

Eljárás mimotóp szekvencia meghatározására

K I V O N A T

A találmány tárgyát mimotóp szekvenciák meghatározására szolgáló eljárások képezik. A találmány szerinti eljárások alapján úgy járnak el, hogy

- (a) vizsgálandó szekvenciák random könyvtárát hordozó szilárd hordozót biztosítanak, ahol a vizsgálandó szekvenciák aminosav, monoszacharid vagy nukleotid építőelemek bármelyikéből épülnek fel;
- (b) a könyvtár minden egyes vizsgálandó szekvenciájának aktivitását meghatározzák a receptorral szemben;
- (c) azonosítanak egy vizsgálandó szekvenciát, amely adott pozícióban olyan építőelemet tartalmaz, amely - a (b) lépés eredményei szerint - az adott pozícióban kedvező hatású, majd az eljárást a kívánt aktivitású mimotóp szekvencia azonosításáig ismétlik. A találmány szerinti eljárás során a vizsgálandó szekvenciák könyvtárát minikártyán vagy lapos hordozó közegen rögzítve biztosítják.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti eljárás alkalmazásával azonosított mimotóp szekvenciák is.

jellemző ábra d

TK



72

Eljárás mimotóp szekvencia meghatározására

A találmány tárgyát mimotóp szekvenciák meghatározására szolgáló eljárások képezik. A találmány szerinti eljárások alapján úgy járunk el, hogy

- (a) vizsgálandó szekvenciák random könyvtárát hordozó szilárd hordozót biztosítunk, ahol a vizsgálandó szekvenciák aminosav, monoszacharid vagy nukleotid építőelemek bármelyikéből épülnek fel;
- (b) a könyvtár minden egyes vizsgálandó szekvenciájának aktivitását meghatározzuk a receptorral szemben;
- (c) azonosítunk egy vizsgálandó szekvenciát, amely adott pozícióban olyan építőelemet tartalmaz, amely - a (b) lépés eredményei szerint - az adott pozícióban kedvező hatású, majd az eljárást a kívánt aktivitású mimotóp szekvencia azonosításáig ismételjük. A találmány szerinti eljárás során a vizsgálandó szekvenciák könyvtárát minikártyán vagy lapos hordozó közegen rögzítve biztosítjuk.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti eljárás alkalmazásával azonosított mimotóp szekvenciák is.

Napjainkban a random eloszlásos könyvtárakat széles körben alkalmazzák vezérmolekulák azonosítására a diagnosztikában, a gyógyhatású termékek és a vakcinák előállításában. Amikor a vezérmolekula peptid, a vezérmolekulák azonosításában alkalmazott módszereket gyakran mint pepszken módszerek említik.



A pepszken módszerek a nyolcvanas évek elejétől ismertek. Az ezen módszerek mögött fellelhető alapvető elmélet az EP-A-0 138 855 és az EP-A-0 190 205 szabadalmakban került leírásra.

A random eloszlásos könyvtárak szkrínelésének két sarkalatos aspektusa azok mérete - azaz hány különböző vegyületre van szükség egy vezérmolekula azonosítására - valamint a vezérmolekula szerkezetének vagy szekvenciájának az optimalizálására szolgáló módszer. A legtöbb, az irodalomban leírásra került módszer - úgy tűnik - azon az ötleten alapul, hogy minél nagyobb a random eloszlásos könyvtár, annál nagyobb annak az esélye, hogy jó vezérmolekulát találhatunk benne.

Az aspektus, amely szerint az ismert módszerek a leginkább eltérnek egymástól, a vezérmolekula optimalizálásának a módszere. Miután a random eloszlásos könyvtárat megszintetizálták, ez vizsgálható a kívánt aktivitásra. Természetesen lehetőség van arra is, hogy vezérmolekulának egyszerűen a random eloszlásos könyvtár azon tagját válasszuk, amely a legnagyobb értéket mutatja a kívánt aktivitás szempontjából. Azonban a legtöbb módszer tartalmaz lépéseket az adott, a legnagyobb aktivitást mutató tag szerkezetének optimalizálására annak érdekében, hogy egy még magasabb aktivitást mutató vezérmolekulához jussunk.

Minipepszken könyvtárakat - amelyek csupán néhány ezer peptidből álltak - alkalmaztak vezérmolekulák azonosítására, amelyeket ezt követően gyorsan optimalizáltak olyan molekulákra, amelyek aktivitása hasonló volt azon molekulák



aktivitásához, amelyhez viszont több millió vegyületet tartalmazó könyvtárakból kiindulva jutottak. Ezekről Slootsra és munkatársai számoltak be [Slootstra és mtsai.: Molecular Diversity 1 87 (1995b) valamint Slootstra és mtsai.: J. Mol. Recogn. 10 217 (1997)]. Ezekben a cikkekben bemutatják, hogy a pepszken alapú optimalizálási eljárásokkal kombinált kisméretű könyvtárak értékes eszközöknek tekinthetők vezérmolekulák azonosítására és optimalizálására.

A találmány tárgyát képezi egy javított eljárás vezérmolekula azonosítására és optimalizálására.

Azt találtuk, hogy a találmány tárgyát képező javított módszert úgy tudjuk megvalósítani, ha ismert vizsgálandó molekulákat tartalmazó könyvtárból indulunk ki, kiértékeljük a könyvtár aktivitását, és a legmagasabb aktivitást mutató néhány vizsgálandó molekula struktúráját optimalizáljuk oly módon, hogy a vizsgált molekulák minden egyes építőelemét módszeresen kicseréljük az összes többi elképzelhető építőelemre.

A találmány tárgyát képezi tehát egy eljárás receptor mimotóp szekvenciájának meghatározására, amelynek során az alábbi lépéseket hajtjuk végre:

- (a) vizsgálandó szekvenciák könyvtárát biztosítjuk;
- (b) a könyvtárban minden egyes vizsgálandó szekvencia aktivitását meghatározzuk a receptorral szemben;
- (c) vizsgálandó szekvenciát azonosítunk, amely adott pozícióban olyan építőelemet tartalmaz, amely - a (b) pontban kapott eredmények szerint - az adott pozícióban előnyös;



(d) a vizsgálandó szekvenciák egy következő könyvtárát biztosítjuk - amely a (c) pont szerint azonosított vizsgálandó szekvencián alapul - oly módon, hogy az azonosított vizsgálandó szekvencia kiválasztott pozícióiban egy építőelemet kiválasztott építőelemekkel helyettesítünk;

(e) a (d) pont szerint biztosított könyvtárban minden egyes vizsgálandó szekvencia aktivitását meghatározzuk a receptorral szemben;

(f) vizsgálandó szekvenciát azonosítunk, amely adott pozícióban olyan építőelemet tartalmaz, amely - az (e) pontban kapott eredmények szerint - az adott pozícióban előnyös;

(g) a vizsgálandó szekvenciák (d) pont szerint biztosított könyvtárára megismételjük a (d)-(f) lépéseket, annyi cikluson keresztül, amely elegendő az (f) lépésben a receptorral szemben megfelelő aktivitást mutató mimotóp szekvencia azonosításához.

Azt találtuk, hogy az eljárás - kényelmesen megvalósítható módon - egy, a kívánt receptorral szemben nagyon magas kötési affinitást mutató mimotóp szekvenciát eredményez. Bizonyos esetekben - ahol a pontos epitóp (azaz egy antigén antitesthez történő kötődését biztosító részleges szekvenciája) ismert - azt találtuk, hogy az eljárás már néhány lépésben az epitóp pontos szerkezetéhez vezetett.

A találmány szerint egy receptorhoz tartozó mimotóp szekvenciát határozunk meg. Ebben az értelemben mimotóp szekvencia alatt olyan molekulát értünk, amely adott receptor jelenlétében meghatározott, minimális, kívánt aktivi-



tást mutat. Ennek példájául szolgálhat adott antitesthez tartozó antigén epitóp szekvenciájának a meghatározása. Azonban néhány esetben az is elegendő lehet, ha utánózzuk a pontos epitópot és a megtalált molekula valamivel gyengébb kötődési erősséget mutat a receptorral szemben.

A mimotóp szekvencia várhatóan adott számú építőelemből álló molekula lesz, ahol az építőelemek száma és sorrendje szabályozza a molekula tulajdonságait. A találmány szerint eljárva meghatározható mimotóp szekvencia típusokra például szolgálhatnak peptidek - kívánt esetben ezekhez szteroid vagy szacharid-jellegű struktúrák kapcsolódhatnak - szacharidok, DNS (oligonukleotidok), és PNS (peptid-szerű nukleinsavak). Így az építőelem az alábbiak bármelyike lehet: aminosavak (mind a természetes eredetű és a nem természetes aminosavak), monoszacharidok és nukleotidok.

A receptor - amelyhez a találmány szerint mimotóp szekvenciákat határozunk meg - bármely vegyület, készítmény, mikroorganizmus vagy szövet minta lehet, amelyekkel szemben a mimotóp szekvenciák egy típusa bármilyen szintű mérhető aktivitást mutat, mint például a kötési aktivitás. A receptorokra megfelelő például szolgálhatnak antitestek (mind monoklonális és poliklonális antitestek), fehérjék - mint például enzimek - sejtek, hormon receptorok és mikroorganizmusok.

A találmány szerinti eljárás első lépése során vizsgálandó szekvenciák könyvtárát biztosítjuk. Természetesen ezek a vizsgálandó szekvenciák azonos típusú vagy azonos osztályba sorolható építőelemekből állnak, mint a célként



kiválasztott mimotóp szekvencia. Előnyösen a vizsgálandó szekvenciák ismertek azon értelemben, hogy - bár ezek random módon választhatók ki - az összetételük és struktúrájuk ismert. Ez elérhető úgy, hogy például adott számú szekvenciát generálunk manuális úton vagy számítógéppel és az így kapott szekvenciákat megszintetizáljuk. Lehetséges továbbá, hogy a vizsgálandó szekvenciák könyvtárát egy olyan vegyületből származtatjuk, amelyről ismert, hogy előnyös aktivitást mutat a receptor irányában. Elvileg a vizsgálandó szekvenciák kiválasztására alkalmas bármely ismert eljárás felhasználható a könyvtár kialakítására.

A vizsgálandó szekvenciák hossza függ a szekvenciákat alkotó építőelemek jellegétől, a receptor jellegétől és az adott receptorról szemben mutatott kívánt aktivitástól. A legtöbb célnak a 3 és 20 építőelem közti hossz megfelelő lesz.

A könyvtárat alkotó vizsgálandó szekvenciák száma elegendő nagy legyen ahhoz, hogy megfelelő mennyiségű adatot biztosítson egy jó mimotóp szekvencia eléréséhez elfogadható számú lépés/ciklus alatt. Ugyanakkor az adott szám elég kicsi legyen ahhoz, hogy biztosítsa a kapott adatok megfelelően kényelmes kezelését. Általában a vizsgálandó szekvenciák száma a könyvtárban 500 és 100,000 közötti, előnyösen 1,000 és 10,000 közötti.

A kívánt számú vizsgálandó szekvencia létrehozása után a vizsgálandó szekvenciákat megszintetizálhatjuk. Ezt bármilyen ismert eljárás alapján elvégezhetjük, például ahogy az Sloodstra és munkatársai leírták [Sloodstra és mtsai.:



Molecular Diversity 1 87 (1995b)]. Természetesen az is elképzelhető, hogy egy már elkészült könyvtárt alkalmazunk, például azért, mert a jelen eljárás egy korábbi lefuttatása során már felhasználtuk. Ebben az esetben nem kell megszintetizálni a vizsgálandó szekvenciákat.

Kényelmi szempontokból a vizsgálandó szekvenciákat előnyösen egy minikártya vagy egy lapos hordozó közeg alkalmazásával szintetizáljuk meg, ahogyan azt korábban már leírták a 10.019703 azonosítószámú holland szabadalmi bejelentésben.

A találmány szerinti eljárás második lépésében meghatározzuk a könyvtár minden egyes vizsgálandó szekvenciájának aktivitását a receptorral szemben. Ezen meghatározás kivitelezésének módja függ a mimotóp szekvencia és a megcélzott receptor közötti specifikus kölcsönhatástól, a receptor természetétől és a mimotóp szekvencia építőelemeinek jellegétől. Így például, amikor a kívánt aktivitás a mimotóp szekvencia receptorhoz történő kötődése, és a mimotóp szekvencia peptid továbbá a receptor monoklonális antitest, a meghatározás megfelelően elvégezhető ELISA vizsgálati eljárás segítségével, mind oldatban vagy szilárd hordozón. További megfelelő aktivitás meghatározó eljárások lehetnek a következők: BIACORE és AFM („Atomic Force Microscope”, atom-erő mikroszkóp). A szakember feltételezhetően képes a megfelelő aktivitás meghatározó eljárás kiválasztására adott receptor esetére a mimotóp szekvencia jellegétől függően.



A könyvtár vizsgált szekvenciái aktivitásának meghatározása eredményeként legalább egy vizsgált szekvenciát kiválasztunk, amely a találmány szerinti eljárás további lépéseinek alapját fogja képezni. A legalább egy vizsgált szekvenciát - a találmánynak megfelelően - oly módon választjuk ki, hogy adott pozícióban az aktivitás meghatározás eredmények alapján olyan építőelemet tartalmaz, amely az adott pozícióban előnyös. Ebben a megközelítésben az „egy bizonyos pozícióban az adott helyen előnyös építőelem” kifejezés alatt azt értjük, hogy az adott helyen az adott építő elemet tartalmazó vizsgálandó szekvenciák nagy aktivitást mutatnak a receptorral szemben, a további talált aktivitásokhoz viszonyítva.

Lehetséges, hogy a legalább egy azonosított vizsgált szekvencia aktivitását megvizsgáljuk a receptorral szemben mutatott aktivitására és önmagában is magas aktivitást mutat a további talált aktivitásokhoz viszonyítva.

Elképzelhető továbbá az is, hogy az azonosított legalább egy vizsgált szekvenciát önmagát nem vizsgáltuk. Ez a következő módon magyarázható. Például megfigyelhettük azt, hogy egy vizsgált szekvencia - amely a 2. pozícióban az A építőelemet tartalmazza - nagyon magas aktivitást mutat a receptorral szemben. Megfigyelhettük továbbá azt is, hogy egy vizsgált szekvencia - amely a 4. pozícióban a B építőelemet tartalmazza - ugyancsak nagyon magas aktivitást mutat a receptorral szemben. Az azonosítandó legalább egy vizsgálandó szekvencia ekkor lehet az a szekvencia, amely a 2. pozícióban az A, és a 4. pozícióban a B építőelemet tar-



talmazza. Ugyanakkor könnyen megeshet, hogy ezt a szekvenciát önmagát még nem vizsgáltuk a receptorral szemben mutatott aktivitására.

Általánosságban az azonosított vizsgálandó szekvenciák száma - amelyekre a találmány szerinti eljárás további lépéseit alapozzuk - 1 és 150 között lehet. Nagyobb számú kiválasztott vizsgálandó szekvencia jobb eredményekhez vezet, de arányosan nehezebben kezelhető lesz. Előnyösen az említett szám 1 és 25 között lehet. A szakember feltételezhetően képes meghatározni a kiválasztásra kerülő vizsgálandó szekvenciák számát, az eljárás eredményének kívánt minőségétől és az eljárás kivitelezéséhez rendelkezésre álló lehetőségektől függően.

Az azonosított vizsgálandó szekvenciákra alapozva egy következő vizsgálandó szekvencia könyvtárat hozunk létre úgynevezett helyettesítéssel analízis alkalmazásával. Ezt úgy végezzük el, hogy az azonosított vizsgálandó szekvenciák egyes pozícióiban az építőelemeket változtatjuk meg, azaz például az azonosított vizsgált szekvencia kiválasztott pozícióiban egy építőelemet kiválasztott építőelemekkel cserélünk fel.

Így például a legegyszerűbb esetben a helyettesítéssel analízist a következő módon hajtjuk végre. Abban az esetben, ha a vizsgálandó szekvenciák természetben előforduló aminosavakból álló dodekapeptidek, elsőnek az egyik kiválasztott dodekapeptid első pozíciójában található építőelemet cserélhetjük ki a húsz természetben előforduló aminosav mindegyikére, amely így 20 új vizsgálandó szekvenciát ered-

ményez. Ezt megismételjük a dodekapeptid minden egyes pozíciójára, amely így $20 \times 12 = 240$ vizsgálandó szekvenciát eredményez. Ezen 240 szekvencia között az eredeti dodekapeptid 12 példányban található meg. Ezt az eljárást minden egyes kiválasztott dodekapeptiden megismételjük. Így egy következő könyvtárt hozunk létre, amely 240–3600 új vizsgálandó szekvenciát tartalmaz.

Ennek a helyettesítési analízisnek bonyolultabb formái is megvalósíthatók, például úgy, hogy lehetővé tesszük adott építőelemek kicserélését építőelemek csoportjaival (azaz például egy aminosavat két vagy több aminosavra cserélünk). Általánosságban egy ilyen cserét több építőelemmel esetlegesen alkalmazunk. Előnyösen az eljárás különböző ciklusainak legalább egy helyettesítési analízise során legalább egy építőelemet építőelemek csoportjával cserélünk ki. Figyelmet kell fordítani arra is, hogy az egyes helyettesítési analízisek során ne vigyünk be túl sok többszörös építőelemet, mert ebben az esetben felléphetnek a szekvencia hosszával kapcsolatos problémák. Ugyanezen ok miatt a többszörös építőelem csoport előnyösen lehetőleg ne legyen túl hosszú. A szakember - a szakterületen szerzett tapasztalatai alapján - feltételezhetően el tudja dönteni milyen méretű és számú többszörös építőelemek vihetők be.

Elképzelhető továbbá az is, hogy a helyettesítési analízis során egy építőelemet kihagyunk. Ebben az esetben a szekvencia egy építőelemmel rövidebb lesz. Egyértelmű, hogy nem ajánlatos túl sok építőelemet egyszerre kihagyni, mert ez egy nemkívánatos rövid (vagy nem létező) vizsgálandó



szekvenciát eredményezhet. A szakember feltételezhetően képes annak eldöntésére, hogy mikor és melyik pozícióban lehet előnyös egy kihagyás a vizsgált szekvenciában.

Elképzelhető továbbá az is, hogy a helyettesítési analízis során csak kiválasztott építőelemek bevitelét engedélyezzük, vagy csak kiválasztott pozíciókban található építőelemeket cserélünk a vizsgált szekvenciákban. Egyes esetekben előnyös bizonyos építőelemek megtartása adott pozíciókban, például annak érdekében, hogy a vizsgálandó szekvencia egy kívánt háromdimenziós szerkezetét fenn tudjuk tartani. A helyettesítési analízis ilyen megvalósítási módjának egy előnye az, hogy a létrehozott vizsgálandó szekvenciák összes száma korlátozott. Általánosságban azonban, ha a vizsgálandó szekvencia minden egyes pozíciójában az építőelemeket az összes lehetséges építőelemmel felcseréljük, akkor biztosítjuk a kívánt háromdimenziós szerkezettel rendelkező vizsgálandó szekvenciákat is. Ahogyan ezt már korábban említettük, a szakember számára ismertnek tekinthető fel, hogy milyen esetekben érdemes a kicserélést csak bizonyos pozíciókban elvégezni. A szakember továbbá azt is meg tudja határozni, hogy ez mely pozíciókra áll fenn, továbbá milyen építőelemek alkalmazhatók a kicserélés során és mely építő elemeket jobb nem használni a kicserélés során (az adott pozícióra nézve).

A következő könyvtár vizsgálandó szekvenciáit - amelyeket a legalább egy azonosított vizsgálandó szekvencia helyettesítési analízise alapján hoztunk létre - megvizsgáljuk a receptorral szemben mutatott aktivitásukra. Abban az



esetben, ha ezen könyvtár vizsgált szekvenciái között található egy, a receptorral szemben megfelelő aktivitást mutató vizsgált szekvencia, az eljárást befejezzük és megkapjuk a kívánt mimotóp szekvenciát. Egyértelmű, hogy az aktivitás típusától, a receptortól, a mimotóp szekvenciától és a mimotóp szekvencia kívánt alkalmazásától függ, hogy egy adott aktivitást megfelelőnek tekintünk-e. A körülmények ismeretében a szakember feltételezhetően meg tudja választani a kívánt aktivitás küszöbértékét.

Abban az esetben, ha egyetlen vizsgált szekvencia sem mutat megfelelő aktivitást a receptorral szemben, egy további ciklust hajtunk végre. A találmány szerint előnyösen legalább két ciklust, és így két helyettesítéses analízist végzünk el. Így a vizsgálandó szekvenciák egy következő könyvtárát hozzuk létre, az előző könyvtár 10-15 legnagyobb aktivitást mutató vizsgált szekvenciájára alapozva, ahogyan ezt fentebb leírtuk. Ezen következő könyvtár vizsgálandó szekvenciáinak az aktivitását meghatározzuk, és így tovább.

A kivitelezendő ciklusok száma függ a receptorhoz keresett mimotóp szekvencia aktivitásának kívánt fokától. Körülbelül 4500 random dodekapeptidből kiindulva, azt találtuk, hogy kevesebb mint három ciklus alatt eljuthatunk egy monoklonális antitest pontos építőp szekvenciájához.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva, adott receptorral szemben a vizsgálandó szekvenciák aktivitásának meghatározásához az alkalmazott receptor mennyiségét ciklusonként csökkentettük. Azt találtuk, hogy azon építőelemek, amelyek az első ciklusban létfontosságú-



nak tűntek, a további ciklusok során fontosságukat elveszíthetik. Másképpen megfogalmazva, az említett első ciklus során találhatunk egy lokális optimumot, amelyet egy következő ciklusban, vagy a következő ciklusokban átléphetünk. Azt találtuk, hogy a vizsgálandó szekvenciák aktivitásának meghatározásában alkalmazott receptor mennyiségének csökkentése segít az ilyen lokális optimumok átlépésében. Előnyösen egy könyvtárban a vizsgálandó szekvenciák aktivitásának meghatározásához alkalmazott receptor mennyiségét 50-1000 közötti faktorral csökkentjük, előnyösebben 10-100 közötti faktorral csökkentjük.

A találmány megvalósítási módjait az alább következő, nem korlátozó értelemben vett példák segítségével részleteiben is bemutatjuk.

Példák:

Az alábbiakban megadott példák a találmány szerinti optimalizálási módszer hat változatát mutatják be, amelyeket sikeresen alkalmaztunk vezérpeptidek esetében, amely vezérpeptideket peptidek, fehérjék, vírusok, baktériumok, cukrok és szteroidok ellen termeltetett antitestek (monoklonális és poliklonális) segítségével azonosítottunk különböző típusú peptid könyvtárakból. Belátható, hogy további variációk is lehetségesek. Az ezen variációkat szabályozó alapelvek a helyettesítési analízisek megismétlése egy vagy több vezérpeptiden. Így a helyi minimumokat kivédhetjük és epitópokat illetve mimotópokat azonosíthatunk.



Anyagok és módszerek:

Minikártya könyvtárak szintézise és szkrínelése (az 1., 2., 5. és 6. példákban kerül alkalmazásra):

A 20 természetes eredetű L-aminosav alkalmazásával 4550 random dodekapeptidet (12-mer) hoztunk létre random generátor segítségével, amely programot Quick Basic programnyelven írtunk meg, és egy 486DX2 (66 MHz) gépen fut. Ebben a könyvtárban minden egyes aminosav gyakorisága körülbelül 5%. Ezt a szekvencia csoportot alkalmaztuk további könyvtárak megtervezéséhez is. Ezek közül az egyikben az összes szekvencia a D-aminosav formában van, egy másikban a 2. és 11. pozíciót cisztein foglalja el, és a harmadikban a 3. és 10. pozícióban található cisztein. Az utóbbi kettő célja egy diszulfid híd bevitele a peptidbe, ennek következtében a peptid hurok formát vesz fel. Itt nagyon fontos az, hogy az aminosavak szekvenciája a ciszteineken kívül és belül megegyezik az első 4550 dodekapeptidből álló csoport szekvenciájával. Ezen a módon ezeknek a dodekapeptid csoportoknak az aktivitása összehasonlítható. Az 1. példa azokat az eredményeket írja le, amelyeket azzal a szintetikus peptid könyvtárral értünk el, ahol a 3. és 10. pozícióban cisztein található. A 2. példa a 4550 random dodekapeptidből (12-mer) álló szintetikus peptid könyvtárral elért eredményeket írja le, azaz ahol nem használtunk ciszteint, vagy bármilyen más részegységet.

A könyvtárak szintézisére és szkrínelésére hitelkártya formátumú mini-PEPSCAN kártyákat alkalmaztunk (455 peptid/-kártya) a korábban leírtak szerint [Slootstra és mtsai.,



(1995b)]. Az 1. példában egy enzim-kapcsolt PEPSCAN alapú immunológiai vizsgálati eljárás segítségével (ELISA) vizsgáltuk a 26/9 monoklonális antitest kötődését az egyes peptidekhez. A 26/9 monoklonális antitestet már korábban leírták [Wilson és mtsai., (1984); Rini és mtsai., (1992); Churchill és mtsai., (1994)]. A 26/9 monoklonális antitestet az influenza vírus (X47:HA1) hemagglutinin fehérje HA175-110 peptidje ellen termeltették [Wilson és mtsai., (1984)].

Az 1. példa szerint a kovalensen kötött peptideket tartalmazó 455-lyukas hitelkártya formátumú polietilén kártyákat a 26/9 antitesttel inkubáltuk (100 µg/ml). Mosás után a peptideket nyúl eredetű anti-egér peroxidázzal inkubáltuk (rampo, 1/1000 hígítás; Dakopatts; 1 óráig 25 °C-on), majd ezt követően - mosás után - hozzáadtuk a peroxidáz szubsztrátot - 2,2'-azino-di-3-etil-benzthiazolin-szulfonát, (ABTS) - és 2 µl/ml 3% H₂O₂-t. Egy óra eltelte után megmértük a szín megjelenést. Az ELISA szín kialakulásának mennyiségi meghatározását CCD-kamera és képfeldolgozó rendszer segítségével végeztük. Az elrendezés egy CCD-kamerából és egy 55 mm-es lencséből (Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon micro-nikkor 55 mm f/2,8 lencse), kamera adapterből (Sony Camera adaptor DC-77RR) és a TIM képfeldolgozó szoftver csomagból (3.36 verzió; Difa Measuring Systems, Norvégia) áll. A TIM egy 486DX2 (50 MHz) számítógép rendszeren fut.

A dodekapeptid könyvtárat - amely a 4550 random dodeka-peptidből áll - viszonylag magas antitest koncentráció mel-



lett (100 $\mu\text{g/ml}$, gyakrabban 10 $\mu\text{g/ml}$; lásd a 2-6. példákban) szkríneljük. Ez a koncentráció körülbelül két nagyságrenddel nagyobb azon koncentrációnál, ami ELISA esetében a természetes eredetű epitóp peptiddel a maximális kötési aktivitás eléréséhez szükséges koncentráció (az adatok nem kerültek bemutatásra). A 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációt azért alkalmaztuk, hogy sok kötő peptidet kapjunk a 4550 random dodekapeptid kis csoportjából. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy egy ilyen stratégia - kedvezőtlen jel-zaj viszony létrejötte nélkül - több száz kötő peptidhez vezethet, amelyek a természetes eredetű epitóp kisebb lineáris vagy nem-lineáris részeire hasonlítanak [Slootstra és mtsai., (1995b); Slootstra és mtsai., (1997)].

További pepszken könyvtárak szintézise és szkrínelése (a 4. példában kerül alkalmazásra):

A random mini-pepszken könyvtárakon túl, mimotóp szekvenciákat azonosíthatunk standard pepszken könyvtárakból is. Ezek a könyvtárak tartalmazzák az összes átfedő 12-mert (vagy rövidebb/hosszabb szekvenciákat), amely lefedi egy ismert fehérje lineáris szekvenciáját [Slootstra és mtsai., (1995a)].

Nem-pepszken könyvtárak szintézise és szkrínelése (a 3. és 6. példákban kerül alkalmazásra):

Vezérpeptidek származtathatók más típusú könyvtárakból is, mint például fág-display könyvtárakból.

Vezérmolekulák szekvencia analízise (az 5. példában kerül alkalmazásra):



Mind a 4550 dodekapeptidet rangsoroltuk a kötési aktivitásuk szerint. A rangsorolás szerint konszenzus szekvenciákat és részegységeket azonosítottunk. A vezérmolekulák kezdeti optimalizálási eljárásait - amelyek során csak az első 50 molekula szekvenciáját alkalmazzák - korábban már Slootstra és munkatársai leközlötték [Slootstra és mtsai., (1995b); (1997)]. A találmány szerinti eljárás mind a 4550 szekvenciát felhasználja. Első lépésként az önmagukban álló aminosavak, az OO dipeptid részegységek, az OXO dipeptid részegységek és az OXXO dipeptid részegységek gyakoriságát és/vagy eloszlását határozzuk meg Microsoft Excel 4.0 szoftver alkalmazásával („O” jelenti a 20 természetes eredetű L-aminosav bármelyikét; „X” bármilyen aminosav). Második lépésként az aminosavak tulajdonságait (hidrofóbicitás, töltés, stb.) bele vesszük az analízisbe. Harmadik lépésként az összes ilyen adatot felhasználjuk az első 10-50 vezérmolekula aktivitásának optimalizálásához. Ezt úgy végezzük el, hogy az aktivitást gátló építőelemeket kicseréljük és az aktivitást javító építőelemeket illesztünk be.

A találmány szerinti szekvencia analízis módszer javítja a vezérmolekulák aktivitását a könyvtárt alkotó összes szekvencia részegység analízise útján.

Helyettesítéssel analízis (az 1., 2., 3., 4., 5. és 6. példákban kerül alkalmazásra):

Egy helyettesítéssel analízis során a vezérpeptidek szubsztitúciós analógjai egy teljes sorozatának - ahol minden egyes pozíciót a további 19 természetes eredetű L-aminosavval helyettesítünk - kötési aktivitását részletesen



megvizsgáljuk. Továbbá az is elképzelhető, hogy a 20 D-aminosavat és hasonlóképpen további, rendelkezésre álló nem természetes eredetű aminosavakat alkalmazunk. Azon szubsztitúciókat, amelyek megemelkedett kötési aktivitást eredményeznek új építőelem szekvenciákká kombináljuk. Ezeket az új szekvenciákat újra vizsgáljuk egy második helyettesítési analízis során. Amennyiben szükséges, további helyettesítéssel analízis fordulókat hajtunk végre. Mindegyik helyettesítéssel analízis forduló után az antitest (vagy más oldható receptor) koncentrációját csökkenthetjük, hogy maximális kötési aktivitást érjünk el (azaz például 100 µg/ml-ről 0,01 µg/ml-re csökkentjük a helyettesítéssel analízis két fordulója után, ahogyan ezt az 1. példában bemutatjuk).

Irodalmi hivatkozások:

Churchill M. és mtsai.: Crystal structure of a peptide complex of anti-influenza peptide antibody Fab 26/9 [J. Mol. Biol. 241 534 (1994)].

Rini J. és mtsai.: Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen interaction [Science 255 959 (1992)].

Slootstra J. és mtsai.: Possible active site of the sweet-tasting protein thaumatin [Chemical Senses 20 535 (1995a)].

Slootstra J. és mtsai.: Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries [Molecular Diversity 1 87 (1995b)].



Slootstra J. és mtsai.: Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies M1, M2 and M5 [Molecular Diversity 2 156 (1996)].

Slootstra J. és mtsai.: Screening of a small set of random peptides: A new strategy to identify peptides that mimic epitopes [J. Mol. Recog. 10 219 (1997)].

Wilson I. és mtsai.: The structure of an antigenic determinant in a protein [Cell 37 767 (1984)].

Megjegyzések a példákhoz:

A 10 µg/ml, 1 µg/ml, stb. értékek az antitest koncentrációra vonatkoznak.

A „javított 1. pozíció” stb. sor azt jelenti, hogy ez az aminosav csere (aláhúzva) javítja a kötési aktivitást a pepszken ELISA-ban az adott antitest koncentrációnál. Azokat a pozíciókat, amelyeknél nem lehetséges a javítás, nem említjük (mint például a 8. pozíció az 1. példa első helyettesítési hálóján, azaz az eredeti I adja a legmagasabb aktivitást a 8. pozícióban).

1. példa

Epitóp azonosítása vezérpeptid segítségével, amit 4550 random módon létrehozott dodekapeptidből választottunk ki (mini-pepszken könyvtár az **XXCXXXXXXCXX** részlettel, ahol az **X** tetszőlegesen kiválasztott aminosavat jelöl, lásd még az **Anyagok és módszerek** fejezetben)

Anyagok: a GCGAAMNIRCYA vezérpeptid.



Módszer: helyettesítéssel analízis két fordulója.

Eredmények:

Az 1. példában a CGCAAMNIRCYA vezérpeptidet a 3. és 10. pozícióban ciszteint tartalmazó random könyvtárból (lásd fentebb Anyagok és módszerek) származtattuk (26/9 antitest segítségével). A CGCAAMNIRCYA random peptid összes lehetséges egyszeres helyettesítéssel analógját megvizsgáltuk pepszken segítségével kötési aktivitásra a 26/9 antitesttel szemben, 100 µg/ml antitest koncentráció mellett. Ezeket az eredményeket az alábbiakban részletesen ismertetjük.

A CGCAAMNIRCYA vezérpeptid helyettesítéssel analízise olyan építőelemek azonosításához vezetett, amely semmilyen más építőelemmel nem helyettesíthetők (mint például az Y és az A), olyan aminosavak azonosításához vezetett, amelyek egy vagy két másik építőelemmel helyettesíthetők (mint például az N) és olyan aminosavak azonosításához vezetett, amelyek sok más építőelemmel helyettesíthetők (mint például az M). Egyes helyettesítések jelentősen növelik a kötési aktivitást (mint például az N cseréje D aminosavra).

Mindezeket a helyettesítéseket alkalmaztuk a javított EMDEEEDIMNYA peptid kialakításához. Figyeljük meg, hogy ez a peptid a 26/9 antitestet jelentősen alacsonyabb koncentrációban köti, tehát jobb a kötési aktivitása (100 µg/ml a CGCAAMNIRCYA esetében és 1,0 µg/ml az EMDEEEDIMNYA esetében).

Az EMDEEEDIMNYA peptidet egy második helyettesítéssel analízisen is végigvittük. Hasonlóképpen, néhány helyettesítés jelentősen növeli a kötési aktivitást. Ezeket a he-



lyettesítésekét alkalmaztuk az EMDEEEDVPDYA javított peptid kialakítására. Létfontosságú az, hogy az EMDEEEDIMNYA peptid első része - az EMDEEE peptid - nem tartalmaz kritikus aminosavakat, míg a másik része - a DIMNYA - igen. Ebben a második részben a javított oldalláncok kombinációja a DVPDYA szekvenciát eredményezi. A DVPDYA szekvencia azonos a 26/9 antitest lineáris epitópjával. Így a néhány ezer random dodekapeptidből levezetett CGCAAMNIRCYA vezérpeptidet egy természetes eredetű epitóp szekvenciává alakítottuk két helyettesítéssel analízisen keresztül.



I. helyettesítéssel analízis:

eredeti vezérmolekula: CGCAAMNIRCYA

aktivitás mérhető $\geq 100,0 \mu\text{g/ml}$

javított 1. pozíció: EGCAAMNIRCYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

javított 2. pozíció: CMCAAMNIRCYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

javított 3. pozíció: CGDAAMNIRCYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

javított 4. pozíció: CGCEAMNIRCYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

javított 5. pozíció: CGCAEMNIRCYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

javított 6. pozíció: CGCAAENIRCYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

javított 7. pozíció: CGCAAMDIRCYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

javított 9. pozíció: CGCAAMNIMCYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

javított 10. pozíció: CGCAAMNIRNYA

aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$

kombinációs javítás: EMDEEEDIMNYA

aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$



II. helyettesítéssel analízis:

I. helyettesítés analízis kombinációi:	EMDEEEDIMNYA aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 8. pozíció:	EMDEEEDVMNYA aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
javított 9. pozíció:	EMDEEEDIPNYA aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
javított 10. pozíció:	EMDEEEDIMDYA aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	EMDEEEDVDPYA aktivitás mérhető $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

Megjegyzések:

A DVPDYA szekvencia az eredeti epitóp. Az EMDEEEDVDPYA peptid kötési aktivitása 10-szer nagyobb (oldatban) mint az YPYDVDPDYASLRS természetes eredetű epitóp peptid aktivitása.

2. példa

Mimotóp azonosítása vezérpeptid segítségével, amelyet 4550 random dodekapeptidből választottunk ki (random mini-pepszken könyvtár)

Anyagok: az ANWPSAIGAFGL vezérpeptid.

Módszer: helyettesítéssel analízis három fordulója.

Eredmények:

A 2. példában a vezérpeptideket egy random mini-pepszken könyvtáron keresztül azonosítottuk. A különbség az 2.



példa és az 1. példa között az, hogy az 1. példában alkalmazott antitest egy lineáris epitópot köt, míg a 2. példában alkalmazott antitest egy nemlineáris epitópot köt. A következő többszörös helyettesítéssel analíziseket az 1. példában leírtak szerint végeztük. Az azonosított mimotóp szekvencia a természetes eredetű fehérje lineáris szekvenciájának egyik régiójára sem hasonlít.

I. helyettesítéssel analízis:

eredeti vezérmolekula:	ANWPSAIGAFGL aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	<u>H</u> NWPSAIGAFGL aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	A <u>W</u> WPSAIGAFGL aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	AN <u>A</u> PSAIGAFGL aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 4. pozíció:	ANW <u>S</u> SAIGAFGL aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 11. pozíció:	ANWSSAIGAF <u>K</u> L aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	<u>H</u> W <u>A</u> SSAIGAF <u>K</u> L aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$



II. helyettesítéssel analízis:

I. helyettesítéssel analízis kombinációi:	HWASSAIGAFKL aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	<u>K</u> WASSAIGAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	H <u>Y</u> ASSAIGAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	HWG <u>S</u> SAIGAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 7. pozíció:	HWASSA <u>M</u> GAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	<u>KYGSSA</u> <u>M</u> GAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

III. helyettesítéssel analízis:

II. helyettesítéssel analízis kombinációi:	KYGSSAMGAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	KY <u>F</u> SSAMGAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$
javított 6. pozíció:	KYGSSG <u>M</u> GAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	KY <u>FSSG</u> <u>M</u> GAFKL aktivitás mérhető $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$



3. példa

Mimotóp azonosítása vezérmolekula segítségével, amely több mint 1.000.000 random hexapeptidből álló fág-display könyvtárból származik

Anyagok: a SDTRKG* vezérpeptid.

Módszer: az SDTRKG peptidet balra és jobbra meghosszabbítjuk ciszteinekkal/glicinekkel, amelyet helyettesítéses analízis három fordulója követ.

Eredmények:

A 3. példában a vezérpeptideket fág-display eljárás alkalmazásával azonosítottuk. Egymás melletti ciszteineket/glicineket adtunk hozzá a kötési aktivitás javításához. Az elért aktivitás után többszöri helyettesítéses analíziseket végeztünk az 1. példában leírtak szerint.

Hosszabbítás ciszteinekkal/glicinekkel:

fág-display vezér szekvencia	SDTRKG Nincs mérhető aktivitás 10,0 µg/ml koncentrációnál
hosszabbított vezér szekvencia	CSDTRKGC aktivitás mérhető ≥ 10,0 µg/ml
hosszabbított vezér szekvencia	CSDTRKGCG aktivitás mérhető ≥ 10,0 µg/ml



I. helyettesítéssel analízis:

hosszabbított vezér szekvencia:	CSDTRKGCG aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	CTDTRKGCG aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	CSETRKGCG aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 5. pozíció:	CSDTHKGCG aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 6. pozíció:	CSDTRYGCG aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	CTETHYGCG aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

II. helyettesítéssel analízis:

I. helyettesítéssel analízis kombinációi:	CTETHYGCG aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	CYETHYGCG aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 5. pozíció:	CTETKYGCG aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 6. pozíció:	CTETHFGCG aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	CYETKFGCG aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$



III. helyettesítéssel analízis:

II. helyettesítéssel analízis kombinációi:	CYETKFGCG aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	<u>D</u> YETKFGCG aktivitás mérhető $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$
javított 8. pozíció:	CYETKFG <u>N</u> G aktivitás mérhető $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	<u>D</u> YETKFG <u>N</u> G aktivitás mérhető $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

* - ez a vezérpeptid - mint szintetikus peptid - nem aktív (sem ELISA-ban (pepszken vagy standard), sem oldatban). Ez nem egyedülálló. Gyakran a fág-peptidek csak a fág burokfehérje részeként aktívak. Más formátumokban elvesztik aktivitásukat.

4. példa

Mimotóp azonosítása egy standard pepszken analízisből kapott vezérmolekula segítségével

Anyagok: az RVMIKLILVNFR* vezérpeptid és természetes eredetű fehérje teljes szekvenciája (az alkalmazott rész szekvenciája: KIYRVMIKLILVNFRMQP).

Módszer: helyettesítéssel analízis két fordulója, amelyet balra és jobbra történő meghosszabbítás követ, majd két további helyettesítéssel analízis forduló követ, és befejezésül egy 18-mer mimotóppá hosszabbítás következik.



Eredmények:

A 4. példában a vezérpeptidet standard pepszken analízis alkalmazásával azonosítottuk, azaz tehát az antitestet vizsgáltuk az összes átfedő 12-meren, amelyek lefedték a fehérje lineáris szekvenciáját. A következő helyettesítési analízis két fordulóját az 1. példában leírtak szerint végeztük. Továbbá, a mimotópot balra és jobbra meghosszabbítottuk (3 aminosav, ez tovább hosszabbítható) további helyettesítési analízisekkel.

I. helyettesítési analízis:

eredeti vezérmolekula:	RVMIKLILVNFR aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	<u>A</u> VMIKLILVNFR aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	A <u>I</u> MIKLILVNFR aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	AV <u>P</u> IKLILVNFR aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 8. pozíció:	AVMIKLIR <u>V</u> NFR aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 11. pozíció:	AVMIKLILVN <u>Y</u> R aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	<u>A</u> <u>I</u> <u>P</u> IKLIR <u>V</u> <u>N</u> <u>Y</u> R aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

II. helyettesítéssel analízis:

I. helyettesítéssel analízis kombinációi:	AIPIKLIRVNYR aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	<u>Y</u> IPIKLIRVNYR aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	A <u>P</u> PIKLIRVNYR aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	<u>Y</u> PPIKLIRVNYR aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

A természetes eredetű szekvencia meghosszabbítása:

II. helyettesítéssel analízis kombinációi:	YPPIKLIRVNYR aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
balra hosszabbított:	KIYYPPPIKLIRV aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
jobbra hosszabbított:	IKLIRVNYRMQP aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

A balra hosszabbított peptid

III. helyettesítéssel analízise:

balra hosszabbított:	KIYYPPIKLIRV aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	<u>R</u> IYYPPIKLIRV aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	K <u>P</u> YYPPIKLIRV aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	KIW <u>Y</u> PPIKLIRV aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 8. pozíció:	KIYYPPIS <u>L</u> IRV aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	<u>R</u> PWYPPIS <u>L</u> IRV aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$



A jobbra hosszabbított peptid

IV. helyettesítéssel analízise:

jobbra hosszabbított:	IKLIRVNYRMQP aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 10. pozíció:	IKLIRVNYRC <u>Q</u> P aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 11. pozíció:	IKLIRVNYRME <u>P</u> aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 12. pozíció:	IKLIRVNYRMQ <u>N</u> aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	IKLIRVNYRC <u>EN</u> aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
kombinációs totál:	RPWYPPISLIRVNYRCEN aktivitás mérhető $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$

*- a vezérpeptidet egy fehérje lineáris szekvenciáját lefedő összes átfedő 12-merből álló könyvtárból azonosítottuk. Ez lehetővé teszi a peptid meghosszabbítását balra és jobbra szomszédos aminosavakkal, ebben az esetben KIY balról és MQP jobbról. A 12-merek további helyettesítéssel analízisei - a szekvenciához képest három aminosavat balra vagy három aminosavat jobbra csúsztatva - végül egy 18-mer mimotópot eredményeztek.



5. példa

Mimotóp azonosítása hasonló vezérmolekulák csoportja segítségével, amelyeket 4550 random dodekapeptid közül választottunk ki (random mini-pepszken könyvtár)

Anyagok: 6 vezérpeptidből álló csoport: QNNMKLFRGCVP, RGIKWNEMTDQW, KLQQNPTFYPPV, TNNCKEFAGIVP, RGILTNIMKDQW, IVQNNPKFFRGA; (potenciálisan fel egészen 4550 peptid alkalmazható, lásd az anyagok és módszerek fejezetet, ebben az esetben ugyanakkor a „negatív” aminosavakat a vezérpeptidekből eltávolítottuk).

Módszer: konszenzus szekvencia meghatározása, amit a konszenzus szekvencia helyettesítéses analízisének két fordulója követ.

Eredmények:

Az 5. példában hasonló vezérpeptidek csoportját alkalmaztunk egy konszenzus szekvencia azonosításához. A konszenzus szekvenciákat az anyagok és módszerek részben leírtak szerint azonosítottuk. Ezt a szekvenciát alkalmaztuk a helyettesítéses analízisekben.

Vezér szekvenciák összeillesztése:

QNNMKLFRGCVP

RGIKWNEMTDQW

KLQQNPTFYPPV

TNNCKEFAGIVP

RGILTNIMKDQW

IVQNNPKFFRGA

konszenzus: ILQNNMKDFRG



I. helyettesítéssel analízis:

konszenzus vezérmolekula:	ILQNNMKDFRG aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	IL <u>T</u> NNMKDFRG aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 7. pozíció:	ILQNNMP <u>D</u> FRG aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 10. pozíció:	ILQNNMKD <u>W</u> RG aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	IL <u>T</u> NNMP <u>D</u> <u>W</u> RG aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$

II. helyettesítéssel analízis:

I. helyettesítéssel analízis kombinációi:	ILTNNMPDWRG aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$
javított 7. pozíció:	ILTNNM <u>G</u> DWRG aktivitás mérhető $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$
javított 11. pozíció:	ILTNNMPDW <u>Y</u> G aktivitás mérhető $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	ILTNNM <u>G</u> DW <u>Y</u> G aktivitás mérhető $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$



6. példa

Mimotóp azonosítása több mint 1.000.000 random hexapeptidből álló fág-display könyvtárból kiválasztott különböző vezérpeptidek csoportja segítségével

Anyagok: 3 vezérpeptidből álló csoport (ANWPSA, KLITRW, NVCSWS).

Módszer: minden egyes vezérpeptidre két forduló helyettesítéses analízis, amit az összesített konszenzus szekvencia meghatározása követ.

Eredmények:

A 6. példában különböző vezér peptideket alkalmaztunk egy konszenzus szekvencia meghatározásához. Mindegyik vezérpeptidet többszöri helyettesítéses analízisben alkalmaztuk (két forduló). Az eredményül kapott három mimotópot egymással fedésbe hoztuk, ami egy meghosszabbított, javított aktivitással rendelkező mimotópot eredményezett.



IA. helyettesítéssel analízis:

eredeti vezérmolekula:	ANWPSA aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	<u>H</u> NWPSA aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	A <u>W</u> WPSA aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	AN <u>A</u> PSA aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 4. pozíció:	ANW <u>S</u> SA aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	<u>H</u> W <u>A</u> SSA aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

IIA. helyettesítéssel analízis:

IA. helyettesítéssel analízis kombinációi:	HWASSA aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 5. pozíció:	HWAS <u>P</u> A aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	HWAS <u>P</u> A aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$



IB. helyettesítéssel analízis:

eredeti vezérmolekula:	KLITRW aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	<u>S</u> LITRW aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	K <u>S</u> ITRW aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 3. pozíció:	KL <u>A</u> TRW aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 6. pozíció:	KLITR <u>Y</u> aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	<u>SS</u> ATRY aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

IIB. helyettesítéssel analízis:

IB. helyettesítéssel analízis kombinációi:	SSATRY aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	S <u>P</u> ATRY aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	S <u>P</u> ATRY aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$



IC. helyettesítéssel analízis:

eredeti vezérmolekula:	NVCSWS aktivitás mérhető $\geq 10,0 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	NICSWS aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 4. pozíció:	NVCHWS aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
javított 6. pozíció:	NVCSWA aktivitás mérhető $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	NICHWA aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$

IIC. helyettesítéssel analízis:

IC. helyettesítéssel analízis kombinációi:	NICHWA aktivitás mérhető $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
javított 1. pozíció:	YICHWA aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
javított 2. pozíció:	NVCHWA aktivitás mérhető $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$
kombinációs javítás:	YVCHWA aktivitás mérhető $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$



IIA, IIB és IIC kombinációs javítások összeillesztése:

kombinációs javítás 1:	HWASPA
kombinációs javítás 2:	SPATRY
kombinációs javítás 3:	YVCHWA
konszenzus:	YVCHWASSATRY aktivitás mérhető $\geq 0,01 \mu\text{g/ml}$



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy receptor számára mimotóp szekvencia meghatározására, *azzal jellemezve, hogy:*

(a) vizsgálandó szekvenciák random könyvtárát hordozó szilárd hordozót biztosítunk, ahol a vizsgálandó szekvenciák aminosav, monoszacharid vagy nukleotid építőelemek bármelyikéből épülnek fel;

(b) a könyvtár minden egyes vizsgálandó szekvenciájának aktivitását meghatározzuk a receptorral szemben;

(c) azonosítunk egy vizsgálandó szekvenciát, amely adott pozícióban olyan építőelemet tartalmaz, amely - a (b) lépés eredményei szerint - az adott pozícióban kedvező hatású;

(d) a vizsgálandó szekvenciák egy következő könyvtárát biztosítjuk - amely a (c) lépésben azonosított vizsgálandó szekvencián alapul - oly módon, hogy az azonosított vizsgálandó szekvencia kiválasztott pozícióiban egy építőelemet kiválasztott építőelemekkel helyettesítünk;

(e) meghatározzuk a (d) lépés szerint előállított könyvtárban az egyes vizsgálandó szekvenciák aktivitását a receptorral szemben;

(f) azonosítunk egy vizsgálandó szekvenciát, amely adott pozícióban olyan építőelemet tartalmaz, amely - az (e) lépés eredményei szerint - az adott pozícióban kedvező hatású;



(g) a (d)-(f) lépéseket annyiszor ismételjük meg a (d) lépés szerint előállított könyvtár vizsgálándó szekvenciáira, míg csak az (f) lépésben olyan mimotóp szekvenciát nem azonosítunk, amely kívánt mértékű aktivitást mutat a receptorral szemben;

és ahol az egyes vizsgálándó szekvenciák minikártyán vagy lapos hordozó közegen helyezkednek el.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (a) lépésben biztosított vizsgálándó szekvenciaként ismert kémiai összetételű szekvenciákat alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (e) lépésben egy adott mennyiségű receptort alkalmazunk az aktivitás meghatározására, és ez az adott mennyiség kevesebb, mint a (b) lépésben alkalmazott mennyiség, és ahol a (g) lépésben alkalmazott mennyiség kisebb, mint a (g) lépést közvetlenül megelőző ciklus (e) lépésében alkalmazott mennyiség, amely.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (e) lépésben az aktivitás meghatározására alkalmazott receptor mennyisége egy 5 és 1000 közötti tartományba eső faktorial kisebb, mint a (b) lépésben alkalmazott mennyiség és ahol az adott mennyiség a (g) lépésben egy 5 és 1000 közötti tartományba eső faktorial kisebb, mint a (g) lépést közvetlenül megelőző ciklus (e) lépésében alkalmazott mennyiség.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (e) lépésben az aktivitás meghatározására alkalmazott receptor mennyisége egy 10 és 100 közötti tartományba



eső faktorra kisebb, mint a (b) lépésben alkalmazott mennyiség és ahol az adott mennyiség a (g) lépésben egy 10 és 100 közötti tartományba eső faktorra kisebb, mint a (g) lépést közvetlenül megelőző ciklus (e) lépésében alkalmazott mennyiség.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy legalább egy olyan (d) lépést végrehajtunk, ahol legalább egy építőelemet építőelemek egy csoportjával helyettesítünk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan vizsgálándó szekvenciákat alkalmazunk, amelyek 3-20 építőelemet tartalmaznak.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (a) lépésben olyan vizsgálándó szekvenciákat tartalmazó könyvtárt alkalmazunk, amely 500-10.000 vizsgálándó szekvenciát tartalmaz.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy receptorként az alábbiak bármelyikét alkalmazzuk: monoklonális antitestek, fehérjék - például enzimek -, sejtek, hormon receptorok és mikroorganizmusok.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az aktivitást immunológiai vizsgálati módszer - BIACORE vagy AFM - segítségével határozzuk meg.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a könyvtárban található minden egyes vizsgálándó szekvenciát fizikailag elválasztunk a könyvtárban található többi vizsgálándó szekvenciától.

12. Mimotóp szekvencia, amely az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás alkalmazásával állítható elő.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.


dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

43 oldal leírás
0 oldal rajz

43 oldal

