban az MHC-kötő figyelmen kívül hagyjuk, és 3) az eredeti szekvenciákban a 9-tagú szekvenciákat szintén figyelmen kívül hagyjuk.
25

A találmány szerint eljárások általában alkalmazhatóak minden gerinces szervezet esetében, előnyösen emlősök esetében és a legelőnyösebben emberre alkalmazva. A továbbiakban a következő, nem korlátozó jellegű példákkal illusztráljuk a találmányt.

PÉLDÁK

1. Példa

huKS-IL2-immuncitokin immunogén reaktív epitópjai meghatározása

A huKS-IL2 humán eredetű, H-lánccal és L-lánccal kombinált, humanizált V_H - és V_L -régiókból áll. A H-láncot C-terminálisán humán eredetű IL-2 érett szekvenciájával fuzionáltattuk, a korábban leírtak szerint. Ez a $\gamma 1$ -izotípus H-lánca, és nagy affinitása van az Fc-receptorokra nézve. Az ilyen affinitás miatt a huKS-IL2 a keringésből gyorsan eltávolítódik. Nem kívánjuk elkötelezni magunkat egyik elmélet mellett sem, azonban a huKS-IL2 eltávolítása valószínűleg elsődlegesen a májban (Kupffer-sejtek) és a lépben (antigén-prezentáló sejtek) FcR-t hordozó sejtjei által történik meg.

Korábban megállapították, hogy egyes betegekben a huKS-IL2 bizonyos részei immunválaszt váltottak ki, azonban az ilyen antitestek által felismert epitópok nem ismertek. A reaktív epitópok meghatározása céljából a betegek széruma huKS-IL2-vel szembeni viszonylagos reaktivitásait más, hasonló fehérjékkel összehasonlítottuk:

1) hu14.18-IL2, amely molekula teljesen különböző, humanizált V -régiókat, azonban pontosan ugyanazt a C-régiót, és IL-2-vel alkotott fúziós kapcsolódást tartalmazza,

2) VH1, a huKS-IL2 dezimmunizált formája, a V_H - és V_L -régióban nincs T-sejt-epitóp, és amely egéredetű V -régióból származik, felszínre kitett egér-B-sejt-epitópokkal, amelyek felületét humán aminosavak alkotják (*veneered to human residues*).

3) VH2, a huKS-IL2 dezimmunizált formája, a CDR3-ban egy maradék T-sejt-epitóppal, amely egéredetű V -régiókból származik, felszínre kitett egér-B-sejt-epitópokkal, amelyek felületét humán aminosavak alkotják, ahol a VH egy T-sejt-epitópot tartalmaz.

4) 425-IL2, akár KOL- vagy EU $C\gamma 1$ -régiókkal (KS helyett) (allotípusos reaktivitás összehasonlítása céljából),

5) huKS-mIL2 – egéredetű C-régióval és egéredetű IL-2-vel fuzionáltatott huKS- V -régiókat tartalmazó molekula

6) humán eredetű Fc-IL2,

7) csak humán eredetű Fc,

8) csak humán eredetű IL-2.

Immunglobulin-fúziósfehérjéket és fragmenseit protein-A-Sepharose-kromatográfia alkalmazásával tisztítottuk, és 96-üregű lemezeket burkoltunk bikarbonát-pufferben, és ezután 1% BSA-t tartalmazó 1%-os kecskeszérummal blokkoltuk. A betegek szérumai-

nak hígításait inkubáltuk, és ezután a nem kötött anyagot háromszoros, PBS-*Tween*-nel történő mosással eltávolítottuk. A betegek szérumából származó antitesteket különböző, HRP-vel konjugált antitestekkel detektáltuk, a kötött fehérjétől függően. Általában kecske-eredetű, humán λ -lánc-elleni HRP-konjugátumot alkalmaztunk, mivel a legtöbb, lemezre kötődött fehérje humán eredetű Fc-t és humán eredetű κ -láncokat tartalmazott.

Bizonyos betegek széruma a huKS-IL2-vel szemben nyilvánvaló reaktivitást mutatott, ami nem volt detektálható az azonos betegek injektálás előtt vett szérumai esetében. „Preimmun” antiszérumot alkalmaztunk a nem immunizált kontroll-alapvonal megállapítása céljából. A betegek szérumánál tapasztalt reaktivitás a következőknek tulajdonítható: 1) IL-2-elleni reaktivitás, 2) Fc-elleni (allotípusos) reaktivitás, 3) az új kapocsszekvenciával szembeni reaktivitás, vagy 4) a KS-idioípusal való anti-idiotípusos reaktivitás, vagy a reaktivitások kombinációja.

Nem volt olyan betegszérum, amely jelentős mértékben reagált volna rekombináns IL-2-vel vagy az Fc-régióval (fent, 1. és 2.) szemben. Egyes betegek a KS V-régiójával szemben anti-idiotípusos reaktivitást mutattak. Minden betegszérum reaktív volt az Fc-IL-2-vel szemben. Négy beteg közül három volt reaktív az Fc-IL-2-vel szemben. Az Fc-IL-2-vel szembeni reaktivitás, azonban az Fc-vel és az IL-2-vel szembeni reaktivitás elmaradása azt valószínűsíti, hogy az Fc és IL2 közötti kapcsolódást ismeri fel a betegszérum.

2. Példa

Aminosavak módosítása antitest-citokin-fúziósfehérjében antitest-citokin-fúziósfehérje II. osztályú MHC kötőmotívumai eltávolításával, az immunogenitás csökkentése céljából

A peptidfelfűzési vizsgálat (*threading*) két átlapoló peptidszegmenst azonosított, erős MHC-kötő potenciállal az immuncitokin Fc- és IL-2-része közötti kapcsolódásnál. A peptidfelfűzést és potenciális T-sejt-epitópok meghatározását Carr közleménye szerint [WO 00/34317. sz. nemzetközi közzétételi irat] hajtottuk végre. Az aminosavcseréket úgy hajtottuk végre, hogy a létező, potenciális II. osztályú MHC-kötő epitópokat megszüntessük, azonban új, potenciális II. osztályú MHC-kötő epitópokat ne vigyünk be.

Az LSLSPGK-AP (17. a. sz.) kapocsszekvencia ATATPGA-AP (18. a. sz.) „LSLS ATAT-ra”) szekvenciára történő módosítása, ahol a kötőjel az immuncitokin huKS-IL2-kapcsolódás, a kapocseredetű peptidszekvenciát bármely, humán eredetű, II. osztályú MHC-hoz való, immunogenitás eredményezéséhez eléggé nagy affinitású kötésre képtelenné teszi.



3. Példa

Aminosavak módosítása az immunocitokin-fúziófehérjék kapcsolódásánál az immunogenitás csökkentése céljából

- 5 Az LSLSPGK-AP (17. a. sz.) kapocsszekvencia LNLSPGA-AP-ra (19. a. sz.) („LSLS az LNLS-re”) történő módosítása, ahol a kötőjel az immuncitokin huKS-IL2-kapcsolódás, olyan, kapocseredetű peptidszekvenciát eredményez, amely még képes bizonyos mértékű, II. osztályú MHC-molekula kötésére. Ha azonban a KS-IL2-fehérjét emlőseredetű sejtekben expresszáljuk és szekretáljuk, a fehérje N-glikozilálódik a kapcsolódás mellett az NXS/T-szekvencia miatt.
- 10 Az eredményül kapott, kapocseredetű peptidek nem hatékonyak T-sejt-epitópként, mivel a kapocseredetű peptidek II. osztályú MHC által T-sejteknek történő bemutatásakor a nagy N-glikozilációs molekularész megakadályozza a T-sejt-receptor és a II. osztályú MHC közötti specifikus dokkolást.

4. Példa

- 15 Az antigén-prezentáló sejtek huKS-IL2-immuncitokinnel szembeni immunreaktivitásának jellemzése a dezimmunizált huKS-IL2-immuncitokinnel összehasonlítva

Az immunreaktivitásnak a reaktív epitóp LSLS-ről ATAT-ra való módosítása általi csökkentését közvetlenül teszteltük a következőképpen. Az ilyen szekvenciákat utánzó, szintetikus peptidek megváltoztatják klasszikus antigén-prezentáló sejtek, mint például dendritikus sejtek (DC) által adott immunválaszt. A következő szintetikus peptideket alkalmaztuk DC által közvetített, autológ T-sejteknek történő antigén-prezentálás stimulálására:

KSLSLSPGK-APTS (20. a. sz.), és

KSATATPGK-APTS (21. a. sz.),

- 25 ahol a kötőjel a KS-IL2-kapcsolódás. Az ilyen T-sejteknek a peptidantigénnek való kitettségre válaszreakcióként adott proliferációra való képessége szolgál az adott peptid immunogenitási mértékeként.

Specifikusan, perifériás, mononukleáris vérsejteket (PBMC-k) izoláltunk leukopakból standard sűrűséggradiens-technikákkal. A mononukleáris sejteket szérumbesűrt *Aim-V*-tápközegben reszuszpendáltuk és kitapadni hagytunk. A kitapadt sejteket 7 napig tenyésztettük humán eredetű GM-CSF-et (50 ng/ml) és IL-4-et (20 ng/ml) tartalmazó tápközegben, éretlen dendritikus sejtállapotig (DC). 7 nap elteltével a sejteket összegyűjtöttük és fenotípust jellemeztük *flow* citometria alkalmazásával, alkalmas, FITC-jelölésű, I.



osztályú MHC-elleni, II. osztályú MHC-elleni, CD80- és CD40-elleni antitestekkel, az éretlen DC-fenotípus igazolása céljából.

A nem kitapadt sejteket IL-2-vel és IL-7-tel tenyésztettük abból a célból, hogy autológ effektorsejteket (T-sejteket) kapjunk, amelyeket a következő funkcionális vizsgálatokban alkalmaztunk. Funkcionális vizsgálatok céljából T-sejteket adtunk éretlen dendritikus sejtekhez (10:1 arányban) és huKS-sel, dezimmunizált huKS-sel, 13 tagú dezimmunizált peptidkapcsolóval (KSLSLSPGK-APTS) (20. a. sz.) és a módosított, dezimmunizált 13 tagú peptiddel (KSATATPGK-APTS) (21. a. sz.) együtt tenyésztettük. A proliferációs index (a triciált timidin beépülésének mértéke mindegyik immunocitokinnek, vagy immunogén és módosított, dezimmunizált peptidnek való kitettség után) mutatja mindegyik molekula immunogenitása mértékét. Konkrétan, a radioaktív beépülés hozzávetőlegesen arányos minden peptid esetében a DC-n található, II. osztályú MHC-molekulához való kötődés és a T-sejteken való prezentálhatóság képességével.

5. Példa

Az albumin-fúziósfehérjéken található immunreaktív epitópok meghatározása és aminosavak módosítása a fúziós kapcsolódásban az immunogenitás csökkentése céljából

A humán eredetű szérumalbumint (HSA) rendkívül hosszú féléletideje, széleskörű *in vivo* elterjedtsége és az enzimatis és immunológiai funkciók hiánya miatt alkalmazzák terápiás peptidek és fehérjék hordozójaként. Kimutatták, hogy genetikailag módosított HSA-CD4-hibrid blokkolja a humán immundeficiencia-vírus CD4⁺-sejtekbe való bejutását, miközben a szolubilis CD4-hez hasonló antivirális *in vitro* tulajdonságokat mutat [Yeh és mtsai., PNAS 89: 1904-1908 (1992)]. Így bioaktív peptidek HSA-val való genetikai fúziója alkalmas szekretált, terápiás HSA-származékok előállítására. A HSA-CD4 azonban, mint minden fúziós fehérje, tartalmaz új kapocsrégiót, amely immunogén lehet és tartalmazhat II. osztályú MHC-n prezentálható T-sejt-epitópokat. A HSA és a CD4 közötti kapcsolódás 1., 2., 3. és 4. példánál leírtak szerinti vizsgálatával azonosíthatóak az MHC-kötő lehetőséggel rendelkező peptidek. A potenciálisan immunogén szekvenciákat módosítjuk a potenciálisan T-sejt- és B-sejt-epitópok (száma) csökkentése vagy azok megszüntetése, az immunogenitás mértékének csökkentése céljából. Hasonló módon új glikozilációs helyet vihetünk be a kapocsrégióba az immunogenitás csökkentése céljából.

Albuminszekvencia

CD4-szekvencia

TCFAEEGKKLVAAASQAALGL-

KKVVLGKKGDTVELTCTAS (22. a. sz.)



A találmány szerinti megoldásban a HSA-IFN α -fúziósfehérje kapocsrégiója három T-sejt-epitóp-jelöltet tartalmaz:

KKLVAASQAALGL (13. a. sz.),

KLVAASQAALGLC (23. a. sz.).

5 és LGLCDLPQTHSLG (24. a. sz.)

A 13. és a 23. azonosítószámú szekvenciák alatt feltüntetett szekvenciák átlapolóak, és dezimmunizálhatóak az LV (félkövérrel jelölve) bármilyen aminosavra (kivéve F, I, L, M, V, W és Y) történő cseréjével. Alternatív módon a peptidfelfűzési (*threading*) index jelentős mértékben csökkenthető az LG TT-re való cseréjével. A 24. azonosítószámú szekvenciában a T-sejt-epitóp dezimmunizálható a második L (félkövérrel jelölve) A-ra történő cseréjével.

Ráadásul a találmány szerinti megoldásban HSA-X-fúzió esetében, ahol X lehet bármely fehérje, a fúziós kapcsolódás dezimmunizálását az AALGL (25. a. sz.) szekvencia TATTA (26. a. sz.) szekvenciára való cseréjével érjük el: CFAEEGKKLVAASQTATTA
15 (27. a. sz.).

6. Példa

X-Fc fúziós fehérjék és aminosavak módosítása a fúziós kapcsolódásban az immunogenitás csökkentése céljából

Egyes esetekben specifikusan előnyös X-Fc-orientációjú fúziós fehérje tervezése.
20 Az ilyen konstrukciók esetében az N-terminális fúziós fehérje a célfehérje, amelyet Fc-fragmens követ. Például a glukagonszerű peptid (GLP-1) aktivitásához szabad N-terminális részt igényel, így a GLP1-Fc-fúzió alkalmazható.

GLP1-Fc-fúziósfehérjét szerkesztünk a technikában ismert eljárások alkalmazásával. Ez a fúziós fehérje a C-terminálisán γ 1-nehézlánc kapocsrégiójához kapcsolt GLP1-et tartalmaz. Olyan γ 1-kapocsszekvenciát alkalmaztunk, amely az IgG1—könnyűláncal diszulfidhidat képező Cys-aminosavat megszüntető Cys-Ser-mutációt (5. aminosav) tartalmaz [Lo és mtsai., Protein Engineering 11: 495-500 (1998)]. A nem mutáns szekvenciát: EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG (28. a. sz.) (a kapocsrégiót aláhúzással jelöltük) a CH2-domén-szekvencia eleje követi.

30 A GLP1(7-37) és a mutáns Fc közötti fúziós kapcsolódás:

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG –

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLG (29. a. sz.).

A GLP1(7-37) és a normál Fc közötti fúziós kapcsolódás:

SYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG (30. a.sz.).

A GLP-1 és az Fc közötti fúziós kapcsolódásnál három, potenciális epitópot azonosítottunk a peptidfeldfűzési technikával:

KEFIAWLVKGRGE (31. a. sz.)

EFIWLVKGRGEP (32. a. sz.)

5 AWLVKGRGEPKSS (33. a. sz.)

A GLP-1 (félkövér) és az Fc (normál) közötti fúziós kapcsolódás vizsgálata, amelyet az 1-3. példánál leírtak szerint hajtottunk végre, azonosítja az MHC-kötő potenciállal rendelkező peptideket. A potenciális helyek peptidfeldfűzési vizsgálattal történő azonosítása után a potenciálisan immunogén szekvenciákat aminosav-szubsztitúcióval módosítjuk a
10 potenciális T- és B-sejt-kötő epitópok (számának) csökkentése vagy azok megszüntetése, és az immunogenitás csökkentése céljából.

A fenti, potenciális T-sejt-epitópokat a 31., 32. és 33. azonosítószámú szekvenciaként tüntettük fel, és egyszeres aminosav-szubsztitúcióval dezimmunizáltuk. Például a 31. azonosítószámú szekvenciaként feltüntetett peptidet úgy dezimmunizáltuk, hogy a lizint
15 (félkövérral jelölve) treoninra, és az arginint (félkövérral jelölve) treoninra cseréltük. A 32. azonosítószámú szekvenciaként feltüntetett peptidet úgy dezimmunizáltuk, hogy az izoleucint (félkövérral jelölve) alaninnal vagy prolinnal helyettesítjük, és a 33. azonosítószámú peptidet a leucint alaninra vagy prolinra cserélve dezimmunizáltuk. Az eredményül kapott, dezimmunizált kapcsolódás:

20 **HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFAAWAVTGTG-**
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLG (34. a. sz.).

Egy fúziós kapcsolódásnál glikozilációs hely bevitelére példaként említhető eljárás szerint a következő változtatásokat vittük be:

SYLEGQAAKEFIAWLVKGRN – **GSKSSDKTHTCPPCPAPELLG** (35. a. sz.)

25 **7. Példa**

Az ENBREL, egy TNF-Fc-fúziósfehérje immunogén reaktív epitópjai megállapítása és a fúziós kapcsolódásnál aminosavak módosítása az immunogenitás csökkentése céljából

30 Az ENBREL vagy etanercept az FDA által jóváhagyott fúziós fehérje, rheumatoid arthritis kezelésében alkalmazott tumornekrózisfaktor (TNF) inhibitor. Az ENBREL dimer fúziós fehérje, amely TNF-receptor extracelluláris ligandkötő doménja humán IgG1 Fc-fehérjéhez kapcsolva. A TNFR-Fc teljes mértékben gátolja a TNF receptorához való kötődését, és a kötött TNF-et biológiailag inaktívvá teszi, a gyulladásos aktivitás jelentős mér-



tékű csökkentését eredményezve. Amint azt a fentiekben a GLP-1-Fc eseténél leírtuk, a TNFR-Fc új kapcsolódással bír, amely potenciális T-sejt-epitópokat tartalmaz.

A TNF-R C-terminális része (félkövér) g1-kapocsrégió (normál betű, a kapocsrégiót aláhúzással jelöltük) N-terminálisával közvetlenül fuzionáltatva a kapcsolódás:

5 **STSFLPMGSPSPAEGSTGD – EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG** (36. a. sz.)

A TNF-R és az Fc közötti kapcsolódás vizsgálata, amelyet az 1-4. példánál leírtak szerint hajtunk végre, MHC-kötő potenciállal rendelkező peptideket azonosít. A potenciális helyek peptidfelfűzéssel történő azonosítása után a potenciálisan immunogén szekvenciákat aminosav-helyettesítéssel módosítjuk a potenciális T- és B-sejt-epitópok (számának) csökkentése vagy azok megszüntetése céljából, és az immunogenitás csökkentése céljából.

Egy fúziós kapcsolódásnál glikozilációs hely bevitelére példaként említhető eljárás szerint a következő változtatásokat vittük be:

15 **STSFLPMGSPSPAEGSTGN – GSKSCDKTHTSPSPAPPELLG** (37. a. sz.)

8. Példa

Fc-X-Y fúziós fehérjék, mint például Fc-IL12-IL2 immunogén reaktív epitópja meghatározása és a fúziós kapcsolódásnál aminosavak módosítása az immunogenitás csökkentése céljából

Fc-X-Y orientációjú fúziós fehérjék, mint például az Fc-IL12-IL2, több új, fúziós kapcsolódást tartalmaz, amelyek potenciálisan immunogének. Például az Fc-IL-12 fúziós kapcsolódása hasonló más Fc-X fúziós fehérjékhez vagy immuncitokinekhez (1. példa), azonban új az IL12-citokin alkalmazása miatt. A fúziós kapcsolódást vizsgáljuk immunogén kötőhelyekre nézve, és ennek megfelelően módosítjuk. Másodszor, van egy X-Y fúziós kapcsolódás az 5. példánál leírtakkal összehasonlítható módon, ahol két különböző citokin alkot fúziós fehérjét. Mindegyik fúziós kapcsolódás esetében peptidfelfűzési vizsgálatot alkalmaztunk.

A kapcsolódás vizsgálata:

1) **MHEALHNHYTQKSLSLSPGK – RNLPVATPDPGMFCLHH SQ**
(38. a. sz.)

30 az Fc C-terminálisa (félkövér) és az IL12p35 (normál betű) N-terminálisa között,
és

2) **RAQDRYYDDDWSEWASVPCS – APTSSSTKKTQLQLEHLLLD**
(39. a. sz.)

az IL12p40 (félkövér) C-terminálisa és az IL-2 (normál betű) N-terminálisa között peptidfelfűzéssel azonosítottuk az MHC-kötő potenciállal rendelkező peptideket. A potenciálisan immunogén szekvenciákat módosítjuk a potenciális T-sejt-epitópok (száma) csökkentése vagy azok megszüntetése céljából.

5 Például a fenti, 1. szekvencia esetében, a következő változtatásokat hajtottuk végre:

MHEALHNHYTQKSATATPGK – **RNLVPVATPDPGMFPC LHHSQ**
(40. a. sz.).

10 Ezek a változtatások csökkentik vagy megszüntetik néhány T-sejt-epitóp II. osztályú MHC-kötő potenciálját az Fc és az IL12 p35-alegysége kapcsolódásánál.

Egy másik példánál, a fenti, 2. szekvenciát úgy módosítottuk, hogy glikozilációs helyet viszünk be az IL-2-ben az első két pozícióban aszparagin és glicin bevitelével. Ez a stratégia a természetes körülmények között, az érett IL-2 3. pozíciójában található treonint használja fel. Ráadásul, fontos, hogy ne akadályozzuk meg a diszulfidhíd kialakulását a
15 p40-molekularészben, mivel ez alkalmas arra, hogy a p40 ciszteinjétől legalább egy vagy két aminosavval elválassza a glikozilációs helyet.

RAQDRYYSSSWSEWASVPCS – **NGTSSSTKKTQLQLEHLLLD** (41. a. sz.).

Az IL1240-IL2 fúzió esetében glikozilációs hely bevitele a fentiekben ismertetett módon a következő potenciális T-sejt-epitópokat állítja elő:

20 **SEWASVPCSNGTS** (42. a. sz.)

ASVPCSNGTSSST (43. a. sz.)

A T-sejt-epitóp glikozilációja azonban megakadályozza a II. osztályú MHC kötődését, így csökkent immunogenitást eredményezve.

9. Példa

25 X-Fc-Y fúziós fehérje immunogén reaktív epitópjai meghatározása és a fúziós kapcsolódásnál aminosavak módosítása a II. osztályú MHC-kötés csökkentése céljából

Az X-Fc-Y konfigurációjú fúziós fehérjék, mint például az IL4-Fc-GMCSF, több, olyan fúziós kapcsolódást tartalmaznak, amelyek potenciális T-sejt-epitópokat tartalmaznak. Az IL4-Fc más, X-Fc fúziós fehérjék kapcsolódási analógja (6. és 7. példa), azonban új az IL-4 citokin alkalmazása miatt. Például humán $\gamma 1$ -ből származó kapocsrégiót, CH2- és CH3-domént tartalmazó Fc-formát alkalmazunk. Amint azt a fentiekben állítottuk, $\gamma 1$ -kapocsszekvencia pdCs-huFc $\gamma 1$ -ben tartalmazhat Cys-Ser-mutációt (aláhúзва), amely megszünteti az IgG1 könnyűláncával diszulfidhidat képező Cys-aminosavat [Lo és mtsai., Protein Engineering 11: 495-500 (1998)], ezáltal harmadik, potenciálisan immunogén fú-

ziós kapcsolódást előállítva vizsgálat céljaira. A fúziós kapcsolódást vizsgáljuk potenciális T-sejt-epitópokra és módosítjuk az 1-4. példánál leírt eljárásoknak megfelelően. Van egy új Fc-Y-fúziós kapcsolódás, amely összehasonlítható az 1. példánál, a huKS-IL2 immun-citokin esetével: egy másik citokinnel, a GMCSF-fel alkotott fúziós fehérje. Ezt a fúziós kapcsolódást szintén vizsgáltuk potenciális T-sejt-epitópokra és az 1-4. példánál leírt eljárásoknak megfelelően módosítottuk.

Specifikusan, a következő kapocsszekvenciák vizsgálata:

1) **ENFLERLKTIMREKYSKCSS** – epks_cdkthtcppcpapellg (44. a. sz.)

az IL-4 C-terminálisa (félkövér) és az Fc N-terminálisa (normál), valamint a

2) **MHEALHNHYTQKSLSLPGK** – parspsstqpwehvnaie (45. a. sz.)

az Fc C-terminálisa (félkövér) és a GmCSF (normál) N-terminálisa között peptidfelfűzéssel MHC-kötő potenciállal rendelkező peptideket azonosít. A potenciális T-sejt-epitópokat módosítjuk a potenciális T-epitópok (száma) csökkentése vagy azok megszüntetésére, az immunogenitás csökkentése céljából.

Az IL4-Fc fúziós fehérje kapcsolódásánál T-sejt-epitóp-jelölt:

EKYSKCSSEPKSC (46. a. sz.),

ahol az E (félkövér) T-re történő cseréje jelentős mértékben csökkenti a peptidfelfűzési pontszámot vagy a II. osztályú MHC-kötési potenciált. A módosított IL-4-Fc-fúzió módosított szekvenciája a következő:

ENFLERLKTIMREKYSKCSS – tpks_cdkthtcppcpapellg (47. a. sz.)

Az Fc-GMCSF fúziós kapcsolódást az LSLS-szekvencia ATAT-szekvenciára való cseréjével dezimmunizáljuk, az alábbiak szerint:

MHEALHNHYTQKSATATPGK – parspsstqpwehvnaie (48. a. sz.).

10. Példa

Immuncitokinek és hibrid izotípussal előállított immunfuzinok fúziós kapcsolódásánál található aminosavak módosítása T-sejt-epitópok eltávolítása céljából

Gyakran alkalmas az antitest vagy antitest-alapú, hibrid izotípusú fúziós fehérje szerkesztése úgy, hogy a különböző izotípusok hasznos tulajdonságai kombinálhatóak egyetlen molekulában. Hibrid izotípusú fúziós fehérjét módosíthatóak a találmány szerinti megoldásban az immunogenitás csökkentése céljából.

A következő komponenseket tartalmazó antitest-fúziósfehérjét szerkesztettünk standard DNS-technikák alkalmazásával: könnyűlánc és nehézlánc, tumorspecifikus antigént felismerő V-régiók, a könnyűlánc tipikus könnyűlánc, és a nehézlánc tartalmaz IgG2-

ből származó CH1-, CH2- és CH3-doménok és IgG1-ből származó kapocsrégió, a nehéz-lánc C-terminálisára fuzionált citokinnel, a fent ismertetett kapocsrégióval.

Ez a fehérje új kapcsolódásokat tartalmaz a Ch1g2 és g1-kapocs, és a g1-kapocs és a CH2g2 között. Az ilyen kapcsolódásokban a potenciális T-sejt-epitópok azonosítását és módosítását a következőképpen hajtuk végre. Immuncitokinek vagy IgG2, vagy akár IgG2h-izotípussal előállított Fc-X fúziós fehérjék esetében ezek a módosítások azonosak az 1., 2., 3 és 8. példánál bemutatottakkal. Az X-Fc IgG2h-immunfuzinok esetében az új kapcsolódás szintén azonos, mivel az Fc N-terminálisa az IgG2h-fehérje kapocsrégiójában lokalizálódik, amelyet IgG1-típusra módosítottak. Két új, fúziós kapcsolódás van azonban, mivel az IgG2-immunglobulinba illesztett IgG1-kapocsrégió két új kapcsolódást képez az IgG2 CH1 és IgG1 kapocsrégió, valamint az IgG1 kapocsrégió és az IgG2 CH2 között.

IgG2 CH1 – IgG1 kapocs – IgG2 CH2 – IgG2 CH3 – célfehérje

Így a következő kapcsolódások:

qtytcnvdhkp~~s~~ntkvdktv – epkscdktht~~c~~ppcp (49. a. sz.)

az IgG2 CH1 C-terminálisa (félkövér) és az IgG1 kapocsrégió (normál), és a

epkscdktht~~c~~ppcp – appvagspsvflfpkpkd~~t~~l (50. a. sz.)

Az IgG1 kapocsrégió (félkövér) C-terminálisa és az IgG2 CH2F N-terminálisa (normál) közötti kapcsolódás peptidfelfűzéssel történő vizsgálata azonosítja az MHC-kötő potenciállal rendelkező peptideket.

A potenciálisan immunogén szekvenciákat módosítjuk a potenciálisan T-sejt- és B-sejt-epitópokat az immunogenitás csökkentés céljából.

Az IgG2CH1-IgG1 kapocsrégió fúziós kapcsolódásában két új, potenciális T-sejt-epitóp van,

TKVDKTVEPKSCD (51. a. sz.), és KTVEPKSCDKTHT (52. a. sz.).

Az IgG2CH1-IgG1 kapocsrégió fúziós kapcsolódást dezimmunizáltuk a V-t (félkövér) A-ra, T-re vagy P-re történő cseréjével. A módosított fúziós kapcsolódás szekvenciáját az 53. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be:

qtytcnvdhkp~~s~~ntk~~a~~dk~~t~~a – epkscdktht~~c~~ppcp (53. a. sz.).

Amint azt a fentiekben állítottuk, a pdCs-huFcγ1 γ1-kapocsszekvenciája tartalmazhat Cys-Ser-mutációt (aláhúzva), amely megszünteti az IgG1 könnyűláncával diszulfidhidat képező Cys-t [Lo és mtsai., Protein Engineering 11: 495-500 (1998)], ezáltal két, további potenciálisan immunogén fúziós kapcsolódást képez vizsgálat és módosítás céljaira:

3) **qtytcnvdhkp~~s~~ntkvdktv** – epkscdktht~~c~~ppcp (54. a. sz.)



4) **epksSdkthtspssp** – appvagpsvflfppkpkdtl (55. a. sz.)

11. Példa

Fc-EPO fúziós fehérje előállítása IgG1 és IgG4 hibrid izotípus alkalmazásával

Fc-eritropoietin fúziós fehérje előállítása céljából, a következő expressziós plazmidot szerkesztettük standard molekuláris biológiai technikák alkalmazásával. XmaI-XhoI-DNS-fragmenst alkalmaztunk, amely tartalmazta a His32Gly, Cys33Pro, Trp88Cys és Pro90Ala aminosav-szubsztitúciókat eredményező mutációkat tartalmazó, humán eredetű eritropoietint kódoló szekvenciát. A megfelelő fehérjeszekvenciát 56. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be:

```
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEGPSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEV
WQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPCQGLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAAS
AAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR
```

Ezt az XmaI-XhoI-DNS-fragmenst olyan plazmidvektorba illesztettük, amely IgG1-ből származó kapocsrégiót és IgG2-ből származó CH2- és CH3-régiót kódol, azonban tartalmaz két mutációkészletet, amely a CH3 C-terminális régiójában aminosav-szubsztitúciókat eredményez, így a CH3 C-terminálisa és az EPO N-terminálisa kapcsolatszekvenciája a következő:

...TQKSATATPGA – APPRLI... (57. a. sz.)

Az első mutációkészletet, amely az IgG2 CH3-régiója KSLSLSPG-szekvenciáját (58. a. sz.) a KSATATPG-re változtatja (59. a. sz.), a 60/280,625. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés tárja fel. A Leu-Ser-Leu-Ser (az 58. a. sz. 3-6 pozíciója) Ala-Thr-Ala-Thr-nal történő helyettesítésének (az 59. a. sz. 3-6 pozíciója) hatása a humán eredetű, „nem saját”, potenciálisan T-sejt-epitópok eltávolítása, amely akkor lépne fel, ha humán Fc és a humán eritropoietin nem saját peptidszekvenciákat tartalmaz. A második készlet a CH3-régió C-terminális aminosava egyetlen aminosav-cseréjéből (K-A) áll, amelyet a 09/780,668. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés tár fel.

Az eredményül kapott plazmidot Ns/0-sejtekbe juttattuk transzfekcióval, és az Fc-Epo fúziós fehérjét expresszáltuk és tisztítottuk a technikában ismert eljárásoknak megfelelően. Protein-A-hoz való kötésen alapuló tisztítás után a fent ismertetett, IgG2CH3- és eritropoietin-szubsztitúciókat tartalmazó, huFcγ2h-huEPO-fehérjét méretkizárási kromatográfiával jellemeztük és megállapítottuk, hogy 97%-ban monomer és 90%-ban monomer két független preparátumban. A fent ismertetett, IgG2CH3- és eritropoietin-szubsztit-

túciókat tartalmazó, huFcγ2h-huEPO-fehérje moláris alapon körülbelül annyira aktív, mint a humán eredetű eritropoietin sejtalapú mérési eljárásban, amely az eritropoietin TF-1-sejtosztódást stimuláló képességét méri. A mérést a WO01/36489. sz. nemzetközi közzétételi iratban leírtak szerint hajtottuk végre.

5 Ráadásul jellemeztük az akár IgG1 (kapocsrégió-CH2-CH3), IgG2 (kapocsrégió-CH2-CH3), vagy IgG1(kapocsrégió)-IgG2(CH2-CH3) Fc-régió C-terminálisával fuzionáltott, nem mutáns, humán eredetű eritropoietin fúzióját. A nem mutáns, humán Fc-szekvenciákat és a nem mutáns, eritropoietin-szekvenciákat tartalmazó expressziós plazmidokat szerkesztettünk a fenti plazmiddal analóg módon. NS/0-sejteket
10 transzfektáltunk az Fcγ1-Epo, Fcγ2-Epo és az Fcγ2h-Epo expressziós plazmidokkal, és stabil klónokat izoláltunk, minden plazmid esetében megközelítőleg azonos számú klón szkrínélése után. A legjobban termelő klónok 50 µg/ml Fcγ1-Epo-t, 20 µg/ml Fcγ2-Epo-t és 120 µg/ml Fcγ2h-Epo-t termeltek.

A következő példánál részletesen leírjuk az immunogén szekvenciaregiók (T-sejt-
15 epitópok) azonosítását a fúziós fehérjék szekvenciáiba, ahogyan azt a találmány leírásában feltárjuk. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy az adott molekulát más, ismert eljárásokkal is megkaphatjuk.

12. Példa

T-sejt-epitópok azonosítása számítógépes eljárásokkal

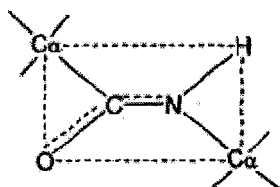
20 A találmány szerinti eljárásban fúziós fehérje kapocsrégiójában epitópok módosíthatók olyan eljárások alkalmazásával, amelyekkel mutációkat visznek be fehérjékbe az immunrendszerrel való kölcsönhatásuk módosítása céljából. A találmány szerint megoldásban a technika állása szerinti, ismert eljárások adaptálhatóak a találmány szerint, többek között azok, amelyeket a technika állása szerinti közlemények feltárnak [WO92/10755. sz.
25 és WO96/40792. sz. nemzetközi közzétételi irat (*Novo Nordisk*), az EP 0519596. sz. európai közzétételi irat (*Merck & Co.*), az EP 0699755. sz. európai közzétételi irat (*Centro de Immunologia Molecular*), a WO 98/52976. sz. és a WO98/59244. sz. nemzetközi közzétételi irat (*Biovation Ltd.*)] vagy ezekkel összefüggő eljárások.

Az előnyös, mutáns fehérjék azonban előállíthatóak, ha az adott epitópokat a kö-
30 vetkező, új eljárással felismerjük, amely eljárást a következőkben részletesen leírunk és alkalmazunk a fúziós fehérjék kapocsrégiójára, a találmány szerinti eljárásban.

Egy fehérje, polipeptid vagy immunglobulin teljes szerkezetének meghatározásában számos faktor játszik fontos szerepet. Először is, az aminosavakat összekapcsoló peptidkötés egy kovalens kötés. Ez a kötés planáris szerkezetű, alapvetően egy

szubsztituált amid. „Amid” alatt értjük szerves vegyület bármely csoportját, amely tartalmazza a $-\text{CONH}-$ csoportot.

A planáris peptidkötés, amely a szomszédos $\text{C}\alpha$ -kat köti össze, az alábbiakban ábrázolható:



5

Az $\text{O}=\text{C}$ és $\text{C}-\text{N}$ -atomok viszonylag merev síkban fekszenek, az ilyen tengelyek körül nincs szabad rotáció. Így a szaggatott vonalakkal jelült síkot „amid” vagy „peptidsíknak” nevezzük, ahol a peptidváz oxigén- (O), szén- (C), nitrogén- (N) és hidrogén- (H) atomjai elhelyezkednek. Az amidsík ellenkező sarkaiban helyezkednek el a $\text{C}\alpha$ -atomok. Mivel alapvetően nincs rotáció az $\text{O}=\text{C}-$ és $\text{C}-\text{N}$ -atomok körül a peptid- vagy amidsíkban, egy polipeptidlánc így a $\text{C}\alpha$ -atomokat összekötő planáris peptidkötések sorozatát tartalmazza.

Polipeptid vagy fehérje teljes szerkezetét vagy konformációját meghatározó második, fontos szerepet játszó faktor mindegyik amidsík forgási szöge a közös $\text{C}\alpha$ -kötés körül. A „forgási szög” és „torziós szög” kifejezéseket ekvivalens kifejezésnek tekintjük. Feltéve, hogy az O-, C-, N- és H-atomok az amidsíkban maradnak (ez rendszerint jogos feltételezés, azonban bizonyos konformációk esetében a planáristól kis eltérés lehet), az ilyen forgási szögek meghatározzák az N- és R-polipeptidváz konformációját, azaz a szomszédos aminosavak közötti szerkezetet. A két szöget ϕ -ként és ψ -ként ismerjük. Az ϕ_i , ψ_i szögek készlete, ahol az i-index a polipeptidlánc adott aminosavát jelképezi, így hatékonyan meghatározza a polipeptid másodlagos szerkezetét. A ϕ , ψ szögek meghatározásakor alkalmazott konvenciók, azaz a referenciapont, ahol az amidsík 0 fokos szöget zár be, és annak meghatározása, hogy melyik a ϕ szög és melyik a ψ szög, adott polipeptid esetére az a szakirodalomban megtalálható. Lásd például Ramachandran és munkatársai [Ramachandran és mtsai., Adv. Prot. Chem. 23: 283-437 (1968)], a 28-94. oldalakon, amelyeket úgy tekintünk, mintha a kitanítás részét képeznék.

A találmány tárgyát képező eljárás alkalmazható bármely fehérje esetében, és az eljárás alapját részben az a felismerés képezi, hogy a II. osztályú MHC-molekula kötőárka 1. zsebe horgony-pozíciója adott aminosav-oldalláncra jól megtervezett specifikitást mutat.

30

A zseb specifikitását a II. osztályú MHC-molekula 86. pozíciójában levő aminosav határozza meg. Ez a hely az 1. zseb alján helyezkedik el, és meghatározza a zsebbe elhelyezhető oldallánc méretét [Marshall, K.W., J. Immunol. 152: 4946-1956 (1994)]. Ha ez az aminosav glicin, akkor minded hidrofób alifás és aromás aminosav (a hidrofób alifás aminosavak: valin, leucin, izoleucin, metionin, és az aromás aminosavak: fenilalanin, tirozin és triptofán) elhelyezhető a zsebben, az aromás oldalláncok nagyobb valószínűséggel. Ha ez a zsebamino-sav valin, akkor az aminosav oldallánca benyúlik a zsebbe, és korlátozza az elhelyezhető peptid oldalláncainak méretét úgy, hogy csak hidrofób, alifás oldalláncok helyezhetők el. Ezáltal bármilyen aminosav-szekvenciában, ahol hidrofób alifás vagy aromás oldallánc található, lehetséges, hogy II. osztályú MHC által korlátozott T-sejt-epitóp van jelen. Ha azonban az oldallánc hidrofób alifás, megközelítőleg kétszeres annak a valószínűsége, hogy T-sejt-epitóppal van összefüggésben, mintha aromás oldallánc lenne (a globális populációban az 1. típusú zseb megközelítőleg egyenletes eloszlását feltételezve).

A találmány egyik megvalósítási módja szerint számítógépes eljárással állapítjuk meg egy peptidrégió által tartalmazott a T-sejt-epitópok valószínűségét a következők szerint: 1) előre meghatározott hosszúságú peptidszegmens elsődleges szekvenciáját szkenneljük, és minden, jelen levő hidrofób alifás és aromás oldallánc jelenlétét azonosítjuk. 2) A hidrofób alifás oldalláncokhoz nagyobb értéket rendelünk, mint az aromás oldalláncokhoz, például 2-t a hidrofób alifás oldalláncokhoz és 1-et az aromás oldalláncokhoz. 3) A meghatározott értékeket összeadjuk minden átlapoló, előre meghatározott, egyforma hosszúságú aminosavsze-gmens (ablak) esetében, és az adott szegmens esetében a teljes értéket egyetlen, a szegmens (ablak) közbenső pozíciójában elhelyezkedő aminosavához, előnyösen körülbelül a vizsgált szegmens (ablak) középponti aminosavához rendeljük. Ezt az eljárást megismételjük minden vizsgált, átlapoló aminosavsze-gmens (ablak) esetében. Így a peptid minden aminosavához rendelünk egy értéket, amely az adott szegmensben (ablakban) jelen levő T-sejt-epitóp valószínűségével van összefüggésben. 4) A 3. lépésben leírtak szerint kiszámított és hozzárendelt értékeket a teljes, vizsgált aminosav-szekvencia aminosav-koordinátaival szemben ábrázolhatjuk. 5) Minden szekvenciárész esetében, amely előre meghatározott értékű pontszámmal, pl. 1-es értékkel rendelkezik, valószínűsítjük, hogy tartalmaz T-sejt-epitópot, és a szekvenciárész szükség esetén módosítható.

A találmány egy speciális szempontja szerint a találmány tárgyát képezi általános eljárás, amely alkalmazásával meghatározható az, hogy peptidek mely régiói tartalmaznak valószínűség szerint T-sejt-epitópokat. A peptid ilyen régiókban történő módosítása lehetőséget nyújt arra, hogy módosítsuk a II. osztályú MHC-kötő jellegzetességeket.

A találmány egy másik szempontja szerint T-sejt-epitópok jósolhatók nagyobb pontossággal, bonyolultabb számítógépes eljárással, amely számításba veszi a peptidek II. osztályú MHC-allélok modelljével való kölcsönhatásait.

Ebből a szempontból a találmány tárgyát képező, peptidben T-sejt-epitópok jóslására szolgáló számítógépes eljárás magában foglalja legalább 42, II. osztályú MHC-alléll modelljének szerkesztését, amely mindegyik, ismert, II. osztályú MHC-molekula szerkezetén alapul, valamint a modellek alkalmazására, T-sejt epitópok számítógépes azonosítására szolgáló eljárást, minden modell esetében peptidváz-könyvtárak szerkesztését a peptidváz alfa-szénatomjai (C α) relatív pozícióinak ismert változatossága lehetővé tétele céljából, minden váz esetében aminosavoldallánc-konformációk könyvtára szerkesztését, minden modell esetében mind a 20 aminosav-alternatíva dokkolását a II. osztályú MHC-molekula és a peptid közötti kölcsönhatásban kritikus pozíciókban, és az ilyen váz- és oldallánc-konformáció-könyvtárak alkalmazását a pontozási megoldással kiegészítve történő alkalmazásban, az optimális váz- és oldallánc-konformáció kiválasztására, speciális, II. osztályú MHC-molekulához dokkolt, speciális peptid esetére, valamint a kölcsönhatás kötőpontoszámai származtatását.

II. osztályú MHC-molekulák modelljei képezhetők homológia-modellezéssel, a *Brookhaven Protein Data Bank*-ban („PDB”) található, számos, hasonló szerkezet alapján. Ezek elkészíthetők félautomatikus homológiamodellező szoftverek [*Modeller*, Sali, A. és Blundell, T.L., *J. Mol. Biol.* 234: 779-815 (1993)] alkalmazásával, amelyek szimulált annelálási funkciót tartalmaznak, *CHARMm*-erőterrel kiegészítve energiaminimalizálás céljából (*Molecular Simulations Inc.*, San Diego, Ca., USA). Alkalmazhatók alternatív modellező eljárások is.

A találmány szerinti eljárás jelentős méretében különbözik más, számítógépes eljárásoktól, amelyek mindegyik aminosav-alternatívára, II. osztályú MHC-molekulák kisméretű készleténél a kötőárok minden pozíciójára kísérletileg megállapított kötési adatok könyvtárait alkalmazza [Marshall, K.W. és mtsai., *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids*, 1(3): 157-162 (1995)] vagy más, számítógépes eljárásoktól, amely hasonló, kísérleti adatokat alkalmaz a kötőárokban specifikus kötőzseb-típusok kötési jellegzetességei meghatározása céljából, szintén viszonylag kisméretű MHC-molekulakészletet alkalmazva, és ezután a „zsebkönyvtár”-ból származó zsebtípusok „keverése és illesztése” (*mixing and matching*) által további „virtuális”, II. osztályú MHC-molekulákat képezve [Sturniolo, T. és mtsai., *Nat. Biotech.*, 17(6): 555-561 (1999)]. Mindkét, előbbi eljárás fő hátránya az, hogy a vizsgálatok komplexitása és nagyszámú peptidváltozat szintézisének szükségessége miatt csak

kis számú II. osztályú MHC-molekula szkennelhető kísérleti úton. Ezáltal az előbbi első eljárás alkalmazásával csak kisszámú, II. osztályú MHC-molekula esetén készíthetünk jóslásokat. Az előbbi második eljárás szintén alkalmazza azt a feltételezést, hogy az egyik molekula esetében hasonló aminosavakkal bélelt zseb különböző II. osztályú alléllal összefüggésben azonos kötési jellegzetességekkel rendelkezik, valamint az is hátránya, hogy csak olyan, II. osztályú MHC-molekula állítható elő „virtuálisan”, amely a „zsebkönyvtárban” megtalálható zsebet tartalmazza. Az itt leírt modellezési megközelítés alkalmazásával bármilyen számú és bármilyen típusú, II. osztályú MHC-molekula levezethető, ezáltal a teljes populációt képviselő allélok specifikusan kiválaszthatók. Ráadásul a szkennelt, II. osztályú MHC-molekulák száma növelhető további modellek készítésével, ahelyett, hogy komplex kísérletezéssel állítanánk elő további adatokat.

Vázkönyvtár alkalmazása lehetővé teszi a különböző, szkennelt peptidek α -szénatomjai pozíciójának variációit specifikus, II. osztályú MHC-molekulákhoz való dokkoláskor. Ez szintén ellentétes a korábbi, fent leírt, alternatív számítógépes eljárásokkal, amelyek aminosavkötés specifikus zsebekben történő szkennelésekor egyszerűsített peptidvázak alkalmazására épül. Ezek az egyszerűsített vázak valószínűleg nem reprezentatívak a „valódi” peptidek konformációi szempontjából, és a peptidkötés jóslásakor pontatlanságokhoz vezetnek. A találmány szerinti megoldásban alkalmazott vázkönyvtárat úgy állítottuk elő, hogy a *Protein Data Bank*-ban található, mindegyik, II. osztályú MHC-molekulához kötött peptid vázait szuperponáltuk, és figyelembe vettük mind a kötőárokban elhelyezkedő, mind a tizenegy aminosav α -szénatomja közötti deviáció átlagos szórásgyökét (RMS). Ez a könyvtár leszármaztatható kisszámú (jelenleg 13), alkalmas, elérhető, egér- és humán eredetű szerkezetből, azonban még nagyobb variabilitási lehetőség lehetővé tétele céljából mindegyik α -C''-pozíció esetében az RMS-értéket 50%-kal megnöveltük. Mindegyik aminosav esetében az átlagos α -C-pozíciót meghatároztuk, és gömböt rajzoltunk e pont köré, amely sugara egyenlő az ahhoz a ponthoz tartozó RMS deviációval (plusz 50%). Ez a gömb reprezentálja mindegyik megengedett α -szén-pozíciót.

A legkisebb RMS-deviáción alapuló α -szén kiindulva (ahol az 1. zsebben a fentiek szerint ekvivalens a kötőzseb 11 aminosava közül a 2. pozícióval), a gömb háromdimenziósan rácsozott, és a rácsozatban mindegyik tetőpontot alkalmazzuk az adott aminosav α -szénatomja lehetséges lokációjaként. Ezt követően az amidsíkot, amely a következő aminosav peptidkötéséhez tartozik, mindezekre az α -szénatomokra helyezzük, és a ϕ és ψ szögeket lépésenként forgatjuk beállított közőkkel, a következő α -szénatom pozícionálása céljából. Ha a következő α -szénatom az adott α -szénatom „megengedett pozíciói” gömbjé-

be esik, akkor a dipeptid orientációját elfogadjuk, azonban ha a gömbön kívül esik, a dipeptidet nem fogadjuk el. Ezután ezt az eljárást ismétljük mindegyik, következő α -szénatom esetére úgy, hogy a peptid kinő az 1. zseb α -szénatom-„magjából”, míg mind a kilenc, ezt követő α -szénatomot pozícionáljuk az előző α -szénatomok összes, lehetséges permutációiból. Az eljárást ezután még egyszer ismétljük az 1. zsebpozíciót megelőző egyetlen α -szénatomra, a kötőárkokban lokalizált α -szénatom-vázkönyvtár elkészítése céljából.

Az előállított vázak száma néhány tényezőtől függ: A „megengedett pozíciók gömbje” méretétől, az 1. zsebpozícióban az „elsődleges gömb” rácsozotttsága finomságától, a következő α -szénatomok pozícionálásakor alkalmazott ϕ és ψ -szögek fokozatos forgatásának finomságától. Az eljárás alkalmazásával nagy vázkönyvtárak állíthatók elő. Minél nagyobb a vázkönyvtár, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy adott peptidnek a II. osztályú molekula kötőárkában az optimális illeszkedését találjuk meg. Mivel nem mindegyik váz lesz alkalmas a II. osztályú MHC-molekula-modellekkel való dokkolásra a kötődomének aminosavaival való ütközések miatt, mindegyik allél esetében könyvtár-részhalmazt állítunk elő, amely az adott allélban elhelyezhető vázakat tartalmazza. A vázkönyvtár alkalmazása a II. osztályú MHC-molekula-modellekkel kiegészítve teljes adatbázist állít elő, amely a mindegyik megengedett vázat dokkoló, II. osztályú MHC-molekula esetében, a kötőárkok mindegyik pozíciója esetében, mindegyik aminosav megengedett oldallánc-konformációit tartalmazza. Ezt az adatkészletet úgy állítjuk elő, hogy egyszerű, szterikus átlapoló függvényt alkalmazunk, ahol II. osztályú MHC-molekulát dokkolunk egy vázzal, és aminosav-oldalláncot helyezünk a vázra a kívánt pozícióban. Az oldallánc mindegyik, forgatható kötését fokozatosan forgatjuk, beállított közönként, és az atomok eredményül kapott pozíciói a megfigyelt kötéstől függ. Az atomnak a kötőárkok oldalláncaival való kölcsönhatását megfigyeljük, és a pozíciókat elfogadjuk vagy elutasítjuk a következő feltételek alapján: mindegyik, eddig pozícionált atom átlapolási összege nem léphet túl egy előre meghatározott értéket. Így a konformációs vizsgálat szigorúsága a kötés fokozatos rotációjakor alkalmazott, beállított közöktől és a teljes átlapolás előre meghatározott korlátjától függ. Ez utóbbi érték lehet kicsi, ha tudjuk, hogy a konkrét zseb rideg, azonban a szigorúságon enyhíthetünk, ha tudjuk, hogy a zseb oldalláncai viszonylagosan flexibilisek. Így engedményeket tehetünk a kötőárkok zsebeiben a flexibilitás változatai imitálásakor. Ezt a konformációs kutatást ezután mindegyik váz mindegyik pozíciója mindegyik aminosava esetében ismétljük a váz mindegyik II. osztályú MHC-val való dokkolásakor, az oldalláncok konformációi teljes adatbázisa előállítására céljából.

Alkalmas matematikai kifejezést alkalmaztunk a peptidligandum és a II. osztályú MHC-molekulák modelljei kötési energiája becslésére, e peptidligandum konformációjával konjugálva, amelyet empirikusan kellett meghatározni a váz – oldallánc-konformációk fent ismertetett, nagyméretű adatbázisa szkennelésével. Így egy fehérjét úgy szkennelünk po-

5 tenciális T-sejt-epitópok jelenlétére, hogy minden, lehetséges 9-20 aminosav közötti (minden szkennelés során a hosszúságot állandóan tartjuk) hosszúságú peptidet a következő számításnak vetünk alá: II. osztályú MHC-molekulát választunk az adott molekula által lehetővé tett peptidvázal egyútt, és a kívánt peptidszekvenciához tartozó oldalláncokat ráillesztjük. Az atomidentitásokat és az interatomi távolsági adatokat, amelyeket adott ol-

10 dallánchoz viszonyítunk, a váz adott pozíciójában összegyűjtjük az adott aminosav minden megengedett konformációja esetére (amelyeket a fent ismertetett adatbázisból nyertünk). Ezt a peptidváz minden oldalláncára megismételjük és peptid-pontszámokat származtatunk pontozófüggvény alkalmazásával. A vázra a legjobb pontszámot megtartjuk, és az eljárást a kiválasztott modellre megengedett minden vázra megismételjük. Minden, megengedett

15 váz pontszámait összehasonlítjuk, és a legmagasabb pontszámot tartjuk az adott, II. osztályú MHC esetére a kívánt peptidpontszámnak. Ezt az eljárást ezután minden modellre megismételjük minden, a szkennelt fehérjéből származó lehetséges peptiddel, és a peptidpontszámokat a modellekkel szemben megjelenítjük.

A találmány leírásakor minden ligandum, amelyet kötőaffinitás számításakor prezentálunk, a fentiek szerint ismertetett peptid vagy fehérje aminosav-szegmense. Így a ligandum körülbelül 9-20 aminosav hosszúságú aminosav-lánc, amely ismert szekvenciájú peptidből, polipeptidből vagy fehérjéből származik. Az „aminosav” és „csoport” kifejezést egyenértékű kifejezésként alkalmazzuk. A ligandumot, a vizsgálandó peptid egymást követő aminosavai formájában, vázkönyvtárból származó vázra illesztjük, és II. osztályú MHC-

25 molekulamodell-könyvtárból származó II. osztályú MHC-molekula kötőárkába pozicionáljuk a peptidváz α -C''-atomjainak koordinátái alkalmazásával, és minden oldallánc esetében egy megengedett konformációt választunk ki a megengedett konformációk adatbázisából. A lényeges atomi identitásokat és interatomi távolságokat szintén ebből az adatbázisból keressük ki, és alkalmazzuk a peptidkötési pontszám számításakor. A II. osztályú MHC

30 kötőzsebéhez nagy kötési affinitással kötődő ligandumokat tartjuk irányított mutagenézisre jelölteknek. Aminosav-szubsztitúciókat hajtunk végre a kijelölt ligandumban (és így a vizsgált fehérjében), amelyet ezután újra tesztelünk a pontozófüggvény alkalmazásával abból a célból, hogy meghatározzuk azokat a változtatásokat, amelyek egy előre meghatá-

rozott küszöbérték alá csökkentik a kötési affinitást. Ezeket a változtatásokat ezután beépíthetjük a vizsgált fehérjébe T-sejt-epitópok eltávolítása céljából.

A peptidligandum és II. osztályú MHC-molekula kötőárka közötti kötésben nem kovalens kölcsönhatások játszanak szerepet, többek között, de nem kizárólagosan: hidrogénkötések, elektrosztatikus kölcsönhatások, hidrofób (lipofil) kölcsönhatások és *Van der Waal's* kölcsönhatások. Ezek vannak figyelembe véve a peptidpontoszó függvényekben, amint azt az alábbiakban részletesen leírjuk. Nyilvánvaló, hogy a hidrogénkötés olyan, nem kovalens kötés, amely poláros vagy töltéssel rendelkező csoportok között alakulhat ki, és két, másik atom által megosztott hidrogénatomból áll. A hidrogéndonor hidrogénje pozitív töltésű, míg a hidrogénakceptor parciális negatív töltéssel rendelkezik. Peptid – fehérje kölcsönhatások céljaira, hidrogénkötés-donor lehetnek akár hidrogént kötő nitrogének, vagy oxigénhez vagy nitrogénhez kötött hidrogének. Hidrogénkötés-akceptoratomok lehetnek hidrogénhez nem kötődő oxigének, hidrogénhez nem kötődő nitrogének egy vagy két kapcsolódással, vagy csak egy kötésben levő kén. Bizonyos atomok, mint például a hidrogénnel kötött oxigének vagy az imino-nitrogének (pl. $C=NH$) lehetnek hidrogénakceptorok vagy –donorok. A hidrogénkötés energiája 3-7 kcal/mol közötti, és sokkal erősebb, mint a *Van der Waal's*-kötések, azonban gyengébbek, mint a kovalens kötések. A hidrogénkötések ezen kívül erősen irányítottak, és akkor a legerősebbek, ha a donoratomb, a hidrogénatom és az akceptor kolineárisak. Elektrosztatikus kötések alakulnak ki ellentétes töltésű ionpárok között, és a kölcsönhatás erőssége fordítottan arányos az atomok közötti távolság négyzetével a *Coulomb*-féle törvény szerint. Az ionpárok közötti optimális távolság körülbelül 2.8 Å. Fehérje – peptid kölcsönhatásokban elektrosztatikus kötés alakulhat ki arginin, hisztidin vagy lizin és aszparaginsav vagy glutaminsav között. A kötés erőssége az ionizáló csoport pKa-értékétől és a környezet dielektromos állandójától függ, azonban megközelítőleg azonos a hidrogénkötés erősségével.

A lipofil kölcsönhatások kedvező hidrofób-hidrofób kapcsolatok, amelyek létrejönnek a fehérje és a peptidligandum között. Ezek rendszerint a peptid olyan hidrofób aminosav-oldalláncai között lépnek fel, amelyek a kötőárok zsebében úgy vannak eltemetve, hogy nincsenek az oldószer hatásának kitéve. A hidrofób aminosavak oldószernek való kitettsége rendkívül kedvezőtlen, mivel a környező oldószer-molekulák arra kényszerülnek, hogy egymással hidrogénkötést létesítve kalitkaszerű klatrátszerkezetet képezzenek. Az entrópia csökkenése ennek eredményeképp rendkívül kedvezőtlen. Lipofil atom lehet a kén, amely nem poláros és nem hidrogénakceptor, valamint olyan szénatomok, amelyek nem polárosak.



A *Van der Waal's*-féle kötések nem specifikus erők, amelyek egymástól 3-4 Å távolságra levő atomok között lépnek fel. Ezek gyengébbek és kevésbé specifikusak, mint a hidrogén- és elektrosztatikus kötések. Egy atom körül az elektromos töltés eloszlása az időben változik, és bármely időpillanatban a töltéseloszlás nem szimmetrikus. Az elektromos töltés tranziens aszimmetriája a szomszédos atomoknál hasonló aszimmetriát indukál. Az ennek eredményeként fellépő, atomok közötti vonzóerők a *Van der Waal's*-féle kontakt távolságban maximumot ér el, azonban nagyon gyorsan csökken körülbelül 1-2 Å távolságban. Ezzel szemben, amint az atomok a kontakt távolságnál kisebb távolságban vannak, növekvő, erős taszítóerők válnak dominánssá, amint a külső elektronfelhők átlapolnak. A vonzóerők viszonylag gyengék az elektrosztatikus és a hidrogénkötésekhez viszonyítva (kb. 0.6 kcal/mol), azonban a taszítóerők különösen fontosak lehetnek annak meghatározásában, hogy egy peptidligandum eredményesen kötődik-e fehérjéhez.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint, *Böhm*-féle pontozófüggvényt (*SCORE1*-megközelítés) alkalmazunk a kötési állandó becslésére [Böhm, H.J., J. Comput. Aided Mol. Des., 8(3): 243-256 (1994), amelyet a leírás részének tekintünk, és az a kitanítás részét képezi]. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a pontozófüggvényt (*SCORE2*-megközelítés) alkalmazzuk a kötési affinitás, mint a ligandum T-sejt-epitóptartalma indikátorának becslésére [Böhm, H.J., J. Comput. Aided Mol. Des., 12(4): 309-323 (1998), amelyet a leírás részének tekintünk, és az a kitanítás részét képezi]. A fenti hivatkozásokban ismertetett *Böhm*-féle pontozófüggvényeket azonban ligandum fehérjéhez való kötési affinitásának becslésére alkalmazzák, ahol már ismert, hogy a ligandum sikeresen kötődik a fehérjéhez és a fehérje-ligandum-komplex szerkezete már megoldott, a megoldott szerkezet megvan a *Protein Data Bank*-ban („PDB”). Ezáltal a pontozófüggvényt ismert, pozitív kötési adatok felhasználásával fejlesztették ki. A negatív és pozitív kötők közötti megkülönböztetés lehetővé tétele céljából taszítási tagot kell adnunk az egyenlethez. Ráadásul a kötési energia még kielégítőbb becslését érhetjük el a lipofil kölcsönhatások páronkénti számításával, a fenti, területalapú, *Böhm*-féle energiatag alkalmazásával szemben. Ezáltal a találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a kötési energiát módosított *Böhm*-féle pontozófüggvény alkalmazásával becsüljük. A módosított *Böhm*-féle pontozófüggvényben a fehérje és a ligandum közötti kötési energiát (ΔG_{bind}) a következő paraméterek figyelembe vételével becsüljük: A kötési energia csökkenése a ligandum translációs és rotációs entrópiája általános vesztesége miatt (ΔG_0); ideális hidrogénkötésből való részesedés (ΔG_{hb}), ahol legalább az egyik partner semleges; nem perturbált, ionos kölcsönhatásból való részesedés (ΔG_{ionic}); lipofil kölcsönhatások lipofil ligandumatomok



és lipofil akceptoratomok között (ΔG_{lipo}); a kötési energia vesztesége a ligandumban a belső szabadsági fok befagyása, azaz mindegyik C-C-kötés körüli forgás szabadságának csökkenése miatt (ΔG_{rot}); A fehérje és a ligandum közötti kölcsönhatás energiája (E_{vdw}). A kifejezések figyelembe vétele adja az 1. egyenletet:

$$5 \quad (\Delta G_{\text{bind}}) = (\Delta G_0) + (\Delta G_{\text{hb}} \times N_{\text{hb}}) + (\Delta G_{\text{ionic}} \times N_{\text{ionic}}) + (\Delta G_{\text{lipo}} \times N_{\text{lipo}}) + (\Delta G_{\text{rot}} \times N_{\text{rot}}) + (E_{\text{vdw}}).$$

Ahol N a módosító kölcsönhatások száma a specifikus kifejezésben, és a találmány egyik megvalósítási módja szerint ΔG_0 , ΔG_{hb} , ΔG_{ionic} , ΔG_{lipo} és ΔG_{rot}

állandó, és értéke a következő: 5.4, -4.7, -0.17 és 1.4.

Az N_{hb} kifejezést a 2. egyenlet szerint számítjuk:

$$10 \quad N_{\text{hb}} = \sum_{\text{h-kötés}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \times f(N_{\text{szomszéd}}) \times f_{\text{pcs}}$$

$f(\Delta R, \Delta \alpha)$ büntetőfüggvény, amely a hidrogénkötések ideálistól való nagymértékű eltéréseit veszi figyelembe, és ezt a 3. egyenlet szerint számítjuk:

$$f(\Delta R, \Delta \alpha) = f1(\Delta R) \times f2(\Delta \alpha),$$

ahol

$$15 \quad f1(\Delta R) = 1, \text{ ha } \Delta R \leq \text{TOL}, \text{ vagy}$$

$$f1(\Delta R) = 1 - (\Delta R - \text{TOL})/0.4, \text{ ha } \Delta R \leq 0.4 + \text{TOL}, \text{ vagy}$$

$$f1(\Delta R) = 0., \text{ ha } \Delta R > 0.4 + \text{TOL}$$

És:

$$f2(\Delta \alpha) = 1, \text{ ha } \Delta \alpha < 30^\circ, \text{ vagy}$$

$$20 \quad f2(\Delta \alpha) = 1 - (\Delta \alpha - 30)/50, \text{ ha } \Delta \alpha \leq 80^\circ, \text{ vagy}$$

$$f2(\Delta \alpha) = 0, \text{ ha } \Delta \alpha > 80^\circ$$

A TOL a megengedett hidrogénkötéshossz = 0.25 Å

ΔR a H-O/N-hidrogénkötés hosszának ideális értéktől, az 1.9 Å-tól való eltérése

$\Delta \alpha$ a hidrogénkötés idealizált értékétől, a 180°-tól való eltérése

25 $f(N_{\text{szomszéd}})$ a fehérjefelszín konkáv és konvex felszínét különbözteti meg, és ezáltal nagyobb súlyt ad a poláros kölcsönhatásoknak a zsebekben, mint a fehérje felszínén. Ezt a függvényt a 4. egyenlet szerint számítjuk:

$$f(N_{\text{szomszéd}}) = f(N_{\text{szomszéd}}/N_{\text{szomszéd},0})^\alpha, \text{ ahol } \alpha = 0.5$$

30 $N_{\text{szomszéd}}$ az olyan, nem hidrogén fehérjeatom száma, amely bármely, adott fehérjeatomhoz 5 Å-nél közelebb van.

$$N_{\text{szomszéd},0} \text{ állandó} = 25$$

f_{pcs} olyan függvény, amely lehetővé teszi a hidrogénkötésre eső poláros kontakt-felszínt, és ezáltal megkülönbözteti az erős és a gyenge hidrogénkötéseket, és értékét a következő feltételek szerint határozzák meg:

$f_{\text{pcs}} = \beta$, ha $A_{\text{polar}}/N_{\text{HB}} < 10 \text{ \AA}^2$, vagy

$f_{\text{pcs}} = 1$, ha $A_{\text{polar}}/N_{\text{HB}} > 10 \text{ \AA}^2$

A_{polar} a poláros fehérje-ligandum kontakt felszín,

N_{HB} a hidrogénkötések száma,

5 β konstans érték, = 1.2

A módosított *Böhm*-féle pontozófüggvény megvalósításához az ionos kölcsönhatásokat, a ΔG_{ionic} -ot hasonló módon számítjuk, mint amelyet fent a hidrogénkötések esetében leírtunk, mivel azonos geometriafüggést feltételezünk.

Az N_{lipo} -kifejezést az 5. egyenlet szerint számítjuk:

10 $N_{\text{lipo}} = \sum_{\text{IL}} f(r_{\text{IL}})$

$f(r_{\text{IL}})$ -t mindegyik lipofil ligandumatomra, (I), és mindegyik lipofil fehérjeatomra (L) kiszámítjuk, a következő feltételek mellett:

$f(r_{\text{IL}}) = 1$, ha $r_{\text{IL}} \leq R1$ $f(r_{\text{IL}}) = (r_{\text{IL}} - R1)/(R2 - R1)$, ha $R2 < r_{\text{IL}} > R1$

$f(r_{\text{IL}}) = 0$, ha $r_{\text{IL}} \geq R2$, ahol

15 $R1 = r_1^{\text{vdw}} + r_L^{\text{vdw}} + 0.5$, és

$R2 = R1 + 3.0$, és

r_1^{vdw} az I-atom *Van der Waal*'s-féle sugara, és

r_L^{vdw} az L-atom *Van der Waal*'s-féle sugara.

20 Az N_{rot} kifejezés az aminosav-oldalláncok forgatható kötéseinek száma, és értékét az aciklikus $\text{sp}^3\text{-sp}^3$ - és $\text{sp}^3\text{-sp}^2$ -kötések száma. A terminális $-\text{CH}_3$ vagy $-\text{NH}_3$ rotációját nem vesszük figyelembe.

Az utolsó kifejezést, E_{vdw} -t a 6. egyenlet szerint számítjuk ki:

$E_{\text{vdw}} = \epsilon_1 \epsilon_2 ((r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}})^{12}/r^{12} - ((r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}})^6/r^6)$, ahol

ϵ_1 és ϵ_2 az atom azonosságától függő állandók,

25 $r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}}$ a *Van der Waal*'s-féle atomsugár,

r egy atompár közötti távolság.

30 A 6. egyenletre való tekintettel, a találmány egyik előnyös megvalósítási módja szerint a konstans ϵ_1 és ϵ_2 az atomokra megadva: C: 0.245, N: 0.283, O: 0.316 (azaz a szén-, nitrogén- oxigén- és kénatomokra megadva). Az 5. 6. egyenletre való tekintettel, *Van der Waal*'s-féle sugarak az atomokra megadva: C: 1.85, N: 1.75, O: 1.60, S: 2.00 Å.

Meg kell értenünk, hogy minden, a fenti egyenletekben megadott, előre meghatározott érték és konstans a fehérje-ligandum-kölcsönhatások jelenlegi megállapodásai szerint adott kényszereken belül határoztuk meg, különös figyelemmel az elvégzendő számítások típusára. Ezáltal lehetséges, hogy a pontozási függvényt tovább finomítva ezek az



értékek és állandók változhatnak, és bármely, alkalmas numerikus érték, amely a kívánt eredményeket adja a fehérje ligandumhoz való kötési energiájának becslése szempontjából, alkalmazható, és így a találmány oltalmi körébe esik.

A fent leírtak szerint, a pontozófüggvényeket alkalmazzuk az oldallánc-konformációk, atomidentitások és interatomikus távolságok adatbázisából kivont adatokra. Az adatbázisban a találmány szerinti megoldás céljaira alkalmazható, II. osztályú MHC-molekulák száma 42 modell, plusz négy megoldott szerkezet. A fenti leírás alapján nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti számítógépes eljárás moduláris természete azt jelenti, hogy az új modellek egyszerűen hozzáadhatók és szkennelhetők a peptidváz-könyvtár és oldallánc-konformációs keresőfunkcióval további adatkészletek előállítására, amelyek feldolgozhatóak a fent ismertetett, peptidpontozó függvény alkalmazásával.

A találmány tárgyát képező jóslási eljárás kalibrálható olyan adatkészletre, amely nagyszámú peptidet tartalmaz, amelyek különböző, II. osztályú MHC-molekulához való affinitását korábban kísérletesen meghatározták. A számított és kísérletes adatok összehasonlításával meghatározható az adatok olyan metszete, amelyről ismert, hogy mindegyik, kísérletesen meghatározott T-sejt-epitóp helyesen van megjósolva.

Magától értetődik, hogy a fenti pontozófüggvény viszonylag egyszerű a hozzáférhető, bonyolult eljárásokhoz viszonyítva, a számítások extrém módon gyorsan végrehajthatók. Meg kell értenünk, hogy a cél nem az, hogy egy kiválasztott, II. osztályú MHC-molekula kötőárában dokkolt mindegyik peptid valódi kötési energiáját *per se* kiszámítsuk. A cél összehasonlító kötési energiaadatok számítása abból a célból, hogy kiválasztott fehérje elsődleges szerkezete (azaz aminosav-szekvenciája) alapján T-sejt-epitópok elhelyezkedésének jóslását segítsük. Viszonylag nagy kötési energia vagy kiválasztott küszöbérték feletti kötési energia azt valószínűsíti, hogy T-sejt-epitóp van jelen a ligandumban. A ligandumot ezután legalább egy aminosav-szubsztitúciónak kitehetjük, és a kötési energiát újra számoljuk. A számítások gyors természete miatt, a peptidszekvencia ilyen manipulációi végrehajthatóak a program felhasználója *interface*-én interaktív módon, költség szempontjából hatékony, rendelkezésre álló számítógépes hardveren. A számítógépes hardveren nagyobb befektetés így nem szükséges.

A technikában jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy más, hozzáférhető szoftver alkalmazható azonos célokra. Közelebbről, alkalmazható olyan bonyolultabb szoftver, amely alkalmas ligandumok fehérjék kötőhelyeire történő dokkolására, energia-minimalizálással kiegészítve. A dokkoló szoftverekre példaként említhetjük: *DOCK* [Kuntz és mtsai., J. Mol. Biol. 161: 269-288 (1982)], *LUDI* [Böhm, H.J., Comput. Aided



Mol. Des. 8: 623-632 (1994)] és *FLEXX* [Rarey, M. és mtsai., ISMB, 3: 300-308 (1995)]. Molekulamodellező és manipulációs szoftverekre példaként említhetjük: az *AMBER*-t (*Tripes*) és a *CHARMm*-ot (*Molecular Simulations, Inc.*). Az ilyen számítógépes eljárások alkalmazása komolyan korlátozza a találmány szerinti eljárás áteresztőképességét, a szükséges számítások elvégzéséhez szükséges feldolgozási idő hossza miatt. Az ilyen eljárások azonban alkalmazhatóak „másodlagos szkrínelésként” az olyan peptidek kötési energiája pontosabb számításaira, amelyeket „pozitív kötőknek” találtunk a találmány szerinti eljárásban. A bonyolult molekuláris mechanikai vagy molekuláris dinamikai számítások feldolgozási idejének korlátozása az egyik olyan tényező, amelyet egyaránt meghatároznak az ilyen számításokat elvégző szoftver felépítése és a számítógépes hardver jelenlegi technológiai korlátozásai. Előre látható, hogy a jövőben hatékonyabb kód írásával és a számítógépes processzorok folyamatosan növekvő sebessége mellett megvalósíthatóvá válik az ilyen számítások kezelhetőbb időkeretben történő végrehajtása. Makromolekulákra alkalmazott energiafüggvényekről további információk és feltekeredett fehérjeszerkezetben végbemenő, különböző kölcsönhatások vizsgálata megtalálható a következő közleményben: Brooks, B.R. és mtsai., *J. Comput. Chem.* 4: 187-217 (1983), és az általános, fehérjeligandum-kölcsönhatásokkal kapcsolatos további információk megtalálhatóak: Dauber-Osguthorpe és mtsai., *Proteins* 4(1): 31-47 (1988), amely közleményeket úgy tekintünk, mintha a leírásba építettük volna, és ezek a kitanítás részét képezik. Alkalmazható háttérinformáció találhatunk például Fasman közleményében [Fasman, G.D. (szerk.), *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, kiad.: Plenum Press, New York, ISBN: 0-306 4313-9].

A találmány megvalósítható más, specifikus formákban enélkül, hogy annak szellemiségétől vagy alapvető jellegzetességeitől eltávolodnánk. A megelőző megvalósítási módokat ezáltal minden tekintetben illusztratívnak kell tekintenünk, és nem az itt leírt találmány korlátozásának. A találmány oltalmi körét így az előbbi leírás helyett inkább a csatolt igénypontok jelzik, és minden változtatást, amelyek az igénypontok értelmezésébe és tartományába esnek, az igénypontok magukban foglalnak.

Minden, itt említett szabadalmi iratot, szabadalmi bejelentést és tudományos közleményt úgy tekintünk, mintha teljes terjedelmében a leírásba építettük volna, és ezek a kitanítás részét képezik.

SZEKVENCIALISTA

A szekvencialistában szereplő kötetlen szövegrészek (223-as kód) fordítása:

- 5 <210> 1
 <223> humán Ig gamma nehézlánc C-régió
- <210> 2
 <223> humán Ig gamma-2 lánc C-régió
- 10 <210> 3
 <223> humán Ig3 konstans régió
- <210> 4
15 <223> Ig gamma-4 lánc C-régió
- <210> 5
 <223> potenciális T-sejt epitóp
- 20 <210> 6
 <223> mutáns potenciális T-sejt epitóp
- <210> 7
 <223> mutáns potenciális T-sejt epitóp
- 25 <210> 8
 <223> IgA Fc régió CH3 doménjének C-terminálisához közeli szekvencia
- <210> 9
30 <223> IgA Fc régió CH3 doménjének C-terminálisához közeli szekvencia
- <210> 10
 <223> az IgA-X fúzióban található dezimmunizált szekvencia
- 35 <210> 11
 <223> az IgA-X fúzióban található dezimmunizált szekvencia
- <210> 12
 <223> az IgA-X fúzióban található dezimmunizált szekvencia
- 40 <210> 13
 <223> potenciális T-sejt epitóp a HSA-IFNalfa kapcsolódási helyén
- <210> 14
45 <223> albumin módosított C-terminálisa
- <210> 15
 <223> az Fc fúziós fehérjében lévő szekvencia

- <210> 16
<223> módosított szekvencia Fc fúziós fehérjében
- 5 <210> 17
<223> kapocsszekvencia
- <210> 18
<223> módosított kapocsszekvencia
- 10 <210> 19
<223> módosított fúziós kapcsolódási hely
- <210> 20
<223> reaktív epitópot tartalmazó szintetikus peptid
- 15 <210> 21
<223> reaktív epitópot tartalmazó szintetikus peptid
- <210> 22
20 <223> albumin-CD4-kapocsszekvencia
- <210> 23
<223> potenciális T-sejt-epitóp HSA-IFNalfa fúzióban
- 25 <210> 24
<223> potenciális T-sejt-epitóp HSA-IFNalfa fúzióban
- <210> 25
<223> albumin C-terminális szekvenciája
- 30 <210> 26
<223> mutáns C-terminális albumin szekvencia
- <210> 27
35 <223> módosított albumin-kapocsrégió
- <210> 28
<223> nem-mutáns Fc-szekvencia
- 40 <210> 29
<223> GLP-1 és mutáns Fc fúziós kapcsolódási helye
- <210> 30
<223> GLP-1 és normál Fc fúziós kapcsolódási helye
- 45 <210> 31
<223> potenciális T-sejt epitóp a GLP-1-Fc fúziós helynél
- <210> 32
50 <223> potenciális T-sejt epitóp a GLP-1-Fc fúziós kapcsolódási helynél

- <210> 33
<223> potenciális T-sejt epitóp a GLP-1-Fc fúziós kapcsolódási helyen
- 5 <210> 34
<223> dezimmunizált GLP-1-Fc fúziós kapcsolódási helye
- <210> 35
<223> GLP-1-Fc fúziós kapcsolódási helye a glikozilációs hellyel
- 10 <210> 36
<223> TNF-R-gamma-1 fúziós kapcsolódási helye
- <210> 37
<223> TNF-R-Fc fúziós kapcsolódási helye
- 15 <210> 38
<223> Fc-IL12p35 fúziós kapcsolódási helye
- <210> 39
20 <223> IL-12p40-IL2 fúziós kapcsolódási helye
- <210> 40
<223> módosított Fc-IL12p35 fúziós kapcsolódási helye
- 25 <210> 41
<223> módosított IL12p40-IL2 fúziós kapcsolódási helye
- <210> 42
<223> potenciális T-sejt-epitóp az IL12p40-IL fúziós helyen
- 30 <210> 43
<223> potenciális T-sejt-epitóp az IL12p40-IL2 fúziós kapcsolódási helyen
- <210> 44
35 <223> IL4-Fc fúziós kapcsolódási hely
- <210> 45
<223> Fc-GMCSF fúziós kapcsolódási hely
- 40 <210> 46
<223> potenciális T-sejt epitóp at IL4-Fc fúziós kapcsolódási hely
- <210> 47
<223> módosított IL4-Fc fúzió
- 45 <210> 48
<223> dezimmunizált Fc-GMCSF fúziós kapcsolódási hely
- <210> 49
50 <223> IgG2CH1-IgG1-csuklórégió fúziós kapcsolódási helye



- <210> 50
<223> IgG1csuklórégió-IgG2CH2 fúziós kapcsolódási helye
- <210> 51
5 <223> potenciális T-sejt epitóp a IgG2CH1-IgG1-csuklórégió fúziós kapcsolódási helyen
- <210> 52
<223> potenciális T-sejt epitóp a IgG2CH1-IgG1 hinge fúziós kapcsolódási helyen
- 10 <210> 53
<223> módosított IgG2CH1-IgG1-csuklórégió fúziós kapcsolódási helye
- <210> 54
<223> módosított IgG2CH1-IgG1-csuklórégió fúziós kapcsolódási helye
- 15 <210> 55
<223> módosított IgG1-csuklórégió -IgG2CH2 fúziós kapcsolódási helye
- <210> 56
20 <223> mutáns EPO-szekvencia
- <210> 57
<223> CH3-EPO fúziós kapcsolódási helye
- 25 <210> 58
<223> IgG2CH3-szekvencia
- <210> 59
<223> módosított IgG2CH3-szekvencia
- 30

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás fúziós fehérje immunogenitásának csökkentésére, *azzal jellemezve*,
5 hogy:

a) fúziós fehérje fúziós kapcsolódását átívelő kapocsrégióban T-sejt-epitóp-
jelöltet azonosítunk; és

b) a kapocsrégióban aminosavat változtatunk meg, miáltal csökkentjük a T-sejt-
epitóp-jelöltnek T-sejt-receptorhoz való kölcsönhatási képességét.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárással előállítható fúziós fehérje.

10 3. Eljárás fúziós fehérje immunogenitásának csökkentésére, *azzal jellemezve*,
hogy a fúziós fehérje fúziós kapcsolódását átívelő kapocsrégióban T-sejt-epitóp-jelöltet
változtatunk meg, miáltal csökkentjük a T-sejt-epitóp-jelölt T-sejt-receptorral való köl-
csönhatási képességét.

4. A 3. igénypont szerinti eljárással előállítható fúziós fehérje.

15 5. Eljárás fúziós fehérje immunogenitásának csökkentésére, *azzal jellemezve*,
hogy glikozilációs helyet viszünk be a fúziós kapcsolódást átívelő kapocsrégióba.

6. Eljárás fúziós fehérje immunogenitásának csökkentésére, *azzal jellemezve*,
hogy glikozilációs helyet viszünk be a fúziós kapcsolódástól legfeljebb 10 aminosav távol-
ságra.

20 7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glikozilációs helyet vi-
szünk be a fúziós kapcsolódástól legfeljebb 5 aminosav távolságra.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glikozilációs helyet vi-
szünk be a fúziós kapcsolódástól legfeljebb 2 aminosav távolságra.

25 9. Eljárás fúziós fehérje immunogenitásának csökkentésére, *azzal jellemezve*,
hogy

a) szubsztituált aminosavat tartalmazó kapocsrégiót tartalmazó fúziós fehérjét áll-
tunk elő, és

b) az így előállított fúziós fehérjét immunogenitási mérési eljárásban vizsgáljuk.

10. Az 5., 6., 7., 8. vagy 9. igénypont szerint előállított fúziós fehérje.

30 11. Az 5-8. igénypontok szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glikozilációs
helyként N-glikozilációs helyet viszünk be.

12. Az 5-8. igénypontok szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glikozilációs
helyként O-glikozilációs helyet viszünk be.



13. 2., 4. vagy 9. igénypontok szerinti fúziós fehérje, ahol a fehérje Ig-régiót tartalmaz.

14. A 2., 4. vagy 9. igénypontok szerinti fúziós fehérje, ahol a fehérje szérumalbumin-régiót tartalmaz.

5 15. A 2., 4. vagy 9. igénypontok szerinti fúziós fehérje, ahol a fehérjének citokinaktivitása van.

16. A 2., 4. vagy 9. igénypontok szerinti fúziós fehérje, ahol a fehérjének hormonaktivitása van.

10 17. A 13. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol az Ig-régió egynél több, különböző antitest-izotípusú szekvenciát tartalmaz.

18. Fúziós fehérje, amely csökkent immunogenitású, és amely tartalmaz

a) egy első fehérjét, és

b) egy második fehérjét, az első fehérjével kapocsrégióval kapcsoltn,

15 ahol a fúziós kapcsolódást körülvevő kapocsrégió aminosav-szekvenciája úgy van módosítva, hogy nem tartalmaz sajáttól különböző T-sejt-epitópot.

19. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a kapocsrégió 1-25 aminosavat tartalmaz.

20. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a kapocsrégió 1-15 aminosavat tartalmaz.

20 21. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a kapocsrégió 1-9 aminosavat tartalmaz.

22. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a kapocsrégió N- vagy O-glikozilációs helyet tartalmaz.

25 23. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a kapocsrégió tartalmaz távtartót vagy összekötőt.

24. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a kapocsrégió Asn-X-Ser/Thr-Gly-aminosav-szekvenciát tartalmaz, ahol X bármely aminosav.

25. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol az első fehérje tartalmaz Ig-molekulát vagy fragmensét.

30 26. A 25. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol az Ig-molekula C-terminálisa a második fehérje N-terminálisával van kapcsolva.

27. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a kapocsrégió tartalmaz IgG-szekvenciát, amely LSLS-aminosav-szekvencia helyett ATAT-aminosav-szekvenciát tartalmaz.

28. A 25. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol az Ig-molekula vagy fragmense Fc-molekulát tartalmaz.

29. A 25. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol az Ig-molekula vagy fragmense tartalmaz két antitest-izotípusból származó aminosav-szekvenciát.

5 30. A 29. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol az Ig-molekula vagy fragmense tartalmaz IgG1- és IgG2-aminosav-szekvenciákat.

31. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a második fehérjének citokin-aktivitása van.

10 32. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol a második fehérjének hormonaktivitása van.

33. A 18. igénypont szerinti fúziós fehérje, ahol az első fehérje albuminfehérje.

34. Eljárás fúziós fehérje immunogenitása csökkentésére, *azzal jellemezve*, hogy

i) azonosítunk egy aminosavat a peptid kapocsrégiójában, ahol az aminosav lehet: leucin, valin, izoleucin, metionin, fenilalanin, triptofán vagy tirozin, és

15 ii) a peptidben az aminosavat kicseréljük úgy, hogy ezáltal a peptid II. osztályú MHC-hez való kötési képességét csökkentjük.

35. A 34. igénypont szerint előállított fúziós fehérje.

36. Csökkentett immunogenitású fúziós fehérjét kódoló nukleinsav, ahol a fúziós fehérje tartalmaz:

20 a) egy első fehérjét,

b) egy második fehérjét, amely az első fehérjéhez fúziós kapcsolódással kapcsolva,

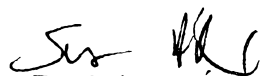
ahol a fúziós kapcsolódást átívelő kapocsrégió aminosav-szekvenciája módosítva van a nem saját T-sejt-epitóp eltávolítása érdekében.

25 37. A 36. igénypont szerinti nukleinsav, ahol a kapocsrégió összekötőt tartalmaz.

A meghatalmazott:

DANUBIA

30 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.


Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő