P0402041

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

Csökkentett immunogenitású, módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF)

Kivonat

A találmány tárgyát olyan polipeptidek képezik, amelyek – elsősorban terápiás célból - speciálisan embereknek adagolhatók. A találmány szerinti polipeptidek módosított polipeptidek, mely módosítás eredményeként a polipeptid - embereknek történő adagolása esetén - kevésbé hajlamos immunreakció kiváltására. Közelebbről, a találmány tárgyát humán granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) módosított változatai képezik, mely G-CSF-protein-változatok *in vivo* alkalmazáskor lényegében nem immunogének vagy kevésbé immunogének, mint a megfelelő, módosítás nélküli alakjuk. Szintén a találmány tárgyát képezik a nem módosított proteinből származó T-sejt-epitóp peptidek, valamint azok alkalmazása csökkent immunogenitású, módosított G-CSF-változatok előállítására. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti módosított G-CSF-molekulákat kódoló DNS-ek, a találmány szerinti módosított G-CSF-molekulákat tartalmazó gyógyászati készítmények, valamint eljárások a módosított G-CSF-molekulák előállítására.

P0402041

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Csökkentett immunogenitású, módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF)

A találmány tárgyát olyan polipeptidek képezik, amelyek – elsősorban terápiás célból - speciálisan embereknek adagolhatók. A találmány szerinti polipeptidek módosított polipeptidek, mely módosítás eredményeként a polipeptid - embereknek történő adagolása esetén - kevésbé hajlamos immunreakció kiváltására. Közelebbről, a találmány tárgyát humán granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) módosított változatai képezik, mely G-CSF-proteinváltozatok *in vivo* alkalmazáskor lényegében nem immunogének vagy kevésbé immunogének, mint a megfelelő, módosítás nélküli alakjuk. Szintén a találmány tárgyát képezik a nem módosított proteinből származó T-sejt-epitóp peptidek, valamint azok alkalmazása csökkent immunogenitású, módosított G-CSF-változatok előállítására. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti módosított G-CSF-molekulákat kódoló DNS-ek, a találmány szerinti módosított G-CSF-molekulákat tartalmazó gyógyászati készítmények, valamint eljárások a módosított G-CSF-molekulák előállítására.

A terápiás hatású proteinek hatékonyságát számos esetben korlátozzák az ilyen proteinekre irányuló, nem kívánatos immunreakciók. A különböző humán betegségek gyógykezelésére több egéreredetű monoklonális antitest is ígéretesnek bizonyult, azonban ezek, bizonyos esetekben, jelentős mértékű humán anti-egér antitest (HAMA-) reakció indukálása miatt használhatatlannak bizonyultak [ld. Schoff és mtsai.: Cancer Res. 45, 879 (1985); Shawler és mtsai.: J. Immunol. 135, 1530 (1985)]. A monoklonális antitesteket illetően, számos technikát fejlesztettek ki a HAMA-reakció csökkentésére (ld. a WO 89/09622 és WO 91/06667 számú nemzetközi közzétételi iratokat, illetve az EP 0239400 és EP 0438310 számú európai szabadalmi leírásokat). Ezek a rekombináns DNS-technológián alapuló eljárások a végeredményként kapott antitest-konstrukcióban általában az egéreredetű genetikai információ mennyiségét csökkentették, miközben a humán genetikai információ mennyiségét növelték, azonban az így létrehozott „humanizált" antitestek, jó néhány esetben, továbbra is immunreakciókat váltottak ki a páciensekben [ld. Issacs: Sem. Immunol. 2, 449 (1990); Rebello és mtsai.: Transplantation 68, 1417 (1999)].

Mindazonáltal, a terápiás hatóanyagként alkalmazott polipeptidek közül nem kizárólag antitestek ellen indulhat be immunreakció; a kezelt személyekben még a humán eredetű, illetve az emberekben előfordulóval azonos aminosav-szekvenciát tartalmazó proteinek is indu-

kálhatnak immunreakciókat. Példaként említhető, többek között, a granulocita-makrofág kolonizációt stimuláló faktor [Wadhwa és mtsai.: Clin. Cancer Res. 5, 1353 (1999)] és az interferon-α-2 [Russo és mtsai.: Bri. J. Haem. 94, 300 (1996); Stein és mtsai.: New. Engl. J. Med. 318, 1409 (1988)] terápiás célú alkalmazása.

Az immunreakciók indukálásának alapvető tényezője egy olyan protein vagy peptid jelenléte, amely a T-sejtek aktivitását MHC II. osztályú molekulákon, ún. „T-sejt-epitópokon" prezentálva serkenti. A potenciális T-sejt-epitópok olyan aminosav-szekvenciaként definiálhatók, amelyek képesek az MHC II. osztályú molekulákhoz kötődni. Az ilyen T-sejt-epitópok az MHC-kötődés kialakítására mérhetők, következésképpen, egy „T-sejt-epitóp" olyan epitóp, amelyet - ha MHC-molekulákhoz kötődik – egy T-sejt-receptor (TCR) képes felismerni, és amely, legalábbis elméletileg, egy T-sejt-receptor lekötése révén e T-sejtek aktiválását okozza, ami T-sejt-reakciót indukál. Mindazonáltal, általánosan elfogadott, hogy bizonyos peptidek, amelyek MHC II. osztályú molekulákhoz kötődnek, az adagolásra szánt protein aminosav-szekvenciájában megtarthatók, mivel az ilyen peptideket az organizmus (amelybe a protein-végterméket bejuttatjuk) immunrendszere „sajátként" ismeri fel.

Ismeretes, hogy az ilyen T-sejt-epitóp peptidek közül néhány a peptidek, polipeptidek vagy proteinek sejten belüli lebomlásakor felszabadulhat, és a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulákon prezentálásra kerülhet, ami a T-sejtek aktiválását eredményezi. Az MHC II. osztályú molekulák által prezentált peptidek esetében a T-sejtek aktiválása, például - a B-sejtek antitest-termelésre történő közvetlen stimulálása révén -, antitest-reakciót idézhet elő.

Az MHC II. osztályú molekulák rendkívül polimorf proteinek csoportját alkotják, amelyek központi szerepet töltenek be a „*helper*" T-sejt-szelekcióban és –aktiválásban. E proteinek fő izotípusát a humán leukocita-antigének DR-csoportja (HLA-DR) képezi, amely a találmány szerinti megoldás szempontjából központi jelentőségű. Mindazonáltal, a HLA-DQ- és HLA-DP-csoport hasonló funkciók betöltésére képes, így a találmány szerinti megoldás ezekre is azonos mértékben alkalmazható. Az MHC II. DR-molekulák egy alfa-láncból és egy béta-láncból állnak, amelyek C-terminálisuknál a sejtmembránba vannak beillesztve. Mindegyik hetero-dimer tartalmaz egy ligandumkötő domént, amely 9-20 aminosavas peptidekhez kötődik (bár a kötőbarázda maximum 11 aminosav befogadására képes). A ligandumkötő domén az alfa-lánc 1-85. aminosavaiból, illetve a béta-lánc 1-84. aminosavaiból áll. Újabban kimutatták, hogy a DQ-molekulák homológ szerkezetűek, és várhatóan a DP-családba tartozó proteinek is nagyon hasonlóak. Emberekben a DR-izotípus hozzávetőleg 70, a DQ-izotípus 30, míg a DP-izotópus 47 különböző allotípusa ismert. Minden egyén 2-4 DR-allélt, két DQ-allélt és két DP-

allélt hordoz. Számos DR-molekula szerkezetét megfejtették, és ezekből a struktúrákból olyan nyitott végződésű peptidkötő barázdák létezésére lehet következtetni, amelyek magukban foglalják a peptid hidrofób aminosavait (kötőzseb-aminosavakat) [ld. Brown és mtsai.: Nature 364, 33 (1993); Stern és mtsai.: Nature 368, 215 (1994)]. A II. osztályú molekula különböző allotípusait meghatározó polimorfizmusok a peptidkötő barázdán belüli peptidkötő felületek nagy változékonyságát teszik lehetővé, ami populációs szinten az idegen proteinek felismerési képessége és a patogén organizmusok elleni immunreakciók vonatkozásában maximális rugalmasságot biztosít. A ligandumkötő domén jelentős mértékű polimorfizmusai figyelhetők meg, amelyek a különböző földrajzi populációkban és etnikai csoportokban jól elkülöníthető „molekulacsaládok" kialakulását eredményezi. Az ilyen polimorfizmusok hatással vannak a peptidkötő domén kötési tulajdonságaira, ezáltal a DR-molekulák eltérő „családjai" különböző szekvencia-tulajdonságú peptidekre irányuló specifitással bírnak (bár lehetnek bizonyos átfedések). Ez a specifitás határozza meg a Th-sejt-epitópok felismerését (II. osztályú T-sejtes reakció), melyek, végső soron, azon β-sejt-epitópok elleni antitest-reakció beindításáért felelősek, amelyek ugyanazon proteinen helyezkednek el, amelyből a Th-sejt-epitóp származik. Ilyenformán, egy adott személyben egy protein elleni immunreakciót jelentős mértékben befolyásolja a T-sejt-epitóp felismerése, ami az adott személy HLA-DR-allotípusának peptidkötő-specifitásának függvénye. Ennek megfelelően, egy proteinen vagy peptiden belüli T-sejt-epitópok azonosítása érdekében (egy teljes populáció vonatkozásában) a HLA-DR-allotípusok lehető legváltozatosabb halmaza kötőspecifitásának figyelembe vételére van szükség, lefedve ezáltal a világpopuláció lehető legnagyobb hányadát.

A terápiás hatású proteinek (például, a találmány szerinti protein) elleni immunreakció az MHC II. osztályú peptid-prezentálási reakcióút közvetítésével zajlik le, melynek során az exogén proteinek megkötése és a prezentáláshoz történő feldolgozása a DR-, DQ- vagy DP-típusba tartozó MHC II. osztályú molekulák közreműködésével zajlik le. Az MHC II. osztályú molekulákat a professzionális antigénprezentáló sejtek (APC-k), mint például, többek között, a makrofágok és a dendritikus sejtek expresszálják. A T-sejt felületén egy MHC II. osztályú peptidkomplex rokon származású T-sejt-receptor általi megkötése – bizonyos egyéb receptorokkal (pl. CD4-molekulával) bekövetkező keresztkötéssel együtt – a T-sejt aktivált állapotát indukálja. Ez az aktiválás citokinfelszabadulást eredményez, amely más limfocitákat (pl. B-sejteket) antitestek termelésére indukál, illetve aktiválja az ölő T-sejteket, miáltal teljes celluláris immunreakció alakul ki.

Egy peptid azon képessége, hogy - antigénprezentáló sejt felületén bekövetkező prezentálását lehetővé téve - adott MHC II. osztályú molekulához kötődjön, számos tényezőtől függ, melyek közül legfontosabb a peptid elsődleges aminosav-szekvenciája, ami egyaránt befolyásolja a proteolitikus hasításra vonatkozó hajlamát, illetve az MHC II. osztályú molekula peptidkötő barázdájában bekövetkező kötődésre vonatkozó affinitását. Az antigénprezentáló sejt felületén kialakuló MHC II. osztályú molekula/peptid-komplex egy adott – a peptid, illetve az MHC II. osztályú molekula szabad aminosavai által reprezentált determinánsok felismerésére képes - T-sejt-receptor (TCR) számára kötőfelületet biztosít.

A MHC II. osztályú molekulák megkötésére képes szintetikus peptidek azonosítására több eljárást is feltártak (ld. pl. a WO 98/52976 és WO 00/34317 számú nemzetközi közzétételi iratot). Az ilyen peptidek – különösen *in vivo*, az érési („*processing*") reakcióutak és egyéb jelenségek miatt - nem minden esetben funkcionálhatnak T-sejt-epitópként. Az epitóp eliminálásának első lépése a T-sejt-epitóp azonosítása. Korábban leírták a potenciális T-sejt-epitópok azonosítását és proteinekről történő eltávolítását, továbbá eljárásokat tártak fel T-sejt-epitópok detektálására, melyek során kísérletileg meghatározott T-sejt-epitópokban a felismert szekvencia-motívumok átvizsgálására számítógépes programokat alkalmaztak, vagy más módon, a számítógépes technikákat a MHC II. osztályú molekulákhoz kötődő peptidek – konkrétan a DR-kötő peptidek – megjóslására alkalmazták.

A WO 98/52976 és WO 00/34317 számú nemzetközi közzétételi iratban számítógépes tesztelési eljárásokat tártak fel MHC II. osztályú DR-allotípusok részhalmazához kötődni képes polipeptid-szekvenciák azonosítására. Ezen eljárásokban a megjósolt T-sejt-epitópokat a terápiás hatású antitest vagy a humán vagy nem humán eredetű, nem antitest protein elsődleges aminosav-szekvenciáján belüli, jól megválasztott aminosav-szubsztitúciókkal távolítják el.

A rekombináns MHC-molekulák szintetikus peptidekkel alkotott oldékony - és emberekből vagy kísérleti állatokból származó perifériás vérmintákból származó T-sejt-klónokhoz kötődni képes - komplexeit felhasználó egyéb technikákat is leírtak [ld. Kern és mtsai.: Nature Medicine 4, 975 (1998); Kwok és mtsai.: Trends in Immunology 22, 583 (2001)], melyek epitóp-azonosításra is alkalmazhatók.

A fentieknek megfelelően, előnyös lenne a terápiás szempontból értékes, de eredetileg immunogén hatású peptid, polipeptid vagy protein T-sejt-epitópjainak azonosítása és eltávolítása (vagy mennyiségük legalább részleges csökkentése).

A G-CSF egy fontos vérképzési citokin, amelyet jelenleg olyan esetek kezelésére alkalmaznak, ahol a vér neutrofil granulocitái mennyiségének növekedése jótékony hatású. Pél-

daként említhető a rákterápia, a különböző fertőző betegségek és az azokkal járó állapotok (pl. szepszis) kezelése. A G-CSF önmagában vagy más vegyületekkel és citokinekkel együtt a vérképző sejtek *ex vivo* szaporítására is alkalmazható (csontvelő-transzplantáció céljára).

A humán G-CSF két alakja ismeretes: az egyik 177 aminosavas, a másik 174 aminosavas protein [Nagata és mtsai.: EMBO J. 5, 575 (1986)], mely utóbbiról megállapították, hogy nagyobb specifikus *in vivo* biológiai aktivitású. A rekombináns DNS-technikák – eukarióta és prokarióta gazdasejt expressziós rendszerek alkalmazásával – a G-CSF kereskedelmi méretekben történő előállítását tették lehetővé.

A humán granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) aminosav-szekvenciája (egybetűs kóddal) a következő:

TPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPW
APLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI
WQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQ
P

A G-CSF egyéb polipeptid-analógjait és peptidfragmenseit is leírták, ideértve a helyspecifikus aminosav-szubsztitúciókkal vagy kémiai adduktumokkal módosított alakokat. A 4 810 643 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban olyan analógokat tártak fel, amelyekben bizonyos ciszteinek más aminosavval vannak helyettesítve, illetve feltártak egy G-CSF-változatot, amely az első – N-terminális – pozícióban alanint tartalmaz. Az EP 0 335 423 számú európai szabadalmi leírásban G-CSF-aktivitású polipeptid legalább egy aminocsoportjának módosítását írták le. Az EP 0 272 703 számú európai szabadalmi leírásban olyan G-CSF-származékokat tártak fel, amelyek az N-terminális közelében hordoznak aminosav-szubsztitúciót vagy –deléciót. Az EP 0 459 630 számú európai szabadalmi leírásban olyan G-CSF-származékokat tártak fel, amelyek 17. ciszteinje és 27. aszparaginsava szerinnel van helyettesítve. Az EP 0 243 153 számú európai szabadalmi leírásban – a rekombináns termeltetés hozamának növelése céljából legalább egy élesztőeredetű KEX2-proteázos „processing"-hely inaktiválásával - módosított G-CSF-et tártak fel. A 4 904 584 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban lizin-módosított proteineket, a WO 90/12874 számú nemzetközi közzétételi iratban pedig cisztein-módosított változatokat tártak fel. Az AU-A-10948/92 számú ausztrál szabadalmi leírásban olyan G-CSF-változatot tártak fel, amelyben a molekula tetszőleges végéhez - prokarióta sejtekben végzett expresszáltatása utáni összehajtogatódásának („*folding*") elősegítése érdekében - aminosavakat kapcsoltak. Az AU-76380/91 számú szabadalmi leírásban olyan G-CSF-változatokat írtak le, amelyek a 174 aminosavas G-CSF-alak 50-56. pozíci-

óiban, illetve a 177 aminosavas alak 53-59. pozícióiban hordoznak módosításokat. Meghatározott hisztidineknél végrehajtott további módosításokat is leírtak.

A fenti megoldások a G-CSF kereskedelmi léptékű termelésének javítását célozzák (például, a molekula *in vitro* stabilitásának növelését). Mindazonáltal, a fenti leírásokban nem ismerték fel sem a T-sejt-epitópoknak a protein immunogén tulajdonságaira vonatkozó jelentőségét, sem az ilyen tulajdonságok specifikus és kontrollált módon (találmányunk szerinti rendszerben végrehajtható) módosításának lehetőségét.

Mindazonáltal, továbbra is szükség van a granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) javított tulajdonságú analógjaira. Az ilyen javítások közé tartoznak a szóban forgó, terápiás hatású protein expresszáltatásának és tisztításának alternatív módjai, továbbá a protein biológiai tulajdonságainak javításai. Különösen nagy szükség van a protein – embereknek történő adagolást követően megnyilvánuló - *in vivo* tulajdonságainak javítására. E vonatkozásban rendkívül előnyös lenne olyan granulocita-kolonizációt stimuláló faktort (G-CSF) létrehozni, amely embereknek adagolva kevésbé (vagy egyáltalán nem) képes immunreakciót indukálni.

A találmány értelmében granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) módosított alakjait tárjuk fel, amelyek immunológiai jellemzői a potenciális T-sejt-epitópok eltávolításával vagy számuk csökkentésével vannak javítva. A humán G-CSF olyan módosított alakjait tárjuk fel, amelyekből egy vagy több T-sejt-epitóp el van távolítva.

Ezen túlmenően, a granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) elsődleges aminosav-szekvenciájában azonosított szekvenciákat tárunk fel, amelyek – MHC II. osztályú molekulákhoz történő kötődési képességük révén - potenciális T-sejt-epitópként funkcionálnak. A találmány tárgyához tartozik a humán granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) mindkét ismert változata, vagyis mind a 177, mind pedig a 174 aminosav hosszúságú változat.

A találmány szerinti megoldás bármely granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) molekulára alkalmazható, amelynek elsődleges aminosav-szekvenciája lényegében azonos az általunk feltárt szekvenciákkal; ennek megfelelően, az ilyen molekulák közé tartoznak a génsebészeti módszerekkel vagy más eljárásokkal létrehozott granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) molekulák, melyek nem feltételenül 177 vagy 174 aminosavat tartalmaznak.

Az G-CSF-proteinek – mint például a egerekből, szarvasmarhákból, kutyákból és egyéb emlősfajokból azonosított G-CSF-proteinek - számos, a találmány szerinti peptidszekvenciákkal azonos peptidszekvenciát tartalmaznak, és számos olyan peptidszekvenciát

tartalmaznak, amelyek az általunk feltártakkal lényegében azonos szekvenciájúak. Ennek megfelelően, az ilyen proteinszekvenciák szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak.

Feltárjuk továbbá a találmány szerinti molekula elsődleges szekvenciájának azon specifikus pozícióit, amelyek specifikus aminosav-szubsztitúcióval, -addícióval vagy -delécióval módosíthatók, anélkül, hogy a protein biológiai aktivitásának alapvető változását okoznánk. Olyan esetekben, ha a molekula immunogenitása csak biológiai aktivitásának egyidejű csökkentésével mérsékelhető, az aktivitást a protein aminosav-szekvenciájának további módosításaival állíthatjuk helyre.

Ezen túlmenően, eljárásokat tárunk fel a találmány szerinti módosított molekulák előállítására, mindenekelőtt azon T-sejt-epitópok azonosítására szolgáló eljárásokat, amelyeket az immunogén helyek eltávolítása vagy számuk csökkentése érdekében módosítani kell.

A találmány szerinti protein emberekben várhatóan fokozott keringési idejű, s alkalmazása különösen előnyös lehet a krónikus vagy kiújuló betegségek esetén, melyek az granulocita-kolonizációt stimuláló faktort (G-CSF) érintő indikációk esetében gyakoriak. A találmány értelmében az granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF-) proteinek olyan módosított alakjait tárjuk fel, amelyek várhatóan javított *in vivo* tulajdonságúak. A találmány szerinti módosított G-CSF-molekulák gyógyászati készítmények összetevőiként alkalmazhatók.

A találmány megvalósítási módjai a következők:

- módosított molekula, amely granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) biológiai aktivitásának kifejtésére képes, és *in vivo* alkalmazás során lényegében nem immunogén tulajdonságú vagy kevésbé immunogén, mint az ugyanolyan biológiai aktivitású, nem módosított molekula;
- az előző pont szerinti molekula, amelynek immunogenitása az eredeti, nem módosított molekula egy vagy több potenciális T-sejt-epitópjának eltávolításával van mérsékelve;
- a fentiek szerinti molekula, amelynek immunogenitása az e molekulából származó peptidekhez kötődni képes MHC-allotípusok számának csökkentésével van mérsékelve;
- a fentiek szerinti molekula, amelyből egy T-sejt-epitóp van eltávolítva;
- a fentiek szerinti molekula, amelyben az eredetileg előforduló T-sejt-epitópok MHC II. osztályú ligandumok vagy peptidszekvenciák, amelyek a T-sejteket II. osztályú molekulákon prezentálva serkentik vagy kötődnek hozzájuk;
- a fentiek szerinti molekula, amelyben a peptidszekvenciák az 1. táblázatban felsorolt szekvenciák közül valók;

- a fentiek szerinti molekula, amelyben az eredeti T-sejt-epitópok 1-9 aminosava, előnyösen egy aminosava van módosítva;
- a fentiek szerinti molekula, amelyben a módosítás(ok) az eredetileg jelenlévő aminosav(ak) meghatározott pozíció(k)ban más aminosavval (aminosavakkal) történő szubsztitúciójával vagy addíciójával vagy deléciójával van(nak) végrehajtva;
- a fentiek szerinti molekula, amelyben egy vagy több aminosav-szubsztitúció a 2. táblázatban bemutatott szubsztitúciók egyike;
- a fentiek szerinti molekula, amelyben egy vagy több (további) aminosav-szubsztitúció a 3. táblázatban bemutatott szubsztitúciók egyike, amely a molekulából származó peptidek megkötésére képes MHC-allotípusok számát csökkenti;
- a fentiek szerinti molekula, amely, biológiai aktivitásának helyreállítása érdekében, szükség szerint, további specifikus aminosava(ka)t érintő szubsztitúcióval, addícióval vagy delécióval van módosítva;
- DNS-szekvencia vagy –molekula, amely a fentebb meghatározott molekulák bármelyikét kódolja;
- gyógyászati készítmény, amely granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) biológiai aktivitásának kifejtésére képes - fentebb és/vagy az igénypontokban meghatározott - módosított molekulát és, adott esetben, gyógyászati szempontból elfogadható hordozót, diluendumot vagy segédanyagot tartalmaz;
- eljárás a fentiek szerint meghatározott, granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) biológiai aktivitásának kifejtésére képes, módosított molekula előállítására, mely eljárás a következő lépésekből áll: (i) meghatározzuk a polipeptid vagy részlete aminosav-szekvenciáját; (ii) a protein aminosav-szekvenciájában (tetszőleges eljárással, ideértve a peptidek MHC-molekulákhoz történő kötődésének *in vivo* vagy *in silico* technikákkal vagy biológiai tesztekkel történő meghatározását) egy vagy több potenciális T-sejt-epitópot azonosítunk; (iii) új szekvencia-változatokat tervezünk, amelyek az azonosított, potenciális T-sejt-epitópokon belül egy vagy több olyan aminosav-módosítást hordoznak, melyek a T-sejt-epitóp aktivitásának jelentős mértékű csökkentését vagy megszüntetését eredményezik (amit a peptidek MHC-molekulákhoz történő kötődésének *in vivo* vagy *in silico* technikákkal vagy biológiai tesztekkel végzett meghatározásával állapítunk meg); (iv) rekombináns DNS-technikák alkalmazásával előállítjuk a megtervezett szekvencia-változatokat, és azokat egy vagy több - kívánt tulajdonságokkal bíró – változat azonosítása céljából teszteljük; és (v) adott esetben megismételjük az (ii)-(iv) lépéseket;

- az előző pont szerinti eljárás, melynek során az (iii) lépést az eredeti molekula T-sejt-epitópjai bármelyikének 1-9 aminosavát érintő szubsztitúcióval, addícióval vagy delécióval hajtjuk végre;
- a fentiek szerinti eljárás, melynek során a módosítást egy homológ protein szekvenciája és/vagy *in silico* modellező technikák alapján hajtjuk végre;
- a fentiek szerinti eljárás, melynek során az (ii) lépést a következők szerint végezzük: (a) kiválasztjuk a peptid ismert aminosav-szekvenciájú régióját; (b) a kiválasztott régióból egymást követően - előre meghatározott, egyforma méretű, a kiválasztott régió legalább három aminosavát tartalmazó - átfedő aminosav-szekvencia-szegmenseket választunk ki; (c) mindegyik kiválasztott szegmensre kiszámítjuk az MHC II. osztályú molekulákhoz történő kötődésre vonatkozó pontszámot, oly módon, hogy a kiválasztott szegmensben lévő hidofób aminosavakhoz hozzárendelt pontszámokat összeadjuk; és (d) az MHC II. osztályú molekulákhoz történő kötődésre kiszámított pontszám alapján kiválasztunk legalább egy olyan szegmenst, amely alkalmas a peptid bruttó MHC II. kötési pontszámát megváltoztató módosítására, anélkül, hogy a peptid terápiás alkalmazhatóságát jelentős mértékben csökkentené; azzal, hogy a (c) lépést előnyösen a Böhm-féle pontszám-előállító függvény (amelyet 12-6 van der Waals-féle ligandum-protein taszítási energia tag és ligandum konformációs energia tag beiktatásával módosítottunk) alkalmazásával hajtjuk végre, a következők szerint: (1) létrehozunk egy első adatbázist, amely MHC II. osztályú molekulamodelleket tartalmaz; (2) létrehozunk egy második adatbázist, amely az MHC II. osztályú molekulamodellekre megengedett peptidvázakat tartalmaz; (3) az első adatbázisból kiválasztunk egy modellt; (4) a második adatbázisból kiválasztunk egy megengedett peptidvázat; (5) azonosítjuk az egyes kiválasztott aminosav-szekvencia-szegmensekben jelenlévő aminosav-oldalláncokat; (6) az egyes kiválasztott szegmensekben lévő összes oldalláncra kötési affinitási értéket határozunk meg; és az (1)-(5) lépéseket minden egyes modellre és peptidvázra megismételjük;
- 13mer T-sejt-epitóp peptid, amely potenciálisan MHC II. osztályú molekulát megkötő aktivitással bír, és amely immunogenitási szempontból nem módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktorból (G-CSF) van kialakítva, mely peptid az 1. táblázatban bemutatott aminosav-szekvenciák egyikét tartalmazza, valamint e peptid alkalmazása granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) előállítására, amely *in vivo* felhasználás esetén lényegében nem immunogén vagy kisebb immunogenitású, mint egy tetszőleges, azonos biológiai aktivitású, nem módosított molekula;

- peptidszekvencia, amely egy előző pont szerinti 13mer T-sejt-epitóp peptid legalább kilenc egymást követő aminosavából áll, valamint e peptidszekvencia alkalmazása granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) előállítására, amely *in vivo* felhasználás esetén lényegében nem immunogén vagy kisebb immunogenitású, mint egy tetszőleges, azonos biológiai aktivitású, nem módosított molekula.

Ahogy a találmány leírásában használjuk, a „T-sejt-epitóp" kifejezésen olyan aminosav-szekvenciát értünk, amely képes az MHC II. osztályú molekulákhoz kötődni, képes a T-sejtek indukálására és/vagy MHC II. osztályú molekulával komplexet alkotva képes a T-sejtekhez kötődni (anélkül, hogy mérhető aktiválását idézné elő). Ahogy a leírásban és az igénypontokban használjuk, a „peptid" kifejezésen két vagy több aminosavat tartalmazó vegyületet értünk, amelyben az aminosavak peptidkötéssel vannak egymáshoz kapcsolva (a peptidkötés meghatározását ld. később). A peptidek biológiai produkciójában 20 különböző, természetben előforduló aminosav játszik szerepet, melyek tetszőleges mennyisége tetszőleges sorrendben peptidlánccá vagy peptidgyűrűvé kapcsolódhat. A peptidek biológiai produkciójában felhasznált, természetes aminosavak mindegyike L-konfigurációjú. Szokványos szintézises eljárások alkalmazásával szintetikus peptidek is előállíthatók – ilyen esetben L-aminosavak, D-aminosavak és a két konfigurációjú aminosavak különböző kombinációi alkalmazhatók. Bizonyos peptidek csak néhány aminosavat tartalmaznak. Az ilyen rövid (pl. tíznél kevesebb aminosavat tartalmazó) peptideket „oligopeptideknek" nevezzük. Más peptidek nagyobb számú (pl. 100 vagy még több) aminosavat tartalmaznak, s ezeket „polipeptideknek" nevezzük. Általában a „polipeptid" három vagy több aminosavat tartalmazó peptidlánc, míg az „oligopeptid" a „rövid polipeptid" speciális típusának tekinthető. Ilyenformán, ahogy itt használjuk, a „polipeptid" kifejezés jelentése kiterjed az oligopeptidekre is, míg a „peptid" kifejezés a polipeptideket, oligopeptideket és proteineket egyaránt magában foglalja. Az aminosavak minden egyes eltérő elrendeződése különböző polipeptideket vagy proteineket hoz létre. A létrehozható polipeptidek – s ezáltal a proteinek – száma gyakorlatilag végtelen.

Az „alfa-szénatom" (αC) kifejezés a polipeptidek peptidlánca szénhidrogén (CH) komponensének szénatomjára vonatkozik. Az „oldallánc" az alfa-szénatomhoz kapcsolódó csoport, amely egyszerű vagy összetett csoport vagy gyök lehet, melynek fizikai kiterjedése a peptid méreteihez képes jelentős eltérést mutathat.

A találmány szerinti megoldás bármely granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) molekulára alkalmazható, amelynek elsődleges aminosav-szekvenciája lényegében azonos az általunk feltárt szekvenciákkal; ennek megfelelően, az ilyen molekulák közé tartoznak a

génsebészeti módszerekkel vagy más eljárásokkal létrehozott granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) molekulák, melyek nem feltételenül 177 vagy 174 aminosavat tartalmaznak.

A granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF-) proteinek - mint például az egyéb emlős forrásokból azonosított G-CSF-proteinek - számos, a találmány szerinti peptidszekvenciákkal azonos peptidszekvenciát tartalmaznak, és számos olyan peptidszekvenciát tartalmaznak, amelyek az általunk feltártakkal lényegében azonos szekvenciájúak. Ennek megfelelően, az ilyen proteinszekvenciák szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak.

A találmány kidolgozása során célul tűztük ki, hogy megakadályozzuk annak gyakorlati lehetőségét, hogy az autológ organizmusokba bejuttatott oldékony proteinek olyan immunreakciót váltsanak ki, amely a gazdaszervezetben - oldható proteinek megkötésére képes – antitestek kialakulását eredményezi. Az egyik ilyen példa, többek között, az interferon-α-2, amely ellen az emberek egy részében antitestek termelődnek, annak ellenére, hogy ez a protein endogén módon termelődik [Russo és mtsai. (1996), ld. fentebb Stein és mtsai. (1988), ld. fentebb]. Valószínű, hogy ugyanez a helyzet a granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) terápiás célú alkalmazásával. A találmány szerinti megoldás értelmében ezt olyan G-CSF-proteinek létrehozásával kívánjuk megoldani, amelyek embereknek történő adagolást követően kevésbé hajlamosak immunreakciót kiváltani.

A módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) létrehozásának találmány szerinti általános eljárása a következő lépésekből áll:

(a) meghatározzuk a polipeptid vagy részlete aminosav-szekvenciáját;

(b) a protein aminosav-szekvenciájában (tetszőleges eljárással, ideértve a peptidek MHC-molekulákhoz történő kötődésének *in vivo* vagy *in silico* technikákkal vagy biológiai tesztekkel történő meghatározását) egy vagy több potenciális T-sejt-epitópot azonosítunk;

(c) új szekvencia-változatokat tervezünk, amelyek az azonosított, potenciális T-sejt-epitópokon belül egy vagy több olyan aminosav-módosítást hordoznak, melyek a T-sejt-epitóp aktivitásának jelentős mértékű csökkentését vagy megszüntetését eredményezik (amit a peptidek MHC-molekulákhoz történő kötődésének *in vivo* vagy *in silico* technikákkal vagy biológiai tesztekkel végzett meghatározásával állapítunk meg). Az ilyen szekvencia-változatokat oly módon állítjuk elő, hogy a szekvencia módosítása következtében ne alakuljanak ki újabb potenciális T-sejt-epitópok, hacsak azok, végső soron, nem úgy vannak módosítva, hogy jelentős mértékben csökkenjen vagy megszűnjön a T-sejt-epitóp aktivitása; és

(d) rekombináns DNS-technikák alkalmazásával előállítjuk a megtervezett szekvenciaváltozatokat, és azokat egy vagy több - kívánt tulajdonságokkal bíró – változat azonosítása céljából jól ismert rekombináns technikákkal teszteljük.

A (b) lépésben a potenciális T-sejt-epitópok azonosítását korábban feltárt eljárásokkal végezhetjük. Az erre a célra alkalmas eljárások (melyek leírását illetően ld. a WO 98/59244, WO 98/52976 és WO 00/34317 számú nemzetközi közzétételi iratokat) előnyösen az granulocita-kolonizációt stimuláló faktor- (G-CSF-) eredetű peptidek MHC II. osztályú molekulákhoz történő kötődésére vonatkozó hajlamának azonosítására alkalmazhatók.

A T-sejt-epitópok azonosításának egy másik nagyon hatékony módszere a Példában leírt számítás, amely a találmány előnyös megvalósítási módját reprezentálja.

A gyakorlatban számos módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) proteint állítottunk elő és teszteltünk a kívánt immunológiai és funkcionális tulajdonságokra. A proteinváltozatokat legelőnyösebben rekombináns DNS-technikák alkalmazásával állítottuk elő, de egyéb eljárások is alkalmazhatók (mint például a granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) fragmenseinek kémiai szintézissel történő előállítása).

A fenti általános eljárás (b) lépésében végzett – és a humán granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) 174 és 177 aminosavas alakjának szekvenciájára vonatkozó - analízis eredményét az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

A humán granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) - humán MHC II. osztályú molekulákhoz potenciálisan kötődni képes – peptidszekvenciái

TPLGPASSLPQSF,	SSLPQSFLLKCLE,	QSFLLKCLEQVRK,	SFLLKCLEQVRKI,
FLLKCLEQVRKIQ,	KCLEQVRKIQGDG,	EQVRKIQGDGAAL,	RKIQGDGAALQEK,
AALQEKLVSECAT,	EKLVSECATYKLC,	KLVSECATYKLCH,	AALQEKLCATYKL,
EKLCATYKLCHPE,	ATYKLCHPEELVL,	YKLCHPEELVLLG,	EELVLLGHSLGIP,
ELVLLGHSLGIPW,	HSLGIPWAPLSSC,	IPWAPLSSCPSQA,	APLSSCPSQALQL,
QALQLAGCLSQLH,	GCLSQLHSGLFLY,	SQLHSGLFLYQGL,	SGLFLYQGLLQAL,
GLFLYQGLLQALE,	LFLYQGLLQALEG,	FLYQGLLQALEGI,	QGLLQALEGISPE,
GLLQALEGISPEL,	QALEGISPELGPT,	EGISPELGPTLDT,	PTLDTLQLDVADF,
DTLQLDVADFATT,	LQLDVADFATTIW,	LDVADFATTIWQQ,	TTIWQQMEELGMA,
TIWQQMEELGMAP,	QQMEELGMAPALQ,	EELGMAPALQPTQ,	LGMAPALQPTQGA,
PALQPTQGAMPAF,	GAMPAFASAFQRR,	PAFASAFQRRAGG,	SAFQRRAGGVLVA,
GGVLVASHLQSFL,	GVLVASHLQSFLE,	VLVASHLQSFLEV,	SHLQSFLEVSYRV,
QSFLEVSYRVLRH,	SFLEVSYRVLRHL,	LEVSYRVLRHLAQ	

A táblázatban szereplő peptidek 13merek (az aminosavakat egybetűs kóddal adtuk meg); a felsorolt peptidszekvenciák között olyanok is előfordulnak, amelyek a G-CSF 177 és 174 aminosavas alakjában egyaránt megtalálhatók.

A találmány szerinti módosított molekula - fentebb leírt általános eljárás (c) és (d) lépése szerint végrehajtott - tervezésének, illetve előállításának eredményeit a 2. és 3. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

A humán granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) potenciális T-sejt-epitópjainak megszüntetését eredményező szubsztitúciók (VTA = vad típusú aminosav)

Residue #	WT Residue	Substitution												
3	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
9	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
14	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
15	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
18	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
21	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
24	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
31	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
35	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
39	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
41	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
47	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
48	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
49	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
50	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
54	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
56	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
58	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
61	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
69	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
71	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
75	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
78	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
82	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
83	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
84	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
85	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
88	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
89	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
92	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
95	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
99	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
103	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
106	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
108	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
110	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
113	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
117	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
118	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
121	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
124	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
130	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
137	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
140	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
144	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
151	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
152	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
153	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
157	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
160	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
161	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
163	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T

3. táblázat

Egy vagy több MHC-allotípushoz megfelelő potenciális T-sejt-epitóp eltávolítását eredményező további szubsztitúciók (VTA = vad típusú aminosav)

Residue #	WT Residue	Substitution												
6	A	H	P	O	R	S	T							
8	L	H	L											
14	L	F	I	M	V	W	Y							
16	K	A	C	F	G	I	L	M	P	V	W	Y		
17	C	D	E	H	K	N	P	O	R	S	T			
18	L	F	I	M	V	W	Y							
19	E	A	C	G	L	M	V	W	Y					
21	V	M	W	Y										
22	R	H	P	O	S	T								
24	I	W	Y											
29	A	D	E	G	H	K	N	P	O	R	T			
30	A	H	K	P	O	R	S	T						
31	L	F	I	M	V	W	Y							
32	O	A	C	G	I	L	M	P	V	W	Y			
33	E	A	C	G	H	P								
34	K	H	P	T	W									
35	L	I	M	W	Y									
39	Y	M	W											
40	K	A	C	F	G	I	L	M	P	V	W	Y		
41	L	M	W	Y										
42	C	H	P	T										
43	H	A	G	P										
45	E	P	T											
47	L	F	I	M	V	W	Y							
48	V	M	W	Y										
49	L	F	I	W										
50	L	F	M											
51	G	P	T	W										
53	S	P	Y											
54	L	F	I	M	V	W	Y							
61	L	F	I	M	W	Y								
62	S	A	C	F	G	I	L	M	P	V	W	Y		
63	S	A	C	G	P									
64	C	D	E	H	I	K	N	P	O	R	S	T	W	Y
66	S	D	H	P										
67	O	P	T											
69	L	W												
71	L	F	I	M	V	W	Y							
74	L	H	P											
75	L	F	I	M	V	W	Y							
76	S	A	C	G	P									
77	O	A	C	F	G	L	P	M	P	V	W	Y		
79	H	A	C	G	P	W	Y							
80	S	F	H	P	W	Y								
81	G	E	H	P	O	R	S	T						
82	L	F	I	M	V	W	Y							
86	O	A	C	G	P									
87	O	F	I	L	P	W								
90	O	F	I	P	T	W	Y							
92	L	W	Y											
98	E	P	T											
99	L	I	M	V	W	Y								
100	G	H	P	T										
103	L	M	W	Y										
106	L	F	I											
108	L	F	I	M	V	W								
110	V	M	W											
112	D	A	C	G	P									
113	F	M	W											
117	I	M	W											

Residue #	WT Residue	Substitution													
119	Q	A	C	F	G	I	L	M	P	V	W	Y			
120	Q	I	P	T											
122	E	P													
123	E	H	P												
124	L	F	I	M	W	Y									
127	A	P													
129	A	D	E	H	N	P	Q	R	S	T	W				
130	L	F	I	M	V	W	Y								
131	Q	A	C	G	P										
134	Q	A	C	G	P										
135	G	D	H	N	P	Q	R	S	T						
136	A	P													
142	S	A	C	P											
149	G	D	H	P											
150	G	P													
151	V	I	M	W	Y										
152	L	I	M	V	W	Y									
153	V	F	M	W	Y										
154	A	P													
155	S	P													
156	H	P													
159	S	F	H	I	P	T	V	W	Y						
161	L	F	I	M	V	W	Y								
162	E	A	C	G	P										
163	V	F	I	M	W	Y									
164	S	A	C	G	M	P	T								
166	R	F	P	T	Y										
167	V	P													
168	L	F	H	I	K	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
169	R	P	T												
170	H	A	C	F	G	I	L	M	P	V	W	Y			
171	I	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q
171ctd		R	S	T	V	W	Y								

A találmány értelmében a granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) olyan analógjait tárjuk fel, amelyekben meghatározott pozíciókban legalább egy aminosavat érintő szubsztitúciók vannak végrehajtva, amelyek a protein egy vagy több potenciális T-sejt-epitópja megszűnését vagy aktivitásának jelentős mértékű csökkenését eredményezik. A potenciális MHC II. osztályú ligandumok bármelyikében az 1. táblázatban megadott pozíciókban végrehajtott egy vagy több aminosav-szubsztitúció a granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) olyan változatát eredményezi, amely embereknek gyógyszerként adagolva csökkentett immunogén hatású. Az aminosav-szubsztitúciókat előnyösen a peptidszekvencia megfelelő pozícióiban hajtjuk végre, amelyekről megjósoltuk, hogy a T-sejt-epitóp aktivitásának jelentős mértékű csökkentését vagy megszüntetését eredményezik. A gyakorlatban ez a megfelelő pozíció előnyösen olyan aminosavval tekinthető azonosnak, amely az MHC II. osztályú kötőbarázdán belüli hidrofób kötőzsebek egyikében helyezkedik el.

A kötőbarázda első kötőzsebén bekövetkező kötődést legelőnyösebben a peptid ún. P1-pozíciójában vagy P1-horgonyzópozíciójában módosíthatjuk. Felismertük, hogy a peptid

P1-horgonyzópozíciójában lévő aminosav és az MHC II. osztályú kötőbarázda első kötőzsebe közötti kötési kölcsönhatás minősége a teljes peptidre vonatkozó bruttó kötési affinitás fő meghatározója. A peptid e pozíciójában végrehajtott megfelelő szubsztitúció olyan aminosav behelyettesítését eredményezi, amely kevésbé fér el a kötőzsebben (például, egy nagyobb hidrofilitású aminosav behelyettesítése). A peptid azon pozícióiban lévő aminosavak, amelyek az MHC II. osztályú kötőbarázda más kötőzseb-régióin belüli kötődésnek felelnek meg, szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak.

Az epitópok eltávolításának legelőnyösebb módját az adott potenciális T-sejt-epitópon belüli egyszeres aminosav-szubsztitúciók reprezentálják. Egy epitópon belül több szubsztitúció is végrehajtható, ami olyan esetekben lehet különösen előnyös, ha a külön-külön meghatározott epitópok egymással átfedőek. Ezen túlmenően, egy adott epitópon belüli egyszeres vagy egy epitópon belüli kombinált aminosav-szubsztitúciók olyan pozíciókban is végrehajthatók, amelyek az MHC II. osztályú kötőbarázda vonatkozásában nem felelnek meg a „kötőzseb-aminosavaknak", hanem a peptidszekvencián belül bármely pozícióban. A szubsztitúciók – szakember számára jól ismert *in silico* technikák alkalmazásával létrehozott - homológ struktúra vagy strukturális módszer alapján, a találmány szerinti molekula strukturális jellemzői ismeretében hajthatók végre. Valamennyi ilyen szubsztitúció a találmány igényelt oltalmi körébe tartozik.

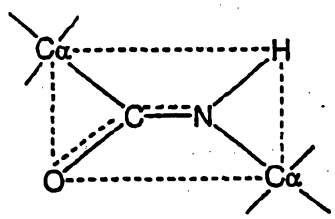
A fentebb azonosított peptideken kívül is végrehajthatók szubsztitúciók, különösen olyan esetekben, ha azok a felsorolt peptideken belüli szubsztitúcióval vagy szubsztitúciókkal vannak kombinálva. Például, ilyen szubsztitúciót a módosított molekula szerkezetének vagy biológiai aktivitásának helyreállítása céljából alkalmazhatunk. Az ilyen kompenzáló módosítások, valamint az granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF-) polipeptid adott aminosavait érintő deléciót vagy addíciót magában foglaló változtatások, amelyek kívánt aktivitású változatot eredményeznek, és a feltárt peptidek bármelyikében végrehajtott változtatásokkal kombinálva, a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak.

Minthogy a találmány tárgyát módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) képezi, a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak az ilyen módosított G-CSF-proteineket vagy azok fragmenseit tartalmazó készítmények is. A találmány egy következő szempontjának megfelelően módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktort (G-CSF) kódoló nukleinsavakat tárunk fel. A találmány egy másik megvalósítási módja értelmében eljárásokat tárunk fel emberek módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF-) proteinek alkalmazásával végzett gyógykezelésére.

Példa

A proteinek vagy polipeptidek teljes szerkezetének meghatározásában több faktor is fontos szerepet játszik. Először is, a peptidkötés (amely a peptidláncban az aminosavakat egymáshoz kapcsolja) kovalens kötés. Ez a kötés planáris szerkezetű; lényegében egy szubsztituált amid. Az „amid" –CONH- atomcsoportot tartalmazó szerves vegyület.

A szomszédos aminosavak alfa-szénatomjait egymáshoz kapcsoló, planáris peptidkötés az alábbiak szerint ábrázolható



Mivel az O=C és a C-N atomok viszonylag merev síkban helyezkednek el, e tengelyek körül szabad rotáció nem lehetséges. Ennek megfelelően, a szaggatott vonallal jelölt síkot, amelyben a peptidváz oxigénatomja, szénatomja, nitrogénatomja és hidrogénatomja fekszik, „amidsíknak" vagy „peptidsíknak" is nevezik. Az amidsík egymással szemben fekvő sarkaiban helyezkednek el az alfa-szénatomok. Mivel a peptid- vagy amidsíkban elhelyezkedő O=C és C-N atompárok tengelyei körül lényegében nincs rotáció, a polipeptid-lánc az alfa-szénatomokat összekötő planáris peptidkötések sorozatából áll.

A polipeptidek vagy proteinek teljes szerkezetének vagy konformációjának meghatározásában fontos szerepet játszó második faktor az egyes amidsíkok közös αC-kötés körüli elfordulásának szöge. Az „elfordulási szög" vagy „torziós szög" kifejezéseket egymás szinonimáinak tekintjük. Ha feltételezzük, hogy az oxigén-, szén-, nitrogén- és hidrogénatomok az amidsíkban maradnak (ami rendszerint valós feltételezés, bár bizonyos konformációkban ezen atomok némileg kiterhetnek a síkból), ezek az elfordulási szögek határozzák meg az N és R polipeptidváz-konformációt, azaz a szomszédos aminosavak közötti struktúrát. Ez a két szög a ϕ és ψ. Ilyenformán, a ϕ_1, ψ_1 szögek sorozata (ahol az „i" index a polipeptid-lánc i-edik aminosavát reprezentálja) megfelelően definiálja a polipeptid másodlagos szerkezetét. A ϕ és ψ szögek meghatározására alkalmazott konvenciók, vagyis azon vonatkoztatási pontok, amelyeknél az amidsíkok 0°-os szöget alkotnak, és annak definíciója, hogy egy adott polipeptidben melyik

szög a ϕ és melyik a ψ, szakirodalmi forrásokban találhatók [ld. pl. Ramachandran és mtsai.: Adv. Prot. Chem. 23, 283 (1968), amely cikk 285-294. oldalait a kitanítás részének kell tekinteni]. A találmány szerinti eljárás bármely proteinre alkalmazható, és, részben, azon a felismerésen alapul, hogy emberekben az MHC II. osztályú molekula kötőbarázdájának elsődleges 1. zseb horgonypozíciója meghatározott aminosav-oldalláncokra vonatkozó specifitással bír. E zseb specifitását az MHC II. osztályú molekula béta-lánca 86. pozíciójában lévő aminosav határozza meg. Ez a pozíció a 1. zseb alján található, és meghatározza az e zsebben elférő oldallánc méretét [Marshall: J. Immunol. 152, 4946 (1994)]. Ha ez az aminosav glicin, úgy a zsebben valamennyi hidrofób alifás és aromás oldalláncú aminosav elhelyezhető (hidrofób alifás oldalláncú a valin, leucin, izoleucin és metionin; aromás oldalláncú a fenilalanin, tirozin és triptofán), de előnyösebbek az aromás oldalláncúak. Ha a zseb alján lévő aminosav valin, annak oldallánca benyúlik a zsebbe, és korlátozza a zsebben elhelyezhető aminosav-oldallánc méretét, ezáltal a zsebben csak hidrofób alifás oldalláncok helyezhetők el. Ennek megfelelően, egy aminosav-szekvenciában akár hidrofób alifás, akár aromás oldalláncú aminosav található, megvan a lehetősége egy MHC II. osztályú korlátozott T-sejt-epitóp jelenlétének. Mindazonáltal, ha az oldallánc hidrofób alifás, hozzávetőleg kétszer nagyobb a T-sejt-epitóp jelenlétének valószínűsége, mint egy aromás oldallánc esetén (az egész populációra az „1. zseb" típusok körülbelül egyenletes eloszlását feltételezve).

A találmány szerinti számítógépes eljárással a következők szerint határozható meg annak valószínűsége, hogy egy adott peptidrégió T-sejt-epitópot tartalmazzon:
(1) Átvizsgáljuk egy előre mghatározott hosszúságú peptidszegmens elsődleges szekvenciáját, és azonosítjuk valamennyi jelenlévő hidrofób alifás és aromás oldalláncot. (2) A hidrofób alifás oldalláncokhoz nagyobb értéket rendelünk, mint az aromás oldalláncokhoz (előnyösen az aromás oldalláncokhoz rendelt érték körülbelül kétszeresét; például, egy hidrofób alifás oldallánchoz 2-est, míg egy aromás oldallánchoz 1-est). (3) A peptiden belül minden egyes -előre meghatározott, egyforma hosszúságú - átfedő peptidszegmensere (ablakra) összegezzük a kapott értékeket, és az adott szegmensre (ablakra) meghatározott összértéket a szegmens (ablak) egy közbülső pozíciójában - előnyösen a vizsgált szegmens (ablak) kb. közepén – elhelyezkedő egyetlen aminosavhoz rendeljük. Ezt mindegyik vizsgált átfedő peptidszegmensre (ablakra) megismételjük, így a peptid minden egyes aminosavához hozzárendelünk egy értéket, amely annak valószínűségét tükrözi, hogy az adott szegmensben (ablakban) T-sejt-epitóp helyezkedik el. (4) A 3. lépésben leírtak szerint kiszámított és hozzárendelt értékeket a vizsgált teljes aminosav-szekvencia aminosav-koordinátáinak függvényében ábrázolhatjuk. (5) A szekvencia va-

lamennyi olyan részletét, amely egy előre meghatározott (pl. 1-es) pontértékkel bír, potenciálisan T-sejt-epitópot tartalmazónak tekintünk, és ez a részlet, kívánt esetben, módosítható. A találmány e megvalósítási módja egy olyan általános eljárás, amellyel leírhatók a potenciálisan T-sejt-epitópot tartalmazó peptidrégiók. A peptidek e régiókban végzett módosításai lehetőséget nyújtanak az MHC II. osztályú molekulák kötődésére vonatkozó tulajdonságok módosítására.

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében a T-sejt-epitópok egy kifinomultabb – a peptidek MHC II. osztályú allélok modelljeivel bekövetkező kölcsönahatásait figyelembe vevő - számítógépes eljárás alkalmazásával nagyobb pontossággal jósolhatók meg. Egy peptiden belül elhelyezkedő T-sejt-epitópok számítógépes meghatározásának e speciális megvalósítási módja szerinti az összes ismert MHC II. osztályú molekula szerkezete alapján elkészítjük legalább 42 MHC II. osztályú allél modelljét és e modelleket T-sejt-epitópok számítógépes azonosítására alkalmazzuk; a peptidváz relatív alfa-szénatom (Cα) pozícióinak ismert variabilitásának figyelembe vétele érdekében a egyes modellekhez elkészítjük a peptidvázak könyvtárait; az egyes peptidvázakra elkészítjük az aminosav-oldallánc-konformációk könyvtárait, melyeket összekapcsolunk a - peptid és az MHC II. osztályú molekula közötti interakció szempontjából kulcsfontosságú - pozíciókra lehetséges 20 aminosav-alternatíva mindegyikének modelljével; és a peptidvázak és az oldallánc-konformációk e könyvtárait – pontszám-előállító függvény felhasználásával – egy bizonyos MHC II. osztályú molekulával összekapcsolt, adott peptidre optimális peptidváz- és oldallánc-konformáció kiválasztására alkalmazzuk, és a kölcsönhatás alapján kötési pontszámot származtatunk le.

Az MHC II. osztályú molekulák modelljei a Brookhaven Protein Adatbankban (PDB) található hasonló struktúrák alapján, homológia-modellezéssel származtathatók le. Az ilyen modellezések félautomata homológia-modellező szoftver [„Modeller", ld. Sali és Blundell: J. Mol. Biol. 234, 779 (1993)] alkalmazásával hajthatók végre, amely – a „CHARMm" erőtérrel együtt - magában foglal egy szimulációs illesztő (*„annealing"*) függvényt (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA). Ezen túlmenően, egyéb modellezési eljárások is alkalmazhatók.

A találmány szerinti eljárás jelentős mértékben eltér az egyéb számítógépes eljárásoktól, amelyekben az MHC II. osztályú molekulák kis részhalmazához való kötőbarázda egyes pozícióiban lévő minden egyes aminosav-alternatíva kísérletileg meghatározott kötési adatainak könyvtárát alkalmazzák [ld. Marshall és mtsai.: Biomed. Pept. proteins Nucleic Acids 1(3), 157 (1995)], továbbá azoktól a számítógépes eljárásoktól, amelyek a kötőbarázdán

belüli kötőzsebek adott típusai kötési tulajdonságainak meghatározására hasonló kísérleti kötési adatokat alkalmaznak (ismét csak az MHC II. osztályú molekulák viszonylag kis részhalmazának felhasználásával), majd e kötőzseb-könyvtárból a kötőzseb-típusokat - további virtuális MHC II. osztályú molekulák mesterséges létrehozása céljából – „összekeverik és párosítják". [ld. Sturniolo és mtsai.: Nat. Biotech. 17(6), 555 (1999)]. E két különböző eljárás fő hátránya, hogy – a vizsgálati eljárások bonyolultsága és nagyszámú peptidváltozat szintézisének szükségessége miatt – csak kevés MHC II. osztályú molekula kísérleti átvizsgálására van lehetőség. Ilyenformán, az elsőként említett korábbi módszer csak kisszámú MHC II. osztályú molekulára vonatkozó jóslásokat eredményez, míg a másodikként említett eljárásra szintén jellemző az a feltételezés, hogy egy molekulában a hasonló aminosavakkal „kibélelt" zseb egy eltérő MHC II. osztályú allél vonatkozásában hasonló kötési tulajdonságú, további hátrányként pedig az említhető, hogy csak olyan MHC II. osztályú molekulák „virtuális" létrehozására ad lehetőséget, amelyek a kötőzseb-könyvtárban lévő kötőzsebeket tartalmaznak. A találmány szerinti modellezési eljárással bármilyen számú és típusú MHC II. osztályú molekula szerkezete megjósolható, miáltal az allélok specifikusan úgy szelektálhatók, hogy a teljes populációra reprezentatívak legyenek. Ezen túlmenően, az átvizsgált MHC II. osztályú molekulák száma további modellek létrehozásával növelhető, anélkül, hogy bonyolult kísérletezéssel további adatokat kellene produkálni.

A peptidváz-könyvtár alkalmazásával figyelembe vehetők az átvizsgálás alatt álló, különböző (adott MHC II. osztályú molekulákkal összekapcsolódott) peptidek α-szénatomjai pozícióinak variációi. Ez ismét ellentétes a fentebb említett, korábbi számítógépes eljárásokkal, melyek - az adott kötőzsebekben létrejövő aminosav-kötődés átvizsgálására - egyszerűsített peptidvázak alkalmazásán alapulnak. Az ilyen egyszerűsített peptidvázak kevéssé reprezentatívak a „valódi" peptidekben megfigyelhető peptidváz-konformációkra, ami a peptidkötés megjóslásának pontatlanságát eredményezi. A találmány szerinti peptidváz-könyvtár létrehozása érdekében szuperponáljuk a Protein Adatbankban található MHC II. osztályú molekulákhoz kötődő valamennyi peptid molekulavázát, és feljegyezzük a kötőbarázdán belül elhelyezkedő 11 aminosav alfa-szénatomjai közötti négyzetes középérték- (RMS-) eltérést. Bár ez a könyvtár viszonylag kevés (jelenleg 13) rendelkezésre álló egéreredetű és humán struktúrából származtatható, a még nagyobb variabilitás figyelembe vétele érdekében minden egyes α-szénatom RMS-értékét 50 %-kal növeljük. Ezután meghatározzuk az egyes aminosavak átlagos Cα-pozícióját, és e pont körül egy gömböt rajzolunk, amelynek sugara egyenlő az adott pozícióban

meghatározott RMS-eltérés 150 %-ával. Ez a gömb reprezentálja az összes megengedett Cα-pozíciót. A legkisebb RMS-eltérést mutató α-szénatomból kiindulva (a fentebb említett 1. zsebben elhelyezkedő aminosav, amely ekvivalens a kötőbarázdában lévő 11 aminosav 2. pozíciójával) a gömböt háromdimenziós rácsozattal látjuk el, és a rácsozat valamennyi szögpontját az adott aminosav alfa-szénatomjának lehetséges pozíciójaként használjuk. A következő amidsíkot (amely a következő aminosavhoz történő kapcsolódást lehetővé tevő peptidkötésnek felel meg) átültetjük ezen lehetséges alfa-szénatomok mindegyikére, és a ϕ és ψ szögeket – a következő alfa-szénatom pozíciójának meghatározása céljából - előírt intervallumokban, lépésenként elforgatjuk. Ha a következő alfa-szénatom az ezen alfa-szénatomra megengedett pozíciók gömbjébe esik, úgy a dipeptid orientációját elfogadjuk, ellenkező esetben a dipeptidet nem fogadjuk el. Ezt az eljárást a következő Cα-pozíciók mindegyikére megismételjük (miáltal a peptid az 1. zseb alfa-szénatom „magjából" nő ki), egészen addig, míg az előző alfa-szénatomok valamennyi lehetséges permutációja alapján mind a kilenc maradék alfa-szénatom pozícióját meg nem határozzuk.

Az eljárást ezután az 1. zseb előtt elhelyezkedő alfa-szénatomra még egyszer megismételve a kötőbarázdán belül elhelyezkedő peptidváz-alkotó Cα-pozíciók könyvtárát hozzuk létre. Az így kapott peptidvázak száma több tényezőtől függ; ilyenek a „megengedett pozíciók gömbjei"; az 1. zseb pozícióban megrajzolt „első gömb" rácsozatának finomsága; és a ϕ és ψ szögek - következő alfa-szénatomok pozíciójának meghatározására alkalmazott – lépésenkénti elforgatásának finomsága. Ezzel a módszerrel nagyméretű peptidváz-könyvátrak állíthatók el. Minél nagyobb a peptidváz-könyvtár, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy egy MHC II. osztályú molekula kötőbarázdáján belül megtaláljuk egy konkrét peptid optimális illeszkedését. Minthogy valamennyi peptidváz – a kötődomének aminosavaihoz történő ütközések miatt - nem lesz alkalmas az MHC II. osztályú molekulák valamennyi modelljével történő összekapcsolásra, minden egyes allélra egy olyan könyvtár-részhalmazt hozunk létre, amely olyan peptidvázakból áll, amelyekhez az allél hozzáilleszthető. A peptidváz-könyvtár - MHC II. osztályú molekulák modelljeivel együttes – alkalmazása olyan részletes adatbázis létrejöttét eredményezi, amely – az egyes megengedett peptidvázakkal összekapcsolt – minden egyes MHC II. osztályú molekulához való kötőbarázda valamennyi pozíciójában lehetséges minden egyes aminosavra megengedett oldallánc-konformációkból áll. Ezt az adathalmazt egyszerű térbeli átfedési függvény alkalmazásával hozzuk létre, ahol is egy MHC II. osztályú molekula egy peptidvázzal van összekapcsolva, és a peptidvázra – a kívánt pozícióban – egy aminosav-

oldallánc van ráültetve. Az oldalláncok valamennyi elforgatható kötését előírt intervallumokban, lépésenként elforgatjuk, és az így kapott, adott kötéstől függő atompozíciókat feljegyezzük. Az atom és a kötőbarázdában elhelyezkedő oldalláncok atomjai közötti kölcsönhatást feljegyezzük, és a pozíciókat – a következő kritériumok alapján - elfogadjuk vagy elvetjük. Az adott pontig pozicionált valamennyi atom átfedésének összege nem haladhat meg egy előre meghatározott értéket. Ennek megfelelően, a konformációkeresés szigorúsága a kötés lépésenkénti elforgatása során alkalmazott intervallum és a teljes átfedésre előre meghatározott határérték függvénye. Ez az utóbbi érték kicsi lehet, ha tudjuk, hogy az adott kötőzseb merev, azonban a szigorúság enyhíthető, ha a kötőzseb-oldalláncok pozícióiról ismert, hogy viszonylag flexibilisek. Ilyenformán, a kötőbarázda zsebein belüli flexibilitási változékonyság imitálása érdekében engedmények vehetők figyelembe. Ezt a konformációs keresést az egyes peptidvázak valamennyi pozíciójában lévő aminosavra megismételjük (amikor azok az egyes MHC II. osztályú molekulákkal vannak összekapcsolva).

Az MHC II. osztályú molekulák modelljei és a peptidligandum-konformációk (melyeket a peptidváz/oldallánc-konformációk fentebb ismeretett, nagyméretű adatbázisának átvizsgálása révén, kísérleti úton kell leszármaztatni) közötti kötődés energiájának becslésére megfelelő matematikai kifejezést alkalmazunk. Ennek megfelelően, egy protein lehetséges T-sejtepitópok jelenlétére történő átvizsgálása céljából az összes lehetséges, 9 és 20 aminosav között változó hosszúságú peptidet (bár a peptidhosszúságot az egyes átvizsgálások során állandóként tartjuk) az alábbi számításoknak vetjük alá: Kiválasztunk egy MHC II. osztályú molekulát (az adott molekulára megengedett peptidvázzal együtt, és erre ráültetjük a kívánt peptidszekvenciának megfelelő oldalláncokat. A peptidváz egy bizonyos pozíciójában elhelyezkedő konkrét oldalláncra vonatkozó atomazonossági és atomközi távolsági adatokat az adott aminosav minden egyes (fentebb leírt adatbázisból származ) megengedett konformációjára összegyűjtjük; ezt a peptidváz mentén minden egyes oldalláncra megismételjük, és pontszámelőállító függvény alkalmazásával peptidpontszámokat származtatunk le. Az adott peptidvázra kapott legjobb pontszámot megtartjuk, és az eljárást a kiválasztott modell valamennyi megengedett peptidvázára megismételjük. A megengedett peptidvázakra kapott pontszámokat összehasonlítjuk, és a legnagyobb pontszámot tekintjük a szóban forgó MHC II. osztályú modellben a kívánt peptid peptidpontszámának. Ezt az eljárást mindegyik modell esetében – az átvizsgálás alatt álló proteinből származó - minden egyes lehetséges peptidre megismételjük, és a modellek függvényében megjelenítjük a peptidpontszámokat.

A találmány szerinti megoldás értelmében a kötési affinitási számításra prezentált minden egyes ligandum egy peptidből vagy proteinből fentebb leírtak szerint kiválasztott aminosav-szegmens. Ennek megfelelően, a ligandum egy ismert szekvenciájú peptidből, polipeptidből vagy proteinből származó, kb. 9-20 aminosav hosszúságú, kiválasztott szakasz. A ligandumot - a peptidváz-könyvtárból származó peptidvázra ráültetett, vizsgálni kívánt peptid egymás utáni aminosavai formájában – az MHC II. osztályú molekulák modellkönyvtárából származó MHC II. osztályú molekula kötőbarázdájában a peptidváz alfa-szénatomjainak koordinátái, és az egyes oldalláncokra megengedett – a megengedett konformációk adatbázisából kiválasztott – konformáció alapján helyezzük el. Ebből az adatbázisból visszakeressük a releváns atomazonosságokat és atomközi távolságokat is, és ezeket felhasználjuk a peptidkötődési pontszám kiszámítására. Az MHC II. osztályú kötőzsebhez nagy kötődési affinitást mutató ligandumokat helyspecifikus mutagenezisre kiszemelt célpontokként megjelöljük. A megjelölt (*„flagged"*) ligandumokban (s így a vizsgált proteinben) aminosav-szubsztitúciókat hajtunk végre, melyeket a pontszám-előállító függvény alkalmazásával ismételt tesztelésnek vetünk alá, hogy meghatározzuk azokat a változásokat, amelyek a kötési affinitást egy előre meghatározott küszöbérték alá csökkentik. Ezeket a változásokat azután – a T-sejt-epitópok eltávolítása érdekében - beiktathatjuk a kérdéses proteinbe. A peptidligandum és az MHC II. osztályú molekulák kötőbarázdája közötti kötődés nem kovalens kölcsönhatásokkal valósul meg, ideértve, többek között, a hidrogénkötéseket, elektrosztatikus kölcsönhatásokat, hidrofób (lipofil) kölcsönhatásokat és Van der Waals-féle kölcsönhatásokat. Ezeket az alábbiakban leírtak szerint foglalhatjuk a peptidpontszám-előállító függvénybe. A hidrogénkötést nem kovalens kötésnek kell tekinteni, amely poláros vagy töltéssel bíró csoportok között alakul ki, és két másik atom által közösen birtokolt hidrogénatomból áll.

A hidrogéndonor hidrogénatomja pozitív töltésű, míg a hidrogénakceptor részlegesen negatív töltéssel bír. A peptid/protein kölcsönhatásokat illetően a hidrogénkötés-donorok nitrogénatomok, amelyekhez hidrogénatom kapcsolódik, vagy olyan hidrogénatomok, amelyek oxigénatomhoz vagy nitrogénatomhoz kapcsolódnak. A hidrogénkötés akceptoratomja hidrogénatomhoz nem kapcsolt oxigénatom, kapcsolt hidrogénatomot nem tartalmazó nitrogénatom (egy vagy két kapcsolódással) vagy kénatom, csak egy kapcsolódással. Bizonyos atomok, mint pl. a hidrogénatomokhoz kapcsolt oxigénatomok vagy az imin-nitrogének (pl. C=NH) egyaránt lehetnek hidrogénakceptorok vagy –donorok. A hidrogénkötés energiája 3-7 Kcal/mol, vagyis sokkal erősebb, mint a Van der Waals-féle kölcsönhatás, de gyengébb, mint a kovalens kötés. Ezen túlmenően, a hidrogénkötések nagymértékben irányfüggők, és akkor a legerősebbek, ha a

donoratom, a hidrogénatom és az akceptoratom egy egyenesbe esik. Az elektrosztatikus kötések ellentétes töltésű ionok között jönnek létre, és a kölcsönhatás erőssége fordítottan arányos az atomok közötti távolság négyzetével (a Coulomb-törvénynek megfelelően). Az ionpárok közötti optimális távolság körülbelül 2,8 Å. A protein/peptid kölcsönhatásokban elektrosztatikus kötések az arginin, hisztidin vagy lizin és aszparaginsav vagy glutaminsav között alakulhatnak ki. A kötés erőssége az ionizáló csoport pKa-értékétől és a közeg dielektromos állandójától függ, bár hozzávetőlegesen hasonló erősségűek a hidrogénkötéssel. A lipofil kölcsönhatások kedvező hidrofób-hidrofób kölcsönhatások, amelyek a protein és a peptidligandum között alakulnak ki. Az ilyen kölcsönhatások rendszerint a peptid – kötőbarázda zsebeibe besüllyedt – hidrofób aminosav-oldalláncai között alakulnak ki, amelyek nem érintkeznek az oldószerrel. A hidrofób aminosavak oldószerrel történő érintkeztetése nagyon kedvezőtlen, mivel a környező oldószermolekulák egymással hidrogénkötések kialakítására vannak kényszerítve, miáltal ketrecszerű klatrát-struktúrákat alkotnak. Az ebből eredő entrópiacsökkenés igen kedvezőtlen. A lipofil atomok kénatomok (amelyek sem nem polárosak, sem nem hidrogénakceptor tulajdonságúak) vagy szénatomok lehetnek, amelyek nem polárosak. A Van der Waals-féle kölcsönhatások az egymástól 3-4 Å távolságra elhelyezkedő atomok között kialakuló, nem specifikus kötőerők – gyengébbek és kevésbé specifikusak, mint a hidrogénkötések és az elektrosztatikus kötések. Az elektronok töltéseloszlása az atomok körül időbeni változást mutat és – bármely pillanatban - nem szimmetrikus. Az elektrontöltés ezen átmeneti aszimmetriája a szomszédos atomokban hasonló aszimmetriát indukál, és az atomok között kialakuló vonzóerők a Van der Waals-féle kötőtávolságban érik el maximális értéküket, de kb 1-2 Å atomtávolságnál ugrásszerűen lecsökkennek. Ezzel szemben, minthogy az atomokat az érintkezési távolságnál kisebb távolság választja el, az atomok külső elektronfelhőinek átfedésével egyre nagyobb taszítóerők válnak dominánssá. Bár a vonzóerők az elektrosztatikus kötéshez és hidrogénkötéshez viszonyítva viszonylag gyengék (kb. 0,6 Kcal/mol), a taszítóerők különösen fontosak lehetnek annak megállapításában, hogy egy peptidligandum sikeresen kötődik-e egy proteinhez.

A találmány egyik megvalósítási módja értelmében a kötési állandó megbecslésére a Böhm-féle pontszám-előállító függvényt („SCORE1" módszer) alkalmazzuk [ld. Böhm, H.J.: J. Comput. Aided Mol. Des. 8(3), 243 (1994), melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk]. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a pontszám-előállító függvényt („SCORE2" módszer) – T-sejt-epitópot tartalmazó ligandum indikátoraként – a kötési affinitás megbecslésére alkalmazzuk [Böhm, H.J.: J. Comput. Aided Mol. Des. 12(4), 309 (1998), me-

lyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk]. Mindazonáltal, a fenti cikkekben leírt Böhm-féle pontszám-előállító függvényeket egy protein liganduma kötési affinitásának olyan esetekben történő megbecslésére alkalmazzák, amikor ismert, hogy a ligandum sikeresen kötődik a proteinhez, és a protein/ligandum komplex szerkezete megoldott, mely megoldott szerkezet megtalálhatóa Protein Adatbankban. Ilyenformán, a pontszám-előállító függvényt ismert pozitív kötési adatok alapján fejlesztették ki. A pozitív és negatív kötőmolekulák megkülönböztetése érdekében az egyenletbe egy taszítási tagot kell foglalni. Ezenfelül, a lipofil kölcsönhatások páronkénti kiszámításával a kötési energia kielégítőbb pontosságú megbecslése érhető el, mint a fenti Böhm-függvények területalapú energia-kifejezéseinek alkalmazásával. Ennek megfelelően, az egyik előnyös megvalósítási mód értelmében a kötési energiát módosított Böhm-féle pontszám-előállító függvény alkalmazásával becsüljük meg. A módosított Böhm-féle pontszám-előállító függvénnyel a protein és ligandum közötti kötési energiát ($\Delta G_{kötés}$) a következő paraméterek figyelembe vételével határozzuk meg: a ligandum összes transzlációs és rotációs entrópia-veszteségének betudható kötési energiacsökkenés (ΔG_0); hozzájárulások az ideális hidrogénkötésekből (ΔG_{hk}), ahol legalább egy partner semleges; hozzájárulások a zavartalan ionos kölcsönhatásokból (ΔG_{ionos}); lipofil ligandumatomok és lipofil akceptoratomok közötti lipofil kölcsönhatások (ΔG_{lipo}); a kötési energia vesztesége a ligandum belső szabadságfokainak befagyasztása miatt, vagyis az egyes C-C kötések körüli elfordulás szabadságának csökkenése (ΔG_{rot}); a protein és a ligandum közötti kölcsönhatás energiája (E_{VdW}). E tagok megfelelő elrendezésével az 1. egyenlethez jutunk:

$$(\Delta G_{kötés})=(\Delta G_0)+(\Delta G_{hk} x N_{hk})+(\Delta G_{ionos} x N_{ionos})+(\Delta G_{lipo} x N_{lipo})+(\Delta G_{rot} x N_{rot})+(E_{VdW})$$

amelyben „N" egy adott tagra a kvalifikáló kölcsönhatások száma; és – az egyik megvalósítási módban - ΔG_0, ΔG_{hk}, ΔG_{ionos}, ΔG_{lipo} és ΔG_{rot} állandók, melyek értéke, sorrendben, a következő: 5,4; -4,7; -4,7; -0,17; 1,4.

Az „N_{hk}" tag a 2. egyenlettel számítható ki:

$$N_{hk} = \Sigma_{h\text{-kötések}} f(\Delta R, \Delta\alpha) \times f(N_{szomsz}) \times f_{pcs}$$

ahol „$f(\Delta R, \Delta\alpha)$" egy büntetési függvény, amely számot ad a hidrogénkötések ideálistól való nagy eltéréseire, és amely a következő, 3. egyenlettel számítható ki:

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

ahol $f1(\Delta R) = 1$; ha $\Delta R \leq TOL$

vagy $= 1-(\Delta R-TOL)/0,4$; ha $\Delta R \leq 0,4+TOL$

vagy $= 0$; ha $\Delta R > 0,4+TOL$;

és $f2(\Delta R) = 1$; ha $\Delta\alpha < 30°$ TOL

vagy $= 1-(\Delta\alpha-30)/50$; ha $\Delta\alpha \leq 80°$

vagy $= 0$; ha $\Delta\alpha > 80°$

„TOL" jelentése: a hidrogénkötés hosszúságának tolerált eltérése = 0,25 Å;

„ΔR" jelentése: a H-O/N hidrogénkötés hosszúságának ideális értéktől való eltérése = 1,9 Å;

„Δα" jelentése: Az N/O-H...O/N hidrogénkötés szögének ideális 180°-tól való eltérése;

az „$f(N_{szomszéd})$" tag megkülönbözteti egy protein felületének konkáv és konvex részeit, s ezáltal nagyobb súlyt rendel a zsebekben található poláros kölcsönhatásokhoz, mint a protein felületén találhatókhoz (ezt a függvényt az alábbi, 4. egyenlet szerint számítjuk ki):

$f(N_{szomszéd}) = (N_{szomszéd}/N_{szomszéd,0})^{\alpha}$; ahol $\alpha = 0,5$;

„$N_{szomszéd}$" jelentése: a protein azon nem hidrogén atomjainak száma, amelyek a protein bármely adott atomjához 5 Å-nél közelebb helyezkednek el;

„$N_{szomszéd,0}$" egy állandó, értéke: 25;

„f_{pcs}" jelentése: olyan függvény, amely számításba veszi a poláris érintkezési felület hidrogénkötésenkénti területét, s ezáltal különbséget tesz az erős és gyenge hidrogénkötések között – értékét a következő kritériumok alapján határozzuk meg:

$f_{pcs} = \beta$, ha $A_{poláros}/N_{HK} < 10$ Å^2; vagy

$f_{pcs} = 1$, ha $A_{poláros}/N_{HK} > 10$ Å^2;

„$A_{poláros}$" jelentése: a poláros protein-ligandum érintkezési felület mérete;

„N_{HK}" jelentése: a hidrogénkötések száma;

β jelentése: állandó, amelynek értéke: 1,2.

A Böhm-féle módosított pontszám-előállító függvény teljesítése érdekében az ionos kölcsönhatásokból származó hozzájárulást a hidrogénkötésekre fentebb leírtak szerint számítjuk ki (mivel hasonló geometria-függőséget feltételezünk).

Az „N_{lipo}" tagot a következő, 5. egyenlet szerint számítjuk ki:

$N_{lipo} = \Sigma_{lL} f(r_{lL})$;

amelyben az $f(r_{lL})$ tagot az összes lipofil ligandumatomra (l) és az összes lipofil proteinatomra (L) a következő kritériumok alapján számítjuk ki:

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

$f(r_{lL}) = 0$, ha $r_{lL} \geq R2$;

ahol $R1 = r_l^{vdw} + r_L^{vdw} + 0,5$; és

$R2 = R1 + 3,0$; és

„r_l^{vdw}" jelentése: az „l" atom Van der Waals rádiusza;

„r_L^{vdw}" jelentése: az „L" atom Van der Waals rádiusza;

„N_{rot}" jelentése: az aminosav-oldallánc elforgatható kötéseinek száma, melyet a nem ciklusos sp^3-sp^3 és sp^3-sp^2 kötések számának veszünk (a terminális $-CH_3$ vagy $-NH_3$ csoportok elforgatását nem vesszük figyelembe).

A pontszám-előállító függvény utolsó tagja, az „E_{VdW}", a 6. egyenlet szerint számítható ki:

$E_{VdW} = \varepsilon_1\varepsilon_2((r_l^{vdw}+r_2^{vdw})^{12}/r^{12} - (r_l^{vdw}+r_2^{vdw})^6/r^6$;

ahol ε_1 és ε_2: az adott atomtól függő állandók;

$r_l^{vdw}+r_2^{vdw}$: Van der Waals atomrádiuszok;

r = egy atompár közötti távolság.

A 6. egyenletben, az egyik megvalósítási mód szerint, az ε_1 és ε_2 állandók a következő atomi értékek: szén (C): 0,245; nitrogén (N): 0,283; oxigén (O): 0,316; kén (S): 0,316. Az 5. és 6. egyenlet vonatkozásában, a Van der Waals atomrádiuszok a következő atomi értékek: C: 1,85; N: 1,75; O: 1,60; S: 2,00 Å.

Megjegyezzük, hogy a fenti egyenletekben megadott valamennyi előre meghatározott érték és állandó a protein-ligandum kölcsönhatások ismeretének jelenlegi állásának megfelelően van meghatározva (különös tekintettel a általunk végzett számítás típusára). Ennek megfelelően, lehetséges, hogy e pontszám-előállító függvény további finomítása során ezek az értékek és állandók változhatnak, így bármely – a protein-ligandum kölcsönhatás kötési energiájának meghatározását illetően kívánatos eredményeket adó – numerikus érték alkalmazható, s ezek alkalmazása szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartozik.

Ahogy fentebb említettük, a pontszám-előállító függvényt az oldallánc-konformációk, atomazonosságok és atomközi távolságok adatbázisából kivont adatokra alkalmazzuk. A találmány céljaira az ezen adatbázisban található MHC II. osztályú molekulák száma: 42 modell + négy megoldott struktúra. Az eddigiek alapján érthető, hogy a találmány szerinti számítógépes eljárás konstrukciójának moduláris természete azt jelenti, hogy – a fentiekben ismertetett peptidpontszám-előállító függvénnyel feldolgozható újabb adathalmazok létrehozása céljából - új modellek egyszerűen hozzáadhatók és a peptidváz-könyvtárral és oldallánc-konformációs keresőfüggvénnyel átvizsgálhatók. Ez lehetővé teszi az átvizsgált MHC II. osztályú molekulák repertoárjának egyszerű növelését, illetve szerkezetek és azokhoz kapcsolódó adatok helyettesítését (ha adatok állnak rendelkezésre a létező allélok pontosabb modelljeinek létrehozására).

A találmány szerinti prediktív eljárás nagyszámú peptidből álló adathalmazzal szemben kalibrálható, mely peptidek különböző MHC II. osztályú molekulákra vonatkozó affinitása korábban kísérleti úton meghatározásra került. A számított és a kísérletileg meghatározott adatok összehasonlításával olyan határérték állapítható meg, amely felett tudjuk, hogy valamennyi kísérletileg meghatározott T-sejt-epitóp pontosan van megjósolva.

Megjegyezzük, hogy – bár a fenti pontszám-előállító függvény a néhány hozzáférhető, kifinomult módszerhez képest viszonylag egyszerű – a számítások rendkívül gyorsan hajthatók végre. Tudni kell továbbá, hogy célunk nem a kiválasztott MHC II. osztályú protein kötőbarázdájába bekapcsolódott minden egyes peptid valós kötési energiájának önmagában történő meghatározása, hanem az, hogy a T-sejt-epitópok elhelyezkedésének – kiválasztott protein elsődleges szerkezete (vagyis aminosav-szekvenciája) alapján történő - megjóslásának segédeszközeként összehasonlító kötési energia adatokat nyerjünk. Egy viszonylag nagy kötési energia (vagy egy kiválasztott küszöbérték feletti kötési energia) a ligandumban a T-sejt-epitóp jelenlétére utalhat. A ligandumot ezután legalább egy aminosav-szubsztitúciónak vethetjük alá, és ismét kiszámíthatjuk a kötési energiát. A számítások gyorsaságának köszönhetően a peptid szekvenciájában végrehajtott manipulációk olcsó hardver felhasználásával, a program felhasználói interfészén belül interaktív módon hajthatók végre. Ilyenformán, a programhoz nincs szükség hardver-szintű beruházásokra.

Szakember számára kézenfekvő, hogy e célokra egyéb szoftverek is alkalmazhatók. Közelebbről, az energia-minimalizálással összefüggésben olyan, kifinomultabb szoftverek alkalmazhatók, amelyek alkalmasak a ligandumok protein kötőhelyekre történő beillesztésére. A beillesztő (*„dokkoló"*) szoftverek példái a következők: „DOCK" [Kuntz és mtsai.: J. Mol. Biol. 161, 269 (1982); „LUDI" [Böhm: J. Comput. Aided Mol. Des. 8, 623 (1994)] és „FLEXX" [Rarey és mtsai.: ISMB 3, 300 (1995)]. A molekuláris modellező és manipulációs szoftverek példáiként az „AMBER" (Tripos) és a „CHARMm" (Molecular Simulations, Inc.) említhető. E számítástechnikai eljárások alkalmazása – a megfelelő számítások elvégzéséhez szükséges adatfeldolgozási idő hosszúsága miatt - jelentős mértékben korlátozhatja a találmány szerinti eljárás teljesítményét, azonban e módszereket ésszerűen „másodlagos szűrőként" alkalmazhatjuk azon peptidek kötési energiájának még pontosabb kiszámítására, amelyeket a találmány szerinti eljárással „pozitív kötőképességűnek" találtunk. A kifinomult molekuláris mechanikai vagy molekuláris dinamikai számítások feldolgozási idejének korlátját az e számítások elvégzésére használt szoftver típusa, illetve a hardver jelenlegi technológiai korlátjai határozzák meg. A jövőt illetően az várható, hogy az ilyen számítások – hatékonyabb számítógépes

kód kifejlesztése és a számítógép-processzorok sebességének folyamatos növekedése révén - kezelhetőbb időkeretben lesznek végrehajthatók.

A makromolekulákra alkalmazott energiafüggvényeket, valamint az összehajtogatódott proteinszerkezeten belül potenciálisan bekövetkező, különféle kölcsönhatásokra vonatkozó megfontolásokat illetően ld. Brooks és mtsai.: J. Comput. Chem. 4, 187 (1983), míg az általános protein-ligandum kölcsönhatásokkal kapcsolatos további információkat illetően ld. Dauber-Osguthorpe és mtsai.: Proteins 4(1), 31 (1988), mely forrásokat teljes terjedelmükben a kitanítás részének kell tekinteni. További hasznos háttérinformációk találhatók, például, a „Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation" című kiadványban (szerk.: Fasman, Plenum Press, New York, ISBN: 0-306 4313-9).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Módosított molekula, amely granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) biológiai aktivitásának kifejtésére képes, és *in vivo* alkalmazás során lényegében nem immunogén tulajdonságú vagy kevésbé immunogén, mint egy ugyanolyan biológiai aktivitású, nem módosított molekula.

2. Az 1. igénypont szerinti molekula, amelynek immunogenitása az eredeti, nem módosított molekula egy vagy több potenciális T-sejt-epitópjának eltávolításával lett mérsékelve.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti molekula, amelynek immunogenitása az e molekulából származó peptidekhez kötődni képes MHC-allotípusok számának csökkentésével lett mérsékelve.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti molekula, amelyből egy T-sejt-epitóp lett eltávolítva.

5. A 2-4. igénypontok bármelyike szerinti molekula, amelyben az eredetileg előforduló T-sejt-epitópok MHC II. osztályú ligandumok vagy peptidszekvenciák, amelyek képesek a T-sejteket II. osztályú molekulákon prezentálva serkenteni vagy hozzájuk kötődni.

6. Az 5. igénypont szerinti molekula, amely peptidszekvenciákként az 1. táblázatban felsorolt szekvenciák közül kiválasztott szekvenciákat tartalmaz.

7. A 2-6. igénypontok bármelyike szerinti molekula, amelyben az eredeti T-sejt-epitópok bármelyikében 1-9 aminosav van módosítva.

8. A 7. igénypont szerinti molekula, amelyben az eredeti T-sejt-epitópok egy aminosava van módosítva.

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti molekula, amelyben a módosítás(ok) az eredetileg jelenlévő aminosav(ak) specifikus pozíció(k)ban más aminosavval (aminosavakkal) történő szubsztitúciójával van(nak) végrehajtva.

10. A 9. igénypont szerinti molekula, amely egy vagy több aminosav-szubsztitúcióként a 2. táblázatban bemutatott szubsztitúciók közül kiválasztott szubsztitúció(ka)t tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti molekula, amely a 3. táblázatban bemutatott szubsztitúciók közül egy vagy több további aminosav-szubsztitúciót tartalmaz, amely(ek) a molekulából származó peptidek megkötésére képes MHC-allotípusok számának csökkenését eredményezi(k).

12. A 9. igénypont szerinti molekula, amely a 3. táblázatban bemutatott szubsztitúciók közül egy vagy több további aminosav-szubsztitúciót tartalmaz.

13. A 7. vagy 8. igénypont szerinti molekula, amely aminosav-módosításként, specifikus pozíció(k)ban, az eredetileg jelenlévő aminosav(aka)t érintő deléció(ka)t hordoz.

14. A 7. vagy 8. igénypont szerinti molekula, amely aminosav-módosításként az eredetileg jelenlévő, specifikus pozíció(k)ban aminosav-addíció(ka)t hordoz.

15. A 7-14. igénypontok bármelyike szerinti molekula, amely biológiai aktivitásának helyreállítására további módosításokat tartalmaz.

16. A 15. igénypont szerinti molekula, amely további módosításként specifikus aminosav(ak)at érintő szubsztitúciót, addíciót vagy deléciót hordoz.

17. A 7-16. igénypontok bármelyike szerinti módosított molekula, amely egy homológ proteinszekvencia alapján végrehajtott aminosav-módosítást hordoz.

18. A 7-16. igénypontok bármelyike szerinti módosított molekula, amely *in silico* modellezési technikák alapján végrehajtott aminosav-módosítást hordoz.

19. DNS-szekvencia, amely 1-18. igénypontok bármelyike szerinti módosított granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF)-molekulát kódol.

20. Gyógyászati készítmény, amely granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) biológiai aktivitásának kifejtésére képes, 1-19. igénypontok bármelyike szerinti módosított molekulát és, adott esetben, gyógyászati szempontból elfogadható hordozót, diluendumot vagy segédanyagot tartalmaz.

21. Eljárás granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) biológiai aktivitásának kifejtésére képes, 1-20. igénypontok bármelyike szerinti módosított molekula előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) meghatározzuk a polipeptid vagy részlete aminosav-szekvenciáját;

(ii) a protein aminosav-szekvenciájában (tetszőleges eljárással, ideértve a peptidek MHC-molekulákhoz történő kötődésének *in vivo* vagy *in silico* technikákkal vagy biológiai tesztekkel történő meghatározását) egy vagy több potenciális T-sejt-epitópot azonosítunk;

(iii) új szekvencia-változatokat tervezünk, amelyek az azonosított, potenciális T-sejt-epitópokon belül egy vagy több olyan aminosav-módosítást hordoznak, mely(ek) a T-sejt-epitóp aktivitásának jelentős mértékű csökkentését vagy megszüntetését eredményezi(k) (amit a peptidek MHC-molekulákhoz történő kötődésének *in vivo* vagy *in silico* technikákkal vagy biológiai tesztekkel végzett meghatározásával, vagy a peptid-MHC komplexek T-sejtekhez történő kötődése alapján állapítunk meg);

(iv) rekombináns DNS-technikák alkalmazásával előállítjuk a megtervezett szekvencia-változatokat, és azokat egy vagy több - kívánt tulajdonságokkal bíró – változat azonosítása céljából teszteljük; és

(v) adott esetben, megismételjük az (ii)-(iv) lépéseket;

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (iii) lépést az eredeti molekula T-sejt-epitópjai bármelyikének 1-9 aminosavát érintő szubsztitúcióval, addícióval vagy delécióval hajtjuk végre.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a módosítást egy homológ protein szekvenciája és/vagy *in silico* modellező technikák alapján hajtjuk végre.

24. A 21-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (ii) lépést a következők szerint végezzük: (a) kiválasztjuk a peptid egy ismert aminosav-szekvenciájú régióját; (b) a kiválasztott régióból egymást követően - előre meghatározott, egyforma méretű, a kiválasztott régió legalább három aminosavát tartalmazó - átfedő aminosav-szekvencia-szegmenseket választunk ki; (c) mindegyik kiválasztott szegmens esetében MHC II. osztályú molekulákhoz történő kötődésre vonatkozó pontszámot számítunk ki, oly módon, hogy a kiválasztott szegmensben lévő hidofób aminosavakhoz hozzárendelt pontszámokat összeadjuk; és (d) az MHC II. osztályú molekulákhoz történő kötődésre kiszámított pontszám alapján kiválasztunk legalább egy olyan szegmenst, amely alkalmas a peptid bruttó MHC II. kötési pontszámát megváltoztató módosítására, anélkül, hogy a peptid terápiás alkalmazhatóságát jelentős mértékben csökkentené.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a (c) lépést előnyösen a Böhm-féle pontszám-előállító függvény (amelyet 12-6 van der Waals ligandum-protein taszítási energia tag és ligandum konformációs energia tag beiktatásával módosítottunk) alkalmazásával hajtjuk végre, a következők szerint: (1) létrehozunk egy első adatbázist, amely MHC II. osztályú molekulamodelleket tartalmaz; (2) létrehozunk egy második adatbázist, amely az MHC II. osztályú molekulamodellekre megengedett peptidvázakat tartalmaz; (3) az első adatbázisból kiválasztunk egy modellt; (4) a második adatbázisból kiválasztunk egy megengedett peptidvázat; (5) azonosítjuk az egyes kiválasztott aminosav-szekvencia-szegmensekben jelenlévő aminosav-oldalláncokat; (6) az egyes kiválasztott szegmensekben lévő összes oldalláncra kötési affinitási értéket határozunk meg; és az (1)-(5) lépéseket minden egyes modellre és peptidvázra megismételjük.

26. Potenciálisan MHC II. osztályú molekulát megkötő aktivitással bíró 13mer T-sejt-epitóp peptid, amely immunogenitási szempontból nem módosított granulocita-kolonizációt

stimuláló faktorból (G-CSF) van kialakítva, és az 1. táblázatban bemutatott aminosavszekvenciák egyikét tartalmazza.

27. Peptidszekvencia, amely egy 26. igénypont szerinti 13mer T-sejt-epitóp peptid legalább 9 egymást követő aminosavát tartalmazza.

28. A 26. igénypont szerinti 13mer T-sejt-epitóp peptid alkalmazása granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) előállítására, amely *in vivo* felhasználás esetén lényegében nem immunogén vagy kisebb immunogenitású, mint egy tetszőleges, azonos biológiai aktivitású, nem módosított molekula.

29. A 27. igénypont szerinti peptidszekvencia alkalmazása granulocita-kolonizációt stimuláló faktor (G-CSF) előállítására, amely *in vivo* felhasználás esetén lényegében nem immunogén vagy kisebb immunogenitású, mint egy tetszőleges, azonos biológiai aktivitású, nem módosított molekula.

A meghatalmazott:
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Pethő Árpád
szabadalmi ügyvivő

34 oldal
13 szekvencia
47 oldal

P0402041

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A szekvencialistában található kötetlen szövegek fordításai

1. szekvencia: <223> Az eritropoietin aminosavszekvenciája

2. szekvencia: <223> A humán eritropoietinben (EPO) található peptidszekvencia, amely potenciálisan II. osztályú humán MHC-t kötő aktivitású

3. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

4. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

5. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

6. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

7. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

8. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

9. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

10. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

11. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

12. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

13. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

14. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

15. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

16. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

17. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

18. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

19. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

20. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

21. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

22. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

23. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

24. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

25. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

26. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

27. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

28. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

29. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

30. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

31. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

32. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

33. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

34. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

35. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

36. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

37. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

38. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

39. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

40. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

41. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

42. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

43. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

44. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

45. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

46. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

47. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

48. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

49. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

50. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

51. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

52. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

53. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

54. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

55. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

56. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

57. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

58. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

59. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

60. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

61. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

62. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

63. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

64. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

65. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

66. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

67. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

68. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

69. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

70. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

71. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia

72. szekvencia: <223> lásd: 2. szekvencia