

## Tentamen Octrooigemachtigden

Tentamen “Opstellen van een octrooiaanvraag” (deel A)

*chemie*

---

**9 oktober 2023**

**13.30 – 17.30 uur**

TENTAMENOPGAVE 'OPSTELLEN VAN EEN OCTROOIAANVRAAG' (A) CHEMIE – 2023

Geachte collega,

5 Zoals je weet begint mijn langverwachte wereldreis morgen, en zal ik anderhalf jaar onbereikbaar zijn. Voor mijn klant Vaction moet overmorgen hun volgende aanvraag nog ingediend worden. Zoals je weet houdt Vaction zich bezig met vaccins die vooral uit bovengemiddeld lange peptiden bestaan, en deze nieuwe vinding is daarop geen uitzondering. Het zal je niet verbazen dat het over een corona-vaccin lijkt te gaan. Ik voeg de  
10 data-rapporten van hun wetenschappers bij. Het zag er goed bruikbaar uit toen ik er zelf naar keek. Er zijn ook wat documenten uit de stand der techniek.

Zou je een **set conclusies** willen opstellen (niet meer dan 15 claims s.v.p.), met daarbij een **beschrijvingsinleiding en een bruikbare set experimentele resultaten als voorbeelden**  
15 **voor de uitvinding**? Mocht je trouwens samenstellingen claimen: Vaction stelt altijd prijs op een claim op een injectiespuit bevattende zo'n samenstelling. Ze willen sowieso altijd zoveel mogelijk verschillende types product-claims, waar mogelijk.

De sequens listing leveren ze morgen zelf aan, die hoef je niet te maken - maar het is wel  
20 belangrijk om gewoon dezelfde tabel te gebruiken als die ze zelf aangeleverd hebben omdat anders hun listing niet meer overeenstemt met onze tekst. Plak die tabel maar aan het einde van de beschrijvingsinleiding, voor de zekerheid. Plaatjes zijn er verder niet.

Bedankt voor je hulp,

25 Uw collega

*Herinnering: dit is een examen. De gerepresenteerde wetenschappelijke inhoud is in grote  
lijnen realistisch, maar kan op sommige punten van de werkelijkheid afwijken. Zo is er in dit  
30 examen maar 1 spike eiwit met 1 sequentie.*

## Onderzoeksprogramma “vaccin coronavirus”

### Identificatie geschikte peptiden

In onze missie om goede vaccins naar de markt te brengen hebben we dit programma opgetuigd om ook een vaccin voor coronavirus te ontwikkelen. Onze eerdere vaccins zijn  
5 altijd mengsels van peptiden geweest, waarbij de peptiden altijd een fragment van het pathogeen zijn geweest. Zulke mengsels zijn gunstig omdat de reactie van elk individu op een individueel peptide anders kan zijn. Door verschillende peptiden te combineren, wordt de kans vergroot dat een individu een goede weerstand opbouwt dankzij tenminste één van de peptiden. Door kennis van immunologie te gebruiken, proberen we te voorspellen welke  
10 peptiden een zo groot mogelijke kans hebben om een goede immuunrespons te geven. Onze peptiden zijn vaak ook effectief in de behandeling van een ziekte zelf, in aanvulling op de voorkomende (preventieve) werking van een gebruikelijk vaccin.

Voor de eerste vaccins ooit werden indertijd ‘levende’ pathogenen gebruikt, met alle risico’s van dien. Zo kon de relevante ziekte soms in milde vorm optreden als gevolg van de  
15 vaccinatie. Later werd dit verbeterd door geïnactiveerde (of ‘dode’) vaccins te gebruiken, waarin een volledige bacterie, of een volledig virus, voor toediening eerst onschadelijk werd gemaakt, bijvoorbeeld door koken of crosslinken. Dit had als voordeel dat er minder risico op bijwerkingen was, maar de immuunrespons werd ook minder sterk - de inactivatie kon de structuur van de betrokken moleculen aanpassen. Met de opkomst van moderne analytische  
20 en synthetische technieken werd het mogelijk om de betrokken moleculen, in ons geval eiwitten, te analyseren en na te maken. Zo wordt de kans op bijwerkingen vrijwel nul; wanneer van een virus alleen een eiwit wordt toegediend, en geen genetisch materiaal, dan kan het zich ook niet ziekmakend voortplanten.

Zodra de sequentie van een virus bekend is, ligt het voor de hand om de complete eiwitten  
25 te testen op immunogeniciteit. Daarnaast is het algemeen bekend dat het kostbaar en omslachtig is om met complete eiwitten te werken. Daarom wordt vaak gezocht naar peptiden met een minimale lengte, die toch nog steeds een immunogeen effect hebben. Het is echter geen gegeven dat elke uitsnede uit het grotere eiwit ook tot een immuunrespons leidt, en daarom kun je a priori niet van elk peptide verwachten dat het bescherming kan  
30 opwekken. Wat nodig is, is dat het peptide een epitoomp omvat. Ook dit is weer algemeen bekend, zoals bijna elke onderzoekstechniek in dit veld. Maar wat niet algemeen bekend is, is welke sequenties nou uiteindelijk epitopen omvatten of zijn. De sequenties zelf, daar ligt in dit veld vaak de uitvinding. Zodra een aminozuursequentie bekend is, kan een vakman routinematig de bijbehorende coderende nucleïnezuren ontwerpen. Zulke nucleïnezuren  
35 kunnen dan ook weer door elke vakman verwerkt worden in een vector.

Epitopen worden gekenmerkt door hun aminozuursequentie. Het zijn de subsequenties die door witte bloedcellen, in dit geval T-cellen, worden 'uitgeknipt' uit een groter eiwit of uit een langer peptide. Dit 'uitknippen' gebeurt door middel van proteases die over het algemeen overal in een organisme wel aanwezig zijn. Het uitgeknipte epitoom wordt gepresenteerd op het oppervlak van een cel, en de epitopen zijn hierbij gebonden aan MHC-moleculen. T-cel-epitopen die gepresenteerd worden door MHC klasse I-moleculen zijn normaal tussen de 8 en 11 aminozuren lang. MHC klasse II-moleculen presenteren langere peptiden.

Omdat ons bedrijf de focus legt op MHC klasse II-moleculen, onderzoeken wij altijd langere peptiden. Wanneer een epitoom in een MHC klasse I-molecuul wordt gepresenteerd, dan kan het resultaat zijn dat een witte bloedcel de presenterende cel zal doden. Zo wordt een pathogeen de kans ontnomen om zich voort te planten. Maar wanneer een MHC klasse II een epitoom presenteert, dan stimuleert dit de aanmaak van antilichamen tegen het epitoom, en wordt een duurzamere en bredere reactie opgebouwd. De cellen die met MHC klasse II moleculen werken, zijn antigeen-presenterende cellen (APC).

We hebben nu voor sommige epitopen ontdekt dat wanneer de bijbehorende peptide een lengte heeft van 30 tot 41 aminozuren, dat het peptide dan extra goed door APCs wordt opgenomen. Peptiden onder de 30 in lengte zijn te klein en worden als het ware genegeerd door deze professionele epitoom presenteerders. Peptiden van 42 aminozuren of langer zijn zo groot dat de protease-machinerie betrokken bij directe antigeen presentatie er niet meer op kan aangrijpen. Ook in die gevallen treedt het positieve effect niet meer op. Technisch gezien treedt het effect alleen op wanneer de lengte 30-36 is, maar bij peptiden met een lengte van 37-41 kunnen exoproteases de peptiden door knipreacties terugbrengen tot een lengte van 36 of minder. Deze exoproteases komen in bijna alle mensen voor, hoewel er wel polymorfismes (genetische variaties) zijn waardoor sommige mensen dit vermogen niet hebben.

Een screening met het APC effect in gedachten bracht ons tot peptiden die een aaneengesloten fragment van een spike eiwit van een coronavirus zijn, waarin de peptiden een lengte van 30-41 aminozuren hebben, waarin zo'n fragment omvat of bestaat uit een van SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, en 6.

Dit lijken krachtige MHC klasse II epitopen te zijn.

SEQ ID NO:	Aminozuursequentie	Lengte
1	enkilmeter ssprschiet enndermidr	30
2	wegnaarwan tikenwegva nvanchtend vreg	34
3	vertrkkeni ndelwtevan denachtent ien	33
4	mintenpdet reingewach twantdieha d	31
5	watvertrag ingmingdda araalikvan	30
6	tienminten minderiliv enkankeden gkede	35

In data-tabel 1 wordt een gestandaardiseerd overzicht getoond van het effect van deze peptiden op de virus-titer van geïnfecteerde hamsters. Een hoger effect is wenselijker. De hamsters werden gevaccineerd met een samenstelling omvattende i) een peptide, en ii) een farmaceutisch aanvaardbare hulpstof. De volgende waarden zijn relevant:

- 5
- + het effect is vergelijkbaar met het effect van het totale spike eiwit;
  - ++ het effect ligt op 150-250% van +;
  - +++ het effect ligt op 250-500% van +;
  - ++++ het effect ligt boven 500% van +.

Data-tabel 1

Epitooop SEQ ID NO:	Lengte van peptide							
	28	30	31	35	36	37	40	42
1	+	+++	+++	++++	++++	+++	++	+
2	+	+	+	++++	++++	+++	++	+
3	+	+	+	++++	++++	+++	++	+
4	+	+	+++	++++	++++	+++	++	+
5	+	+++	+++	++++	++++	+++	++	+
6	+	+	+	++++	++++	+++	++	+
Totaal spike eiwit	+	+	+	+	+	+	+	+
1*	+	+++	+++	++++	++++	+	+	+

10 \* hier werd een protease-deficiënte hamster gebruikt

15 Wanneer een SEQ ID NO uit tabel 1 niet in de genoemde lengte past (wat dus eigenlijk geen juiste weergave is), hebben we alle varianten geprobeerd waarin de sequentie aan één of beide kanten ingekort werd. Wanneer een SEQ ID NO juist korter is dan de genoemde lengte, hebben we voor het verlengen elke passende uitsnede uit het spike eiwit geprobeerd. Voor al deze variaties was de uitkomst bij een gegeven lengte steeds vergelijkbaar.

Het is van belang om te weten dat minimale peptiden zoals bekend uit het beroemde werk van M. I. Thrandir et al. steeds met een + presteerden. Dit was zelfs het geval wanneer deze minimale epitopen uitgesneden werden uit onze nieuwe SEQ ID NOs, ondanks een grondige door ons uitgevoerde screening in een poging meer te leren over onze epitopen.

- 5 Het lijkt er sterk op dat er niet getornd kan worden aan de sequentie van de door ons geïdentificeerde peptiden. Wanneer we ook maar een enkele substitutie deden waardoor het test-peptide afweek van de natuurlijke sequentie van het spike eiwit, of het nou binnen of buiten de genoemde SEQ ID NOs was, dan werd als resultaat hooguit een + bereikt. De SEQ ID NOs zelf lijken daardoor een bepaalde tot nu toe onbekende significantie te hebben.
- 10 Het is goed mogelijk dat peptiden die bestaan uit exact een van SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, of 6 nog onontdekte voordelen hebben.

- Er bestaan verschillende bekende technieken om de respons van een peptide op te krikken. Zo kan een co-administratie gedaan worden met aluminiumzout, zo kan een peptide gebruikt worden dat een kunstmatig gefluoreerde zijgroep heeft, en zo kan de toediening op een lege
- 15 maag gedaan worden. Data-tabel 2 toont de effecten aan van deze routinematige optimalisaties. De + symbolen hebben dezelfde betekenis als bij data-tabel 1.

Data-tabel 2

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Al-zout</b>	<b>F-zijgroep</b>	<b>Lege maag</b>
1, lengte 30	+++	++++	+++
1, lengte 35	++++	++++	++++
1, lengte 40	++	++++	++
3, lengte 30	+	+	+
3, lengte 35	++++	++++	++++
3, lengte 40	++	++++	++

- Uit ons onderzoek bleek dat sommige hamsters, niet geheel onverwacht, niet reageerden op
- 20 sommige van de peptiden. We hebben ook gewerkt met een samenstelling omvattende 2, 3, 4, 5, of 6 verschillende peptiden, waarin elk peptide is zoals hierboven beschreven, waarin elk peptide één van SEQ ID NOs: 1-6 omvat. De kans dat een hamster niet reageerde op zo'n mengsel zou kleiner moeten worden naarmate meer verschillende peptiden omvat zijn. Zodra alle zes de peptiden omvat waren, kwamen er inderdaad geen non-responsieve
- 25 hamsters meer voor. Zo blijkt dat de peptiden, maar ook mengsels, samenstellingen, en verdere producten (zie 'celtherapie' gedeelte) geschikt zijn voor behandeling of het voorkomen van een coronavirale infectie.

### Verwerking in ons programma voor celtherapie

Onze directie streeft na dat we al onze peptiden de markt op brengen als ‘payload’ voor celtherapie. Om celtherapie toe te kunnen passen is er behoefte aan een nucleïnezuur dat codeert voor een peptide zoals hierboven beschreven. Zo’n nucleïnezuur kan dan verder  
5 voorzien worden van de gebruikelijke elementen, zodat er een vector ontstaat die zo’n nucleïnezuur omvat. De kern van het platform, van ons programma, is uiteindelijk een dendritische cel die zo’n vector omvat. De techniek in zijn algemeenheid is jaren geleden al door ons gepatenteerd en wordt zelfs al routinematig door derden toegepast (onder licentie). Het blijkt ook niet uit te maken wat de verdere eigenschappen van de vector zijn.

10 Immunodeficiënte patiënten kunnen vaak niet goed met een infectie omgaan. Wat de zaak nog verder bemoeilijkt, is dat het belangrijke wapen van vaccinatie ook niet werkt bij zulke patiënten. De immunodeficiëntie zorgt er voor dat er geen reactie wordt opgebouwd tegen een peptide, of tegen een nucleïnezuur dat een peptide codeert. Het blijkt dat de dendritische cellen van immunodeficiënte patiënten niet naar behoren functioneren, of zelfs  
15 afwezig zijn. Normaal gesproken zijn dendritische cellen betrokken bij de eerste reactie van het lichaam op pathogenen, en spelen ze een sleutelrol in het verworven immuunsysteem.

Jaren onderzoek hebben ertoe geleid dat er een protocol is ontwikkeld waarmee dendritische cellen kunnen worden overgebracht naar een ontvanger. Zo’n cel mist dan de aansluiting op het immuunsysteem van de ontvanger, en zal dus niet veel effect kunnen  
20 bewerkstelligen. In ons programma voor celtherapie verschaffen we de dendritische cellen zoals hierboven beschreven. Doordat ze zelf een immunogeen peptide tot expressie brengen, kunnen ze op eigen kracht het epitoom presenteren. Het blijkt dat een immunodeficiënte patiënt als gevolg van zo’n presentatie alsnog een respons kan opbouwen. De resultaten hierboven tonen aan dat we in kunnen zetten op producten voor  
25 de behandeling van een immunodeficiënte patiënt.

## D1

### Synthetisch vaccin tegen het coronavirus

F. te Ling, A. Penheul, en V. Luwe

5 Om vaccins minder bijwerkingen te geven, worden vaak geïnactiveerde virussen gebruikt. Dit heeft als nadeel dat de relevante eiwitten soms van structuur veranderen. Het capside van coronavirus omvat een spike eiwit, en dit eiwit is erg belangrijk voor infectie en de immuunrespons. Wij presenteren hier een compleet spike eiwit dat volledig synthetisch vervaardigd is. Dit eiwit is 1300 aminozuren lang, en het kon succesvol gebruikt worden om  
10 een immuunrespons op te wekken in hamsters.

Om de synthese succesvol te laten verlopen, hebben we aan de hars eerst kleinere onderdelen vervaardigd van ongeveer 45 aminozuren per stuk. Die onderdelen hebben we als blokken aan elkaar geligeerd, om tot de totale spike te komen. Voordat het spike eiwit als vaccin gebruikt kon worden, moesten eerst de sporen van de synthese weggezuiverd  
15 worden (zoals reagentia, en het zeer giftige oplosmiddel dimethylformamide, ofwel DMF).

De synthese verliep voorspoedig, al lieten sommige bouwstenen zich slecht zuiveren. Dit kan voorkomen wanneer er zich te veel geladen domeinen in het peptide bevinden. We hebben dit probleem opgelost door sommige bouwstenen langer of korter te maken, en dus niet alleen maar stenen te maken volgens de leer 1-45, 46-90, 91-135, etc. Het kortste  
20 fragment dat we nodig hadden, was fragment Y, te weten de volgende:

```
watvertrag ingmingdda araalikvan (lengte: 30)
```

Dit leverde ons project vertraging op, omdat we niet verwacht hadden dat we tot zulke korte bouwstenen moesten terugvallen. Om fragment Y te identificeren, hebben we door een high-throughput synthesizer elk peptide van 41 residuen laten vervaardigen dat een uitsnede is  
25 uit het spike eiwit (zij bijlage [*niet getoond in examen*], van elke 41-meer is de exacte massa gegeven als bewijs van succesvolle productie). We hebben fragment Y ook binnen de sequentie van de spike 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, of 10 aminozuren langer gemaakt, met elke mogelijke permutatie (zie wederom de bijlage). Zo weten we zeker dat fragment Y echt niet opgerekt kon worden voor een gunstige totaalsynthese. Gelukkig gedroeg fragment Y zich  
30 goed in DMF, waarin het gesynthetiseerd, bewaard, en uiteindelijk ook gebruikt werd.

Het complete spike eiwit werd na vorming gezuiverd en daarna geformuleerd met een geschikte farmaceutische buffer. Het riep een immuunrespons op bij hamsters die vergelijkbaar was met de respons van een geïnactiveerd virus.



## D2

### Minimale peptiden voor verhoogde vaccin-efficiëntie

M. I. Thrandir, L. Rond, en S. aux Ronne

- 5 Het verschaffen van peptiden is weliswaar een routinematig proces zodra de gewenste sequentie bekend is, maar de benodigde reagentia blijven prijzig. Ook bestaat er de kans dat een langer peptide mogelijk tot neveneffecten leidt, omdat het nou eenmaal langer is en dus meer interacties aan kan gaan. Hierdoor is er een universele vraag naar zo kort mogelijke peptiden voor gebruik voor behandeling of het voorkomen van een virale infectie.
- 10 Wij hebben een bibliotheek van miljoenen peptiden van 8 tot 11 residuen lang vervaardigd, door willekeurige koppelingen te doen met mengsels van vrije aminozuren. We hebben miljoenen celculturen blootgesteld aan kleine doses van deze peptiden. Wanneer we nu een nieuw pathogeen toevoegen aan deze celculturen, dan zijn er altijd wel culturen bij die een goede immunrespons geven. Omdat we in onze databank hebben staan welke peptiden
- 15 eerder aan deze cellen zijn toegevoegd, kunnen we zo achterhalen welke peptiden een respons hebben helpen opbouwen tegen het pathogeen. Zo kan snel een minimaal peptide geïdentificeerd worden waarmee nieuwe pathogenen bestreden kunnen worden.

Het is van belang om zuiver te werken, met individueel gedefinieerde peptiden. Het mengen van peptiden gaf in ons systeem slechte resultaten. We raden hierom af om mengsels te

20 gebruiken. Dit past ook niet in onze minimalistische benadering.

Als bewijs dat onze aanpak werkt, hebben we minimale peptiden uit onze bibliotheek geïdentificeerd die het nieuwe coronavirus kunnen helpen bestrijden. De volgende peptiden bleken tot wel 150% van het effect van het totale spike eiwit te geven in hamsters, wanneer eerst ons peptide werd toegediend, en er daarna infectie met het virus plaatsvond:

- 25            kedengkede n            (lengte: 11)
- kilmeters            (lengte: 9)
- gsmeewis            (lengte: 8)

Bio-informatische analyse toont aan dat deze sequenties in het spike eiwit van het coronavirus voorkomen. Het ligt voor de hand dat deze peptiden belangrijke epitopen zijn

30 van MHC klasse I-moleculen, wat hun verdere ontwikkeling in minimalistische vaccins veelbelovend maakt.