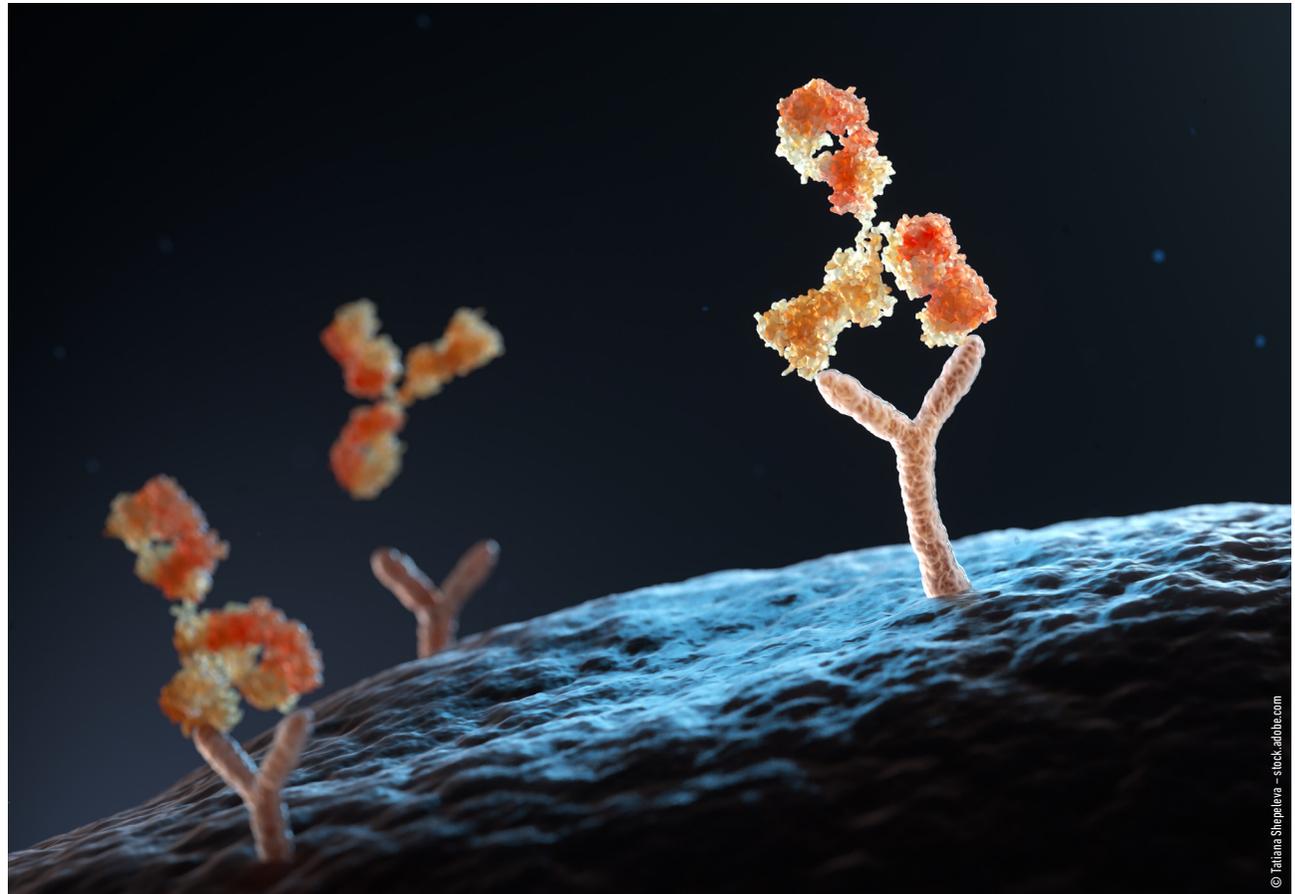


Konservative Aminosäure-substitutionen und Deep Learning bei der Definition von Antikörpern

Praxishinweise für Anmelder

Von Dr. Philip Weissshuhn und Dr.-Ing. Florian Kühbeck



Eine patentrechtlich und wissenschaftlich wichtige Frage ist, inwieweit die Seitenketten der Aminosäuren eines Antikörpers notwendig sind.



Dr. Philip Weissshuhn

KUHNEN & WACKER Patent- und Rechtsanwaltsbüro PartG mbB,
Freising
Patentanwaltskandidat, DPhil in Biochemistry, Dipl.-Biologe
philip.weissshuhn@kuhnen-wacker.de
www.kuhnen-wacker.de



Dr.-Ing. Florian Kühbeck

KUHNEN & WACKER Patent- und Rechtsanwaltsbüro PartG mbB,
Freising
Dipl.-Chem., Dipl.-Ing., Patentanwalt, European Patent
Attorney, European Trademark and Design Attorney
florian.kuehbeck@kuhnen-wacker.de
www.kuhnen-wacker.de

Einleitung

2021 führte das Europäische Patentamt (EPA) einen eigenen Abschnitt zu Antikörpern in den Prüfungsrichtlinien ein. Danach sind Antikörper durch ihre Struktur, durch ihre Funktion oder durch eine Kombination ihrer Struktur und ihrer Funktion zu definieren. Im Streit um breite Antikörperansprüche bei der strukturellen Definition hat sich das EPA dabei auf eine eher strenge Position zurückgezogen, wonach bei hochaffinen Antikörpern in der Regel keine Sequenzvarianten der CDRs und der Rahmenregionen mehr beanspruchbar sind. Allerdings führt dies in der Anwendung zu Ansprüchen mit unnötig engem Schutzzumfang. Aus unserer Sicht stehen in den Prüfungsrichtlinien des EPA dringend zwei Aspekte aus: Zum einen wäre die regelmäßig funktionelle Ähnlichkeit eines Antikörpers nach geeigneter konservativer Aminosäuresubstitution durch Gewähren entsprechender Sequenzvarianten (entsprechend) zu würdigen. Zum anderen wäre der Nachweis funktioneller Äquivalenz von Sequenzvarianten über die modernen Technologien, also der Strukturvorhersage und der Dockingvorhersage mit Deep Learning, anzuerkennen. Bei aktueller Ausnahme der CDR-H3 ließen sich so Sequenzvarianten der weiteren Complimentarity-Determining Regions (CDR) und Rahmenregionen selbst bei hochaffinen Antikörpern schützen. Da die Relevanz dieser Aspekte in den Verfahren vor dem EPA für die Zukunft absehbar ist, sollten Anmeldungen für Patente mit Antikörpern schon jetzt entsprechend verfasst werden.

Der Antikörper und seine Struktur

Die stammesgeschichtliche Hauptfunktion der unüberschaubar großen und diversen Familie der Antikörper ist es, für jedes unter den unendlich vielen Antigenen, einen besonderen Antikörper bereitzustellen, welcher spezifisch und mit hoher Affinität an dieses Antigen bindet.

Spezifität und Affinität der Antikörper-Antigen-Bindung sind abhängig von den feinen, dreidimensionalen Strukturen der Antikörper und Antigene. Die Bausteine eines Antikörpers sind die 20 Aminosäuren, welche sich durch ihre Seitenketten physikalisch und chemisch unterscheiden. Dabei gibt es unter anderem hydrophile, hydrophobe, positiv oder negativ geladene und größere und kleinere Seitenketten. Wie bunte Perlen auf einer Kette fügen sich mehrere hundert Aminosäuren zunächst linear in einer Primärstruktur aneinander. Ein typischer Antikörper weist vier solcher Ketten auf. Daraufhin faltet sich die Kette zu einer dreidimensionalen Struktur, wobei die benachbarten Bausteine auch bevorzugte Torsionswinkel zueinander eingehen. So bewirkt die Aminosäure Glycin eine gesteigerte Beweglichkeit an ihrer Stelle in der Kette, wohingegen die Aminosäure Prolin zu einer eher steiferen Struktur führt. Wichtig ist, an welcher Stelle eine Aminosäureseitenkette positioniert und wie sie aufgebaut ist. Nach außen weisende Seitenketten sind dabei oft polar, denn in oder außerhalb der Zelle befindet sich ein Antikörper im wässrigen, also polaren, Milieu. Die Seitenketten nach innen weisender Aminosäuren sind oft unpolar und benachbart zu weiteren unpolaren Seitenketten angeordnet. Seitenketten können auch Salzbrücken oder Disulfidbrücken (Cystein) bilden.

Die typischen Antikörper weisen einheitlich die bekannte Y-Struktur auf. Allerdings gibt es an den Antigen-Bindungsstellen der Antikörper sogenannte, mit Bezug auf die Aminosäuresequenz und die sich daraus ergebende Struktur, hypervariable Regionen. Konkret gibt es sechs hypervariable Regionen, die wegen der Bindung zum Antigen auch Complimentarity-Determining Regions (CDR) genannt werden. Die Hypervariabilität der sich in den sechs CDRs befindenden, insgesamt etwa 46 Aminosäuren, wobei jeweils theoretisch die 20 Aminosäuren, siehe oben, zur Auswahl stehen, bewirkt die strukturelle Vielfalt der Bindungsmöglichkeiten. Zwischen und seitlich der CDRs befinden sich die weniger variablen Rahmenregionen. Von den 46 Aminosäuren in den CDRs bindet wiederum nur ein kleiner Teil der Aminosäuren durch nicht-kovalente Bindung im Sinne von Schüssel-Schloss unmittelbar an das Antigen. Die Bindungsstelle muss aber auch zugänglich sein, so dass eine sterische Hinderung nicht unmittelbar an der Bindung beteiligter Aminosäuren einer Bindung entgegenwirkt.

Eine patentrechtlich und wissenschaftlich wichtige Frage ist, inwieweit die Seitenketten der Aminosäuren eines Antikörpers im Bereich der unmittelbaren Bindungsstelle, der sechs CDRs oder der Rahmenregionen für die Affinität und Spezifität der Bindung jeweils und im Einzelnen notwendig sind. Auch ist zu klären, ob die Art der Seitenkette der Aminosäure, mit welcher substituiert wird, Einfluss auf die Bindung nimmt. Bei diesen Fragen hat sich das EPA derzeit auf die Position zurückgezogen, dass es ohne weiteren Nachweis keine Sequenzvarianten in den sechs CDRs und den Rahmenregionen erlaubt.

Das Problem mit der prozentualen Sequenzidentität

Angenommen, ein überraschender technischer Effekt ist für eine bestimmte Aminosäuresequenz eines Antikörpers nachgewiesen worden, wie etwa mit Hilfe einer klinischen Studie oder Antikörper-Antigen-Bindungsexperimenten. Dann ist von der Existenz weiterer Sequenzvarianten dieser bestimmten Aminosäuresequenz, die diesen überraschenden technischen Effekt in äquivalenter Weise erzielen, auszugehen. Alle Sequenzvarianten, in welchen unbedeutende Aminosäuresubstitutionen vollzogen wurden, gehören zu dieser Gruppe. Aus patentrechtlichen Gründen ist es in solchen Fällen wünschenswert, alle äquivalenten Sequenzvarianten im Schutzzumfang unterzubringen.

Eine Möglichkeit, Sequenzvariationen einzuführen, besteht traditionell darin, einen Antikörper über das Merkmal der prozentualen Identität einer Aminosäuresequenz zu definieren. Zum Beispiel wurden alle Antikörper beansprucht, die mindestens 90% Sequenzidentität mit einer bestimmten Aminosäuresequenz aufweisen, was bedeutet, dass bis zu 10% der Aminosäuren innerhalb dieser Aminosäuresequenz durch eine andere Aminosäure ersetzbar sind.

In der Vergangenheit gab es hierzu viele Diskussionen und einiges an Rechtsprechung. Aus unserer Sicht gibt es bei diesem Ansatz jedenfalls ein rein technisches Problem; denn eine Substitution einer einzigen Aminosäure in der Aminosäuresequenz eines beliebigen Biomoleküls, einschließlich eines Antikörpers, wie zum Beispiel

der Austausch eines Glycins durch ein Prolin, könnte die Rückgratstruktur dieses Biomoleküls und damit seine Funktion erheblich beeinflussen. Ebenso sind die Ladungen und die Polarität der Aminosäurereste an der Bindungsstelle für die Bindung an das Antigen entscheidend. So wurde etwa berichtet, dass eine einzige Aminosäuresubstitution von Glutaminsäure zu Alanin an der Position 35 in der ersten hypervariablen CDR eines bestimmten Antikörpers die Bindung an das Antigen stört (vgl. Rudikoff et al., 1982).

„Eine patentrechtlich und wissenschaftlich wichtige Frage ist, inwieweit die Seitenketten der Aminosäuren eines Antikörpers im Bereich der unmittelbaren Bindungsstelle, der sechs CDRs oder der Rahmenregionen für die Affinität und Spezifität der Bindung jeweils und im Einzelnen notwendig sind.“

Daher ist bei der Abfassung der Patentansprüche von der Verwendung des Merkmals der prozentualen Identität regelmäßig abzuraten. Insoweit ist auch die strikte Forderung des EPA nach der exakten Aminosäuresequenz der erforderlichen CDRs und der Rahmenregionen in bestimmten Situationen nachvollziehbar.

Konservative Aminosäuresubstitution

Wer neben der experimentell erarbeiteten Aminosäuresequenz weitere, gleichwertige Sequenzvarianten beanspruchen will, muss die Prüfungsabteilung oder das Gericht davon überzeugen, das heißt es plausibel machen, dass alle Sequenzvarianten technisch umsetzbar sind und die technische Wirkung erzielen, die der Erfindung zugrunde liegt. Andernfalls erhebt die Prüfungsabteilung je nach Fallkonstellation Einwände aus Gründen der Ausführbarkeit, der Klarheit oder des erfinderischen Schritts (Art. 56, 83, 84 EPÜ).

Nicht alle Aminosäuresubstitutionen weisen die gleiche Wahrscheinlichkeit auf, eine strukturelle und funktionelle Veränderung zu bewirken. Es ist bekannt, dass sogenannte konservative Substitutionen oft keine Auswirkung auf die Funktion eines Biomoleküls haben. Konservative Substitutionen beinhalten zum Beispiel den Austausch von Lysin und Arginin, die beide eine lange, positiv geladene Seitenkette aufweisen. Ebenso gehören Substitutionen zwischen Glutaminsäure und Asparaginsäure dazu. Auch manche hydrophobe oder hydrophile Aminosäuren sind jeweils untereinander substituierbar. Eine derartige Klassifizierung muss in der Beschreibung der Patentanmeldung detailliert ausgeführt werden und sollte auch von der Funktion der jeweiligen Aminosäure im Antikörper abhängig gemacht werden. Man könnte also argumentieren, dass die Äquivalenz der Funktion von Sequenzvarianten mit solchen konservativen Substitutionen wesentlich plausibler ist als die von Sequenzvarianten mit nicht-konservativen Substitutionen. Das EPA scheint sich des Konzepts der konservativen Ami-

nosäuresubstitutionen bewusst zu sein, wie aus Kapitel F IV 4.24 der aktuellen Fassung der Richtlinien für die Prüfung hervorgeht.

Dieser Ansatz ist insbesondere auch bei einem Anspruch mit einer kurzen Aminosäuresequenz eines Antikörpers in Kombination mit einem eindeutigen Funktionsmerkmal sinnvoll. Auf diese Weise könnte eine große Anzahl von gleichwertigen Sequenzvarianten geschützt werden, ohne dass der herkömmliche Ansatz der Sequenzidentität bemüht werden muss.

Die Plausibilität über Deep Learning

Die technische Wirkung muss dabei nicht für jede Sequenzvariante einzeln experimentell nachgewiesen werden. Vielmehr muss sie für die beanspruchten Sequenzvarianten plausibel gemacht werden. Ausgehend von vorliegenden experimentellen Daten für einen Antikörper mit einer bestimmten Aminosäuresequenz ist zu fragen, wie die Plausibilität der technischen Wirkung für die beispielsweise durch konservative Aminosäuresubstitutionen oder anderweitig erhaltenen Sequenzvarianten zu erreichen ist, insbesondere mit Blick auf die unter Umständen große Zahl von Sequenzvarianten.

Die Strukturvorhersage mittels Deep Learning, chemischen Verschiebungen (NMR) und Strukturdaten für kleinere Proteine wird seit längerem praktiziert (Shen et al., 2009). Inzwischen wird auch die Affinität von Antikörpern über eine Kombination aus Phagen-Display und Strukturmodellierung verbessert (Frick et al., 2022). Ver-

lässliche Strukturvorhersagen für Antikörper sind mit Ausnahme der CDR-H3 bislang möglich (Ruffolo et al., 2021). Ebenso können Andockversuche simuliert werden (etwa RosettaDock). Ein Ansatz wäre es somit, bereits verfügbare experimentelle Daten für bestimmte Aminosäuresequenzen mit Deep Learning zu kombinieren, um weitere Sequenzvarianten ermitteln und beanspruchen zu können.

Beweise, die auf Deep Learning basieren, sind aus technischer Sicht grundsätzlich nicht weniger geeignet als experimentelle Beweise. Der Vorteil von Berechnungen oder Simulationen gegenüber Experimenten ist, dass die ersten theoretisch vom EPA selbst überprüft werden könnten.

Die Kombination aus einer experimentell in ihrer Funktion nachgewiesenen Aminosäuresequenz und einer großen Anzahl von Sequenzvarianten, deren funktionelle Plausibilität durch Deep Learning nachgewiesen wird, gegebenenfalls unter besonderer Berücksichtigung konservativer Aminosäuresubstitutionen, scheint uns der Weg zu sein, der sich in den nächsten Jahren abzeichnet.

Fazit

Anmelder sollten bereits jetzt zum einen das Konzept der konservativen Aminosäuresubstitution berücksichtigen und zum anderen die mit Computerprogrammen in ihrer äquivalenten Funktion bestätigten Sequenzvarianten in die Ansprüche aufnehmen, um einen ausreichenden Schutzzumfang ihrer Erfindungen zu erhalten. ←

Literatur

- Frick R, Høydahl LS, Hodnebrug I, Vik ES, Dalhus B, Sollid LM, Gray JJ, Sandlie I, Løset GÅ. Affinity maturation of TCR-like antibodies using phage display guided by structural modeling. *Protein Eng Des Sel.* 2022 Jul 23;gzac005. doi: 10.1093/protein/gzac005. Epub ahead of print. PMID: 35871543.
- Rudikoff S, Giusti AM, Cook WD, Scharff MD. Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Mar;79(6):1979-83. doi: 10.1073/pnas.79.6.1979. PMID: 6804947; PMCID: PMC346105.
- Ruffolo JA, Sulam J, Gray JJ. Antibody structure prediction using interpretable deep learning. *Patterns (N Y).* 2021 Dec 9;3(2):100406. doi: 10.1016/j.patter.2021.100406. PMID: 35199061; PMCID: PMC8848015.
- Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J Biomol NMR.* 2009 Aug;44(4):213-23. doi: 10.1007/s10858-009-9333-z. Epub 2009 Jun 23. PMID: 19548092; PMCID: PMC2726990.