

## **ÖZET**

### **CXCL8 AMİNO UCU ÖNCÜL DİZİSİNDEN TÜREVLENEN İMMÜNMODÜLATÖR PEPTİT**

- 5 Bu buluş insan CXCL8 kemokin öncül peptit dizisinden (CXCL8-(1-30)) türevlenen fonksiyonel kısa peptit - Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys - dizisi ile ilgilidir. İmmün sistem yanıtlarını etkilemesi ve immün sistem hücrelerine bağlanması özellikleri ile karakterize edilmiştir. Bu fonksiyonel kısa peptit 8 aa.dan uzundur, nötral pH'da pozitif şarja sahip ve amfifiliktir.

## İSTEMLER

1-İnsan CXCL8 kemokin öncül peptit dizisinden (CXCL8-(1-30)) türevlenen küçük peptit molekülü olup,

- Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys (Pep8)

5 amino asit sekansına sahiptir.

2- İstem 1'de belirtilen amino asit sekansına sahip peptid molekülü olup, aşağıda belirtilen özelliklere sahiptir:

- 8 aa.dan uzundur,
- nötral pH'da pozitif şarj taşır,

10 • amfipatiktir, ve

- polar ortamda çözünecek şekilde hidrofobik aa. oranı %55 veya daha küçüktür.

3- İmmün sistem hücreleri ile etkileşerek immün sistem hücrelerinin yanıtlarını etkileme için kullanılacak bir ilacın veya ajanın hazırlanmasında İstem 1'de belirtilen amino asit sekansına sahip peptid molekülünün kullanımı.

15 4- İmmün sistem ile ilişkili hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılacak bir ilacın veya ajanın hazırlanmasında İstem 1'de belirtilen amino asit sekansına sahip peptid molekülünün kullanımı.

20 5- İmmün sistem hücrelerinin hedeflenmesinde kullanılacak bir ilacın veya ajanın hazırlanmasında İstem 1'de belirtilen amino asit sekansına sahip peptid molekülünün kullanımı.

6- İmmün sistem hücrelerinin işaretlenmesinde kullanılacak bir ilacın veya ajanın hazırlanmasında İstem 1'de belirtilen amino asit sekansına sahip peptid molekülünün kullanımı.

## TARİFNAME

### CXCL8 amino ucu öncül bölgesinden türetilen immünmodülatör peptit

#### Teknik Alan:

Bu buluş CXCL8 kemokin molekülüne ait amino-ucu bölgesinde yer alan öncül diziden  
5 (CXCL8-(1-30)) esinlenilerek türetilen ve immün sistem yanıtlarını etkileme fonksiyonu  
olduğu tespit edilen kısa peptit dizisi ile ilgilidir.

#### Tekniğin Durumu:

Sitokinler, hayvan ve bitki hücrelerince üretilen, hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan  
protein ve peptidlerin bir grubudur. İnflamasyon ve bağışıklık reaksiyonlarında, aktif  
10 lenfositler, makrofajlar dâhil immün hücreler, endotel, epitel ve konnektif dokular tarafından  
oluşturulurlar. Sitokinler, hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak hücre çoğalmasını,  
farklılaşmasını ve hücrel yanıtın düzenlenmesini uyarırlar.

Bir patojen varlığında sitokinler, T hücresi ve makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücrelerine  
sinyal verir ve enfeksiyon bölgesine gitmelerini sağlarlar.

15 Sitokinlerin özgül bir grubu kemokinler olup, hücreler arasında kemotaksiye aracılık ederler.  
Kemokinlerin CXC, CC, CX3C ve XC olmak üzere dört alt familyası vardır.

CXC kemokinlerde iki N-terminal sistein bir amino asit ile ayrılmıştır. Memelilerde 17 farklı  
CXC kemokin bulunmakta olup, glutamik asit-lösin-arginin yapısındaki spesifik amino asit  
sekansı (ELR motifi) içerip içermemesine göre ELR-pozitif ve ELR-negatif olmak üzere iki  
20 kategoriye ayrılır.

ELR-pozitif CXC kemokinler diğer bazı immün hücrelerin yanı sıra spesifik olarak nötrofillerin  
migrasyonunu indüklerler ve CXCR1 ile CXCR2 kemokin reseptörleri ile etkileşirler. ELR  
motifi içermeyen diğer CXC kemokinler genellikle lenfositler için kemoatraktan olarak işlev  
görür.

25 CN102816209 no.lu patent kemotaktik peptit chemerin'den türetilen ve fonksiyonu ile  
benzer görevler gören bir peptit (C20)'yi kapsar.

WO2012118124 (A1), CXCR4'e bağlanan CXCL12 kemokinini antagonize etme yeteneğine  
sahip yeni bir siklik peptit dizisini kapsar.

JP2010047598, US6875738 (B1), US6613742 (B1), WO0009152 (A1), CA2322764 (A1)  
30 no.lu patentler CXCR4'e bağlanan CXCL12 kemokinini antagonize etme yeteneğine sahip  
peptit dizilerini kapsar.

US2004152634 (A1), CXCR1' bağlanma kapasitesine sahip ve IL-8'i antagonize etme yeteneği gösteren peptit dizilerini kapsar.

US2014154249 (A1) no.lu patent kemokinlere doğrudan bağlanarak bu molekülün aktivitesini engelleyen, bu sayede inflamasyon ile ilişkili süreçleri değiştirebilecek peptitleri tanımlar.

- 5 WO2005056581 (A2) no.lu patent CCR5'e bağlanan CCL5 kemokinini antagonize etme ve bu reseptör aracılığı ile hücreyi enfekte eden HIV virüsünün girişini bloke etme yeteneğine sahip peptit dizilerini kapsar.

WO0222657 (A2), bu patent çeşitli kemokin reseptörlerine bağlanarak, kemokinlerin aktivitesini antagonize eden peptit dizilerini kapsar.

- 10 Bu patentler aşağıdaki özelliklerden birisine sahiptir: 1- İlgili peptidin köken aldığı kemokinin fonksiyonunu taklit (agonist) edebilme, 2- İlgili peptidin köken aldığı kemokinin fonksiyonunu antagonize edebilme, 3- İlgili peptidin köken aldığı kemokinin olgun protein bölgesinden (öncül bölgesinin dışından) tasarlanmış olma, 4- Belirli bir CXCL veya CCL kemokin molekülüne özgül olma.

- 15 Bu patent başvurusunda sözü geçen CXCL8 kemokininin amino ucundaki öncül bölgesinden (CXCL8-(1-30)) türevlenen kısa peptit dizisinin (Pep8) herhangi bir kemokinin fonksiyonunu antagonize veya agonize etme söz konusu değildir. Bu buluşta bağışıklık sistemi yanıtlarını etkileme kapasitesine sahip peptit dizisi belirlenmiştir.

- 20 Tekniğin durumunda başvuru kapsamındaki peptit sekansı ile örtüşen bir sekanstan veya bu küçük peptidin tarif ettiğimiz spesifik fonksiyonlarından doğrudan bahseden bir bilgi bulunmamıştır. CXCL8 kemokininin öncül dizisinden (CXCL8-(1-30)) türevlenen "Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys" dizisi tekniğin durumunda bilinmemektedir.

- 25 Tekniğin durumunda CXCL8'den köken alan peptitler karboksi uç kısımlarını da içermekte (bizim buluşumuzdaki gibi öncül bölgelerden köken almamaktadır) ve CXCL8'in yaptığı fonksiyonları antagonize veya agonize etmesi açısından değerlendirilmektedir. Bu patent başvurusunda sözü geçen CXCL8 kemokininin amino ucundaki öncül bölgelerinden türevlenen kısa peptit dizisinin (Pep8) herhangi bir kemokini antagonize veya agonize etme fonksiyonu söz konusu değildir. Bu buluşta bağışıklık sistemi yanıtlarını etkileme kapasitesine sahip peptit dizisi belirlenmiştir.

30

### **Buluşun açıklaması**

Peptit yapılı küçük moleküller pek çok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde ve hücrelerarası iletişimin sağlanmasında rol alır. Basit yapıdaki ve düşük moleküler ağırlığa sahip peptitler daha kolay stabilize olur ve hedef dokuya daha rahat ulaşır.

- 5 Bu buluş, bilinen CXCL8 kemokin molekülünün amino ucunda yer alan öncül (CXCL8-(1-30)) dizisinin rasyonel ve özgün bir algoritma ile irdelenmesi suretiyle bu dizilerden türevlenen küçük peptit molekülünün belirlenmesini ve eldesini içermektedir.

Bu diziden küçük peptit molekülü türetilmiş, in vitro kullanıma uygun olacak ve sentezlenmesi mümkün peptit seçilmiştir ve Pep8 olarak adlandırılmıştır.

- 10 Daha sonra sözkonusu küçük peptit molekülünün periferik kan mononükleer hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı belirlenmiş ve molekülün immün hücrelerin çeşitli uyarılar altında aktivasyonunu, çoğalmasını ve sitokin sentezini nasıl etkilediği araştırılmış ve immün düzenleyici etki gösterebildiği saptanmıştır.

- 15 Pep8 floresan işaretli olarak da sentezlenmiş ve hangi immün hücre tipleri ile daha çok etkileştiği araştırılmıştır.

### **Buluşun detaylı açıklaması**

- 20 CXCL8'e ait amino ucunda yer alan öncül dizinin (CXCL8-(1-30)) rasyonel bir algoritma ile irdelenmesi suretiyle bu diziden bir küçük peptit molekülü ve in vitro kullanıma uygun olacak ve sentezlenmesi mümkün olacak şekilde türetilmiştir.

Bu aşamada kullanılan tasarım ve türetme kriteri aşağıda belirtilmiştir:

- 8 aa.dan uzun olma,
- nötral pH'da pozitif şarj taşıma,
- amfipatiklik,
- 25 • polar ortamda çözünmesidir (hidrofobik aa. oranının  $\leq 55\%$  olması).

Tasarlanan peptit molekülüne ait kimyasal formül, izoelektrik nokta, polar ortamda çözünme (hidrofobik aa. %), moleküler ağırlık parametreleri de biyoinformatik yazılımlar kullanılarak hesaplanmıştır. İlgili parametreler hem öncül protein bölgelerinin içerdiği total peptit dizilerini hem de bu bölgelerden türevlenen küçük peptit molekülü için kıyaslanmıştır (Tablo-1a,b).

Tablo 1a.

	Kalıp olarak kullanılan amino ucu öncül peptid dizisi	Küçük peptid molekülü (Pep)
CXCL8	Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ile Ser Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys	Pep8= Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys

5 Tablo 1b.

	CXCL8	Pep8
Uzunluk aa.	30	9
Mol ağırlığı g/mol	3016.68	896.11
Net yük (pH7)	+2	+2
İzoelektrik nokta	9.9-10.02	11.6-11.49
Hidrofobik aa.	%56.67	%44.44
Suda çözünürlük	ZAYIF	İYİ

Küçük peptid molekülünün tasarımı aşamasında, öncelikle National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein veri tabanından insan CXCL8 kemokinlerine ait dizi elde edilmiştir. Biyolojik aktivite kazanmış olgun kemokinler için karakteristik CXC veya ELR motifine kadar olan protein bölgeleri seçilerek Janin hidrofobisite eğrileri [SIB 7 Bioinformatics Resource Portal (ExpASY); Lifetein peptide property calculator; Innovagen peptide property calculator yazılımları kullanılarak] oluşturulmuştur (Şekil-1, A grafiği).

a) Bu eğriler kullanılarak öncül kemokin bölgesinin (CXCL8-(1-30)) amfipatik özelliğe sahip kısımları belirlenmiştir. Bu bölgelerin izoelektrik noktaları yine aynı yazılım kullanılarak grafiği hazırlanmıştır. (Şekil-1, B grafiği).

b) Proteinlerin translasyon sonrasında organel ve hücre membranlarına transferini sağlayan sinyal dizisi ile örtüşen hidrofobik bölgeler (genellikle ilk 24-28 aa.) dışarıda tutularak en az 8 aa. uzunluğa sahip olacak şekilde farklı peptid dizileri seçilmiş ve peptitlerin, hücre yüzeyi ile iyi etkileşebilmeleri için, nötral pH'daki net yükü (Şekil-1, C grafiği) analiz edilmiştir.

Belirlenen Pep8 dizisi LifeTein (ABD) firması tarafından amino terminal asetillenmiş olacak şekilde sentezlenmiş ve HPLC (Saflık, 91.09%), kütle spektrofotometri analizleri ile peptid dizisinin saflığı ve doğruluğu teyit edilmiştir.

Liyofilize formdaki Pep8 steril dH<sub>2</sub>O ile 5 mM stok konsantrasyonuna gelecek şekilde çözülmüştür. Peptid stok çözeltileri son konsantrasyonları 500 µM, 50 µM, 5 µM, 0.5 µM ve 50 nM olacak şekilde, hücre kültür ortamı içerisinde seyreltilerek çalışma çözeltileri oluşturulmuştur. Çözülen peptitler alikotlanarak -86° C'de saklanmıştır.

Daha sonra sözkonusu küçük peptit molekülünün periferik kan mononükleer hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı belirlenmiş ve molekülün immün hücrelerin çeşitli uyarılar altında aktivasyonunu, çoğalmasını ve sitokin sentezini nasıl etkilediği araştırılmış ve Pep8'in immün düzenleyici etki gösterebilen bir küçük peptit molekülü olduğu saptanmıştır.

5 Pep8'in periferik kan mononükleer (PKM) hücrelerinin aktivasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. CXCL öncül peptit türevlerinin PKM hücrelerinin aktivasyonu üzerine olan etkileri HLA-DR, CD80, CD154, CD25, CD86 ve CD69 belirteçlerinin düzeyi akım sitometri ile analiz edilerek değerlendirilmiştir.

10 Pep8'in PKM hücrelerinin çoğalması üzerine etkilerinin akım sitometrik araştırılmış ve PKM hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkileri CFSE boyasının seyrelme düzeyine göre değerlendirilmiştir. İlgili analizler akım sitometri yöntemi ile yapılmıştır.

Pep8'in PKM hücrelerinden salgılanan sitokin düzeyleri üzerine etkileri ELISA deneyleri ile araştırılmıştır.

15 Sonuç olarak, Pep8'in PKM hücrelerinin çoğalması, aktivasyon belirteçlerinin düzeyi ve sitokin sentezi üzerine etki gösterdiği belirlenmiştir. Pep8 immün hücrelerin proliferasyon yeteneğini etkilemiştir. Sitokin üretimi de Pep8 varlığında değişim göstermiştir.

20 İmmün düzenleme etkisi: Lipopolisakkarit (LPS) uyarımı altında mononükleer lökositlerin aktivasyon düzeyini (CD86 artışı; HLA-DR, CD154, CD25 CD69, CD80 düzeyini değiştirmez) belirteçler açısından düşük düzeyde artış yönünde etkiler. Pro-inflamatuvar IFN- $\gamma$  sitokin sentezini azaltır; IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  düzeylerini değiştirmez.

CD3/CD28 uyarımı altında mononükleer lökositlerin aktivasyon düzeyini (CD86 artışı; HLA-DR, CD154, CD25 CD69, CD80 düzeyini değiştirmez) belirteçler açısından düşük düzeyde artış yönünde etkiler. T lenfositlerin çoğalmasını etkilemez.

25 CD3/allojenik mononükleer hücre THP-1 uyarımı altında mononükleer lökositlerin aktivasyon düzeyini etkilemez. T lenfositlerin çoğalmasını artırır. Pro-inflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  düzeyini artırır; anti-inflamatuvar sitokinler TGF- $\beta$  ve IL-10 düzeylerini artırır; IL-4 düzeyini değiştirmez.

30 Bu peptit dizisinin floresan (FITC) ile işaretlenmesi sonucunda özellikle monosit, NK ve B lenfositler hücreleri ile etkileştiği görülmüştür. T lenfositler ile etkileşiminin yüksek düzeyde olmadığı belirlenmiştir.

## Sonuçlar

Pep8'in immün yanıtları farklı açılardan ve farklı hassasiyette etkileme kapasitesi vardır. Elde edilen molekülün; bağışıklık sistemi biyolojisi çalışmaları, tüm inflamatuvar hastalıkların teşhis ve tedavisi ve immün sistem veya immün sistem ile etkileşen diğer doku ve hücreleri hedefleyebilmek için kullanımları sözkonusu olabilir.

Sonuçta elde edilen bu peptit türevinin immün yanıtları farklı açılardan ve farklı hassasiyette etkileyebileceği anlaşılmaktadır. Bağışıklık sistemi biyolojisi açısından ele alındığı zaman, ilgili küçük molekülün inflamatuvar yanıtlar sırasında açığa çıkma olasılığı bulunmaktadır. Bu peptitlerin inflamatuvar bölgelerden izolasyonu veya tespiti yapılmamasına rağmen elde edilen bulgular CXCL kemokinlerin proteolitik olarak işlenmesi sırasında açığa çıkan küçük peptit molekülünün immün yanıtları etkileme kapasitesinin bulunabileceğine işaret etmektedir.

Diğer taraftan küçük peptit molekülünün terapötik uygulamalar için elverişli olduğu bilinmektedir. Mevcut buluş ile sentezlenen peptitin immün yanıtları değiştirici etkilerinin olabileceği gösterildiğinden immünolojik veya immün sistemin dahil olduğu veya inflamatuvar hastalıklarda veya olaylarda bulunan peptit molekülünün sağlık bilimleri ve biyoloji alanlarının çeşitli uygulamalarında terapötik kullanım olanağı olabilecektir.

Başvuruda belirtilen CXCL8 kemokin öncül dizisinden veya bu bölgeye komşu amino asit bölgelerinden türevlenen küçük peptit molekülünün immün hücreleri özgül olarak işaretleme kapasitesinden yararlanması mümkündür. Bu sayede özellikle miyeloid kökenli ve monositik hücrelerin belirlenmesi ilgili peptit molekülünün kullanımı ile söz konusu olabilecektir.

İmmün sistem ile ilişkili hastalıkların teşhis ve tedavisinde veya immün sistem hücrelerinin hedeflenmesinde ve/veya işaretlenmesinde kullanılacak bir ilacın veya ajanın hazırlanmasında Pep8 molekülünün kullanımı mümkündür. Bu amaçla Pep8 molekülü doğrudan kullanılabilmesi gibi çeşitli biyolojik ve kimyasal modifikasyonlarının eldesi suretiyle de kullanılabilir.

Belirtilen amino asit sekansına sahip Pep8 molekülü aşağıdaki terapötik amaçlar için bir ilacın veya ajanın hazırlanmasında kullanılabilir.

- İmmün sistem hücreleri ile etkileşerek immün sistem hücrelerinin yanıtlarını etkileme için
- İmmün sistem ile ilişkili hastalıkların teşhis ve tedavisinde
- İmmün sistem hücrelerinin hedeflenmesinde
- İmmün sistem hücrelerinin işaretlenmesinde

### Şekillerin açıklaması:

**Şekil-1.** Pep8 peptidinin tasarım aşamasında çizilen hidrofobisite (A) ve izoelektrik nokta (B ve C) grafikleri

- 5 A) CXCL8 kemokinlerin total öncül peptit dizilerine ait Janin hidrofobisite eğrisi. Küçük peptit tasarım algoritmasına en uygun olduğu belirlenen bölgeler kutu içinde işaretlenmiştir. Seçilen küçük peptite ait amino asit dizisi kutunun altında belirtilmiştir.
- B) CXCL8'e ait total öncül peptit dizilerinin (1. pozisyondaki metiyonin aa.'dan CXC veya ELR motifine kadar olan bölge) izoelektrik nokta grafiği verilmiştir. Kutu içerisinde pH 7'de izlenen net şarj değeri gösterilmiştir.
- 10 C) CXCL8'e ait küçük peptit dizilerinin izoelektrik nokta grafiği verilmiştir. Kutu içerisinde pH 7'de izlenen net şarj değeri gösterilmiştir.

<110>	ESENDAGLI, GUNES
<120>	AN IMMUNOMODULATOR PEPTIDE DERIVED FROM CXCL8 AMINO TERMINAL PRECURSOR SEQUENCE
<160>	13

<210>	1
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	A peptide molecule derived from CXCL8 chemokine amino terminal precursor sequence
<400>	3 Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys 1 5

