

ÖZET

KAN BEYİN BARIYERİ MEKİĞİ

- 5 Mevcut buluş, kan beyin bariyeri (R/BBB) üzerine bağlanan kan beyin bariyeri mekikleri ve bunların kullanım yöntemleri ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Bir kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; bir bağlayıcı ve bir transferrin reseptörüne bağlanan bir tek değerli bağlama varlığı içermesi, burada bağlayıcının, efektör varlığını, transferrin reseptörüne bağlanan tek değerli bağlama varlığına kenetlemesi, burada transferrin reseptörüne bağlanan tek değerli bağlama varlığının Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'in amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne yönelmiş bir scFab içermesi ve burada beyin efektör varlığının, nörolojik bozukluk ilaçları, nörotrofik faktörler ve β -sekretaz 1, A β , epidermal büyüme faktörü, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2, Tau, fosforilize Tau, apolipoprotein E4, alfa sinüklein, alfa sinükleinin oligomerik fragmanları, CD20, huntingtin, prion proteini, lösince zengin tekrarlı kinaz 2, parkin, presenilin 2, gama sekretaz, ölüm reseptörü 6, amiloid prekürsör proteini, p75 nörotrofin reseptörü ve kaspaz 6'dan oluşan gruptan seçilen bir beyin hedefine yönelmiş antikorlardan oluşan gruptan seçilmesidir.

2. İstem 1'in kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada beyin efektör varlığının proteinler, polipeptidler ve peptidlerden oluşan gruptan seçilmesidir.

3. İstem 2'in kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'in amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne yönelmiş bir scFab ihtiva eden transferrin reseptörüne bağlanan tek değerlikli bağlama varlığının, beyin efektör varlığının C ucuna bağlayıcı tarafından kenetlenmesidir.

4. İstem 1 ila 3'ün kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada beyin efektör varlığının, beyin hedefine yönelmiş bir tam uzunluklu antikör olmasıdır.

5. İstem 4'ün kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada tam uzunluklu antikörün, bir tam uzunluklu IgG olmasıdır.

6. İstem 5'in kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; tam uzunluklu IgG antikoru olarak beyin efektör varlığı, bağlayıcı ve Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'nın amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne yönelmiş bir scFab içermesi, burada scFab'ın, bağlayıcı tarafından IgG antikorunun ağır zincirlerinin birinin Fc parçasının C terminali ucuna kenetlenmiş olmasıdır.
7. İstem 4-6'nın kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada efektör varlığının, Aβ'ye yönelmiş bir tam uzunluklu antikor olmasıdır.
8. İstem 7'nin kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada, söz konusu Aβ'ye yönelen antikorun, şunları içermesidir: (a) Seq. Id. No. 5'in amino asit sekansını içeren H-CDR1, (b) Seq. Id. No. 6'nın amino asit sekansını içeren H-CDR2, (c) Seq. Id. No. 7'nin amino asit sekansını içeren H-CDR3, (d) Seq. Id. No. 8'in amino asit sekansını içeren L-CDR1, (e) Seq. Id. No. 9'un amino asit sekansını içeren L-CDR2 ve (f) Seq. Id. No. 10'un amino asit sekansını içeren L-CDR3.
9. İstem 8'in kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; Abeta'ya yönelen antikorun, Seq. Id. No. 11'in amino asit sekansını içeren bir V_H domeni ve Seq. Id. No. 12'in amino asit sekansını içeren bir V_L domeni içermesidir.
10. İstem 4 ila 6'nın kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada efektör varlığının, fosforile Tau'ya yönelmiş bir tam uzunluklu antikor olmasıdır.
11. İstem 4 ila 6'nın kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada efektör varlığının, alfa sinükleine yönelmiş bir tam uzunluklu antikor olmasıdır.
12. İstem 1 ila 11'in kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada bağlayıcının bir peptit bağlayıcı olmasıdır.
13. İstem 12'nin kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada peptid bağlayıcının, en az 20 amino asit uzunluklu bir amino asit sekansı olmasıdır.
14. İstem 13'ün kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği;

burada peptid bağlayıcının, 25 ila 50 amino asit uzunluklu bir amino asit sekansı olmasıdır.

15. İstem 1'in kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada transferrin reseptörüne bağlanan tek değerlikli bağlama varlığının, bir CH2-CH3 Ig varlığı ve Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'nın amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne yönelmiş bir scFab içermesi, burada scFab'ın, bir ikinci bağlayıcı tarafından CH2-CH3 Ig varlığının bir C terminali ucuna kenetlenmesidir.

16. İstem 15'in kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; beyin efektör varlığı, bağlayıcı, CH2-CH3 Ig domeni, ikinci bağlayıcı ve Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'nın amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne yönelen bir scFab içermesi, burada beyin efektör varlığının, birinci bağlayıcı tarafından CH2-CH3 Ig domeninin bir N terminali ucuna kenetlenmesi ve scFab'ın, ikinci bağlayıcı tarafından CH2-CH3 Ig domeninin bir C terminali ucuna kenetlenmesidir.

17. İstem 15 veya 16'nın kan beyin bariyeri mekiği olup, özelliği; burada CH2-CH3 Ig varlığının, bir CH2-CH3 IgG varlığı olmasıdır.

18. Bir beyin efektör varlığını kan beyin bariyeri boyunca taşımak için bir füzyon proteini olup, özelliği; bir CH2-CH3 Ig varlığı, bir bağlayıcı ve Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'nın amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan bir transferrin reseptörüne yönlendirilmiş bir scFab içermesi, burada scFab'ın, bağlayıcı tarafından CH2-CH3 Ig varlığının bir C terminali ucuna kenetlenmiş olması ve burada beyin efektör varlığının, nörolojik bozukluk ilaçlar, nörotrofik faktörler ve bir beyin hedefine yönelmiş scFv, Fv, scFab, Fab, VHH, F(ab')₂'den oluşan gruptan seçilen antikor fragmanlarından veya bir beyin hedefine yönelmiş peptidlerden seçilmesidir ve burada beyin hedefinin, β -sekretaz 1, A β , epidermal büyüme faktörü, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

2, Tau, fosforilize Tau, apolipoprotein E4, alfa sinüklein, alfa sinükleinin oligomerik fragmanları, CD20, huntingtin, prion proteini, lösince zengin tekrarlı kinaz 2, parkin, presenilin 2, gama sekretaz, ölüm reseptörü 6, amiloid prekürsör protein, p75 nörotrofin reseptörü ve kaspaz 6'dan oluşan gruptan seçilmesidir.

19. Bir beyin efektör varlığını İstem 18'in kan beyin bariyeri boyunca taşımak için füzyon proteini olup, özelliği; burada bağlayıcının peptit bağlayıcı olmasıdır.

20. İstem 18 veya 19'un füzyon proteini olup, özelliği; burada CH2-CH3 Ig varlığının, bir CH2-CH3 Ig varlığı olmasıdır.

21. Bir beyin efektör varlığını, istem 18 veya 19'un kan beyin bariyeri boyunca taşımak için bir füzyon proteini içeren bir konjugat ve beyin efektör varlığı olup, özelliği; bir bağlayıcı tarafından füzyon proteininin CH2-CH3 Ig varlığının bir N-terminal ucuna bağlanmasıdır.

22. İstem 21'in konjugatı olup, özelliği; burada beyin efektör varlığının proteinler, polipeptidler ve peptidlerden oluşan gruptan seçilmesidir.

23. İstem 22'nin konjugatı olup, özelliği; burada efektör varlığının bir C terminali ucunun, CH2-CH3 Ig varlığının N-terminal ucuna bağlayıcı tarafından kenetlenmesidir.

TARİFNAME

KAN BEYİN BARIYERİ MEKİĞİ

5

Mevcut buluş, kan beyin bariyeri (R/BBB) üzerine bağlanan bir kan beyin bariyeri mekiği ve bunların kullanım yöntemleri ile ilgilidir.

10 BULUŞUN ARKA PLANI

Örneğin nörolojik bozukluk ilaçlarının beyin penetrasyonu, düşük beyin penetrasyonuna sahip büyük biyoterapötik ilaçlar veya küçük moleküllü ilaçlar, nörovasküler birimdeki (NVU) diğer hücre bileşeni ile birlikte kapsamlı ve geçirgen olmayan kan-beyin bariyeri (BBB) ile sıkı şekilde sınırlıdır. Bu engelin üstesinden gelmek için birçok strateji test edilmiştir ve bunlardan biri, beyin kapiller endotelyumunda eksprese edilen endojen reseptörlerin aracılık ettiği transsitoz yolaklarını kullanmaktır. Rekombinant proteinler örneğin monoklonal antikolar veya peptidler reseptör aracılı biyoterapötiklerin beyne iletilmesini sağlamak için bu reseptörlere karşı tasarlanmıştır. Ancak, beyin alımını maksimize ederken beyin endotel hücreleri içerisinde (BEC'ler) yanlış tasnifleme ve BEC içinde belirli organellerde birikme derecesini (özellikle biyoterapötiğin bozunmasına yol açan organeller) minimize etmek için stratejiler, halen keşfedilmemiştir.

Monoklonal antikolar ve diğer biyoterapötikler, merkezi sinir sisteminde (MSS) patoloji tedavisi için büyük terapötik potansiyele sahiptir. Ancak, beyin içerisine doğru yolları, BBB tarafından önlenir. Önceki çalışmalar, kan dolaşımına enjekte edilen bir IgG'nin çok küçük bir yüzdesi (yaklaşık %0,1) MSS bölümlerine nüfuz edebildiğini göstermiştir (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52: 1158-1164 (1974)). Bu kesinlikle antikorun MSS'sindeki düşük konsantrasyon nedeniyle

farmakolojik etkileri sınırlandıracaktır.

WO 2012/075037, bir anti-BACE1 Fab fragmanı ve bir anti-transferrin reseptörü Fab fragmanı ihtiva eden bir bispesifik tam uzunluklu antikoru açıklamaktadır. Bu bispesifik antikor, bir kan beyin bariyeri mekiği olarak görev görür.

US 2005/147613, ya bir anti-transferrin reseptörü tam uzunluklu antikoru ve bir anti-Abeta tam uzunluklu antikoru veya bir anti-transferrin Fab fragmanı ve bir anti-abeta Fab fragmanı ihtiva eden bispesifik antikoları açıklamaktadır.

Her iki yapı da kan beyin bariyeri mekiği olarak görev yapar.

Dolayısıyla, nörolojik bozukluk yüklerini BBB boyunca mekik yüklerine beyine etkili şekilde aktarım sistemleri için bir ihtiyaç bulunmaktadır.

BULUŞUN ÖZETİ

Bir birinci görünümde, mevcut buluş, bir bağlayıcı ve bir transferrin reseptörüne bağlanan bir tek değerli bağlama varlığı içeren bir kan beyin bariyeri mekiği sunar, burada bağlayıcı, efektör varlığını, transferrin reseptörüne bağlanan tek değerli bağlama varlığına kenetler, burada transferrin reseptörüne bağlanan tek değerli bağlama varlığı Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'in amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne yönelmiş bir scFab içerir ve burada beyin efektör varlığı, nörolojik bozukluk ilaçları, nörotrofik faktörler ve β -sekretaz 1, A β , epidermal büyüme faktörü, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2, Tau, fosforilize Tau, apolipoprotein E4, alfa sinüklein, alfa sinükleinin oligomerik fragmanları, CD20, huntingtin, prion proteini, lösince zengin tekrarlı kinaz 2, parkin, presenilin 2, gama sekretaz, ölüm reseptörü 6, amiloid prekürsör proteini, p75 nörotrofin reseptörü ve kaspaz 6'dan oluşan gruptan seçilen bir beyin hedefine yönelmiş antikordardan oluşan gruptan seçilir.

Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, beyin efektör varlığı proteinler, polipeptidler ve peptidlerden

oluşan gruptan seçilir.

Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, beyin efektör varlığı, bir beyin hedefine yönelmiş bir tam uzunluklu antikor, tercihen bir tam uzunluklu IgG içerir.

- 5 Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, kan beyin bariyeri mekiği, bir tam uzunluklu IgG antikor olarak beyin efektör varlığı, bağlayıcı ve Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'nın amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne bağlanan bir scFab
- 10 içerir, burada scFab, bağlayıcı tarafından IgG antikorunun ağır zincirlerinin birinin Fc parçasının C terminali ucuna kenetlenir.

Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, efektör varlığı, A β 'ye yönelmiş bir tam uzunluklu antikordur.

- 15 Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, söz konusu A β 'ye yönelen antikor, şunları içerir: (a) Seq. Id. No. 5'in amino asit sekansını içeren H-CDR1, (b) Seq. Id. No. 6'nın amino asit sekansını içeren H-CDR2, (c) Seq. Id. No. 7'nin amino asit sekansını içeren H-CDR3, (d) Seq. Id. No.
- 20 8'in amino asit sekansını içeren L-CDR1, (e) Seq. Id. No. 9'un amino asit sekansını içeren L-CDR2 ve (f) Seq. Id. No. 10'un amino asit sekansını içeren L-CDR3.

- Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, Abeta'ya yönelen antikor, Seq. Id. No. 11'in amino asit sekansını
- 25 içeren bir V_H domeni ve Seq. Id. No. 12'in amino asit sekansını içeren bir V_L domeni içerir.

- Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, bir beyin hedefine yönelmiş kan beyin bariyeri mekiğinin antikorunun birinci ağır zinciri, bir birinci dimerizasyon modülü içerir
- 30 ve bir beyin hedefine yönelmiş kan beyin bariyeri mekiğinin antikorunun ikinci ağır zinciri, iki ağır zincirin heterodimerizasyonuna imkan veren bir ikinci dimerizasyon modülü içerir.

- Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, beyin
- 35 hedefine yönelmiş kan beyin bariyeri mekiğinin antikorunun

birinci ağır zincirinin birinci dimerizasyon modülü topuzlar içerir ve beyin hedefine yönelmiş kan beyin bariyeri mekiğinin antikorunun ikinci ağır zincirinin dimerizasyon modülü, delikler içine topuzlar stratejisine göre delikler içerir.

5 Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, efektör varlığı, fosforile Tau'ya yönelmiş bir tam uzunluklu antikordur.

Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, efektör varlığı, alfa sinükleine yönelmiş bir tam uzunluklu antikordur.

10 Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, bağlayıcı, tercihen, en az 25 amino asit uzunluklu bir amino asit sekansı, daha tercihen 30 ila 50 amino asit uzunluklu bir peptid olan bir peptid bağlayıcıdır, özellikle bahsedilen bağlayıcı, $(G_4S)_6G_2$ veya $(G_4S)_4$ 'tür.

Mevcut buluşun aşağıdaki üç uygulaması, bir kan beyin bariyeri mekiği ile ilgili olup, burada beyin efektör varlığı, beyin efektör varlığının bir tam uzunluklu antikor, özellikle bir tam uzunluklu IgG olmaması koşuluyla bir protein, polipeptid veya peptiddir.

20 Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, bağlanan transferrin reseptörüne tek değerli bağlama varlığı bir CH2-CH3 Ig varlığı ve Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'in amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne bağlanan bir scFab içerir, burada scFab, bir ikinci bağlayıcı tarafından CH2-CH3 Ig varlığının bir C terminali ucuna kenetlenir.

30 Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, kan beyin bariyeri mekiği beyin efektör varlığı içerir, bağlayıcı, CH2-CH3 Ig domeni, ikinci bağlayıcı ve Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'nın amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu tanıyan transferrin reseptörüne bağlanan bir scFab içerir, burada beyin efektör varlığı, birinci bağlayıcı tarafından CH2-CH3 Ig domeninin bir N terminali ucuna kenetlenir ve scFab, ikinci bağlayıcı

tarafından CH2-CH3 Ig domeninin bir C terminali ucuna kenetlenir.

Kan beyin bariyeri mekiğinin özel bir uygulamasında, CH2-CH3 Ig varlığı, bir CH2-CH3 IgG varlığıdır.

5 Mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği bir ilaç olarak kullanılabilir, özellikle bir nörolojik bozukluğun, örneğin Alzheimer's hastalığının tedavisi için kullanılabilir.

Mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği beyin efektör varlığını kan beyin bariyeri boyunca taşımak için
10 kullanılabilir.

Özel bir uygulamada, Fc parçasının C terminali ucundan kan beyin bariyeri reseptörüne bağlanan tek değerli bağlama varlığı olarak scFab'a kenetlenmiş mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiğinin IgG antikorunun ağır zinciri aşağıdaki yapıya sahiptir:
15

- IgG ağır zinciri,
- IgG ağır zincirinin Fc kısmının C-terminal ucunun, scFab'ın VL bölgesinin N-terminal ucuna bağlayıcı kenetlemesi,
- ScFab'ın değişken hafif zincir domeni (VL) ve C-kappa hafif zincir domeni,
20
- scFab'ın C-kappa hafif zincir domeninin C-terminal ucunun scFab'ın VH bölgesinin N-terminal ucuna bağlayıcı kenetlemesi,
- scFab antikorunun değişken ağır zincir domeni (VH) ve IgG
25 CH3 ağır zincir domeni.

Bir ikinci görünümde mevcut buluş, bir beyin efektör varlığını kan beyin bariyeri boyunca taşımak için bir CH2-CH3 Ig varlığı, bir bağlayıcı ve Seq. Id. No. 14, 15 veya 16'in amino asit sekansında bulunan transferrin reseptöründeki bir epitopu
30 tanıyan bir transferrin reseptörüne yönlendirilmiş bir scFab ihtiva eden bir füzyon proteini sunmaktadır, burada scFab, bağlayıcı tarafından CH2-CH3 Ig varlığının bir C terminali ucuna kenetlenmiştir ve burada beyin efektör varlığı nörolojik bozukluk ilaçlar, nörotrofik faktörler ve bir beyin hedefine
35 yönelmiş scFv, Fv, scFab, Fab, VHH, F(ab')2'den oluşan gruptan

seçilen antikor fragmanlarından veya bir beyin hedefine yönelmiş peptidlerden seçilir ve burada beyin hedefi, β -sekretaz 1, A β , epidermal büyüme faktörü, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2, Tau, fosforilize Tau, apolipoprotein E4, alfa sinüklein, alfa sinükleinin oligomerik fragmanları, CD20, huntingtin, prion proteini, lösince zengin tekrarlı kinaz 2, parkin, presenilin 2, gama sekretaz, ölüm reseptörü 6, amiloid prekürsör protein, p75 nörotrofin reseptörü ve kaspaz 6'dan oluşan gruptan seçilir.

10 Mevcut buluşun füzyon proteininin özel bir uygulamasında, mevcut buluşun füzyon proteini ayrıca, beyin efektör varlığını CH2-CH3 Ig varlığının N terminali ucuna kenetlemek için CH2-CH3 Ig varlığının N terminali ucunda bir bağlayıcı içerir.

Mevcut buluşun füzyon proteininin özel bir uygulamasında, bağlayıcı, bir peptid bağlayıcı, özellikle, en az 15 amino asit uzunluklu, daha özel olarak 20 ila 50 amino asit uzunluklu bir amino asit sekansı olan bir peptid olup, en özellikle bahsedilen bağlayıcı, amino asit sekansı (G₄S)₆G₂ (Seq. Id. No. 13) veya (G₄S)₄ (Seq. Id. No. 17)'ye sahiptir.

20 Mevcut buluşun füzyon proteininin özel bir uygulamasında, CH2-CH3 Ig varlığı, bir CH2-CH3 IgG varlığıdır.

Bir üçüncü görünümde mevcut buluş mevcut buluşun bir füzyon proteini ve mevcut buluşun füzyon proteininin CH2-CH3 Ig varlığının bir N terminali ucuna bir bağlayıcı ile kenetlenen bir beyin efektör varlığını ihtiva eden bir konjüгат sunar.

Mevcut buluşun konjüгатının özel bir uygulamasında, beyin efektör varlığı, bir nörotrofik faktördür ve burada nörotrofik faktörü CH2-CH3 Ig varlığının N terminali ucuna kenetleyen bağlayıcı, bir peptid bağlayıcıdır.

30 Ayrıca, mevcut buluş, mevcut buluşun konjüгатını ihtiva eden bir farmasötik formülasyon ve bir farmasötik taşıyıcıyı, konjüгатın bir ilaç olarak kullanımını, özellikle konjüгатın bir nörodejeneratif bozukluğun, özellikle Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanımını sunmaktadır.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1: Kan beyin bariyeri mekiklerinin (füzyon proteinleri) farklı biçimi örneklerde kullanılmıştır. 1A: A β (mAb31)'e yönelen IgG. IB: A β (mAb31)'e yönelen bir IgG'nin Fc parçasına kenetlenen TfR'ye yönelmiş tek Fab (sFab = tek scFab). 1C: A β (mAb31)'e yönelen bir IgG'nin Fc parçasına kenetlenen TfR'ye yönelmiş çift Fab (dFab = çift scFab). scFab yapısı, IgG antikorunun ağır zincirinin C terminal ucuna kaynaştırılır.

Şekil 2: Füzyon proteinlerinin A β yapılarına bağlanma özellikleri. Bağlanma afinitesi bir ELISA kurulumu kullanılarak ölçülmüş olup, Fab yapılarının A β bağlanma özelliklerini muhafaza ettiklerini göstermiştir. mAb31-8D3 yapılarının Abeta fibrillerine bağlanması. 8D3 (boş kareler) immobilize edilmiş Abeta fibrillerine bağlanmazken, mAb31-8D3-dFab (dolu kareler), mAb31-8D3-sFab (boş üçgenler) ve mAb31 (dolu üçgenler) karşılaştırılabilir afinitelerle bağlanır.

Şekil 3: Yapıların transferrin reseptörüne (TfR) bağlanma özellikleri. Bağlanma afinitesi bir ELISA kurulumu kullanılarak ölçülmüş, bu ölçüm, sadece Fab yapılarının transferrin reseptörünü (TfR) bağladığını ve çiftli Fab yapısının bivalent bağlama modu nedeniyle biraz daha yüksek görünür afiniteye sahip olduğunu göstermektedir. MAb31-8D3 yapılarının mTfR'ye bağlanması. mAb31 (dolu üçgenler) immobilize edilmiş mTfR'ye bağlanmazken, mAb31-8D3-dFab (dolu kareler) 8D3 ana antikoruninkine (boş kareler) karşılaştırılabilir bir afinite ile bağlanır. Tek değerli mAb31-8D3-sFab yapısı (boş üçgenler) bir ara bağlanma afinitesi göstermektedir.

Şekil 4: Anti-A β monoklonal antikor mAb31 (Şekil 4A), tekli Fab mAb31 (mAb31'in C terminal ucuna kaynaştırılmış tekli scFab) (Şekil 4B) ve çift Fab mAb31'in plak dekorasyonu (mAb31'in C terminal ucuna kaynaştırılmış çift scFab'lar) (Şekil 4C). PS2APP farelerine (n=3/yapısı) enjekte edilen yapı, tek intravenöz 10 mg/kg dozu ve ardından dozdan 8 saat sonra beyin perfüzyonu. Analiz, plak bağlanması için

immünohistokimya ve konfokal mikroskopiye kapsamıştır. Veriler, sadece tek Fab-mAb31 yapısının BBB'yi geçip plakalara bağlanabileceğini göstermektedir. Şekil, tüm hayvanlardan beynin bir temsili alanını göstermektedir.

5 Şekil 5: Çiftli Fab-mAb31 yapısının kantifikasyonunu gösterir. Plak ve kılcal boyama, üç farklı bölgede tedavi edilen üç hayvanın hepsinde ölçülmüştür (her yapı için toplam 9 alan). Veriler, çift Fab-mAb31 yapısı için mAb31'e kıyasla sadece kılcallarda bir artış olduğunu göstermektedir. Plakta (beynin
10 içinde) çift Fab-mAb31 düzeylerinde artış saptanmamıştır. mAb31 (HEK kontrolü) karşısında çift Fab-mAb31'in, 10 mg/kg, dozdan 8 saat sonra kantifikasyonu.

Şekil 6: Tekli Fab-mAb31 yapısının kantifikasyonunu gösterir. Plak ve kılcal boyama, üç farklı bölgede tedavi edilen üç
15 hayvanın hepsinde ölçülmüştür (her yapı için toplam 9 alan). Veriler, tek Fab-mAb31 yapısı için plaklarda mAb31'e kıyasla büyük bir artış olduğunu göstermektedir. Floresans sinyalinin kantifikasyonu, tek Fab-mAb31'in mAb31 yapısına kıyasla 50 kattan fazla artış sağladığını göstermektedir. Kılcal
20 damarlarda, BBB üzerinden geçişi gösteren mAb31 ile karşılaştırıldığında tekli Fab-mAb31 yapısı için geçici bir boyama vardır. Doz sonrası 8 saat ve 25 mg/kg, dozdan 24 saat sonra mAb31 (HEK kontrolü) karşısında tekli Fab-mAb31 10 mg/kg'nin kantifikasyonu.

25 Şekil 7: İki farklı dozda anti-A β monoklonal antikoru mAb31'in ve çok bir düşük dozda tekli Fab mAb31'in (mAb31'in C terminal ucuna tek scFab kaynaştırılmış) plak dekorasyonu. PS2APP farelerine (n=3/yapı) enjekte edilmiş yapı, tek intravenöz doz ve ardından dozdan sonra çeşitli zaman noktalarında beyin
30 perfüzyonu. Analiz, plak bağlanması için immünohistokimya ve konfokal mikroskopiye kapsamıştır. Veriler, sadece tek Fab-mAb31 yapısının BBB'yi geçip plakalara bağlanabileceğini göstermektedir. Beyin maruziyeti, tekli Fab-mAb31 yapısı için çok hızlıdır ve plak dekorasyonu en az bir hafta boyunca tek
35 bir uygulama tarafından sürdürülebilir.

Şekil 8: Tekli Fab-mab31 veya çiftli Fab-mAb31 ile işlenen Tfr'nin hücre yüzeyi ekspresyonunun kantifikasyonu. Çiftli Fab-mAb31 yapısı ile transferrin reseptörü (Tfr) hücre yüzeyinin aşağı regülasyonu. Tfr'yi eksprese eden beyin endotel hücreleri, ya tekli Fab-mAb31 yapısı (Şekil 8A) ya da çift Fab-mAb31 yapısı (Şekil 8B) ile 24 saat süreyle enkübe edilmiştir. Sadece çift Fab-mAb31 yapısı, Tfr eksprese eden hücre yüzeyi seviyesini düşürmüştür.

Şekil 9: Tekli Fab-mab31 veya çiftli Fab-mAb31 ile muamele edilmiş Tfr'nin in vivo hücre trafiği. Erken zaman noktaları, in vivo kapiler ve plak boyamalarını incelemektedir. Hem sFab-MAb31 (Şekil 9A) hem de dFab-MAb31 (Şekil 9B), beyin damarlarını, enjeksiyondan 15 dakika sonra dağılımlarında bir fark olmadan dekore etmektedir. Enjeksiyondan 8 saat sonra, sFab-MAb31, parankime ulaşır ve amiloid plaklarını dekore ederken (Şekil 9C oklar), dFab-MAb31 15 dakika zaman noktasına benzer şekilde beyin damarlarında kalır (Şekil 9D). Parankimde, dFab-MAb31 için herhangi bir amiloid plağı tespit edilememiştir.

Şekil 10: Tekli Fab-mab31 veya çiftli Fab-mAb31 ile muamele edilmiş Tfr'nin in vivo hücre trafiği. Araştırmada kullanılan tüm yapıların bütünlüğünü kontrol etmek için, 18 aylık fare APP transgenik beyin kriyokesitlerinin boyanması MAb31 (Şekil 10A), sFab-MAb31 (Şekil 10B) veya dFab-MAb31 (Şekil 10C) kullanılarak yapılmıştır. Şekil 10D, kontrol sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar, 3 yapının da transgenik farelerin beyinde amiloid plakları tespit ettiğini göstermiştir.

Şekil 11: Tekli Fab-mab31 ile muamele edilmiş Tfr'nin in vivo hücre trafiği. İn vivo tedavi edilmiş örnekler üstünde yüksek çözünürlüklü konfokal mikroskopi sFab-MAb31'in beyin kılcalların luminal yanını dekore etmediğini ancak endotel hücrelerinin luminal membranını geçen vezikül benzeri yapılar içerisinde ve endotel hücresi sitozolü içerisinde bulunduğunu göstermektedir. Şekil 11'deki oklar, endotel hücre çekirdeklerinin abluminal tarafında sFab-MAb31 yapılarını

içeren vezikülleri gösterir. Bu veriler, her iki sFab-MAb31'in beyin endotel hücrelerinin girebildiğini ve vaskülatürü geçebildiğini ve beyinin (Şekil 9A ve C ile karşılaştırınız) parankim boşluğu amiloid plaklarına ulaşabildiğini göstermektedir.

Şekil 12: Çiftli Fab-mab31 ile muamele edilmiş TfR'nin in vivo hücre trafiği. İn vivo tedavi edilmiş örnekler üstündeki yüksek çözünürlüklü konfokal mikroskopi dFab-MAb31'in beyin kılcallarının luminal yanını dekore etmediğini ancak endotel hücrelerinin luminal membranını geçen vezikül benzeri yapılar içerisinde ve endotel hücresi sitozolü içerisinde bulunduğunu göstermektedir. Şekil 12'deki oklar, endotel hücre çekirdeklerinin abluminal tarafında dFab-MAb31 yapılarını içeren vezikülleri gösterir. Bu veriler, dFab-MAb31'in, beyin endotel hücreleri girebileceğini ancak, vaskülatürü geçemeyerek takıldıklarını ve bu yüzden beyinin parankim boşluğundaki amiloid plaklarına ulaşamadıklarını göstermektedir (Şekil 9B ve D ile karşılaştırınız).

Şekil 13: i.v. uygulamadan sonra beyin maruziyeti ve plak dekorasyonu. Şekil 13A: mAb31, dFab ve sFab yapıları, PS2APP transgenik hayvanlarına 10 mg/kg'de intravenöz olarak enjekte edilmiş, hayvanlara perfüzyon yapılmış ve enjeksiyondan 8 saat sonra sakrifiye edilmiştir. dFab için plak dekorasyonunda mAb31 ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış saptanmamıştır. Saptama antikorundan 555 nm'de floresans yoğunluğuna dayalı olarak, sFab yapısı için ana mAb31'den 55 kat daha yüksek bir plak dekorasyonu tespit edilmiştir. Enjeksiyondan 8 saat sonra mAb31 (Şekil 13B), dFab (Şekil 13C) ve sFab'ın (Şekil 13D) korteksinde temsili immünohistokimya boyaması. dFab sadece mikrodamar boyamasını gösterirken, sFab yoğun şekilde amiloid- β plaklarını dekore eder. Şekil 13E: Düşük bir dozda sFab yapısının (2,66 mg/kg) hem 2 mg/kg hem de 10 mg/kg mAb31 ile karşılaştırıldığında hızla ve anlamlı ölçüde beyindeki plaklara ulaştığının gösterilmesi. sFab yapısının hedef bağlantısı, enjeksiyondan en az bir hafta

sonra sürdürülebilir olur. İmmünohistokimya boyaması, mAb31 için 2 mg/kg'da (Şekil 13F) ve sFab için enjeksiyondan 7 gün sonra 2,66 mg/kg'da (Şekil 13G) plak dekorasyonunu gösterir.

5 Şekil 14: 14 haftalık i.v. enjeksiyonlar ile tedavi edilen plak taşıyan PS2APP farelerindeki bir kronik çalışmadaki in vivo etkililik. Çalışmanın sonunda rezidüel plaklara bağlı uygulanan yapıların sırasıyla düşük dozda mAb31, orta dozda mAb31, düşük dozda sFab ve orta dozda sFab (Şekil 14A-D) için hedef plak bağlanması gösterilmiştir. Plakların 10 immünohistokimyasal boyaması sonrası kantitatif morfometrik analizi, korteks ve hipokampus için gösterilmiştir (Şekil 14 E). 4,5 aylıkken sakrifiye edilen tedavi edilmemiş hayvanların plak yükü, çalışmanın başlangıcında referans hattı amiloidoz düzeyi olarak gösterilmektedir. Plak sayısında önemli bir 15 azalma, araçla tedavi edilen hayvanlarda görülen ilerleyici plak oluşumu ile karşılaştırıldığında orta doz sFab ile tedaviden sonra belirgindir; düşük doz sFab'da bile plak oluşumunda azalma eğilimi görülmektedir. Dolayısıyla, sFab yapısı hem korteks hem de hipokampüsteki plak sayılarını 20 önemli ölçüde azaltır. Plak boyutlarının analizi, küçük plak boyutları için en belirgin plak numaralarının azaldığını ortaya koymuştur. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Şekil 15: Fc C-terminaline kaynaşık TfR scFab fragmanlarına sahip olan antikör multimerik ADCC'yi indüklemeyen NK92 aracılı 25 BA/F3 fare eritrolösemi hücrelerinin öldürülmesi, LDH salımının kantifiye edilmesiyle ölçülmüştür. Sadece "geleneksel" "N-terminal - Fc" yönelimindeki TfR bağlayıcı Fab kısmına sahip multimerik yapılar, anlamlı ölçüde ADCC indüklerken, ters yönelimli beyin mekiği yapıları sessizdir.

30 Şekil 16: transferrin reseptörüne yönelmiş scFab 8D3, fare transferrin reseptörünün hücre dışı domenindeki üç ayrı peptidi bağlar. Üç amino asit ile örtüşen antikör 8D3 ile 15 mer peptitlerin bağlanması, immobilize mTfR peptidlerini taşıyan bir CelluSpot lambasında enkübe edilmiş antikörün 35 kemilüminesan tespiti ile açığa çıkarılmıştır. Kutu: 8D3

tarafından bağlı peptidler #373, 374 ve 376 (Seq. Id. No. 15, 16 ve 17).

Buluş Tanımlarının Uygulamalarının Ayrıntılı Açıklaması

"Kan-beyin bariyeri" veya "BBB", beyin kılcal endotelial plazma zarları içindeki sıkı bağlantılarla oluşan, moleküllerin, üre gibi çok küçük moleküllerin bile (60 Dalton) beyine taşınmasını kısıtlayan sıkı bir bariyer oluşturan periferik dolaşım ve beyin ve omurilik arasındaki fizyolojik bariyer anlamına gelir. Beyin içindeki BBB, omurilik içindeki kan omurilik bariyeri ve retina içindeki kan-retinal bariyeri, MSS içindeki bitişik kılcal bariyerlerdir ve burada toplu olarak kan-beyin bariyeri veya BBB olarak adlandırılır. BBB ayrıca, kan-CSF bariyerini (koroid pleksus) kapsar, burada bariyer kapiler endotel hücrelerinden ziyade ependimal hücrelerden oluşur.

Delikler içine topuzlar dimerizasyon modülleri ve antikor tasarımında kullanımları, Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology, Cilt 2, Sayı 1, Şubat 1996, sf. 73-73(1) yayınında tarif edilmektedir.

"Merkezi sinir sistemi" veya "MSS", vücut fonksiyonunu kontrol eden sinir dokusu kompleksi anlamına gelir ve beyin ve omurilięi kapsar.

Bir "kan-beyin bariyeri reseptörü" ("R/BBB" olarak kısaltılır), molekülleri BBB boyunca taşıyabilen veya eksojen olarak verilen molekülleri taşımak için kullanılabilen beyin endotel hücreleri üzerinde eksprese edilen bir ekstraselüler membran ile bağlantılı reseptör proteindir. Buradaki R/BBB örnekleri şunları içerir: transferrin reseptörü (TfR), insülin reseptörü, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGF-R), düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri, örneğin, sınırlayıcı olmaksızın düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü, ile ilgili protein 1 ile ilgili (LRP1) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü, protein 8 ile ilgili (LRP8), ve heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme faktörü (HB-EGF). Burada R/BBB'nin bir örneği, transferrin

reseptörüdür (TfR).

"Beyin efektör varlığı", beyine BBB üzerinden taşınacak bir molekül anlamına gelir. Efektör varlık tipik olarak beyne verilmesi istenen karakteristik bir terapötik aktiviteye sahiptir. Efektör varlığı, nörolojik bozukluk ilaçları ve sitotoksik maddeleri örneğin peptidler, proteinler ve antikolar, özellikle bir beyin hedefine yönelmiş monoklonal antikolar veya bunların fragmanlarını içerir.

"Tek değerlikli bağlanma varlığı", spesifik olarak ve bir monovalent bağlanma modunda bir R/BBB'ye bağlanabilen bir molekül anlamına gelir. Mevcut buluşun kan beyin mekiği ve/veya konjüгатı, bir tek değerlikli bağlanma varlığının bir biriminin bulunması ile, başka bir deyişle mevcut buluşun kan beyin mekiği ve/veya konjüгатının tek değerlikli bağlanma varlığının bir birimini içermesiyle karakterize edilir. Mevcut beyanın tek değerlikli bağlanma varlığı, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla proteinler, polipeptidler, peptidler ve antikor fragmanlarını, örneğin Fab, Fab', Fv fragmanları, tek zincirli antikor moleküllerini, örneğin tek zincirli Fab, scFv'yi kapsar. Tek değerlikli bağlanma varlığı, örneğin faj gösterimi veya immünizasyon gibi son teknolojiler kullanılarak geliştirilmiş bir iskele proteini olabilir. Tek değerli bağlama varlığı bir peptid de olabilir. Mevcut buluşun tek değerli bağlama varlığı bir tek zincirli Fab (scFab)'ı içerir. Belirli uygulamalarda, tek değerli bağlama varlığı bir CH2-CH3 Ig domeni ve bir kan beyin bariyeri reseptörüne yönelmiş bir tek zincirli Fab (scFab)'ı içerir. scFab, CH2-CH3 Ig domeninin C terminal ucuna bir bağlayıcı ile kenetlenir. Belirli uygulamalarda, scFab transferrin reseptörüne yönelmiştir.

"Tek değerlikli bağlanma modu" R/BBB'ye spesifik bir bağlanma anlamına gelir, burada tek değerli bağlama varlığı ve R/BBB arasındaki etkileşim bir tek epitop yoluyla meydana gelir. Tek değerlikli bağlanma modu, tekli bir epitop etkileşim noktası nedeniyle R/BBB'nin herhangi bir dimerizasyonu/multimerizasyonunu önler. Tek değerlikli

bağlanma modu, R/BBB'nin hücre içi sıralamasının değiştirilmesini önler.

"Epitop" terimi, bir antikora spesifik olarak bağlanabilen herhangi bir polipeptit belirleyicisini içerir. Belirli uygulamalarda, epitop belirleyicisi, örneğin amino asitler, şeker yan zincirleri, fosforil veya sülfonil gibi kimyasal olarak aktif yüzey molekül gruplanmaları ve belirli uygulamalarda, üç boyutlu yapısal özelliklere ve spesifik yük özelliklerine sahip olabilir. Bir epitop, bir antijenin, bir antikör tarafından bağlanan bir bölgesidir.

"Transferrin reseptörü" ("TfR"), omurgalılarda demir alımında rol oynayan iki disülfid bağlantılı alt biriminden (her biri yaklaşık 90.000 görünür molekül ağırlıklı) oluşan bir transmembran glikoproteindir (yaklaşık 180.000'lik bir molekül ağırlığı). Bir uygulamada, burada TfR, örneğin, Schneider et al. Nature 311: 675 - 678 (1984) yayınında olduğu gibi insan TfR'i ihtiva eden amino asit sekansıdır.

Bir "nörolojik bozukluk" burada kullanıldığı şekilde, MSS'yi etkileyen ve/veya MSS'de bir etiyojolojiye sahip olan bir hastalık veya bozukluk anlamına gelir. Örnek MSS hastalıkları veya bozuklukları arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, nöropati, amiloidoz, kanser, bir oküler hastalık veya bozukluk, viral veya mikrobiyal enfeksiyon, enflamasyon, iskemi, nörodejeneratif hastalık, nöbet, davranış bozuklukları ve bir lizozomal depolama hastalığı bulunur. Mevcut başvurunun amacı doğrultusunda, MSS'in, normalde vücudun geri kalanından kan-retina bariyeri ile ayrılan gözü de içerdiği anlaşılacaktır. Spesifik nörolojik bozukluk örnekleri arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, nörodejeneratif hastalıklar (örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, Lewy cisimciği hastalığı, postpoliomiyelit sendromu, Shy-Draeger sendromu, olivopontoserebellar atrofi, Parkinson hastalığı, çoklu sistem atrofisi, striatonigral dejenerasyon, tauopatiler (örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, Alzheimer hastalığı ve supranükleer palsi), prion hastalıkları (örneğin,

bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, siğir spongiform ensefalopatisi, skrapı, Creutzfeldt-Jakob sendromu, kuru, Gerstmann-Stravssler-Scheinker hastalığı, kronik harabiyet hastalığı, ve ölümcül familyal uykusuzluk), bulbar palsi, 5 motor nöron hastalığı ve sinir sistemi heterodejeneratif bozuklukları (örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, Canavan hastalığı, Huntington hastalığı, nöronal seroitlipofuskinoz, Alexander hastalığı, Tourette's sendromu, Menkes sendromu, Cockayne sendromu, Halervorden-Spatz 10 sendromu, Lafora hastalığı, Rett sendromu, hepatolentiküler dejenerasyon, Lesch-Nyhan sendromu ve Unverrikht-Lundborg sendromu), demans (örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, Pick hastalığı ve spinoserebellar ataksi), kanser (örneğin MSS ve/veya beyin kanseri, örneğin vücudun herhangi bir yerindeki 15 kanserden kaynaklanan beyin metastazı dahil) bulunur.

Bir "nörolojik bozukluk ilacı", bir veya daha fazla nörolojik bozukluğu tedavi eden bir ilaç veya terapötik maddedir. Mevcut buluşun nörolojik bozukluk ilaçları arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, küçük moleküllü bileşikler, antikolar, 20 peptidler, proteinler, bir veya daha fazla MSS hedefinin doğal ligantları, bir veya daha fazla MSS hedefinin doğal ligantlarının modifiye edilmiş versiyonları, aptamerler, inhibe edici nükleik asitler (başka bir deyişle, küçük inhibe edici RNA'lar (siRNA) ve kısa tokalı RNA'lar (shRNA)), 25 ribozimler ve yukarıdakilerin küçük molekülleri veya aktif fragmanları bulunur. Mevcut buluşun örnek nörolojik bozukluk ilaçları burada tarif edilmektedir ve bunlar arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla: antikolar, aptamerler, proteinler, peptidler, inhibe edici nükleik asitler ve 30 yukarıdakilerin, ya kendileri ya da spesifik olarak bir MSS antijeni veya hedef molekül üzerine tanıyan ve/veya etkileyen (başka bir deyişle, inhibe eden, aktive eden veya saptayan) küçük molekülleri ve aktif fragmanları, örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, amiloid prekürsör proteini veya 35 kısımları, amiloid beta, beta-sekretaz, gama-sekretaz, tau,

alfa-sinüklein, parkin, huntingtin, DR6, presenilin, ApoE, gliyom veya diğer MSS kanser markörleri, ve nörotrofinler bulunur. Sınırlayıcı olmayan nörolojik bozukluk ilaçları ve tedavilerinde kullanılabilecekleri karşılık gelen bozukluklara örnekler: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), kronik beyin hasarı (nörogenez), fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2), Anti-Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Beyin Kanseri, (EGFR)-antikor, Glial Hücre Hattından Türetilen Nöral Faktör Parkinson hastalığı, (GDNF), Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Amyotrofik lateral skleroz, depresyon, beyinin lizozomal enzim lizozomal depolama bozukluğu, Siliyer nörotrofik faktör (CNTF) Amyotrofik lateral skleroz, Neuregulin-1 şizofreni, anti-HER2 antikor (örneğin trastuzumab) HER2-pozitif kanserinin beyin metastazı.

15 An "görüntüleme maddesi", varlığının ve/veya konumunun doğrudan veya dolaylı olarak tespit edilmesine imkan veren bir veya daha fazla özelliğe sahip olan bileşiktir. Bu tür görüntüleme maddelerinin örnekleri, proteinleri ve tespit edilmesine imkan veren etiketli bir öğeyi içeren küçük moleküllü bileşikler içerir.

Bir "MSS antijeni" veya "beyin hedefi", MSS'de, örneğin, beyinde eksprese edilen, bir antikor veya küçük molekül ile hedeflenebilen bir antijen ve/veya moleküldür. Bu tür antijen ve/veya moleküllerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla: beta-sekretaz 1 (BACE1), amiloid beta (Abeta), Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), insan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER2), Tau, apolipoprotein E4 (ApoE4), alfa-sinüklein, CD20, huntingtin, priyon protein (PrP), lösince zengin tekrarlı kinaz 2 (LRRK2), parkin, presenilin 1, presenilin 2, gama sekretaz, ölüm reseptörü 6 (DR6), amiloid prekürsör proteini (APP), p75 nörotrofin reseptörü (p75NTR), ve kaspaz 6 bulunur. Bir uygulamada, antijen, BACEI'dir.

Buradaki "doğal sekans" bir protein, doğal olarak ortaya çıkan proteinin varyantları dahil olmak üzere, doğada bulunan bir

proteinin amino asit sekansını içeren bir proteini belirtir. Burada kullanılan terim, doğal bir kaynaktan izole edilmiş veya rekombinant olarak üretilmiş olan proteini kapsar.

5 "Antikor" terimi burada en geniş anlamıyla kullanılır ve spesifik olarak monoklonal antikorları, poliklonal antikorları, en az iki adet eksiksiz/intakt antikordan oluşan multispesifik antikorları (ör. bispesifik antikorlar) ve istenen biyolojik aktiviteyi göstermeleri kaydıyla antikor fragmanlarını kapsar.

10 Buradaki "antikor fragmanları", antijene bağlanma özelliğini koruyan bir intakt antikorun bir kısmını içerir. Antikor fragmanlarının örnekleri arasında Fab, Fab', F(ab')₂, ve Fv fragmanları; diyakorlar; doğrusal antikorlar; tek-zincirli antikor molekülleri, örneğin tek zincirli Fab (scFab), scFv ve
15 antikor fragmanlarından oluşan multispesifik antikorlar bulunur. "Tek zincirli Fab" formatı, örneğin Hust M. et al. BMC Biotechnol. 2007 Mar 8;7:14 referanslı yayında tarif edilmektedir.

"Monoklonal antikor" terimi, burada kullanıldığı şekliyle,
20 monoklonal antikorun üretimi sırasında ortaya çıkabilecek olan ve genellikle küçük miktarlarda olan olası varyantlar haricinde büyük ölçüde homojen bir antikor popülasyonundan, yani popülasyonu içeren her bir antikorun özdeş olduğu ve/veya aynı epitopa bağlandığı bir antikor popülasyonundan elde
25 edilen bir antikoru belirtir. Farklı determinantlara/belirleyicilere (epitoplar) yöneltilen farklı antikorlar içeren poliklonal antikor preparatlarının aksine, her bir monoklonal antikor tipik olarak antijen üzerindeki tek bir belirleyiciye yöneltilir. Spesifik olmalarının yanı sıra,
30 monoklonal antikorlar, diğer immünoglobülinler tarafından kirletilmemiş olmaları bakımından da avantajlıdır. "Monoklonal" ifadesi, antikorun büyük ölçüde homojen bir antikor popülasyonundan elde edilmiş özellikte olduğunu belirtir ve antikorun, herhangi bir belirli metotla üretimini
35 gerektirecek şekilde sınırlandırılmamalıdır. Örneğin mevcut

buluša uygun olarak kullanılacak monoklonal antikoklar, ilk olarak Kohler ve dię., Nature 256:495 (1975) tarafından tarif edilen hibridom yöntemiyle yapılabilir ya da rekombinant DNA yöntemleriyle yapılabilir (bakınız, örneğın U.S. Patent No 4,816,567). "Monoklonal antikoklar" ayrıca, Clackson ve diğerleri, Nature, 352:624-628 (1991) ve Marks ve diğerleri, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) referanslı belgelerde tarif edilen teknikler kullanılarak faj antikok kütüphanelerinden izole edilebilir. Buradaki monoklonal antikokların spesifik örnekleri arasında kimerik antikoklar, hümanize antikoklar ve insan antikokları, örneğın antijen bağlayıcı fragmanları bulunur. Burada bahsi geçen monoklonal antikoklar arasında özellikle, ağır ve/veya hafif zincirin bir kısmının özel bir antikok sınıfı veya alt sınıfına ait veya özel bir türden köken alan antikoklardaki ilgili sekanslarla özdeş veya bu sekansların homologue olduğu "kimerik" antikokları (immünoglobülinleri) içerirken, zincir(ler)in geri kalanı, istenen biyolojik etkinliğı sergilemek koşuluyla, bir başka antikok sınıfına veya alt sınıfına ait veya bir başka türden köken alan antikoklardaki ilgili sekansların yanı sıra bu tür antikokların fragmanlarıyla özdeş veya bunların homologue (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison ve diğerleri, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). İlgili kimerik antikoklar burada bir insan dışı primattan (örneğın Eski Dünya Maymunu, örneğın babun, al yanaklı maymun veya sinomolgus maymunu) türetilen değışken domen antijen bağlanma sekansları ve insan sabit bölge sekansları (ABD Pat. No 5,693,780) içeren "primatlaştırılmış" antikokları içerir.

İnsan dışı (örn., murin) antikokların "insanlaştırılmış" biçimleri, minimum düzeyde insan dışı immünoglobülininden türetilen dizi içeren kimerik antikoklardır. İnsanlaştırılmış antikoklar çoğtu zaman insan immünoglobülinleridir (alıcı antikok), burada alıcının bir aşırı değışken bölgesine ait kalıntılar, insan olmayan bir türün (verici antikok), örneğın fare, sıçan, tavşan ya da istenen antikok spesifikliğine,

afinitesine ve kapasitesine sahip olan insan olmayan primatin bir aşırı değişken bölgesinden elde edilen kalıntılarla değiştirilir. Bazı durumlarda, insan immüoglobülinin çerçeve bölge (FR) kalıntıları, ilişkin insan olmayan kalıntılarla değiştirilir. Ayrıca, insanlaştırılmış antikolar, alıcı antikorda veya verici antikorda bulunmayan kalıntılar içerebilir. Bu modifikasyonlar antikor performansını daha da iyileştirmek için yapılır. Genellikle, insanlaştırılmış antikor, en az bir ve tipik olarak iki değişken domenin büyük ölçüde tamamını içerecek olup, bunların içinden aşırı değişken bölgelerin tamamı veya büyük ölçüde tamamı, insan olmayan bir immüoglobülininkilere denk düşer ve yukarıda belirtildiği gibi FR ornatımları dışında FR'lerin tamamı veya büyük ölçüde tamamı bir insan immüoglobülin sekansına aittir.

İnsanlaştırılmış antikor, isteğe bağlı olarak ayrıca, immüoglobülin sabit bölgesinin, tipik olarak bir insan immüoglobülinin en az bir kısmını içerir. Daha fazla ayrıntı için bkz., Jones ve diğerleri, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann ve diğerleri, Nature 332:323-329 (1988); ve Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Buradaki bir "insan antikoru", bir insan B hücrelerinden elde edilebilen bir antikorun amino asit sekansı yapısına karşılık gelen ve insan antikollarının antijen bağlayıcı fragmanlarını içeren bir amino asit sekans yapısı içeren bir antikordur. Bu tür antikolar çeşitli tekniklerle tanımlanabilir veya hazırlanabilir, bunlar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere şunlar bulunur: immünizasyondan sonra, endojen immüoglobülin üretimi yokluğunda insan antikolları üretebilen transgenik hayvanlarla (örneğin fareler) üretim (bakınız, örneğin, Jakobovits et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al, Year in Immuno., 7:33 (1993); ve US Patent No'ları 5,591,669, 5,589,369 ve 5,545,807)); insan antikollarını veya insan antikor fragmanlarını eksprese eden faj gösterim kütüphanelerinden seçim (bakınız, örneğin,

McCafferty et al, Nature 348:552-553 (1990); Johnson et al, Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993); Clackson et al, Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Griffith et al, EMBO J. 12:725-734 (1993); US Patent No'ları 5,565,332 ve 5,573,905); in vitro aktif B hücreleri yoluyla üretim (bakınız, ABD Patentleri 5,567,610 ve 5,229,275); ve insan antikoru üreten hibridomlardan izolasyon.

Buradaki "multispesifik bir antikor", en az iki farklı epitop için bağlayıcı özelliklere sahip bir antikordur. Örnek multispesifik antikorlar hem bir R/BBB'yi hem de bir beyin antijenini bağlayabilir. Multispesifik antikorlar, tam uzunluktaki antikorlar veya antikor fragmanları (örneğin F(ab')₂ bispesifik antikorları) olarak hazırlanabilmektedir. İki, üç veya daha fazla (örneğin dört) fonksiyonel antijen bağlanma yerine sahip tasarlanmış antikorlar da tasarlanmıştır (bakınız, örneğin, US Appln No. US 2002/0004587 A1, Miller et al.). Multispesifik antikorlar, tam uzunluklu antikorlar veya antikor fragmanları şeklinde hazırlanabilir.

Buradaki antikorlar, değiştirilmiş antijen bağlama veya biyolojik aktiviteye sahip "amino asit sekansı varyantlarını" içerir. Bu tür amino asit değişikliklerinin örnekleri arasında, antijen için arttırılmış afiniteye sahip antikorlar (örneğin, "afinitesi olgunlaştırılmış" antikorlar) ve Fc bölgesi değişmiş antikorlar, varsa, örneğin değiştirilmiş (arttırılmış veya azalmış) antikora bağlı hücresel sitotoksosite (ADCC) ve/veya kompleman bağımlı sitotoksositeye (CDC) sahip olan (bkz, örneğin, WO 00/42072, Presta, L. ve WO 99/51642, Iduosogie et al); ve/veya artmış veya azalmış serum yarı ömrüne sahip olan (bkz, örneğin, WO00/42072, Presta, L.) Fc bölgesi değişmiş antikorlar.

Bir "afinitesi modifiye edilmiş varyant", afiniteyi (artış veya azalma) değiştiren, bir ana antikorun (örneğin bir ana kimerik, hümanize veya insan antikorunun) bir veya daha fazla ornatılmış hiperdeğişken bölgesi veya çerçeve kalıntılarına

sahiptir. Bir uygulamada, ilave geliştirme için seçilen ortaya çıkan varyant(lar) mevcut buluşa göre R/BBB için düşük afiniteye sahip olacaktır. Bu tür ikame varyantlarını üretmenin uygun bir yolu faj göstergesini kullanır. Özetle, her bölgede tüm olası amino ornatımlarını üretmek için çok sayıda aşırı değişken bölge alanları (örneğin 6-7 bölge) mutasyona uğrattılır. Bu şekilde üretilen antikör varyantları, filamentöz faj parçacıklarından, her bir parçacığın içine paketlenen MI 3'ün gen III ürününe füzyonlar olarak tek değerlikli bir biçimde sunulur. Faj görüntüleme varyantları, daha sonra, kendi biyolojik aktivitesi (örn. bağlanma afinitesi) için taranır/incelenir. Modifikasyon için aday aşırı değişken bölge alanlarının tanımlanması için, antijen bağlanmasına belirgin ölçüde katkıda bulunan aşırı değişken bölge kalıntılarının tanımlanması amacıyla alanin tarama mutagenezi gerçekleştirilebilir. Alternatif veya ek olarak, antikör ve hedefi arasındaki temas noktalarının tanımlanması için, antijen-antikör kompleksinin bir kristal yapısını incelemek yararlı olabilir. Bu gibi temas kalıntıları ve komşu kalıntılar, burada ayrıntıları verilen tekniklere göre ornatım için adaydırlar. Bu tür değişkenler üretildikten sonra, değişkenlerin paneli, taramaya tabi tutulur ve değişmiş afiniteye sahip antikörler ilave geliştirme için seçilebilir. Buradaki antikör, eğer varsa Fc bölgesine bağlı herhangi bir karbonhidratın değişeceği şekilde bir "glikosilasyon varyantı" olabilir. Örneğin, antikörün bir Fc bölgesine tutturulmuş, fukozdan yoksun olgun bir karbonhidrat yapısına sahip antikörler ABD Pat. Başvuru No. US 2003/0157108 (Presta, F.) belgesinde anlatılmıştır. Ayrıca bakınız, U.S. 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Antikörün bir Fc bölgesine bağlı karbonhidratı bisekte eden N-asetilglukosamin (GlcNAc) içeren antikörlere şu yayında değinilmektedir: WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. ve US Patent No. 6,602,684, Umana et al. Antikörün bir Fc bölgesine bağlı oligosakaritte en az bir galaktoz artığına sahip antikörler, WO 1997/30087, Patel et al

yayınında bildirilmektedir. Fc bölgesine bağlı olarak değiştirilmiş karbonhidratlı antikörlerle ilgili olarak, bakınız, ayrıca, WO 1998/58964 (Raju, S.) ve WO 1999/22764 (Raju, S.). Ayrıca, modifiye edilmiş glikosilasyonlu antikörleri tarif eden US 2005/0123546 (Umana ve diğerleri) yayınını inceleyiniz. "Aşırı değişken bölge" terimi, burada kullanıldığında, bir antikörün antijen bağlanmasından sorumlu olan amino asit kalıntılarını belirtir. Aşırı değişken bölge, bir "tamamlayıcılık belirleme bölgesi" veya "CDR" den elde edilen amino asit kalıntılarını (örneğin, hafif zincir değişken domenindeki 24-34 (LI), 50-56 (L2) ve 89-97 (L3) kalıntılarını ve ağır zincir değişken domenindeki 31-35 (HI), 50-65 (H2) ve 95-102 (H3) kalıntılarını; Kabat ve diğ., Sequences of Polypeptides of Immunological Interest, 5'inci Baskı, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) ve/veya bir "aşırı değişken ilmekten" olan kalıntıları (örneğin, hafif zincir değişken domenindeki 26-32 (LI), 50-52 (L2) ve 91-96 (L3) kalıntılarını ve ağır zincir değişken domenindeki 26-32 (HI), 53-55 (H2) ve 96-101 (H3) kalıntılarını; Chothia ve Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) içerir. "Çerçeve" veya "FR" kalıntıları, burada tarif edilen şekilde aşırı değişken bölge kalıntılarının dışında kalan değişken domen kalıntılarıdır.

Bir "tam uzunluklu antikör", bir antijen bağlama değişken bölgesini, aynı zamanda bir hafif zincir sabit alanını (CL) ve CHI, CH2 ve CH3 ağır zincir sabit alanlarını içeren bir antikördür. Sabit domenler, doğal sekans sabit domenleri (örneğin, insan doğal sekansı sabit domenleri) veya bunların amino asit sekansı varyantı olabilir.

"Çıplak antikör", bir sitotoksik varlık, polimer veya radyoaktif işaret gibi heterolog bir moleküle konjuge edilmemiş bir antikördür (burada tanımlandığı gibi).

Antikör "efektör fonksiyonları" ifadesi, bir antikörün Fc bölgesine (bir natif sekans Fc bölgesi ya da amino asit sekansı varyantı Fc bölgesi) atfedilebilen biyolojik

aktiviteleri belirtir. Antikor efektör işlevleri örnekleri arasında, Clq bağlanması, kompleman bağımlı sitotoksiste (CDC), Fc reseptör bağlanması, antikor-bağımlı hücre aracılı sitotoksiste (ADCC), ve benzerleri bulunur. Bir uygulamada, 5 söz konusu antikor, burada aslen efektör işlevden yoksundur. "Antikor-bağımlı hücrel sitotoksiste (ADCC)" terimi, insan hedef hücrelerinin, efektör hücrelerin varlığında bir antikorla lizisi anlamına gelir. "Tamamlayıcı bağımlı sitotoksiste (CDC)" terimi, kompleman faktörü Clq'nin IgG 10 antikoru alt sınıflarının çoğunun Fc parçasına bağlanmasıyla başlatılan bir süreç anlamına gelir. Clq'in bir antikora bağlanmasına, ilgili bağlanma alanındaki tanımlanmış protein-protein etkileşimleri neden olur. Böyle Fc parçası bağlanma alanları tekniğin mevcut durumunca bilinmektedir. Bu tür Fc 15 parçası bağlanma alanları, örneğin, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, ve P329 amino asitleri ile karakterize edilir (Rabat'ın AB endeksine göre numaralandırma). IgG1, IgG2 ve IgG3 alt sınıfı antikorlar genellikle tamamlayıcı aktivasyonu, örneğin Clq ve C3 bağlanması gösterirken IgG4, 20 tamamlayıcı sistemi aktive etmez ve Clq ve/veya C3'ü bağlamaz. Tam uzunluklu antikorlar ağır zincirlerinin sabit domeninin amino asit sekansına bağlı olarak farklı "sınıflara" ayrılabilir. Beş ana tam uzunluklu antikor sınıfı bulunmaktadır: IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM ve bunların birkaçı 25 ayrıca alt sınıflara (izotipler) ayrılabilir; örn. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA ve IgA2. Farklı antikor sınıflarına karşılık gelen ağır zincir sabit domenleri bu sırasıyla alfa, delta, epsilon, gamma ve mu olarak adlandırılır. Farklı immünoglobülin sınıflarının alt birim yapıları ve üç boyutlu 30 konfigürasyonları iyi bilinmektedir. "Rekombinant antikor" terimi, burada kullanıldığı şekilde, antikoru kodlayan nükleik asidi ihtiva eden bir rekombinant konakçı hücre tarafından eksprese edilen bir antikor (örneğin bir kimerik, hümanize veya insan antikoru veya antijen bağlayıcı fragmanı) anlamına 35 gelir. Rekombinant antikorları üretmek için "konak hücrelerin"

örnekleri şunları içerir: (1) memeli hücreleri, örneğin, Çin hamster yumurtalığı (CHO), COS, miyelom hücreleri (Y0 cğ NSO hücreleri dahil), bebek hamster böbreği (BHK), Hela ve Vero hücreleri; (2) böcek hücreleri, örneğin, sf9, sf21 ve Tn5; (3) bitki hücreleri, örneğin Nikotiana cinsine ait bitkiler (örneğin Nicotiana tabacum); (4) maya hücreleri, örneğin, Sakkaromises cinsine ait olanlar (örneğin Sakkaromyces cerevisiae) veya Aspergillus cinsi (örneğin Aspergillus Niger); (5) bakteriyel hücreler, örneğin Escherichia, coli hücreleri veya Bacillus subtilis hücreleri ve benzeri bulunur. Burada kullanıldığı şekilde, "spesifik olarak bağlanma" veya "spesifik olarak bağlanır" ifadeleri, seçici veya tercihen bir antijene bağlanan bir antikora karşılık gelir. Bağlanma afinitesi genel olarak Scatchard analizi veya yüzey plazmon rezonans tekniği gibi standart bir test kullanılarak belirlenir (örneğin BIACORE® kullanılarak).

Bir referans antikoru olarak "aynı epitopa bağlanan bir antikor", bir rekabet deneyinde referans antikorunun antijenine olan bağını % 50 veya daha fazla engelleyen bir antikora karşılık gelir ve tersi şekilde, bir rekabet deneyinde referans antikoru, antikorun antijenine olan bağını %50 veya daha fazla engelleyen bir antikor anlamına gelir.

Burada kullanıldığı haliyle "sitotoksik ajan" terimi, hücrel bir fonksiyonu inhibe eden veya önleyen ve/veya hücrelerin ölümüne veya imhasına neden olan bir maddeyi ifade eder. Sitotoksik maddeler kapsamı dahilinde, fakat bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, radyoaktif izotoplar (örn., At211, 1131, 1125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 ve Lu'nun radyoaktif izotopları); kemoterapötik ajanlar, (örn., metotreksat, adriamisin, vinka alkaloidler (vinkristin, vinblastin, etopozit), doksorubisin, melfalan, mitomisin C, klorambusil, daunorubisin ya da diğer araya sokulan ajanlar); büyüme inhibitörü ajanlar; enzimler ve bunların fragmanları, örneğin nükleolitik enzimler; antibiyotikler; toksinler, örneğin küçük moleküllü toksinler ya da bakteriyel, fungal,

bitkisel ya da hayvansal kökenli enzimatik olarak aktif toksinler ve bunların fragmanları bulunur.

Bir ajanın, örneğin bir farmasötik formülasyonun "etkili bir miktarı", istenen terapötik veya profilaktik sonucu elde etmek için gereken dozajlar ve sürelerde etkili olan bir miktarı ifade eder.

"Fc bölgesi" terimi burada bir immünglobülin ağır zincirinin, sabit bölgenin en azından bir kısmını barındıran bir C-terminal bölgesini tanımlamak için kullanılır. Fc bölgesi, bir immünoglobülinin CH2 ve CH3 domenlerini içerir. Bu terim natif sekansın Fc bölgelerini ve varyant Fc bölgelerini içerir. Bir uygulamada bir insan IgG ağır zincir Fc bölgesi, Cys226'dan veya Pro230'dan, ağır zincirin karboksil ucuna uzanır. Ancak, Fc bölgesinin C terminal lizini (Lys447) mevcut olabilir veya olmayabilir. Burada aksi belirtilmediği sürece, Fc bölgesinde veya sabit bölgedeki amino asit kalıntılarının numaralandırılması AB numaralandırma sistemine veya diğer adıyla AB indeksine göre olup, Kabat ve diğ. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. basım. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 referanslı yayında tarif edilen şekildedir.

"Çerçeve" veya "FR", aşırı değişken bölge (HVR) kalıntıları haricindeki değişken domen kalıntılarını ifade eder. Bir değişken domenin FR'si genellikle dört FR domeninden oluşmaktadır: FR1, FR2, FR3 ve FR4. Buna göre, HVR ve FR sekansları genellikle VH (veya VL) içinde aşağıdaki sekansla görülür: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"CH2-CH3 Ig varlığı" terimi, burada kullanıldığı şekilde, immünoglobülin CH2 veya CH3 domenlerinden elde edilen bir protein varlığı anlamına gelir. "CH2-CH3 Ig varlığı", bir dimer oluşturan iki "CH2-CH3" polipeptidi içerir. İmmünoglobülin IgG, IgA, IgD, IgE veya IgM olabilir. Bir uygulamada, CH2-CH3 Ig varlığı bir IgG immünoglobülin den elde edilir ve burada "CH2-CH3 IgG varlığı" olarak adlandırılır. Terim, doğal CH2-CH3 sekansının domenlerini ve varyant CH2-CH3

domenlerini içerir. Bir uygulamada, "CH2-CH3 Ig varlığı", Cys226 veya Pro230 ile ağır zincirin karboksil-ucu arasında uzanan insan ağır zinciri CH2-CH3 IgG bölgesinden elde edilir. Ancak, Fc bölgesinin C terminal lizini (Lys447) mevcut 5 olabilir veya olmayabilir. Burada aksi belirtilmediği sürece, CH2-CH3 domeni bölgesi veya sabit bölgedeki amino asit kalıntılarının numaralandırılması AB numaralandırma sistemine veya diğer adıyla AB endeksine göre olup, Kabat ve diğ. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. basım. 10 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 referanslı yayında tarif edilen şekildedir. Bir "konjüгат", bir veya daha fazla heterolog molekülüne, örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir etiket, nörolojik bozukluk ilacı veya sitotoksik maddeye konjüge 15 edilmiş mevcut buluşun füzyon proteindir. Burada kullanılan bir "bağlayıcı", kan beyin bariyeri mekiğinin ve/veya füzyon proteininin ve/veya bu buluşun konjugatının farklı varlıklarını kovalent olarak bağlayan bir kimyasal bağlayıcıya veya tek zincirli bir peptit bağlayıcıya 20 karşılık gelir. Bağlayıcı, örneğin beyin efektör varlığını tek değerlikli bağlanma varlığına bağlar. Örneğin, tek değerli bağlama varlığı, bir CH2-CH3 Ig varlığı ve kan beyin bariyeri reseptörüne yönelmiş bir scFab'a yönelmişse, bağlayıcı, scFab'ı CH3-CH2 Ig varlığının C terminali ucuna bağlar. Beyin 25 efektör varlığını tek değerlikli bağlanma varlığına (birinci bağlayıcı) bağlayan bağlayıcı ve scFab'ı CH2-CH3 Ig domeninin C terminali ucuna (ikinci bağlayıcı) bağlayan bağlayıcı aynı veya farklı olabilir. Peptit bağlarıyla birleştirilen bir ila yirmi amino asitten 30 oluşan tek zincirli peptit bağlayıcıları kullanılabilir. Belirli uygulamalarda, amino asitler yirmi doğal olarak oluşan amino asitten seçilir. Başka belirli uygulamalarda, bir veya daha fazla amino asit, glisin, alanin, prolin, asparagin, glutamin ve lizin arasından seçilir. Başka uygulamalarda, 35 bağlayıcı, bir kimyasal bağlayıcıdır. Belirli uygulamalarda,

bahsedilen bağlayıcı, en az 25 amino asit uzunluklu, tercihen ile bir 32 ila 50 amino asit uzunluklu bir amino asit sekansına sahip olan tek bir zincirli peptiddir. Bir uygulamada bahsedilen bağlayıcı, G = glisin, S = serin ile, (x =3, n= 8, 9 veya 10 ve m= 0, 1, 2 veya 3) veya (x = 4 ve n= 6, 7 veya 8 ve m= 0, 1, 2 veya 3), tercihen x = 4, n= 6 veya 7 ve m= 0, 1, 2 veya 3 ile, daha tercihen x = 4, n= 7 ve m= 2 ile (GxS)n'dir. Bir uygulamada bahsedilen bağlayıcı, (G4S)4 (Seq. Id. No. 17)'dir. Bir uygulamada bahsedilen bağlayıcı, (G4S)6G2 (Seq. Id. No. 13)'tür.

Konjügasyon, çeşitli kimyasal bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilebilir. Örneğin, tek değerli bağlama varlığı veya füzyon proteini ve beyin efektör varlığı, çeşitli bifonksiyonel protein kenetleyici ajanlar kullanılarak konjüge edilebilecek olup, bunların arasında örneğin N-süksinimidil-3-(2-piridiltiyo) propiyonat (SPDP), süksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1-karboksilat (SMCC), iminotiyoloan (IT), bifonksiyonel imidoester türevleri (örneğin dimetil adipimidat HCl), aktif esterler (örneğin disüksinimidil suberat), aldehitler (örneğin glutaraldehit), bis-azido bileşikler (örneğin bis (p-azidobenzoil) heksandiamin), bis-diazonyum türevleri (örneğin bis-(p-diazonyumbenzoil)-etilendiamin), diizosiyanatlar (örneğin tolüen 2,6-diizosiyanat) ve bis-aktif flor bileşikleri (örneğin 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen) bulunur. Bağlayıcı, efektör varlığının beyne iletimi üzerine salımını kolaylaştıran bir "ayrılabilir bağlayıcı" olabilir. Örneğin, bir aside dayanıksız bağlayıcı, peptidaza duyarlı bağlayıcı, ışığa dayanıksız bağlayıcı, dimetil bağlayıcı ya da disülfit içeren bağlayıcı (Chari ve diğerleri, Cancer Res. 52: 127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020) kullanılabilir.

Kovalent konjügasyon doğrudan veya bir bağlayıcı aracılığıyla olabilir. Belirli uygulamalarda, doğrudan konjügasyon, bir protein füzyonunun oluşturulması ile (başka bir deyişle, tek değerlikli bağlanma varlığını bir R/BBB ve efektör varlığına

kodlayan iki genin genetik füzyonu ve tek bir protein şeklinde eksprese edilmesi) olur. Belirli uygulamalarda, doğrudan konjugasyon, R/BBB'ye karşı tek değerlikli bağlanma varlığının iki kısmının biri üzerindeki bir reaktif grubu ve beyin 5 efektör varlığı üzerindeki karşılık gelen bir grup veya akseptör arasında bir kovalent bağ oluşturulması ile olur. Belirli uygulamalarda, doğrudan konjugasyon, uygun koşullar altında konjüge edilecek diğer moleküle kovalent bir bağ oluşturan reaktif bir grup içerecek şekilde konjüge edilecek 10 iki molekülden birinin (sınırlayıcı olmayan örnekler olarak, bir sülfhidril grubu veya bir karboksil grubu) modifikasyonu yoluyla (başka bir deyişle, genetik modifikasyon). Sınırlayıcı olmayan bir örnek olarak, bir arzu edilen reaktif gruplu (başka bir deyişle, bir sistein kalıntısı) bir molekül 15 (başka bir deyişle, bir amino asit), örneğin, R/BBB antikoruна karşı monovalent bağlanma varlığına ve nörolojik ilaçla oluşturulmuş bir disülfid bağına dahil edilebilir. Nükleik asitlerin proteinlere kovalent konjugasyonu için yöntemler de teknikte bilinmektedir (başka bir deyişle, foto çapraz 20 bağlantılama, bakınız, örneğin, Zatsepin et al. Russ. Chem. Rev. 74: 77-95 (2005)) Konjugasyon ayrıca çeşitli bağlayıcılar kullanılarak da yapılabilir. Örneğin, bir tek değerli bağlama varlığı ve bir beyin efektör varlığı, çeşitli bifonksiyonel protein kenetleyici ajanlar kullanılarak konjüge edilebilecek 25 olup, bunların arasında örneğin N-süksinimidil-3-(2-piridiltiyö) propiyonat (SPDP), süksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1-karboksilat (SMCC), iminotiyoloan (IT), bifonksiyonel imidoester türevleri (örneğin dimetil adipimidat HCl), aktif esterler (örneğin 30 disüksinimidil suberat), aldehitler (örneğin glutaraldehit), bis-azido bileşikler (örneğin bis (p-azidobenzoil) heksandiamin), bis-diazonyum türevleri (örneğin bis-(p-diazonyumbenzoil)-etilendiamin), diizosiyanatlar (örneğin tolüen 2,6-diizosiyanat) ve bis-aktif flor bileşikleri 35 (örneğin 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen) bulunur. Peptit

bağlarıyla birleştirilen bir ila yirmi amino asitten oluşan peptit bağlayıcıları da kullanılabilir. Belirli bu gibi uygulamalarda, amino asitler yirmi doğal olarak oluşan amino asitten seçilir. Başka belirli böyle uygulamalarda, bir veya 5 daha fazla amino asit, glisin, alanin, prolin, asparagin, glutamin ve lizin arasından seçilir. Bağlayıcı, efektör varlığının beyne iletimi üzerine salımını kolaylaştıran bir "ayrılabilir bağlayıcı" olabilir. Örneğin, bir aside dayanıksız bağlayıcı, peptidaza duyarlı bağlayıcı, ışığa 10 dayanıksız bağlayıcı, dimetil bağlayıcı ya da disülfid içeren bağlayıcı (Chari ve diğerleri, Cancer Res. 52: 127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020) kullanılabilir.

Bir "etiket", buradaki füzyon proteini ile birleştirilmiş ve tespit veya görüntüleme için kullanılan bir markördür. Bu gibi 15 etiketlerin örnekleri arasında radyo etiket, bir florofor, bir kromofor veya bir afinite etiketi bulunur. Bir uygulamada, etiket, medikal görüntüleme için kullanılan bir radyoetiket, örneğin tc99m veya 1123'tür veya nükleer manyetik rezonans (nmr) görüntüleme için bir döner etiket (manyetik rezonans 20 görüntüleme, mri olarak da bilinen), örneğin iyot-123 tekrar, iyot-131, indiyum-111, flor-19, karbon-13, nitrojen-15, oksijen-17, gadolinyum, manganez, demir ve benzeridir. Bir "birey" veya "kişi", bir memelidir. Memeliler, bunlarla sınırlı olmamak üzere, ehlileştirilmiş hayvanlar (örneğin 25 inekler, koyun, kediler, köpekler ve atlar), primatlar (örneğin insanlar ve insan harici primatlar, örneğin maymunlar), tavşanlar ve kemirgenleri (örneğin fareler ve sıçanlar) kapsar. Belirli uygulamalarda, birey veya hasta bir insandır.

30 Bir "izole edilmiş" antikor, doğal ortamındaki bir bileşenden ayrılmış bir antikordur. Bazı uygulamalarda, bir antikor, örneğin elektroforetik (örneğin SDS-PAGE, izoelektrik odaklama (IEF), kapiler elektroforezi) veya kromatografi (örneğin iyon değişimi veya ters faz HPLC) ile belirlendiği şekilde %95 veya 35 %99'dan fazla oranda saflaştırılır. Antikor saflığını

değerlendirmeye yönelik yöntemler için bakınız, örn. Flatman ve diğ. J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

"Prospektüs" terimi, terapötik ürünlerin ticari ambalajlarına alışıldığı üzere dahil edilen ve endikasyonlar, kullanım, 5 dozaj, uygulama, kombinasyon terapisi, kontraendikasyonlar ve/veya bu gibi terapötik ürünlerin kullanımına yönelik uyarılarla ilgili bilgiler içeren talimatları ifade eder.

"Farmasötik formülasyon" ifadesi, içinde bulunan aktif bileşenin biyolojik aktivitesinin etkili olmasına olanak 10 tanıyacak bir biçimde bulunan ve formülasyonun uygulanacağı bir hasta için kabul edilemeyecek düzeyde toksik olan hiçbir ilave bileşen içermeyen bir preparatı ifade eder.

Bir "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı", bir kişi için toksik olmayan, etken madde dışındaki bir farmasötik 15 formülasyondaki bir terkip maddesi anlamına gelir. Farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, bir tampon, yardımcı madde, stabilizatör veya koruyucu içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "tedavi" ifadesi (ve bunun 20 "tedavi etmek" veya "tedavi eden" gibi gramatik varyasyonları), tedavi edilen bireyin doğal seyrini değiştirmek amacıyla yapılan klinik bir girişimi belirtir ve profilaksi amacıyla ya da klinik patolojinin seyri sırasında gerçekleştirilebilir. Tedavinin istenen etkileri, bunlarla 25 sınırlı olmamak üzere, hastalığın ortaya çıkışının veya nüksetmesinin önlenmesi, semptomların hafifletilmesi, hastalığın doğrudan veya dolaylı herhangi bir patolojik sonucunun azaltılması, metastazın önlenmesi, hastalığın ilerleme hızının azaltılması, hastalık durumunun 30 iyileştirilmesi ya da palyasyonu ve iyileştirilmiş prognozu kapsar. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun antikorumları, bir hastalığın gelişimini geciktirmek veya bir hastalığın ilerleyişini yavaşlatmak için kullanılır.

Bileşimler ve yöntemler

35 Mevcut beyanın yöntemleri ve bir imalat ürünleri, bir R/BBB'ye

bağlanan bir kan beyin bariyeri mekiği ve/veya füzyon proteinini kullanır veya dahil eder. Tek değerlikli bağlanma varlığının üretimi veya taraması için kullanılacak olan R/BBB antijeni, örneğin, bir çözünür veya bunların arzu edilen epitopu içeren bir kısmı biçiminde (örneğin ekstraselüler domen) olabilir. Alternatif olarak veya ayrıca, BBB-R'i hücre yüzeylerinde eksprese eden hücreler monovalent bağlanma varlığı üretmek veya taramak için kullanılabilir. Monovalent bağlanma varlığı üretmek için yararlı olan diğer R/BBB formları, teknikte uzman kişilerce açıkça görülecektir. Buradaki R/BBB örnekleri arasında, transferrin reseptörü (TfR), insülin reseptörü, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGF-R), düşük yoğunluk lipoprotein reseptörü, protein 1 (LRP1) ile ilgili ve LRP8 ve heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme faktörü (HB-EGF).

Mevcut buluşa göre, bir "tek değerli bağlanma" varlığı, burada, böyle tek değerlikli bağlanma varlığı gösteriminin, MSS (örneğin, beyin) alımını arttıracaklarını gösteren verilere dayalı olarak TfR'ye karşı seçilir. Bu tür bir bağlanma varlığını tanımlamak için, bunlarla sınırlı olmamak üzere, monovalent bağlanma modunu ölçmek için çeşitli testler mevcuttur: Scatchard deneyi ve yüzey plazmon rezonans tekniği (örneğin BIACORE® kullanılarak) ve burada açıklanan in vivo incelemeler.

Mevcut beyan, bir beyin efektör varlığının, örneğin bir nörolojik bozukluk ilacının, kan-beyin bariyeri boyunca taşınması için yararlı bir tek değerlikli bağlanma varlığını yapma yöntemi sağlamakta olup, yöntem, bir tek değerlikli bağlanma varlığının, R/BBB için monovalent bir bağlanma moduna sahip olmasından ötürü bir R/BBB'ye karşı bir tek değerli bağlanma parçaları paneli arasından seçilmesini içerir. Tek değerlikli bağlanma modu, reseptörlerin normal hücre içi sıralamalarını engellemeyerek belirli R/BBB'ler için verimli BBB geçişi sağlar.

Bir nöropati bozukluk için, seçilebilecek olan bir nörolojik

ilaç, bir analjeziktir, örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir narkotik/opioit analjezik (başka bir deyişle, morfin, fentanil, hidrokodon, meperidin, metadon, oksimorfon, pentazosin, propoksifen, tramadol, kodein ve oksikodon), bir
5 nonsteroidal antienflamatuvar ilaç (NSAID) (başka bir deyişle, ibuprofen, naproksen, diklofenak, diflunisal, etodolak, fenoprofen, flurbiprofen, indometasin, ketorolak, mefenamik asit, meloksikam, nabumeton, oksaprozin, piroksikam, sulindak ve tolmetin), bir kortikosteroid (başka bir deyişle, kortizon,
10 prednizon, prednisolon, deksametazon, metilprednisolon ve triamsinolon), bir antimigren maddesi (başka bir deyişle, sumatriptin, almotriptan, frovatriptan, sumatriptan, rizatriptan, eletriptan, zolmitriptan, dihidroergotamin, eletriptan ve ergotamin), asetaminofen, bir salisilat (başka
15 bir deyişle, aspirin, kolon salisilat, magnezyum salisilat, diflunisal, ve salsalat), bir anti-konvulsan (başka bir deyişle, karbamazepin, klonazepam, gabapentin, lamotrigin, pregabalin, tiagabin, ve topiramet), bir anestetik (başka bir deyişle, izofluran, trikloroetilen, halothan, sevofluran,
20 benzokain, kloroprokain, kokain, siklometikain, dimetokain, propoksikain, prokain, novokain, proparakain, tetrakain, artikain, bupivakain, kartikain, sinkokain, etidokain, levobupiva-kain, lidokain, mepivakain, piperokain, prilokain, ropivakain, trimekain, saksitoksin ve tetrodotoksin), ve bir
25 koks-2 inhibitörüdür (başka bir deyişle, selesoksib, rofesoksib, ve valdesoksib). Vertigonun dahil olduğu bir nöropati bozukluk için, seçilebilecek olan bir nörolojik ilaç, bir anti-vertigo maddesi, örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, meklizin, difenhidramin, prometazin ve diazepamdır.
30 Bulantının dahil olduğu bir nöropati bozukluk için seçilebilecek olan bir nörolojik ilaç, bir anti-bulantı maddesi, örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, prometazin, klorpromazin, proklorperazin, trimetobenzamit ve metoklopramit bulunur. Bir nörodejeneratif hastalık için
35 seçilebilecek olan bir nörolojik ilaç, bir büyüme hormonu veya

nörotrofik faktördür; örnekleri arasında bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-4/5, fibroblast büyüme faktörü (FGF)-2 ve diğer FGF'ler, nörotrofin (NT)-3, 5 eritropoietin (EPO), hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-alfa, TGF-beta, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), interlökin-1 reseptör antagonisti (IL-1ra), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), gliyal-türevli nörotrofik faktör (GDNF), nörturin, 10 trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), heregulin, nöregulin, artemin, persefin, interlökinler, gliyal hücre hattı türevli nörotrofik faktör (GFR), granülosit-koloni uyarıcı faktör (CSF), granülosit-makrofaj-CSF, netrinler, kardiyotrofin-1, dikenliler, lösemi inhibe edici faktör (LIF), midkin, 15 pleiotrofin, kemik morfogenetik proteinler (BMP'ler), netrinler, sapozinler, semaforinler ve kök hücre faktörü (SCF) bulunur. Kanser için, seçilebilecek olan bir nörolojik ilaç, bir kemoterapötik maddedir. Örnekleri kemoterapötik maddeler arasında, alkilleyici maddeler örneğin tiyotepa ve CYTOXAN® 20 siklofosfamid; alkil sülfonatlar örneğin busülfan, improsülfan ve piposülfan; aziridinler örneğin benzodopa, karbokuon, meturedopa, ve uredopa; etileniminler ve metilamelaminler örneğin, altretamin, trietilenmelamin, trietilenfosforamit, trietiylentiyofosfor-amit ve 25 trimetilolomelamin; asetojeninler (özellikle bullatasin ve bullatasinon); delta -9-tetrahidrokannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapakon; lapakol; kolşisinler; betulinik asit; bir kamptotesin (örneğin sentetik analog topotekan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotekan, CAMPTOSAR®), 30 asetilkamptotesin, skopolektin, ve 9-aminokamptotesin); briyostatin; kalistatin; CC-1065 (örneğin adozelesin, karzelesin ve bizelesin sentetik analogları); podofillotoksin; podofillinik asit; tenipozid; kriptofisinler (özellikle kriptofisin 1 ve kriptofisin 8); dolastatin; duokarmisin 35 (örneğin sentetik analogları, KW-2189 ve CB1-TM1);

eleuterobin; pankratistatin; bir sarkodiktin; spongistatin;
nitrojen hardalları örneğin klorambusil, klornafazin,
kolofosfamid, estramustin, ifosfamid, mekloretam, mekloretam
oksit hidroklorür, melfalan, novembikhin, fensterin,
5 prednimustin, trofosfamid, urasil hardal; nitrozüreler örneğin
karmustin, klorozotosin, fotemustin, lomustin, nimustin, ve
ranimustin; antibiyotikler örneğin enedin antibiyotikleri
(örneğin, kalikeamisin, özellikle kalikeamisin gammal ve
kalikeamisin omegal (bakınız, örneğin, Agnew, Chem Inti. Ed.
10 Engl, 33: 183-186 (1994))); dinemisin, örneğin, dinemisin A;
bir esperamisin; ve neokarzinostatin kromofor ve ilgili
kromoprotein enedin antiobiyotik kromoforları),
aklasinomisinerler, aktinomisin, autramisin, azaserin,
bleomisinerler, kaktinomisin, karabisin, karminomisinerler,
15 karzinofilin, kromomisinerler, daktinomisin, daunorubisin,
detorubisin, 6-diazo-5-okso-L-norlösin, ADRIAMYCIN®
doksorubisin (örneğin, morfolino-doksorubisin,
siyanomorfolino-doksorubisin, 2-pirrolino-doksorubisin ve
deoksidoksorubisin), epirubisin, esorubisin, idarubisin,
20 marsellomisinerler, mitomisinerler örneğin mitomisin C, mikofenolik
asit, nogalamisin, olivomisinerler, peplomisinerler, potfiromisin,
puromisin, kelamisinerler, rkokuubisin, streptonigrin,
streptozosin, tübersitin, ubenimeks, zinostatin, zorubisin;
anti-metabolitler örneğin metotreksat ve 5-florourasil (5-FU);
25 folik asit analogları örneğin denopterin, metotreksat,
pteropterin, trimetreksat; purin analogları örneğin
fludarabin, 6-merkaptopurin, tiyamiprin, tiyoguanin; pirimidin
analogları örneğin ansitabin, azasitidin, 6-azauridin,
karmofur, sitarabin, dideoksiuridin, doksifluridin,
30 enositabin, floksuridin; androjenler örneğin kalusteron,
droenanolon propiyonat, epitiostanol, mepitiostan,
testolakton; anti-adrenaller örneğin aminoglutetimit, mitotan,
trilostan; folik asit tazeleyici örneğin frolinik asit;
aseglaton aldofosfamid glikosid; aminolevulinik asit;
35 enilurasil; amsakrin; bestrabusil; bisantren; edatraksat;

defofamin; demekolsin; diazikuon; elfomitin; elliptinyum
asetat; bir epotilon; etoglusid; galyum nitrat; hidroksiüre;
lentinan; lonidainin; maytansinoidler örneğin maytansin ve
ansamitosinler; mitoguazon; mitoksantron; mopidanmol;
5 nitraerin; pentostatin; fenamet; pirarubisin; losoksantron; 2-
etilhidrazit; prokarbazin; PSK® polisakkarit kompleksi (JHS
Natural Products, Eugen, OR); razoksan; rizoksin; sizofiran;
spirogermanyum; tenuazonik asit; triazikuon; 2,2',2"-
triklorotrietilamin; trikotekenler (özellikle T-2 toksin,
10 verrakurin A, roridin A ve anguidin); uretan; vindesin
(ELDISINE®, FILDESIN®); dakarbazin; mannomustin; mitobronitol;
mitolaktol; pipobroman; gasitozin; arabinozid ("Ara-C");
tiyotepa; taksoidler, örneğin, Taxol® paklitaksel (Bristol-
Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM
15 Kremoforsuz, paklitakselin albümin ile geliştirilmiş
nanoparçacık formülasyonu (American Pharmaceutical Partners,
Schaumburg, Illinois), ve Taxotere® doksetaksel (Rhone-Poulenc
Rorer, Antony, Fransa); kloranbusil; gemitabin (GEMZAR®); 6-
tiyoguanin; merkaptopurin; metotreksat; platin analogları
20 örneğin cis-platin ve karboplatin; vinblastin (VELBAN®);
platin; etopozid (VP-16); ifosfamid; mitoksantron; vinkristin
(ONCOVIN®); oksaliplatin; lökovovin; vinorelbin (NAVELBINE®);
novantron; edatreksat; daunomisin; aminopterin; ibantronat;
topoisomeras inhibitörü RFS 2000; diflorometlilomitin (DMFO);
25 retinoidler örneğin retinoik asit; kapesitabin (XELODA®);
yukarıdakilerin herhangi birinin farmasötik olarak kabul
edilebilir tuzları, asitleri veya türevleri; ve
yukarıdakilerin iki veya daha fazlasının kombinasyonu örneğin
CHOP, bir siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve
30 prednizolonun birleşik tedavisi için bir kısaltma ve 5-FU ve
lökovovin ile birleştirilmiş oksaliplatin (ELOXATINTM) ile
tedavi rejiminin kısaltması olan FOLFOX bulunur.

Kemoterapötik ajanların bu tanımında ayrıca, kanser büyümesini
kolaylaştırabilecek hormonların etkilerini düzenleyici,
35 azaltıcı, bloke edici ya da inhibe edici etki gösteren ve

genellikle sistemik ya da tüm vücut tedavisi biçiminde olan anti-hormonal ajanlar da bulunmaktadır. Bunların kendileri de hormon olabilir. Örnekler arasında anti-östrojenler ve seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM'ler), örneğin tamoksifen (NOLVADEX® tamoksifen de dahil), EVISTA® raloksifen, droloksifen, 4-hidroksitamoksifen, trioksifen, keoksifen, LY 117018, onapriston ve FARESTON® toremifen; anti-progesteronlar; östrojen reseptörü aşağı-düzenleyicileri (ERD'ler); yumurtalıkları bastırma ya da kapatma fonksiyonu gösteren ajanlar, örneğin lötinize edici hormon salan hormon (LHRH) agonistleri, örneğin LUPRON® ve ELIGARD® löprolit asetat, goserelin asetat, buserelin asetat ve tripterelein; diğer anti-androjenler, örneğin flutamid, nilutamit ve bikalutamit; ve böbreküstü bezinde östrojen üretimini düzenleyen aromataz enzimini inhibe eden aromataz inhibitörleri, örneğin 4(5)-imidazoller, aminoglutetimit, MEGASE® megestrol asetat, AROMASIN® eksemestan, formestan, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol ve ARIMIDEX® anastrozol bulunur. Ayrıca, kemoterapötik maddelerin bu tür tanımları arasında, bisfosfonatlar örneğin klodronat (örneğin, BONEFOS® veya OSTAC®), DIDROCAL® etidronat, NE-58095, ZOMETAX® zoldronik asit/zoldronat, FOSAMAX® alendronat, AREDIA® pamidronat, SKELID® tiludronat veya ACTONEL® risedronat; ve troksasitabin (bir 1,3-dioksolan nükleosid sitozin analogu); antisens oligonükleotidleri, özellikle anormal hücre proliferasyonunda belirtilen sinyal yollarında genlerin ekspresyonunu inhibe edenler, örneğin, PKC-alfa, Raf, H-Ras, ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGF-R); aşılarda örneğin THERATOPE® aşı ve gen terapisi aşılarda, örneğin, ALLOVECTIN® aşısı, LEUVECTIN® aşısı, ve VAXID® aşısı; LURTOTECAN® topoizomera 1 inhibitörü; ABARELLX® rnrH; lapatinib ditosilat (bir ErbB-2 ve EGFR dual tirozin kinaz küçük-moleküllü inhibitör, GW572016 olarak da bilinir); ve yukarıdakilerin herhangi birinin farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları, asitleri veya türevleri bulunur.

Kanser tedavisi veya önlenmesi için nörolojik ilaçlar olarak seçilebilecek başka bir bileşik grubu, anti-kanser immüoglobülinleri (örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, trastuzumab, bevacizumab, alemtuksumab, setuksimab, 5 gentuzumab ozogamisin, ibritumomab tiuksetan, panitumumab ve rituksimab)'dır. Bazı durumlarda, antikorlar, örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir radyoetiketli tositumomab, toksik bir etiketle birlikte arzu edilen hücreleri (başka bir deyişle, kanser hücreleri) hedeflemek ve 10 öldürmek için kullanılabilir.

Bir oküler hastalık veya bozukluk için seçilebilir olan bir nörolojik ilaç, bir anti-anjiyojenik oftalmik madde (başka bir deyişle, bevacizumab, ranibizumab ve pegaptanib), bir oftalmik glakom maddesi (başka bir deyişle, karbakol, epinefrin, 15 demekaryum bromür, apraslonidin, brimonidin, brinzolamit, levobunolol, timolol, betaxolol, dorzolamit, bimatoprost, karteolol, metipranolol, dipivefrin, travoprost ve latanoprost), bir karbonik anhidraz inhibitörü (başka bir deyişle, metazolamit ve asetazolamit), bir oftalmik 20 antihistamin (başka bir deyişle, nafazolin, fenilefrin ve tetrahidrozolin), bir oküler kaydırıcı madde, bir oftalmik steroid (başka bir deyişle, florometolon, prednisolon, loteprednol, deksametazon, difluprednat, rimeksolon, fluosinolon, mekuruzon ve triamsinolon), bir oftalmik 25 anestetik (başka bir deyişle, lidokain, proparakain ve tetrakain), bir oftalmik anti-enfektif (başka bir deyişle, levofloksasin, gatifloksasin, ciprofloksasin, moksif oksasin, kloramfenikol, basitrasin/polimiksin b, sülfasetamit, tobramisin, azitromisin, besifloksasin, norfloksasin, 30 sülfizoksazol, gentamisin, idoksuridin, eritromisin, natamisin, gramisitit, neomisin, ofloksasin, trif uridin, gansiklovir, vidarabin), bir oftalmik antienflamatuvar madde (başka bir deyişle, nepafenak, ketorolak, flurbiprofen, suprofen, siklosporin, triamsinolon, diklofenak ve bromfenak), 35 ve bir oftalmik antihistamin veya dekonjestan (başka bir

deyişle, ketotifen, olopatadin, epinastin, nafazolin, kromolin, tetrahidrozolin, pemirolast, bepotastin, nafazolin, fenilefrin, nedokromil, lodoksamit, fenilefrin, emedastin ve azelastin) olabilir. Bir nöbet bozukluğu için nörolojik bir ilaç seçilebilir, bunlar arasında, bir antikonvulzan veya antiepileptik örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, barbiturat antikonvulzanlar (başka bir deyişle, primidon, metarbital, mefobarbital, allobarbital, amobarbital, aprobarbital, alfenal, barbital, brallobarbital ve fenobarbital), benzodiazepin antikonvulzanlar (başka bir deyişle, diazepam, klonazepam, ve lorazepam), karbamat antikonvulzanlar (başka bir deyişle felbamat), karbonik anhidraz inhibitör antikonvulzanlar (başka bir deyişle, asetazolamit, topiramet ve zonisamit), dibenzazepin antikonvulzanlar (başka bir deyişle, rufinamit, karbamazepin, ve okskarbazepin), yağ asidi türevli antikonvulzanlar (başka bir deyişle, divalproeks ve valproik asit), gama-aminobutirik asit analogları (başka bir deyişle, pregabalin, gabapentin ve vigabatrin), gama-aminobutirik asit alım inhibitörleri (başka bir deyişle, tiagabin), gama-aminobutirik asit transaminaz inhibitörleri (başka bir deyişle, vigabatrin), hidantoin antikonvulzanlar (başka bir deyişle fenitoin, etotoin, fosfenitoin ve mefenitoin), çeşitli antikonvulzanlar (başka bir deyişle, lakosamit ve magnezyum sülfat), progestinler (başka bir deyişle, progesteron), oksazolidindiyon antikonvulzanlar (başka bir deyişle, parametadiyon ve trimetadiyon), pirrolidin antikonvulzanlar (başka bir deyişle, levetirasetam), süksinimit antikonvulzanlar (başka bir deyişle, etosuksimit ve metsuksimit), triazin antikonvulzanlar (başka bir deyişle, lamotrigin), ve üre antikonvulzanlar (başka bir deyişle, fenasemid ve fenturid) bulunur.

Bir lizozomal depolama hastalığı için seçilebilecek bir nörolojik ilaç, kendisi veya başka türlü, hastalıkta bozulmuş olan enzimin aktivitesini taklit eden bir ilaçtır. Lizozomal depo bozukluklarının tedavisi için örnek rekombinant enzimler

arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, U.S. Patent Başvuru Yayın No. 2005/0142141'de zikredilenler (başka bir deyişle, alfa-L-iduronidaz, iduronat-2-sülfataz, N-sülfataz, alfa-N-asetilglukosaminidaz, N-asetil-galaktosamin-6-sülfataz, beta-galaktosidaz, arilsülfataz B, beta-glukuronidaz, asit alfa-glukosidaz, glukoserebrosidaz, alfa-galaktosidaz A, heksosaminidaz A, asit sfingomyelinaz, beta-galaktoserebrosidaz, beta-galaktosidaz, arilsülfataz A, asit seramidaz, aspartoasilaz, palmitoil-protein tiyoesteraz 1 ve trip eptidil amino peptidaz 1) bulunur.

Amiloidoz için seçilebilecek olan bir nörolojik ilaç, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, özellikle aşağıdakilerden seçilen bir hedefe bağlanan bir antikör veya diğer bağlayıcı molekül (örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, küçük bir molekül, bir peptid, bir aptamer veya diğer protein bağlayıcı) olabilir: beta sekretaz, tau, presenilin, amiloid prekürsör proteini veya kısımları, amiloid beta peptidi veya oligomerleri veya fibrilleri, ölüm reseptörü 6 (DR6), gelişmiş glikasyon son ürünleri için reseptör (RAGE), parkin ve huntingtin; bir kolinesteraz inhibitörü (başka bir deyişle, galantamin, donepezil, rivastigmin ve takrin); bir NMDA reseptör antagonisti (başka bir deyişle, memantin), bir monoamin depletörü (başka bir deyişle, tetrabenazin); bir ergoloit mesilat; bir antikolinergik antiparkinsonizm maddesi (başka bir deyişle, prosiklidin, difenhidramin, triheksilfenidil, benztropin, biperiden ve triheksifenidil); bir dopaminerjik antiparkinsonizm maddesi (başka bir deyişle, entakapon, selegilin, pramipeksol, bromokriptin, rotigotin, selegilin, ropinirol, rasagilin, apomorfin, karbidopa, levodopa, pergolit, tolkapon ve amantadin); bir tetrabenazin; bir antienflamatuvar (örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir nonsteroidal antienflamatuvar ilaç (başka bir deyişle, indometisin ve yukarıda sayılan diğer bileşikler); bir hormon (başka bir deyişle, östrojen, progesteron ve löprolit); bir vitamin (başka bir deyişle, folat ve

nikotinamid); dimebolin; bir homotaurin (başka bir deyişle, 3-aminopropansülfonik asit; 3 APS); bir serotonin reseptör etkinlik modülatörü (başka bir deyişle, ksaliproden); bir interferon ve bir glukokortikoid.

- 5 Viral veya mikrobiyal bir hastalık için seçilebilecek olan bir nörolojik ilaç, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir antiviral bileşik (örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir adamantan antiviral (başka bir deyişle, rimantadin ve amantadin), bir antiviral interferon (başka bir deyişle, peginterferon alfa-2b), bir kemokin reseptör antagonisti (başka bir deyişle, maravirok), bir integraz iplikçik transfer inhibitörü (başka bir deyişle, raltegravir), bir nöraminidaz inhibitörü (başka bir deyişle, oseltamivir ve zanamivir), bir non-nükleosid ters transkriptaz inhibitörü (başka bir deyişle, efavirenz, etravirin, delavirdin ve nevirapin), bir nükleosid ters transkriptaz inhibitörleri (tenofovir, abakavir, lamivudin, zidovudin, stavudin, entekavir, emtrisitabin, adefovir, zalsitabin, telbivudin ve didanozin), bir proteaz inhibitörü (başka bir deyişle, darunavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, ritonavir, nelfmavir, amprenavir, indinavir ve sakonavir), bir purin nükleosid (başka bir deyişle, valasiklovir, famsiklovir, asiklovir, ribavirin, gansiklovir, valgansiklovir ve sitofovir), ve bir çeşitli antiviraller (başka bir deyişle, enfuvirtid, foskarnet, palivizumab ve fomivirsen)), bir antibiyotik (örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir aminopenisillin (başka bir deyişle, amoksisillin, ampisillin, oksasillin, nafsillin, kloksasillin, dikloksasillin, flukoksasillin, temosillin, azlosillin, karbenisillin, tikarsillin, mezlosillin, piperasillin ve bakampisillin), bir sefalosporin (başka bir deyişle, sefazolin, sefalekssin, sefalotin, sefamandol, seftriakson, sefotaksim, sefpodoksime, seftazidim, sefadroksil, sefradin, lorasarbef, sefotetan, sefuroksim, sefprozil, sefaklor, ve sefoksitin), bir karbapenem/penem (başka bir deyişle, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem

ve doripenem), bir monobaktam (başka bir deyişle, aztreonam, tigemonam, norkardikin A ve tabtoksinin-beta-laktam, bir betalaktamaz inhibitörü (başka bir deyişle, klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam) başka bir beta-laktam antibiyotik ile
5 birlikte, bir aminoglikosid (başka bir deyişle, amikasin, gentamisin, kanamisin, neomisin, netilmisin, streptomisin, tobramisin, ve paromomisin), bir ansamisin (başka bir deyişle, geldanamisin ve herbimisin), bir karbasefem (başka bir deyişle, lorasarbef), bir glikopeptidler (başka bir deyişle,
10 teikoplanin ve vankomisin), bir makrolid (başka bir deyişle, azitromisin, klaritromisin, diritromisin, eritromisin, roksitromisin, trolandomisin, telitromisin ve spektinomisin), bir monobaktam (başka bir deyişle, aztreonam), bir kinolon (başka bir deyişle, siprofloksasin, enoksasin, gatifloksasin,
15 levofloksasin, lomefloksasin, moksifloksasin, norfloksasin, ofloksasin, trovafloksasin, grepafloksasin, sparfloksasin ve temafloksasin), bir sülfonamid (başka bir deyişle, mafenid, sülfonamidokrisoidin, sülfasetamid, sülfadiazin, sülfametizol, sülfanilamid, sülfasalazin, sülfizoksazol, trimetoprim,
20 trimetoprim ve sülfametoksazol), bir tetrasiklin (başka bir deyişle, tetrasiklin, demeklosiklin, doksisisiklin, minosiklin ve oksitetrasiklin), bir antineoplastik veya sitotoksik antibiyotik (başka bir deyişle, doksorubisin, mitoksantron, bleomisin, daunorubisin, daktinomisin, epirubisin, idarubisin,
25 plikamisin, mitomisin, pentostatin ve valrubisin) ve çeşitli antibakteriyel bileşikler (başka bir deyişle, bakitrasin, kolistein ve polimiksin B)), bir antifungal (başka bir deyişle, metronidazol, nitazoksanid, imidazol, klorokin, iyodokinol ve paromomisin), ve bir antiparasitik (örneğin,
30 bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, kinin, klorokin, amodiakin, pirimetamin, sülfhadoksin, proguanil, meflokin, atovakuon, primakin, artemesinin, halofantrin, doksisisiklin, klindamisin, mebendazol, pirantel pamoat, tiyabendazol, dietilkarbamazin, ivermektin, rifampin, amfoterisin B, melarsoprol, efornitin ve
35 albendazol) olabilir. İskemi için seçilebilecek bir nörolojik

ilaçlar arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir trombolitik (başka bir deyişle, urokinaz, alteplaz, reteplaz ve tenekteplaz), bir trombosit agregasyon inhibitörü (başka bir deyişle, aspirin, silostazol, klopidogrel, prasugrel ve dipiridamol), bir statin (başka bir deyişle, lovastatin, pravastatin, fiuvastatin, rosuvastatin, atorvastatin, simvastatin, serivastatin ve pitavastatin), ve kan akışını veya vasküler esnekliği geliştirmek için bir bileşik, örneğin, sınırlayıcı olmamak kaydıyla kan basınç ilaçları bulunur.

10 Bir davranışsal bozukluk için seçilebilecek bir nörolojik ilaç, davranış değiştirici bileşik, örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir atipik antipsikotik (başka bir deyişle, risperidon, olanzapin, apripiprazol, quetiapin, paliperidon, asenapin, klozapin, iloperidon ve ziprasidon), bir fenotiyazin antipsikotik (başka bir deyişle, proklorperazin, klorpromazin, flufenazin, perfenazin, trifluoperazin, tiyoridazin ve mezoridazin), bir tiyoksanten (başka bir deyişle, tiyotiksene), bir muhtelif antipsikotik (başka bir deyişle, pimozid, lityum, molindon, haloperidol ve loksapin), bir

15 selektif serotonin alımı inhibitörü (başka bir deyişle, sitalopram, essitalopram, paroksetin, fluoksetin ve sertralin), bir serotonin-norepinefrin alımı inhibitörü (başka bir deyişle, duloksetin, venlafaksin, desvenlafaksin, bir trisiklik antidepresan (başka bir deyişle, doksepin, klomipramin, amoksapin, nortriptilin, amitriptilin, trimipramin, imipramin, protriptilin ve desipramin), bir tetrasiklik antidepresan (başka bir deyişle, mirtazapin ve maprotilin), bir fenilpiperazin antidepresan (başka bir deyişle, trazodon ve nefazodon), bir monoamin oksidaz

20 inhibitörü (başka bir deyişle, izokarboksazid, fenelzin, selegilin ve tranilsipromin), bir benzodiazepin (başka bir deyişle, alprazolam, estazolam, flurazepam, klonazepam, lorazepam ve diazepam), bir norepinefrin-dopamin alımı inhibitörü (başka bir deyişle, bupropiyon), bir MSS uyarıcı

25 (başka bir deyişle, fentermin, dietilpropiyon, metamfetamin,

30

35

dekstroamfetamin, amfetamin, metilfenidat, deksmetilfenidat, lisdeksamfetamin, modafmil, pemolin, fendimetrazm, benzfetamin, fendimetrazm, armodafmil, dietilpropiyon, kafein, atomoksetin, doksapram, ve mazindol), bir
5 anksiyolitik/sedatif/hipnotik (örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir barbiturat (başka bir deyişle, sekobarbital, fenobarbital ve mefobarbital), bir benzodiazepin (yukarıda tarif edilen şekilde) ve bir muhtelif anksiyolitik/sedatif/hipnotik (başka bir deyişle
10 difenhidramin, sodyum oksibat, zaleplon, hidroksizin, kloral hidrat, aolpidem, buspiron, doksepin, eszopiklon, ramelteon, meprobamat ve etklorvinol)), bir sekretin (bakınız, örneğin, Ratliff-Schaub ve diğerleri *Autism* 9: 256-265 (2005)), bir opioit peptidi (bakınız, örneğin, Cowen et al, *J. Neurochem.* 89:273-285 (2004)), ve bir nöropeptid (bakınız, örneğin, Hethwa ve diğerleri *Am. J. Physiol.* 289: E301-305 (2005)) olabilir.

MSS enflamasyonu için, enflamasyonun kendisine hitap eden (başka bir deyişle, bir non-steroidal antiinflamatuvar madde,
20 örneğin ibuprofen veya naproksen) veya enflamasyonun altında yatan nedeni tedavi eden (başka bir deyişle, bir anti-viral veya anti-kanser madde) bir nörolojik ilaç seçilebilir.

Başka bir uygulamada beyin efektör varlığı, sağlam veya tam uzunlukta bir antikordur. İntakt antikordur ağır zincirlerinin
25 sabit domeninin amino asit sekansına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılabilir. Beş ana intakt antikordur sınıfı vardır: IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM ve bunların birkaçı ayrıca alt sınıflara (izotipler) ayrılabilir; örn. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA ve IgA2. Farklı antikordur sınıflarına karşılık gelen
30 ağır zincir sabit domenleri, sırasıyla α , δ , ϵ , γ ve μ olarak adlandırılır. Farklı immünoglobülin sınıflarının alt birim yapıları ve üç boyutlu konfigürasyonları iyi bilinmektedir. Bir uygulamada, intakt antikordur efektör fonksiyondan yoksundur. Antikordur üretme teknikleri bilinmektedir ve bu dokümanın tanım
35 bölümünde yukarıda örnekler verilmiştir. Bir uygulamada, söz

konusu antikör, bir kimerik, hümanize veya insan antikörüdür veya antijen bağlayıcı fragmanlarıdır.

5 Monovalent bağlanma varlığının R/BBB'ye bağlanmasının saptanması için çeşitli teknikler mevcuttur. Böyle bir test, insan R/BBB (beyin antijen) bağlanması bakımından kabiliyet için bir enzime bağlı immünosorbent testidir (ELISA). Bu teste göre, antijen ile kaplanmış plakalar (örneğin rekombinant sR/BBB), R/BBB'ye doğru tek değerlikli bağlanma varlığını içeren bir örnek ile enkübe edilir ve tek değerlikli bağlama 10 varlığının ilgi duyulan antijene bağlanması belirlenir.

Bir görünümde mevcut buluşun tek değerli bağlanma varlığı, antijen bağlanma aktivitesi bakımından, örneğin ELISA, Western blot vb. bilinen metotlarla test edilir.

15 Bir görünümde, mevcut buluşun tek değerlikli bağlanma varlığı, X ışını yapı saptamasının epitop eşleştirmesi kullanılarak bir R/BBB'ye doğru tekli antijen bağlanma etkinliği bakımından test edilmiştir.

Sistemik olarak verilen kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатının alımı ve kan beyin bariyeri mekiğinin ve/veya 20 konjüгатının diğer biyolojik aktivitelerini değerlendirmek için testler, örneklerde açıklanan şekilde veya ilgi duyulan kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı için bilinen şekilde gerçekleştirilebilir. MSS'nin parankim boşluğu içinde konsantrasyonunu ölçmek, örneğin etiketli kan beyin bariyeri 25 mekiği ve/veya konjüгатın ELISA veya radyoaktivite ölçümleriyle birlikte mikrodializ veya kapiler tükenme metodu kullanılarak da kullanılabilir.

Farmasötik formülasyonlar

Mevcut buluşa uygun kullanılan kan beyin bariyeri mekiğinin 30 ve/veya konjüгатının terapötik formülasyonları, opsiyonel farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, ekspiyanlar veya stabilizatörler ile karıştırılarak (Remington's Pharmaceutical Sciences 16'ncı baskı, Osol, A. Ed. (1980)), liyofilize edilmiş formülasyonlar veya sulu çözeltiler 35 biçiminde depolama için hazırlanırlar. Kabul edilebilir

taşıyıcılar, eksipiyanlar veya stabilizatörler, uygulanan dozajlarda ve konsantrasyonlarda alıcılar için toksik değildir ve bunların arasında tamponlar, örneğin fosfat, sitrat ve diğer organik asitler; askorbik asit ve metiyonin dahil antioksidanlar; koruyucular (örneğin oktadesildimetilbenzil amonyum klorür; heksametyum klorür; benzalkonyum klorür, benzetonyum klorür; fenol, bütil veya benzil alkol; alkil parabenler, örneğin metil veya propil paraben; katekol; resorsinol; sikloheksanol; 3-pentanol; ve m-kresol); düşük molekül ağırlıklı (yaklaşık 10 rezidünün altında) polipeptidler; proteinler, örneğin serum albümin, jelatin veya immünoglobülinler; hidrofilik polimerler, örneğin polivinilpirolidon; amino asitler, örneğin glisin, glutamin, asparagin, histidin, arginin veya lizin; monosakaritler, disakaritler ve diğer karbonhidratlar, örneğin glukoz, mannoz veya dekstrinler; şelatlama maddeleri, örneğin EDTA; şekerler, örneğin sukroz, manitol, trehaloz veya sorbitol; tuz oluşturan karşı iyonlar, örneğin sodyum; metal kompleksleri (örn. Zn-protein kompleksleri); ve/veya iyonik olmayan yüzey aktif maddeler, örneğin TWEEN™, PLURONICS™ veya polietilen glikol (PEG) bulunur.

Buradaki formülasyon ayrıca, tercihe göre, birbirini olumsuz yönde etkilemeyen tamamlayıcı aktiviteleri olanlarda, gerektiği kadar birden fazla aktif bileşik içerebilir. Bu tür ilaçların tipi ve etkili miktarları, örneğin formülasyonda bulunan kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjugat miktarına ve deneklerin klinik parametrelerine bağlıdır. Bu tür örnek ilaçlar aşağıda tartışılmıştır.

Aktif bileşenler ayrıca, örneğin koaservasyon teknikleriyle ya da interfasiyel polimerizasyonla hazırlanan mikrokapsüller, örneğin, sırasıyla hidrosimetilselüloz ya da jelatin mikrokapsüller ve poli-(metilmetasilat) mikrokapsüller içinde, kolloidal ilaç dağıtım sistemleri (örneğin, lipozomar, albümin mikrokürecikleri, mikroemülsiyonlar, nano-parçacıklar ve nanokapsüller) ya da makroemülsiyonlar içinde hapsedilebilir.

Bu gibi teknikler, Remington's Pharmaceutical Sciences 16'ncı baskı, Osol, A. Ed. (1980) yayınında açıklanmıştır.

Sürekli salımlı preparatlar hazırlanabilir. Sürekli salımlı preparasyonların uygun örnekleri arasında, antikoru içeren katı hidrofobik polimerlerin yarı geçirgen matrisleri bulunabilir ve bu matrisler, şekilli malzemeler, örn. filmler veya mikrokapsüller biçiminde olur. Sürekli salımlı matrislerin örnekleri arasında polyesterler, hidrojel (örneğin, poli(2-hidroksietil-metakrilat) ya da poli(vinilalkol)), polilaktitler (U.S. Pat. No. 3,773,919), L-glutamik asit ve γ etil-L-glutamat kopolimerleri, bozunmaz etilen-vinil asetat, bozunur laktik asit-glikolik asit kopolimerleri, örneğin LUPRON DEPOT™ (laktik asit-glikolik asit kopolimeri ve löprolit asetatın oluşan enjekte edilebilir mikrokürecikler) ve poli-D-(-)-3-hidroksibütirik asit bulunur.

İn vivo uygulamada kullanılacak olan formülasyonların steril olması gerekir. Sterillik, steril filtrasyon membranları içerisinden filtrasyon yoluyla kolaylıkla sağlanır. Bir uygulamada, formülasyon izotoniktir.

Kan beyin bariyeri mekiği ve/veya buluşun konjüгатı, çeşitli in vivo yöntemlerde kullanılabilir. Örneğin, mevcut beyan, BBB boyunca terapötik bir bileşiğin taşınması için bir yöntem sağlar, bu yöntem, kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатının, tek değerli bağlama varlığının buraya kenetlenmiş terapötik bileşiği BBB boyunca taşıyacağı şekilde BBB'ye maruz bırakılmasını içerir. Başka bir örnekte, mevcut beyan, bir nörolojik bozukluk ilacın BBB boyunca taşınması yöntemini sağlamakta olup, yöntem, kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатının, tek değerli bağlama varlığının buraya kenetlenmiş nörolojik bozukluk ilacını BBB boyunca taşıyacağı şekilde BBB'ye maruz bırakılmasını içerir. Bir uygulamada, buradaki BBB, bir memelide (örneğin bir insanda), bunlarla sınırlı olmamak üzere, aşağıdaki bir nörolojik bozukluğu olan bir memelide bulunur: Alzheimer hastalığı (AD), inme, demans,

kas distrofisi (MD), multipl skleroz (MS), amiyotrofik lateral skleroz (ALS), kistik fibroz, Angelman's sendromu, Liddle sendromu, Parkinson hastalığı, Pick hastalığı, Paget hastalığı, kanser, travmatik beyin hasarı ve benzeri.

5 Bir uygulamada, nörolojik bozukluk aşağıdakilerden seçilir: bir nöropati, amiloidoz, kanser (örneğin MSS veya beyini içeren), bir oküler hastalık veya bozukluk, bir viral veya mikrobiyal enfeksiyon, enflamasyon (örneğin MSS veya beyinin), iskemi, nörodejeneratif hastalık, kasılma, davranışsal
10 bozukluk, lizozomal depolama hastalığı ve benzeri.

Nöropati bozuklukları, uygunsuz veya kontrolsüz sinir sinyalleşmesi veya eksikliği ile karakterize sinir sistemi hastalıkları veya anomalileri olup, bunlar arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, kronik ağrı (örneğin nosiseptif
15 ağrı), vücut dokularının zarar görmesinden kaynaklanan ağrı, örneğin, kanser ile ilgili ağrı, nöropatik ağrı (sinirlerdeki, omurilikteki veya beyindeki anormalliklerin neden olduğu ağrı), ve psikogenik ağrı (tamamen veya çoğunlukla bir psikolojik bozuklukla ilgili), genellikle vertigo veya mide
20 bulantısı gibi nöropati bozukluklarına eşlik eden baş ağrısı, migren, nöropati ve semptomlar ve sendromları bulunur.

Amiloidozlar, MSS'deki hücre dışı proteinli birikintilerle ilişkili bir hastalık ve bozukluk grubu olup, örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, ikincil amiloidoz, yaşa
25 bağlı amiloidoz, Alzheimer's hastalığı (AD), Hafif bilişsel bozukluk (MCI), Lewy cisimcikli demans, Down sendromu, herediter serebral hemoraji ile amiloidoz (Dutch tipi); Guam Parkinson-demans kompleksi, Beyin amiloid anjiyopatisi, Huntington hastalığı, progresif supranükleer palsi, multipl
30 skleroz; Creutzfeldt Jacob hastalığı, Parkinson hastalığı, bulaşıcı süngerimsi ensefalopati, HIV ile ilgili demans, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), inklüzyon-vücut miyozidi (IBM), ve beta-amiloid birikimi ile ilgili oküler hastalıklar (başka bir deyişle, maküler dejenerasyon, drusen ile ilgili
35 optik nöropati ve katarakt) bulunur.

MSS kanserleri, bir veya daha fazla MSS hücrelerinin (başka bir deyişle, bir sinir hücresi) anormal proliferasyonu ile karakterizedir ve bunlar arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, gliyom, glioblastoma multiforme, menenjiyom, 5 astrositom, akustik nöroma, kondroma, oligodendrogliyom, medulloblastomus, ganglioglioma, Schwannoma, nörofibrom, nöroblastom, ve ekstradural, intrameduller veya intradural tümörler bulunur.

MSS'nin viral veya mikrobiyal enfeksiyonları arasında, 10 bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, virüslerin (yani, influenza, HIV, poliovirus, rubella), bakterilerin (yani, Neisseria sp., Streptococcus sp., Pseudomonas sp., Proteus sp., E. coli, S. aureus, Pneumococcus sp., Meningococcus sp., Haemophilus sp., ve Mycobacterium tuberculosis) ve diğer 15 mikroorganizmaların örneğın, mantarlar (yani, maya, Cryptococcus neoformans), bulunur, MSS patofizyolojileri ile sonuçlanan parazitler (yani, toxoplasma gondii) veya amipler arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, menenjit, ensefalit, myelit, vaskulit ve akut veya kronik olabilen apse 20 bulunur. MSS enflamasyonu, MSS'ne verilen bir hasarının neden olduğu enflamasyondur, bu bir fiziksel hasar (başka bir deyişle, bir kaza, cerrahi, beyin travması, omurilik yaralanması, sarsıntı) veya MSS'nin başka bir veya daha fazla hastalık veya bozuklukları ile ilgili bir hasar (başka bir 25 deyişle, apse, kanser, viral veya mikrobiyal enfeksiyon) olabilir.

MSS'nin iskemisi, burada kullanıldığı şekilde, beyinde anormal kan akışı veya vasküler davranışla veya bunun nedenleriyle ilgili bir grup bozukluğu ifade eder ve bunlarla sınırlı 30 kalmamak kaydıyla şunları içerir: fokal beyin iskemisi, global beyin iskemisi, inme (başka bir deyişle, subaraknoid hemoraji ve intraserebral hemoraji), ve anevrizma.

Nörodejeneratif hastalıklar, MSS'de nöral hücre fonksiyon kaybı veya ölümlle ilişkili bir hastalık ve bozukluk grubudur 35 ve bunlar arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla:

adrenolökodistrofi, Alexander's hastalığı, Alper's hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz, Ataksi telenjiektazi, Batten hastalığı, cockayne sendromu, kortiküsobazik dejenerasyon, bir amiloidozun neden olduğu veya ilişkili dejenerasyon, 5 Friedreich ataksisi, frontotemporal lop dejenerasyonu, Kennedy's hastalığı, çoklu sistem atrofisi, multipl skleroz, birincil lateral skleroz, progresif supranükleer palsi, spinal musküler atrofi, transvers miyelit, Refsum's hastalığı ve spinoserebellar ataksi bulunur.

10 MSS'nin nöbet hastalıkları ve bozuklukları, MSS'deki uygunsuz ve/veya anormal elektrik iletimini içerir ve bunlar arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla: epilepsi (başka bir deyişle, yoksunluk nöbetleri, atonik nöbetler, iyi huylu Rolandik epilepsi, çocukluk yoksunluğu, klonik nöbetler, 15 kompleks kısmi nöbetler, frontal lob epilepsisi, ateşli nöbetler, infantil spazmlar, juvenil miyoklonik epilepsi, genç yoksunluk epilepsisi, Lennox-Gastaut sendromu, Landau-Kleffner sendromu, Dravet's sendromu, Otahara sendromu, West sendromu, miyoklonik nöbetler, mitokondril bozukluklar, progresif 20 miyoklonik epilepsiler, psikogenik nöbetler, refleks epilepsi, Rasmussen sendromu, basit kısmi nöbetler, sekonder genel nöbetler, temporal lob epilepsisi, toniklonik nöbetler, tonik nöbetler, psikomotor nöbetler, limbik epilepsi, kısmi-başlangıç nöbetleri, genel-başlangıç nöbetleri, status 25 epileptikus, abdominal epilepsi, akinetik nöbetler, otonomik nöbetler, masif bilateral miyoklonus, katamenial epilepsi, damla nöbetleri, emosyonel nöbetler, fokal nöbetler, gelastik nöbetler, Jacksonian March, Lafora hastalığı, motor nöbetler, multifokal nöbetler, noktürnal nöbetler, ışık duyarlı nöbet, 30 psödo nöbetler, duyuşal nöbetler, gizli nöbetler, silvan nöbetleri, çekilme nöbetleri ve görsel refleks nöbetleri) bulunur.

Davranış bozuklukları, MSS'nin etkilenen kişinin anormal davranışı ile karakterize olan bozukluklar olup, bunlar 35 arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla: uyku

bozuklukları (başka bir deyişle, insomnia, parasomnias, kabuslar, sirkadyen ritm uyku bozuklukları, ve narkolepsi), duygudurum bozuklukları (başka bir deyişle, depresyon, suicidal depresyon, anksiyete, kronik efektif bozukluklar, fobiler, panik ataklar, obsesif-kompulsif bozukluk, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (ADHD), dikkat eksikliği bozukluğu (ADD), kronik yorgunluk sendromu, agorafobi, travma sonrası stres bozukluğu, bipolar bozukluk), yeme bozuklukları (başka bir deyişle, anoreksi veya bulimia), psikozlar, gelişimsel davranış bozuklukları (başka bir deyişle, otizm, Rett's sendromu, Aspberger sendromu), kişilik bozuklukları ve psikotik bozukluklar (başka bir deyişle, şizofreni, sanrılı bozukluk ve benzerleri) bulunur.

Lizozomal depolama bozuklukları, bazı durumlarda CNS ile ilişkili veya MSS-spesifik semptomları bulunan metabolik bozukluklar olup; bu tür bozukluklar arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla aşağıdakiler bulunur: Tay-Sachs hastalığı, Gaucher's hastalığı, Fabry hastalığı, Mukopolisakkaridoz (tipler I, II, III, IV, V, VI ve VII), glikojen depolama hastalığı, GM1-Gangliosidoz, metakromatik lökodistrofi, Farber hastalığı, Canavan lökodistrofisi ve nöronal seroit lipofuskinoz tipleri 1 ve 2, Niemann-Pick hastalığı, Pompe hastalığı ve Krabbe's hastalığı bulunur.

Bir görünümde, bir ilaç olarak kullanılmak üzere mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı sunulmaktadır. Ayrı görünümelerde, bir nörolojik hastalığı veya bozukluğu tedavi etmede kullanım için mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı sunulmaktadır (örneğin, Alzheimer's hastalığı). Belirli uygulamalarda, bir tedavi yönteminde kullanıma yönelik mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı sunulmaktadır. Belirli uygulamalarda, mevcut buluş, bireye etkili bir miktardaki mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатının uygulanmasını içeren uygulanmasını içeren bir nörolojik hastalık veya bozukluğun bir bireyin tedavi edilmesinin bir yönteminde

kullanım için mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатını sağlamaktadır. Yukarıdaki uygulamalardan herhangi birine göre bir "birey" tercihe göre bir insandır.

Mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı ya
5 tek başına ya da bir terapideki diğer maddeler ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin, mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı, en az bir ilave terapötik madde ile birlikte verilebilir. Belirli uygulamalarda, ilave bir terapötik madde, mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği
10 ve/veya konjüгатı, tedavi için kullanılırken aynı veya farklı bir nörolojik bozukluğu tedavi etmek için etkili olan bir terapötik maddedir. Örnek ilave terapötik maddeler arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla şunlar bulunur: yukarıda tarif edilen çeşitli nörolojik ilaçlar, kolinesteraz
15 inhibitörleri (örneğin donepezil, galantamin, rovastigmin ve takrin), NMDA reseptör antagonistleri (örneğin memantin), amiloid beta peptid agregasyon inhibitörleri, antioksidanlar, γ-sekretaz modülatörleri, sinir büyüme faktörü (NGF) mimikleri veya NGF gen terapisi, PPARγ agonistleri, HMS-CoA redüktaz
20 inhibitörleri (statinler), ampakinler, kalsiyum kanal blokörleri, GABA reseptör antagonistleri, glikojen sentaz kinaz inhibitörleri, intravenöz immünoglobülin, muskarinik reseptör agonistleri, nikrotinik reseptör modülatörleri, aktif veya pasif amiloid beta peptid immünizasyonu, fosfodiesteraz
25 inhibitörleri, serotonin reseptör antagonistleri ve anti-amiloid beta peptid antikorları. Bazı uygulamalarda, en az bir ilave terapötik madde, nörolojik ilacın bir veya daha fazla yan etkisini hafifletme kabiliyeti nedeniyle seçilir.

Bu gibi yukarıda belirtilen kombinasyon terapileri birlikte
30 uygulamayı (burada iki veya daha fazla terapötik ajan, aynı ya da farklı formülasyonlara dahil edilir) ve ayrı uygulamayı içermekte olup, ayrı uygulama durumunda, mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı uygulanması, ilave terapötik ajan ve/veya adjuvanın uygulanmasından önce,
35 eşzamanlı olarak ve/veya ardından gerçekleştirilebilir. Mevcut

buluşun kan beyin bariyeri mekikleri ve/veya konjüгатları ayrıca, diğer girişimsel tedavilerle, örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, radyasyon terapisi, davranışsal terapi veya teknikte bilinen ve tedavi edilecek veya önlenecek nörolojik bozukluk için uygun olan diğer terapilerle birlikte de kullanılabilir. Mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı (ve herhangi bir ilave terapötik madde) herhangi bir uygun yolla uygulanabilir, örneğin parenteral, intrapulmoner ve intranazal ve, arzu edilirse lokal tedavi için, intralezyonel uygulama ile verilebilir. Parenteral infüzyonlar arasında intramusküler, intravenöz, intraarteriyel, intraperitoneal ya da subkütanöz uygulama bulunur.

Doz uygulaması herhangi bir uygun yolla, örneğin kısmen uygulamanın kısa süreli ya da sürekli olmasına bağlı olarak enjeksiyon yoluyla, örneğin intravenöz ya da subkütanöz enjeksiyonlarla yapılabilir. Çeşitli doz uygulama planları, örneğin bunlarla sınırlı kalmamak üzere, çeşitli zaman noktalarında tek değerlikli ya da çoklu uygulamalar, bolus uygulama ve atımlı infüzyon burada düşünülmüştür.

Mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатları, iyi tıbbi uygulamalarla uyumlu bir şekilde formüle edilir, dozlanır ve uygulanır. Bu bağlamda dikkate alınması gereken faktörler arasında, tedavi edilen belirli bozukluk, tedavi edilen memeli, hasta bireyin klinik durumu, bozukluğun nedeni, ajanın uygulanma alanı, uygulama yöntemi, uygulama planı ve tıp doktorları tarafından bilinen diğer faktörler bulunur. Mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатları, zorunlu olmamak kaydıyla, ancak isteğe bağlı olarak, ilgili bozukluğun önlenmesi ya da tedavi edilmesinde güncel olarak kullanılan bir veya daha fazla madde ile birlikte formüle edilir. Bu gibi diğer maddelerin etkili miktarı, formülasyonda mevcut bulunan kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатı miktarına, bozukluk ya da tedavi türüne ve yukarıda ele alınan diğer faktörlere bağlıdır. Bunlar genellikle aynı dozajlarda

ve burada tarif edilen uygulama yollarıyla ya da burada tarif edilen dozajların yaklaşık %1 ila %99'u arasında ya da deneysel olarak/klinik olarak uygun olduğu belirlenmiş olan herhangi bir dozaj ve herhangi bir yolla kullanılır.

5 Hastalık önlenmesi ya da tedavisi için, mevcut buluşun kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатının uygun dozajı (tek başına ya da bir veya daha fazla başka ilave terapötik ajanla birlikte kullanıldığında), tedavi edilecek olan hastalığın türüne, kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатının türüne, 10 hastalığın ciddiyetine ve seyrine, antikorun önleyici ya da terapötik amaçla uygulanmasına, terapi geçmişine, hastanın klinik geçmişine ve kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатına yanıtına ve hastaya bakan doktorun takdirine bağlı olarak değişir. Söz konusu kan beyin bariyeri mekiği ve/veya 15 konjüгатı, hastaya bir kerede ya da bir dizi tedavi halinde uygun şekilde tatbik edilir. Hastalığın türüne ve ciddiyetine bağlı olarak, bir veya daha fazla ayrı uygulama biçiminde ya da sürekli inmultimerik biçiminde hastaya uygulanacak olan ilk dozaj, yaklaşık 1 µg/kg ile 15 mg/kg (örneğin 0,1 mg/kg - 10 20 mg/kg) kan beyin bariyeri mekiğinin ve/veya konjüгатı düzeyi arasında olabilir. Tipik bir günlük dozaj, yukarıda bahsedilen faktörlere dayalı olarak yaklaşık 1 µg/kg ila 100 mg/kg veya daha fazlası arasında değişebilir. Birkaç gün veya daha uzun süreler boyunca tekrarlanan uygulamalarda, duruma bağlı 25 olarak, tedavi genellikle, hastalık semptomlarının istenen süpresyonu meydana gelene kadar sürdürülür. Örnek niteliğindeki bir antikor dozajı, yaklaşık 0,05 mg/kg ile yaklaşık 10 mg/kg arasında değişebilir. Bu nedenle, yaklaşık 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ya da 10 mg/kg'lık bir veya 30 daha fazla doz (ya da bunların herhangi bir kombinasyonu) hastaya uygulanabilir. Bu gibi dozlar aralıklı olarak, örneğin her hafta ya da her üç haftada bir uygulanabilir (örneğin hastaya yaklaşık iki ile yaklaşık yirmi doz arasında, örneğin yaklaşık altı doz antikor uygulanır). Yüksek bir başlangıç 35 yükleme dozu ve ardından bir veya birçok düşük doz

uygulanabilir. Ancak, diğer dozaj rejimleri de yararlı olabilir. Bu terapinin ilerleyişi, geleneksel teknikler ve analizler yardımıyla kolaylıkla izlenebilir.

İmalat ürünleri

5 Mevcut buluşun başka bir görünümünde, yukarıda tarif edilen bozuklukların tedavisi ve/veya önlenmesi için yararlı malzemeler içeren bir ürün sağlanır. Bu imalat ürünü, bir kap ve kabın üzerinde ya da kapla ilintili olarak bir etiket ya da prospektüs içerir. Uygun kaplar arasında, örneğin, şişeler,
10 viyaller, şırıngalar, IV çözelti torbaları vb. bulunur. Kaplar, örneğin cam ya da plastik gibi çeşitli malzemelerden oluşabilir. Kabın içinde, bozukluğun tedavi edilmesi, önlenmesi ve/veya teşhis edilmesi için tek başına ya da başka bir bileşimle birlikte etkili olan bir bileşim bulunur ve
15 steril bir erişim ağzına sahip olabilir (örneğin kap, bir derialtı enjeksiyon iğnesiyle delinebilen bir tıkaçı bulunan bir intravenöz solüsyon torbası ya da bir flakon olabilir). Bileşimdeki en az bir aktif madde, mevcut buluşun bir kan beyin mekiği ve/veya konjüгатıdır. Etiket ya da prospektüs,
20 bileşimin seçilen durumun tedavisi için kullanıldığını belirtir. Ayrıca, imalat ürünü, (a) içerisinde mevcut buluşun bir kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатını içeren bir bileşim bulunan bir birinci kaba ve (b) içerisinde başka bir sitotoksik ya da terapötik ajan içeren bir bileşim bulunan bir
25 ikinci kaba sahip olabilir. Mevcut buluşun bu uygulamasında imalat ürünü ayrıca bileşimlerin belirli bir durumun tedavisinde kullanılabileceğini belirtilen bir prospektüs içerebilir. Alternatif veya ek olarak, imalat ürünü ayrıca, farmasötik olarak kabul edilebilir bir tampon, örneğin
30 enjeksiyon için bakteriyostatik su (BWFI), fosfat tamponlu salin, Ringer solüsyonu ve dekstroz solüsyonu içeren ikinci (ya da üçüncü) bir kap içerebilir. İmalat ürünü ayrıca bir ticari son kullanıcı açısından istenebilecek olan başka malzemeler, örneğin başka tamponlar, seyrelticiler, filtreler,
35 iğneler ve şırıngalar içerebilir.

İmalat ürünü tercihe göre ayrıca bir kişideki bir nörolojik bozukluk tedavi etmek için talimatlar bulunan bir prospektüs içerir, burada talimatlar, burada açıklanan şekilde kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатın nörolojik bozukluğu tedavi ettiğini göstermektedir ve tercihe göre kan beyin bariyeri mekiği ve/veya konjüгатın R/BBB'ye monovalent bağlanma modu nedeniyle BBB boyunca alımı arttırdığını göstermektedir.

Örnekler

10 Örnek 1: Ekspresyon plazmidlerinin üretimi

Bazik/standart memeli ekspresyon plazmidi

Arzu edilen proteinler, insan embriyonik böbrek hücrelerinin (HEK 293) geçici transfeksiyonu ile eksprese edilmiştir. Bir arzu edilen gen/proteinin (örneğin antikor-Fab multimerik protein) ekspresyonu için aşağıdaki fonksiyonel elementleri ihtiva eden bir transkripsiyon birimi kullanılmıştır:

- intron A'yı içeren insan sitomegalo virüsünden (P-CMV) yakın erken arttırıcı ve promotör,
- bir insan ağır zincir immünoglobülini 5'-transle edilmemiş bölgesi (5'UTR),
- bir murin immünoglobülin ağır zincir sinyal sekansı (SS),
- eksprese edilecek bir gen/protein (örneğin tam uzunluklu antikor ağır zinciri), ve
- sığır büyüme hormonu poliadenilasyon sekansı (BGH pA).

25 Temel/standart memeli ekspresyon plazmidi, eksprese edilmesi istenen geni içeren ekspresyon biriminin/kasetinin yanında şunları içerir:

- Bu plazmidin E. coli'de replikasyonuna imkan veren pUC18 vektöründen bir replikasyon kaynağı, ve
- E. coli'de ampisilin direnci kazandıran bir beta-laktamaz geni.

Aşağıdaki antikor-scFab füzyon polipeptitlerini/proteinlerini kodlayan ekspresyon plazmitleri oluşturulmuştur:

Tetravalan Mab31-scFab(8D3) (Şekil 1C) (Mab31 = insan

monoklonal antikorunu tanıyan Abeta. Mab 31'in INN'si = Gantenerumab)

Ağır zincir (10132 pPM284 Mab31(IgG1)-(G₄S)₄-VL-Ck-(G₄S)₆-GG-VH-CH1) (Seq. Id. No. 1) :

5 Mab31-scFab(8D3) ağır zincir füzyon proteini bileşimi:

- C ucu Lys olmayan Mab31 insan IgG1 ağır zinciri
- Glisin-Serin bağlayıcı
- Fare 8D3 anti-transferrin antikorunun değişken hafif zincir domeni (VL) varyantı (L596V ve L598I) (Boado, R.J. Zhang, Y. Wang, Y ve Pardridge, W.M., Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)

- İnsan C-kappa hafif zinciri
- GlisinSerin-bağlayıcı
- Fare 8D3 anti-transferrin antikorunun değişken ağır zincir domeni (VH) (Boado, R.J. Zhang, Y. Wang, Y ve Pardridge, W.M., Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)

- İnsan IgG1 CH3 ağır zincir domeni

Hafif zincir (5170-VL-Mab31-BsmI-L2-Neo-BGHPA) (Seq. Id. No. 2)

20 Mab31 hafif zincirinin bileşimi

- Mab31 insan Ckappa hafif zinciri

Üç değerlikli Mab31-scFab(8D3) (Şekil 1B)

Topuz ağır zinciri (10134_pPM287_Mab31(IgG1)_topuz_SS_-(G₄S)₄-VL-Ck-(G₄S)₆-GG-VH-CH1) (Seq. Id. No. 3)

25 Topuz Mab31-scFab(8D3) ağır zincir füzyon proteininin bileşimi

- CH3 topuzu mutasyonu T366W içeren C-terminal Lys olmadan Mab31 insan IgG1 ağır zinciri ve ilave bir disülfid köprüsünün oluşumu için S354C mutasyonu

- GlisinSerin-bağlayıcı

- Fare 8D3 anti-transferrin antikorunun değişken hafif zincir domeni (VL) varyantı (L596V ve L598I) (Boado, R.J. Zhang, Y. Wang, Y ve Pardridge, W.M., Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)

- İnsan C-kappa hafif zinciri

- GlisinSerin-bağlayıcı
- Fare 8D3 anti-transferrin antikoruunun değişken ağır zincir domeni (VH) (Boado, R.J. Zhang, Y. Wang, Y ve Pardridge, W.M., Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)
- İnsan IgG1 CH3 ağır zincir domeni

Delik ağır zinciri (10133 pPM286 Mab31(IgG1) delik SS) (Seq. Id. No. 4)

Delik Mab31 ağır zincir füzyon proteininin bileşimi

- CH3 delik T366S, Y407V ve L368A mutasyonlarını içeren Mab31 insan IgG1 ağır zinciri ve ilave bir disülfid köprüsünün oluşumu için Y349C mutasyonu

Hafif zincir (5170-VL-Mab31-BsmI-L2-Neo-BGHPA) (Seq. Id. No. 2)

Mab31 hafif zincirinin bileşimi

- Mab31 insan Ckappa hafif zinciri

Örnek 2: Tek ve çift Mab31-scFab yapıları sFab ve dFab'ın saflaştırılması

Antikor zincirleri, F17 ortamı içinde (Invitrogen Corp.) kültürlenmiş HEK293 hücrelerinin (insan embriyonik böbrek hücre hattı 293 türevli) geçici transfeksiyonuyla üretilmiştir. Transfeksiyon için "293-Fektin" transfeksiyon ayıracı (Invitrogen) kullanılmıştır. Antikor zincirleri, tetravalan Mab31-scFab(8D3) ağır zinciri ve sırasıyla, Mab31 için karşılık gelen hafif zincir veya topuz ve delik trivalan Mab31-scFab(8D3) ağır zincirleri ve Mab31 için karşılık gelen hafif zincir için kodlama yapan iki (tetravalan Mab31-scFab(8D3)) veya üç (trivalan Mab31-scFab(8D3)) farklı plazmidten eksprese edilmiştir. İki veya üç plazmit, transfeksiyon üzerine eşmolar bir plazmid oranında kullanılmıştır. Transfeksiyonlar, üreticinin talimatlarında belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan yedi gün sonra antikor füzyon proteinleri içeren hücre kültürü üst fazları toplanmıştır. Üst fazlar saflaştırmaya kadar dondurulmuş olarak saklanmıştır.

Proteinler, süzölmüş hücre kültürü üst fazlarından

saflaştırılmıştır. Üst fazlar, bir protein A Sepharose kolonuna (GE Healthcare) uygulanmış ve PBS pH 7.4 ile yıkanmıştır. Antikorların elüsyonu, pH 3.0'da 100 mM Citate tamponu ile gerçekleştirilmiştir, ardından pH 6.5'e hızlı nötrleştirme yapılmıştır. Konsantrasyon agregat oluşturduktan sonra, protein ve diğer yan ürünler, monomerik antikorlardan 20 mM histidin, 140 mM NaCl içinde, pH 6.0 boyut dışlama kromatografisiyle (Superdex 200; GE Healthcare) ayrılmıştır. Her bir fraksiyon, tamamiyle birleştirilmemiş moleküllerin ve diğer yan ürünlerin miktarının belirlenmesi için analitik SEC (TSK G3000SWXL) ve çip bazlı kılcal elektroforez sistemi (CE-SDS, LabChipGX, Caliper) üzerinde analiz edilmiştir. Yan ürünler içermeyen monomerik antikor fraksiyonları toplanmıştır. Bir MILLIPOREAmicon Ultra (30 moleküler ağırlık kesiti) santrifüj yoğunlaştırıcı kullanılarak konsantrasyondan sonra, protein -80 °C'de saklanmıştır. Son ürünün analitik karakterizasyonu UV protein tayini, CE-SDS, boyut dışlama kromatografisi, kütle spektrometrisi ve ayrıca endotoksin tayini ile gerçekleştirilmiştir.

Örnek 3: Tekli scFab (sFab) ve çiftli scFab (dFab) yapılarının ELISA bağlanma verileri

MAb31-8D3 yapılarının fare transferrin reseptörüne (mTfR) bağlanması, indirekt ELISA ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, rekombinant mTfR (ekstraselüler domen; Sino Biological) Maxisorb mikrotitre plakasına (Nunc) 1 µg/mL'de PBS içinde 4 °C'de gece boyunca kaplanmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat süreyle %1 Crotein-C/PBS (bloklama tamponu; Roche) içinde bloke ettikten ve %0,1 Tween-20/PBS (yıkama tamponu) ile 4 yıkamadan sonra, mAb31-8D3 yapıları kuyucuklara bloke edici tamponda 0,01 ila 150 nM arasındaki konsantrasyonlarda ilave edilmiş ve 1 saat süreyle oda sıcaklığında enkübe edilmiştir. 4 yıkama adımından sonra, yapılar, 1:10,000 dilüsyonda blokaj tamponu (1 RT) içinde anti-insan-IgG-HRP (Jackson Immunoresearch) ilavesiyle tespit edilmiştir, daha sonra 6 yıkama ve TMB içinde (Sigma) enkübasyon yapılmıştır.

Absorbans, 1 N HCl ile renk gelişimini durdurduktan sonra 450 nm'de okunmuştur.

Şekil 3, iki değerlikli mAb31-8D3-dFab'ın mTfR'ye bağlanmasının, 8D3 IgG'un bağlanması ile karşılaştırılabilir olurken tek değerli mAb31-8D3-sFab yapısının indirgenmiş bir afinite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

MAb31'in işlevselliği ELISA ile doğrulanmıştır. Kısaca, Abeta (1-40), fibriller Abeta üretmek için 37°C'de 3 gün süreyle PBS içinde 7 µg/mL'de Maxisorp plakaları üzerine kaplanmış, sonra oda sıcaklığında 3 saat kurutulmuştur. Plaka, oda sıcaklığında 1 saat boyunca PBS'de (bloklama tamponu) %1 Crotein C ve %0,1 RSA ile bloke edilmiş, daha sonra bir kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır. mAb31 yapıları, bloke edici tampon içerisinde 100 nM'ye kadar konsantrasyonlarda ilave edilmiş ve gece boyunca 4 °C'de enkübe edilmiştir. 4 yıkama aşamasından sonra yapılar yukarıda belirtildiği gibi tespit edilmiştir.

Şekil 4, her iki mAb31-8D3 yapısının (sFab ve dFab) Abeta fibrillerinin immobilize edilmiş mAb31'dekine benzer bir afinite ile bağlandığını göstermektedir.

Örnek 4: Sadece tekli scFab BBB'yi geçiyor ve plakaları boyuyor

Beyin kesitleme ve immünohistokimyasal boyama:

PBS perfüzyonundan sonra beyinler hazırlanmış ve sagittal kriyokesitler, lateral ~ 1,92 ve 1,68 millimeter arasında Paxinos ve Franklin beyin atlasına göre gerçekleştirilmiştir.

Beyinler, -15 °C'de 20 mikronluk nominal bir kalınlığa bir Leica CM3050 S kriyostat kullanılarak kesitlenmiş ve önceden soğutulmuş cam lameller üzerine yerleştirilmiştir (Superfrost plus, Menzel, Almanya). Her beyin için, aynı lamele 80 mikron aralıklı üç kesit yerleştirilmiştir.

Kesitler, 5 dakika boyunca PBS içerisinde yeniden hidratlanmış ve ardından 2 dakika boyunca -20 °C'ye önceden soğutulmuş %100 asetona daldırılmıştır. Diğer tüm adımlar oda sıcaklığında yapılmıştır. Beyin kesitlerinin olduğu lameller PBS ile yıkanmış, pH 7.4 ve spesifik olmayan bağlanma bölgeleri Ultra V bloğunda (LabVision) 5 dakika boyunca sıralı enkübasyonla

bloke edilmiş, daha sonra PBS yıkaması ve PBS içinde %2 normal keçi serumlu güç blok çözeltisi (BioGenex) içinde 20 dakika süreyle enkübasyon gerçekleştirilmiştir. Lameller direkt olarak ikincil antikor, (ağır ve hafif zinciri için spesifik) Alexa Fluor 555 boyasına (# A-21433, lot 54699A, Molecular Probes) konjüge edilmiş bir afinitesi artırılmış keçi anti-insan IgG'si ile PBS içinde %2 normal keçi serumu içinde, pH 7.4'te 1 saat süreyle bir 20 mikrog/ml konsantrasyonunda enkübe edilmiştir. PBS ile yoğun yıkamadan sonra, plak lokalizasyonu, Alexa Fluor 488 boyasına 0,5 microg /ml'de 1 saat süreyle güç blok çözeltisi (BioGenex) ve %10 normal koyun serumlu PBS içinde Abeta'ya karşı konjüge edilmiş bir Roche kurum içi murin monoklonal antikor olan BAP-2 ile enkübasyon yapılarak Abeta plakları bakımından bir çift etiketleme ile değerlendirilmiştir. PBS yıkamasından sonra, lipofusinin otofloresansı, 4 mM CuSO4 içinde 50 mM amonyum asetat, pH 5 içinde 30 dakika süreyle enkübasyon yoluyla baskılanarak indirgenmiştir. Lameller iki kez damıtılmış suyla durulandıktan sonra, lameller Confocal Matrix'e (Micro Tech Lab, Avusturya) gömülmüştür.

Konfokal mikroskopisi

Her bir PS2APP-farenin beyninin her birinden, ön kortekste plak içeren bölgelere (birincil motor korteksin bölgesi) sahip üç görüntü alınmıştır. Görüntüler, 1 Airy iğne deliği ayarına sahip bir Leica TCS SP5 konfokal sistemi ile kaydedilmiştir.

Alexa Fluor 488 boya ile immünoişaretlenmiş plaklar, aynı spektral şartlarda (488nm'lik bir eksitasyon ve bir 500-554nm bant geçiş emisyonu) foto çoğaltım kazancı ve offset (tipik olarak, sırasıyla 770 V ve %-0) bir %30 lazer gücüne ayarlanmış halde yakalanmıştır.

Doku kesitlerinin erişilebilir yüzeyindeki bağlı ikincil Alexa Fluor 555 antikorları uygulanmış saptama antikorunun emisyon dalgaboyu aralığını kapsayan bir 570 ila 725 nm arasında değişen bir penceredeki 561 nm'deki eksitasyon lazer hattında kaydedilmiştir. Cihaz ayarları; özellikle, lazer gücü, tarama

sürati, kazanç ve offset gibi ayarlar, test edilen insan anti-A β antikorlarının kıyaslamalı yoğunluk ölçümlerine imkan vermek amacıyla görüntü alımları sabit tutulmuştur. Lazer gücü %30 olarak ayarlanmış ve PMT kazancı için ayarlar tipik olarak 5 850 V ve %0'lık bir nominal ofset olmuştur. Bu, aynı ayarda hem soluk hem de çok lekeli plakların görselleştirilmesini sağlamıştır. Toplama frekansı 400 Hz olmuştur.

Konfokal taramalar su içinde bir HCX PL APO 20x 0,7 IMM UV objektifli tek optik katmanlar olarak, bir 512 x 512-piksel 10 çözünürlüğünde kaydedilmiş ve düşey eksende bir optik ölçme derinliği doku kesitinde görüntüleme sağlamak için etkileşimli olarak kontrol edilmiştir. Frontal korteksin 2-5 katmanlarında bulunan amiloid plakları görüntülenmiş ve flüoresan yoğunlukları ölçülmüştür.

15 İstatistiksel analiz

İmmünopozitif bölgeler TIFF görüntüsü olarak görselleştirilmiş ve ImageJ versiyonu 1.45 (NIH) ile floresan yoğunluğu ve alanın (piksel olarak ölçülen) miktarının belirlenmesi için işlenir. Kantifikasyon için 5 zemindeğer yoğunluğu, her 20 görüntüden çıkarılmış ve 5 kare pikselden küçük pozitif bölgeler filtrelenmiştir. Seçilmiş izoyüzeylerin toplam floresans yoğunluğu tekli pozitif bölgelerin yoğunluklarının toplamı olarak belirlenmiş ve ortalama piksel yoğunluğu toplam yoğunluğun analiz edilen piksel sayısına bölünmesiyle 25 hesaplanmıştır.

Ortalama ve standart sapma değerleri her bir hayvan için üç farklı bölümden çekilmiş dokuz fotoğraftan elde edilen tüm ölçülen izoyüzeylerinden Microsoft Excel (Redmond / WA, ABD) ile hesaplanmıştır. Grup karşılaştırması için istatistiksel 30 analiz Student's t test veya bir Mann-Whitney testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

10 mg/ml mAb31 (Şekil 1A'nın yapısı), 13,3 mg/kg sFab-mAb31 1 (Şekil 1B'nin yapısı) ve 16,7 mg/kg dFab-mAb31 (Şekil 1C'nin yapısı) i.v. olarak farelerde kuyruğa enjekte edilmiş ve 8 35 saat sonra beyine PBS püskürtülmüştür. Bölümler yukarıda tarif

edilen şekilde hazırlanmış ve keçi anti-insan IgG'si ile lekelenmiştir. MAb31 yapısı için neredeyse hiçbir spesifik sinyal tespit edilmemiştir (Şekil 4A). Hem plak hem de kılcalların sFab-mAb31 kapsamlı boyaması, tespit edilirken (Şekil 4B), dFab-mAb31'in sadece kılcal damarları boyadığı tespit edilmiştir (Şekil 4C). Bu, transferrin reseptörüne yönelik tek değerlikli bir bağlanma modunun (sFab-mAb31), yapıyı beyin endotel hücreleri üzerinden BBB'ye getirmede çok daha etkilidir. İki değerlikli bağlayıcı molekülün (dFab-mAb31) kantifikasyonu, Şekil 5'te gösterilmektedir. Veriler, dFab-mAb31 yapısı için plak dekorasyonunda artış olmadığını göstermektedir, yapının kılcal birikmesinden dolayı sadece toplam yoğunlukta bir artış söz konusudur.

Örnek 5: Tekli bir scFab yapısı ile beyin maruziyet miktarının belirlenmesi

DeneySEL prosedür Örnek 4'te tarif edilmektedir. sFab-mAb31 beyin maruziyetinin kantifikasyonu, Şekil 6'da 10 mg/ml mAb31 (Şekil 1A'nın yapısı) ve 13,3 mg/kg sFab-mAb31 (Şekil 1B'nin yapısı) kullanılarak gösterilmiştir. sFab-mAb31 yapısının enjeksiyonundan henüz 8 saat sonra mAb31'e kıyasla çok fazla alım bulunmaktadır (yaklaşık 55 kat artış). Benzer veriler, 25 mg/ml mAb31 (Şekil 1A'nın yapısı) ve 33,3 mg/kg sFab-mAb31 (Şekil 1B'nin yapısı) kullanılarak dozdan 24 saat sonra elde edilmiştir. Şekil 6 ayrıca, sFab-mAb31'in geçici kapiler boyama göstermekte olup, bu, zaman içinde hedefleme etkisi ve BBB'nin geçilmesini ortaya koymaktadır. Bütün bu veriler, Şekil 6'da belirtildiği gibi oldukça anlamlıdır.

Şekil 7, düşük bir dozdaki mAb31 (yapısı Şekil 1A'in) ve sFab-mAb31 (yapısı Şekil 1B'in) yapısının verilerini göstermektedir. Yine, sadece sFab-mAb31 yapısı, beyin endotel hücrelerini geçebilir ve beyindeki plağı dekore eder. Maksimum etkiye dozdan 8 saat sonra zaten ulaşılmıştır. mAb31 yapısı için sadece daha yüksek bir dozda (10 mg/kg) ve nispi uzun sürede (7 gün), beyindeki Abeta plaklarına bağlanma sinyalinde artış trendi olmuştur (Şekil 7). Bütün bu veriler, Şekil 7'da

belirtildiği gibi oldukça anlamlıdır.

Örnek 6: Çiftli bir scFab yapısı ile hücre yüzeyi Tfr'sinin spesifik aşağı regülasyonu

Deneysel detaylar: 6 kuyucuklu bir plaka formatında
5 kültürlenmiş bEnd3 hücreleri. dFab-mAb31, sFab-mAb31 ile ortak
tedaviden 2-3 gün sonra veya 24 saat süreyle tedavi edilmemiş
ctr. Ardından ortam çıkarılmış/aspire edilmiş ve hücreler buz
soğukluğundaki PBS (-MgCl) (-CaCl) (Gibco 14190-094), 5 ml/kuyu
ile iki kez yıkanmıştır. 1 ml Tripsin/EDTA (Lonza CC-
10 5012)/kuyu ilave edilmiş, tüm hücreler ayrılincaya kadar 15
dakika süreyle 37°C'de enkübe edilmiştir. 1 ml tripsin
nötrleştirme çözeltisi (buz soğukluğunda) (Lonza CC-5002) ile
tepkime durdurmuştur. 2 ml tripsin/EDTA + nötrleştirme
çözeltisi bir 50ml Falcon tüpünde toplanmış ve buz üzerinde
15 muhafaza edilmiştir. Hücrelerin 4 °C'de 1400 rpm'de 10 dakika
santrifüjlenmesi. Peletler, 50 ml buz soğukluğundaki bEnd3
ortamı (DMEM-12 (Gibco 31331) + %10FBS) içinde yeniden
süspanse edilmiştir. Hücrelerin 4 °C'de 1400 rpm ile 10 dakika
santrifüjlenmesi. Pelet, 3 ml buz soğukluğunda FACS-Tampon (BD
20 554656) içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Hücre
sayıları: a) sFab tüpü ($2,5 \times 10^5$ hücre/ml) canlılık: %47, b)
dFab tüpü ($3,18 \times 10^5$ hücre/ml) canlılık: %55, c) ctr. tüpü
($4,6 \times 10^5$ hücre/ml) canlılık: %57. FACS boyaması 1×10^5
hücre/eppendorf tüpü dağıtılmış ve santrifüje edilmiştir (4
25 °C, 10 dakika, 1500rpm). Üst faz aspire edilmiştir; a) 100
mikroL'e kadar buz soğukluğundaki FACS-tamponu (BD 554656) ile
dolu CD71-PE (klon R17217-IgG2a monoklonal) (Santa cruz sc-
52504) 20 mikroL antikoru/peleti (boyama hacmi 100 mikroL), b)
100 mikroL'ye kadar buz soğukluğundaki FACS-tamponu (BD
30 554656) ile dolu CD31-APC (BD 551262) (sıçan anti fare IgG2a
(200 mikrog/ml)) 5 mikrog antikoru/peleti (boyama hacmi 100
mikroL), c) buz soğukluğundaki FACS-tamponu (BD 554656) içinde
seyreltilmiş 8D3-Alexa488 (1:50) (boyama hacmi 100 mikroL), d)
Alexa488, APC ve PE (tümü BD) için izotip ctr. 1 saat boyunca
35 buzda karanlıkta enkübasyon. Buz soğukluğunda FACS-Tampon ile

1,5 ml'ye kadar doldurulur ve santrifüjlenir (4 °C, 10 dak, 1500rpm). Topak, 1,5 ml buz soğukluğunda FACS-Tampon ile iki kez yıkanmış ve topak, son olarak 500 mikrol PBS içinde tekrar askıya alınmıştır. FACS ölçümü, Guava Flow Cytometry cihazı kullanılarak yapılmıştır. Veriler, çift (dFab) yapısının (Şekil 8B), hücre yüzeyindeki Transferrin reseptörünü aşağı düzenliyor görüldüğünü göstermektedir. Bu, mevcut test kurulumundaki tekli (sFab) yapı ile tespit edilemez (Şekil 8A), bu da, tek değerlikli bir bağlanma modunun hücre trafiği ve beyin endotel hücrelerinde hücre yüzeyindeki Transferrin reseptörünün miktarını belirleyen geri dönüşüm üzerinde doğrudan etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Örnek 7: Tekli ve çiftli scFab yapısının in vivo hücre içi sınıflandırılması

APPswe/PS2 transgenik farelerine, i.v (kuyruk enjeksiyonu) olarak aşağıdaki MAb31 (10 mg/kg), sFab-MAb31 (13,3 mg/kg) veya dFab-MAb31 (17,44 mg/kg) yapıları enjekte edilmiştir. Enjekte edilen doz, referans olarak kullanılan MAb31 ile molekül boyutunu yansıtmaktadır. Enjeksiyondan 15 dk veya 8 saat sonra, fareler CO₂ ile ötenazi edilmiş ve aşağıdaki şekilde muamele edilmiştir. Kalbin sağ kalp atriyumu kesilerek kan ve perfüzyon çözeltisinin dışarı akabilmesi sağlanmıştır. Sol kalp ventrikül kesilmiş ve 10 numaralı gavaj probu aort içine sokulmuştur. Yaklaşık 20 ml PBS (~10 ml/dak, oda sıcaklığı), ardından PBS içinde 30 ml %2 PFA enjekte edilmiştir. Beyinler çıkarılmış ve aynı perfüzyon içinde 7saat00 süreyle daha enkübe edilmiştir. İmmünofloresan boyama için kullanılan 100 mikron beyin serbest yüzer kesitleri oluşturmak için Vibratome kullanılmıştır. Kesitler önce geçirgenleştirilmiş ve PBS-%0,3 Triton X-100-%10 eşek serumu kullanılarak bloke edilmiştir. Ardından, kesitler gece boyunca PBS-5 eşek serumunda seyreltilmiş belirtilen primer antikolarla enkübe edilmiştir. Üretici önerilerini takip ederek moleküler problemler ikincil antikolar kullanılmıştır. Görüntüler bir Leica SP5 konfokal mikroskobu kullanılarak elde

edilmiştir, görüntü işleme ve 3D rekonstrüksiyon için Imaris yazılımı kullanılmıştır.

Bu veriler, periferik olarak uygulanan sFab-MAb31 ve dFab-MAb31'in beyin endotel hücreleri tarafından alımını göstermektedir. MAb31, sFab-MAb31 ve dFab-MAb31, Alexa 555'e bağlanmış bir keçi anti-insan antikoru kullanılarak tespit edilmiştir. Şekil 9'da gösterilen şekilde, hem sFab-MAb31 (Şekil 9A) hem de dFab-MAb31'in (Şekil 9B), beyin damarlarını, enjeksiyondan 15 dakika sonra dağılımlarında bir fark olmadan dekore etmektedir. Enjeksiyondan 8saat00 sonra, sFab-MAb31, parankime ulaşır ve amiloid plaklarını dekore ederken (Şekil 9C oklar), dFab-MAb31 (Şekil 9D) 15 dakika zaman noktasına benzer şekilde beyin damarlarında kalır. Parankimde, dFab-MAb31 ile herhangi bir amiloid plağı tespit edilememiştir.

Şekil 10: Araştırmada kullanılan tüm yapıların bütünlüğünü kontrol etmek için, 18 aylık beyin kriyokesitlerinin boyanması MAb31 (Şekil 10A), sFab-MAb31 (Şekil 10B) veya dFab-MAb31 (Şekil 10C) kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, 3 yapının da transgenik farelerin beyinde amiloid plakları tespit ettiğini göstermiştir.

Şekil 11-12: Yüksek çözünürlüklü konfokal mikroskopi, sFab (Şekil 11) ve dFab-MAb31'in (Şekil 12) beyin kılcallarının luminal yanını dekore etmediğini ancak, endotel hücrelerinin luminal membranını geçen vezikül benzeri yapılar içerisinde ve endotel hücresi sitozolü içerisinde bulunduğunu göstermektedir. Şekil 11 ve Şekil 12'deki oklar, endotel hücre çekirdeklerinin abluminal tarafında sFab veya dFab-MAb31 yapılarını içeren vezikülleri gösterir. Birlikte bu veriler, hem sFab-MAb31 hem de dFab-MAb31'in endotel hücrelerine girebildiğini ama sadece sFab-MAb31'in vaskülatürü geçebildiğini ve amiloid plaklarına ulaşabildiğini göstermektedir.

Mevcut buluşun yöntemleri ve bileşimleri MSS'ye dağılan antikor kısmının büyük ölçüde iyileştirilmesi ve böylelikle MSS'de terapötik bir konsantrasyona daha kolay ulaşması için

bir yol sağlar. Mevcut buluşun yöntemleri ve bileşimleri, yenidir ve abluminal bölgeye ulaşmak için optimal ve bozulmamış bir hücre içi yol/tasnifleme kullanılarak BEC'ler içindeki farklı organellerden geçme etkinliğini önemli ölçüde arttırır.

Örnek 8: BBB'yi geçmek için monovalent reseptör bağlama modu çok önemlidir

Anti-A β monoklonal antikor mAb31, çok spesifik ve güçlü bir A β plak bağlayıcı olup, beyin parankimi içindeki hedef bağıllılığını ölçmek için bize güçlü bir okuma sağlar. PS2APP çift transgenik amiloidoz modelini, iki Beyin Mekiği yapısının mAb31 ebeveyn antikoruna kıyasla beyin maruziyetinin miktarını araştırmak için kullandık. Üç varyant intravenöz olarak 10 mg/kg'de enjekte edilmiş ve beyine maruziyeti derecesi enjeksiyondan 8 saat sonra plaklardaki mevcut antikor miktarı ölçülerek belirlenmiştir. dFab yapısı için, mAb31'e kıyasla plak dekorasyonunda anlamlı bir artış tespit edilmemiştir (Şekil 13A). Bununla birlikte, sFab yapısı için, ana mAb31 antikoruna ile karşılaştırıldığında plak dekorasyonunda büyük bir artış olmuştur. Amiloid plaklarda hedef bağlantı, etiketli bir ikincil antikor kullanılarak floresans yoğunluğu miktarına dayalı olarak sFab yapısı için 50 kattan fazla artmıştır. sFab yapısı, geniş bir plak dekorasyonu göstermiş olma da (Şekil 13D), dFab yalnızca mikrodamarlarda tespit edilmiştir (Şekil 13C), bu, dFab yapısının beyin mikrodamarlarını hedeflediğini ve girdiğini, ancak abluminal taraftan kaçamadığını göstermiştir. sFab yapısının 2,66 mg/kg'lık düşük bir dozdaki hedef angajman kapasitesi ve 7 güne kadar uzun süreli in vivo maruziyet süresini incelemiş bulunmaktayız. Maksimal plak dekorasyonuna 8 saat içerisinde ulaşılmış, daha sonra tek bir enjeksiyondan en az bir hafta sonra kalıcı plak bağlanması söz konusu olmuştur (Şekil 13E).

Önceki bir çalışmada, ana mAb31'in enjeksiyondan 7 gün sonra maksimum plak bağlanmasına ulaştığı gösterilmiştir. Mikrodamar yapılarında lekelenmenin kantifikasyonu, sFab yapısının

lokalizasyonunun BBB'de çok geçici olduğunu göstermiş, bu da, yapının bariyeri geçtiği nispeten hızlı oranı ortaya koymuştur. Enjeksiyondan 7 saat sonra 2 mg/kg'de ana antikor mAb31 için (Şekil 13F) ve sFab yapısı için ekimolar konsantrasyondaki (Şekil 13G) temsili plak boyama görüntüleri, sFab beyin mekik yapısı ile elde edilen plak bağlamasındaki artışı göstermektedir. sFab yapısı, sadece lizozomal kompartmanla küçük bir kolokalizasyon göstermekte, bu, muhtemelen TfR'nin normal esas trafiğini lizozoma yansıtmaktadır. İn vitro çalışmalarımız sFab yapısının geri dönüşüm ve transitozunu da göstermiştir.

Birlikte ele alındığında, bu bulgular sFab yapısının TfR'nin normal trafiğini engellemediğini göstermektedir. Tersine, dFab yapısı lizozomal kompartmanla kuvvetli bir kolokalizasyon gösterir, ancak ne in vitro ne de in vivo olarak transitoz aktivitesi yoktur.

Örnek 9: BBB boyunca artan antikor iletimi, gelişmiş in vivo potansına çevirilir

Bir sonraki deney grubunda, bir monovalent bağlanma modu kullanarak beyin maruziyetindeki önemli artışın, uzun süreli bir tedavi çalışmasında anti-A β antikorunun in vivo potansiyelini arttırıp arttırmadığını sorduk. sFab yapısını ve kontrol ana antikorunu mAb31'i üç ay boyunca haftalık olarak enjekte ettik. Önceki 5 aylık bir çalışmada, terapötik antikor mAb31'in 20 mg/kg'da plak yükünü azalttığı gösterilmiştir. Şekil 14'te gösterilen verilere dayanarak, gelişmiş beyin maruziyetinin in vivo potensin artmasına neden olup olmayacağını araştırmak için iki düşük doz seçtik. Sondaki hedef plak bağlanması, her iki dozda da sFab yapısına ana mAb31 antikorundan daha güçlü bir hedef angajmanı olduğunu göstermiştir (Şekil 14 A-D). APPPS2 çift transgenik farelerde amiloidozun derecesi, referans hattında nicelleştirilmiş ve araç, düşük doz ana mAb31 ve düşük dozda sFab yapısı tedavisine devam edilmiştir. Bu düşük dozlarda, ana monoklonal mAb31 ile in vivo etki saptanmamıştır (Şekil 14E), bu, 5 aydan

uzun süren uzun süreli bir çalışmaya dayanarak beklenen bir durum olmuştur. Tersine, 2,67 mg/kg düşük dozda sFab yapısı ile hem korteks hem de hipokampüsteki plak sayısında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Çok daha düşük 0,53 mg/kg dozunda dahi (Şekil 14E), istatistiksel anlamlılığa erişmiş olmasa da, özellikle kortekste sFab yapısı lehine bir eğilim görülmüştür. Plak boyutlarının ikincil analizi, mAb31 için eylem şekliyle uyumlu olarak, küçük plakalar için plak sayısının daha belirgin bir şekilde azaldığını ortaya çıkarmıştır. Bu veriler, monovalent bir Tfr bağlanma modu ile sağlanan beyin penetrasyonunda artışın, Alzheimer hastalığı patolojisinin kronik bir hayvan modelinde terapötik bir antikorun potansında önemli bir iyileşme sağladığını göstermektedir.

Örnek 10: Farklı antikor füzyon proteinlerinin Tfr+ BaF3 hücreleri üzerindeki in vitro (ADCC) efektör fonksiyonu

BaF3 hücrelerini eksprese eden transferrin reseptörü (DSMZ, # CLPZ04004) (Tfr+) farklı antikor-füzyon molekülleri tarafından uyarılan antikor-bağımlı hücre toksisite (ADCC) deneyleri için hedef hücreler olarak kullanılmıştır.

Kısaca, yuvarlak tabanlı 96 kuyucuk içerisine ekilmiş 1×10^4 BaF3 hücresi ve tercihe göre insan NK92 efektör hücreleri (yüksek afiniteli CD16 klonu 7A2F3; Roche GlycArt) ile bir 3:1 efektör/hedef oranında antikor füzyon proteinleri varlığında ya da yokluğunda birlikte kültürlenmiştir. Dört saatlik enkübasyondan sonra (37 °C, %5CO₂), sitotoksisite, ölü/ölen hücrelerden laktat dehidrojenazın (LDH) salınımı ile ölçülen şekilde değerlendirilmiştir. Bunun için, hücreler 5 dakika 250xg'de santrifüjlenmiş ve 50µl süpernatant düz tabanlı bir plakaya aktarılmıştır. 50µl LDH tepkime karışımı (Roche LDH tepkime karışımı, kat. no. 11644793001; Roche Diagnostics GmbH) ilave edilmiş ve tepkime, 20 dakika boyunca 37 °C, 5% CO₂'de enkübe edilmiştir. Daha sonra, absorbans, 492/620nm dalga boyunda bir Tecan Sunrise Reader'da ölçülmüştür.

Tüm örnekler üç kopya halinde test edilmiş ve sonuçlar aşağıdaki kontrollere dayanarak hesaplanmıştır:

- Sadece hedef hücreler (+ ortam)
- Maksimal LDH salımı: hedef hücreler + %3 Triton-X
- Kendiliğinden salım: hedef hücreler + NK hücreleri (E:T 3:1)

5 % spesifik ADCC/lizisi, aşağıdaki terimle hesaplanmıştır:

$$\% \text{ spek. ADCC} = \frac{\text{Örnek} - \text{spontan salım}}{\text{Maksimal salım} - \text{spontan salım}} \times 100$$

Şekil 15: Fc C-terminaline kaynaşık TfR scFab fragmanlarına
 10 sahip olan antikor füzyon ADCC'yi indüklemeyi. NK92 aracılı
 BA/F3 fare eritrolösemi hücrelerinin öldürülmesi, FDH
 salımının kantifiye edilmesiyle ölçülmüştür. Sadece
 "geleneksel" "N-terminal - Fc" yönelimindeki TfR bağlayıcı Fab
 kısmına sahip füzyon yapıları, anlamlı ölçüde ADCC
 15 indüklerken, ters yönelimli beyin mekiği yapıları sessizdir.
 Yapılar: 8D3-IgG (tam uzunluklu 8D3 IgG), OA - 8D3 (8D3 IgG
 tek ağır zinciri), mAb31 (Şekil 1A'nın antikorunu), mAb31-8D3-
 sFab (Şekil 1B'nin yapısı), mAb31-8D3-dFab (Şekil 1C'in
 yapısı).

20 **Örnek 11: mTfR antikorunu 8D3'ün epitop eşleştirmesi**

Monoklonal antikor 8D3'ün epitop eşleştirmesi, murin
 transferrin reseptörü 1'in ekstraselüler domeninin karşılık
 gelen sekansının (90-763) örtüşen, hareketsizleştirilmiş
 peptit parçalarının (uzunluk: 15 amino asit, kayma: 3 amino
 25 asit) bir kütüphanesi vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Peptit
 dizisinin hazırlanması için Intavis CelluSpots™ teknolojisi
 kullanılmıştır. Bu yaklaşımda, peptitler, modifiye edilmiş
 selüloz disklerinde otomatikleştirilmiş bir sentezleyici
 (Intavis MultiPep RS) ile sentezlenir, bu diskler sentezden
 30 sonra çözünür. Makromoleküler selüloza kovalent olarak bağlı
 kalan ayrı ayrı peptitlerin çözeltileri, ardından daha sonra
 kaplanmış mikroskop lamaları üzerine yerleştirilir. CelluSpots™
 sentezi, bir 384 kuyucuklu sentez plakasındaki amino ile
 modifiye edilmiş selüloz diskleri üstünde 9-

florenilmetoksikarbonil (Fmoc) kimyası kullanılarak adım adım gerçekleştirilmiştir. Her bir kenetleme döngüsünde, karşılık gelen amino asitler, DMF içindeki bir DIC/HOBt çözeltisi ile aktive edilmiştir. Kenetleme adımları arasında, reaksiyona girmemiş amino grupları, bir asetik anhidrür, diizopropiletil amin ve 1-hidroksibenzotriazol karışımı ile başlıklanmıştır. Sentez tamamlanınca, selüloz diskleri 96 kuyucuklu bir plakaya transfer edilmiştir ve bir trifloroasetik asit (TFA), diklorometan, triizoproilsilan (TIS) ve su karışımı ile yan zinciri korumasının kaldırılması için muamele edilmiştir. Yarılma çözeltisinin çıkarılmasından sonra, selüloza bağlı peptidler bir TFA, TFMSA, TIS ve su karışımı ile çözülür, diizopropil eter ile çökeltilir ve DMSO içinde yeniden süspanse edilmiştir. Bu peptit çözeltileri daha sonra bir Intavis lamel lekeleme robotu kullanılarak Intavis CelluSpots™ lamellerine lekelenmiştir.

Epitop analizi için, hazırlanmış lameller etanol ve ardından Tris tamponlu salin (TBS; 50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 8) ile yıkanmış, sonra, bir bloklama adımı 4°C'de 16 saat süreyle TBS, %0,1 Tween 20 içinde 5 mL 10x Western Blocking Reagent (Roche Applied Science), 2,5 g sükröz ile gerçekleştirilmiştir. Yıkamadan sonra (TBS + %0,1 Tween 20), lameller bir antikor 8D3 TBS + %0,1 Tween 20 içindeki çözelti (1 µg/mL) ile ortam sıcaklığında 2 saat süreyle enkübe edilmiştir. Yıkamadan sonra, lameller saptanması için bir anti-fare ikincil HRP-antikoru (1:20000 TBS-T içinde) ile enkübe edilmiştir, daha sonra, kimyasal ışıldama substrat luminolü ile enkübasyon yapılmış ve bir LumiImager (Roche Applied Science) ile görselleştirilmiştir. ELISA-pozitif SPOT'lar ölçülmüş ve ilgili peptid sekanslarının atanması yoluyla antikor bağlanma epitoplari tespit edilmiştir.

Şekil 16: 8D3, fare transferrin reseptörünün hücre dışı domenindeki üç ayrı peptidi bağlar. Üç amino asit ile örtüşen antikor 8D3 ila 15 mer peptitlerin bağlanması, immobilize mTfR peptidlerini taşıyan bir CelluSpot lambasında enkübe edilmiş

antikoron kemilüminesan tespiti ile açığa çıkarılmıştır. Kutu: Peptidler #373, 374 ve 376, 8D3 tarafından bağlanmıştır.

Peptid ID	Peptid Sekansı	Sekans Numarası
373	I-G-Q-N-M-V-T-I-V-Q-S-N-G-N-L	Seq. Id. No. 14
374	N-M-V-T-I-V-Q-S-N-G-N-L-D-P-V	Seq. Id. No. 15
376	Q-S-N-G-N-L-D-P-V-E-S-P-E-G-Y	Seq. Id. No. 16

5 Tablo 1: peptit eşleştirme deneyinde 8D3 ile bağlanan mTfR hücre dışı domeni peptit dizileri.

Burada, bir kan beyin bariyeri reseptörüne karşı biyoterapötik yapılar grubu tarif edilmekte olup, özellikle transferrin reseptörü (TfR), antikorlar, proteinler, peptidler ve küçük moleküller dahil olmak üzere terapötikleri BBB boyunca terapötik olarak ilgili dozlarda iletebilir. Belirli geliştirilmiş biyoterapötik yapıların dağılımı, enjeksiyondan birkaç saat sonra serebrovasküler alandan parankim boşluğuna doğru değişim göstermiştir, bu, bu özel yapıların, parankime ulaşmak için BEC'ler üzerinden önemli miktardaki biyoterapötiğin transitözleştirilmesinin mümkün kılınması için BEC'ler boyunca optimal bir taşıma yolu kullandığını göstermektedir. MSS'deki biyoterapötik yapıların derecesi ve dağılımı, tamamıyla kan beyin bariyeri reseptörüne, özellikle TfR'ye tek değerlikli bağlanma moduna bağımlı olmuştur. TfR, biyoterapötik yapının R/BBB'ye bağlanmasıyla dimerize olduğunda, parankim boşluğu içerisinde saptanabilir bir seviye saptanmamıştır. Buluşun metodolojisi kullanılarak geliştirilmiş bir tekli Fab anti-Abeta monoklonal yapısının tek bir sistemik dozu, hem beyinde önemli antikör alımıyla sonuçlanmış, hem de patolojik amiloid plaklarına anti-Abeta

monoklonal bağlanmasının dekorasyonunu çarpıcı bir şekilde arttırmıştır. Bununla birlikte, R/BBB'ye karşı bir çift Fab bağlanma yapısı kullanılarak, CNS içinde saptanabilir seviyeler tespit edilmemiştir. Bu başvuruda tasvir edilen gerçekler ve deneyler, bir R/BBB'ye karşı bir monovalent bağlanma modu kullanılarak MSS'ye biyo terapötiklerin (antikorlar gibi) alımının artmasının ardındaki esas katkı sağlayıcı mekanizmaları gösterir. İlk olarak, ikili (veya multimerik) bir anti-R/BBB bağlanma modu, lümen tarafındaki hücre yüzeyindeki R/BBB'yi hızlıca aşağı doğru düzenleyerek beyin alımını sınırlandırır, böylelikle, damar içine alınabilecek toplam anti-R/BBB miktarını azaltır, bu, verimli BBB geçişinin ilk adımıdır. İkinci olarak, ikili (veya multimerik) bir anti-R/BBB bağlanma modu, BEC'lerde hücre içi olarak yapının abluminal tarafa ulaşmasını önleyen belirgin bir yanlış tasniflemesini indüklemektedir. İlginç bir şekilde, R/BBB'ye tek değerli bağlanma, vasküler plazmadan MSS içindeki amiloid plaklarına lokalizasyonda tam bir değişim ile birlikte, beyin alımı ve dağılımını geliştirmektedir. İkincisi, R/BBB için biyoterapötik yapıların geliştirilmiş monovalent bağlanma modu, ilave füzyon polipeptid yapısının alımına ve abluminal tarafa ve parankim içine taşınmasına imkan vermek amacıyla R/BBB'nin geri dönüşünü lümen tarafına sabitlemektir. Üçüncü olarak, tek değerli bağlanma modu biyoterapötik yapısı, çoğu durumda in vivo etkinlik için kritik olan terapötik bir monoklonal antikor için orijinal formatı koruyan bir IgG'nin Fc parçasının C terminali ucunda geliştirilir. Bu, bu başvuruda açıklanan bir IgG'nin diğer kısmına bağlanarak da gerçekleştirilebilir. Bu avantajlıdır, çünkü, önceden belirlenmiş klinik öncesi ve klinik etkinliği olan halihazırda geliştirilmiş IgG monoklonalleri, yerleşik işlev ve etkinlikten ödün vermeden bu taşıma sistemine dahil edilebilir. Ayrıca, reseptör aracılı taşıma (RMT) bazlı tek değerli hedefleyici R/BBB teknolojisi, MSS hastalıklarına yönelik çok çeşitli potansiyel terapötikler için kapıyı

açmaktadır. Mevcut buluş, BBB ve MSS dağılımının terapötik olarak taşınmasını büyük ölçüde artıran kanıtlanmış terapötik aktivitelerle birlikte, mevcut IgG formatlarını koruyan BBB nüfuz edici terapötiklerin mühendislik yöntemlerini sağlamaktadır.

5

Açıklanan amino asit sekansları

Amino asit sekansı adı	Sekans Kimlik Numarası (Seq. Id. No.)
Mab31 ağır zinciri - scFab (8D3)	1
Mab31 Hafif Zinciri	2
Topuz Mab31 ağır zinciri - scFab (8D3)	3
Delik Mab31 ağır zinciri - scFab (8D3)	4
Mab 31 V _H CDR1	5
Mab 31 V _H CDR2	6
Mab 31 V _H CDR3	7
Mab 31 V _L CDR1	8
Mab 31 V _L CDR2	9
Mab 31 V _L CDR3	10
Mab 31 V _H	11
Mab 31 V _L	12
Peptid bağlayıcı (G ₄ S) ₆ G ₂	13
8D3 epitop eşleştirme peptidi 373	14
8D3 epitop eşleştirme peptidi 374	15
8D3 epitop eşleştirme peptidi 376	16
Peptid bağlayıcı (G ₄ S) ₄	17

SEKANS LİSTESİ

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Kan beyin bariyeri mekikleri
 5 <130> 30805 WO
 <150> 12182181,3
 <151> 29.08.2012
 <160> 17
 <170> PatentIn versiyon 3.5
 10 <210> 1
 <211> 959
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 <220>
 15 <223> Füzyon polipeptidi
 <400> 1

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
 115 120 125

Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 485 490 495

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu Glu Ile Val Thr
 500 505 510

Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp Leu Ala Trp Tyr
 515 520 525

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr
 530 535 540

Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
 545 550 555 560

Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Ile Gly
 565 570 575

Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 580 585 590

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 595 600 605

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 610 615 620

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 625 630 635 640

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 645 650 655

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 660 665 670

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 675 680 685

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 690 695 700

Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 705 710 715 720

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 725 730 735

Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 740 745 750

Gly Asn Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 755 760 765

Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu
 770 775 780

Trp Ile Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp
 785 790 795 800

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
805 810 815

Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
820 825 830

Tyr Cys Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln
835 840 845

Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
850 855 860

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
865 870 875 880

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
885 890 895

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
900 905 910

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
915 920 925

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
930 935 940

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
945 950 955

<210> 2

5 <211> 234

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Hafif zincir yapısı

10 <400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr
100 105 110

Asn Met Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 3

<211> 959

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

5 <223> Füzyon polipeptidi

<400> 3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
115 120 125

Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 485 490 495

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu Glu Ile Val Thr
 500 505 510

Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp Leu Ala Trp Tyr
 515 520 525

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr
 530 535 540

Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
 545 550 555 560

Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Ile Gly
 565 570 575

Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 580 585 590

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 595 600 605

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 610 615 620

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 625 630 635 640

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 645 650 655

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 660 665 670

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 675 680 685

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 690 695 700

Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 705 710 715 720

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 725 730 735

Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 740 745 750

Gly Asn Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 755 760 765

Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu
 770 775 780

Trp Ile Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp
 785 790 795 800

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 805 810 815

Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 820 825 830

Tyr Cys Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln
 835 840 845

Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 850 855 860

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 865 870 875 880

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 885 890 895

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
900 905 910

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
915 920 925

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
930 935 940

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
945 950 955

<210> 4

<211> 475

5 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Füzyon polipeptidi

10

<400> 4

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
 115 120 125
 Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
420 425 430

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 5

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

10 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 7

<211> 17

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

5

Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

<210> 8

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

15 **Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala**
1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

25

<210> 10

<211> 8

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile
1 5

5

<210> 11

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 11

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

15

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

5 <210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

10 <220>

<223> Peptid bağlayıcı

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

15 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

<210> 14

<211> 15

<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>

5 <223> Epitop haritalama peptidi

<400> 14

Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser Asn Gly Asn Leu
1 5 10 15

10

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

15

<220>
<223> Epitop haritalama peptidi

<400> 15

20

Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

25

<220>
<223> Epitop haritalama peptidi

30

<400> 16

Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

5

<220>
<223> Peptid bağlayıcı

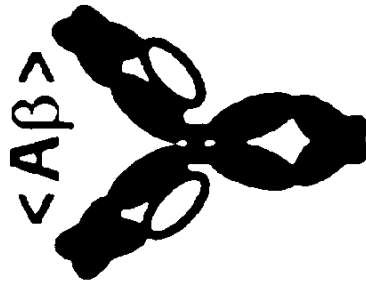
<400> 17

10

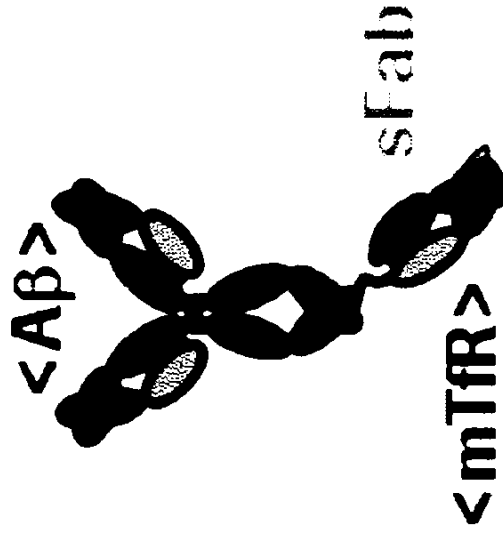
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

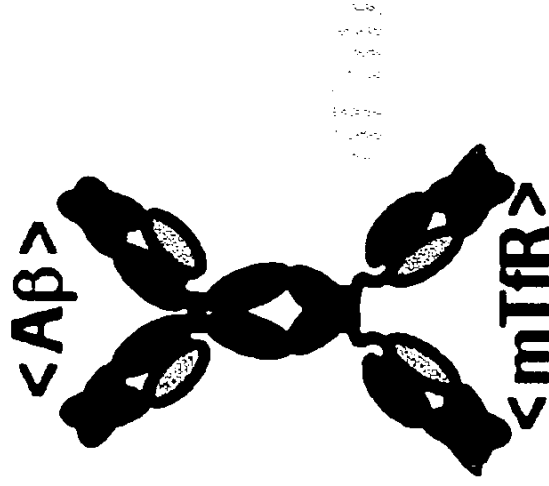
ŞEKİL 1A



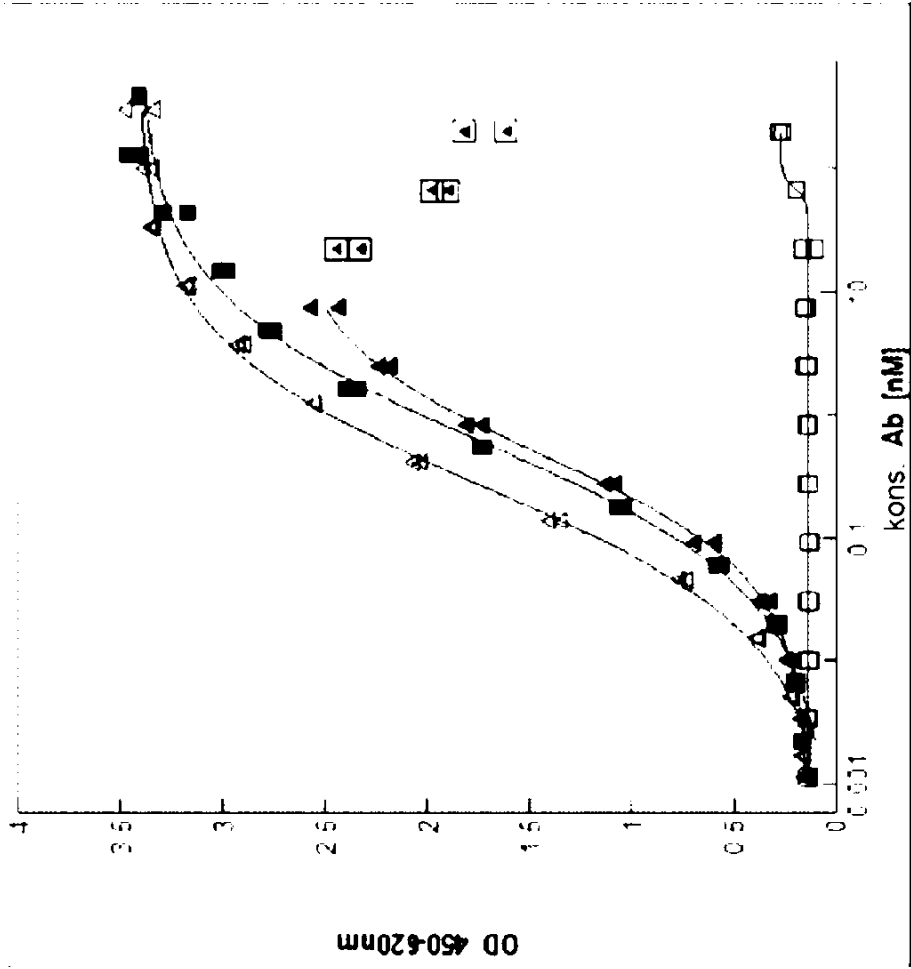
ŞEKİL 1B



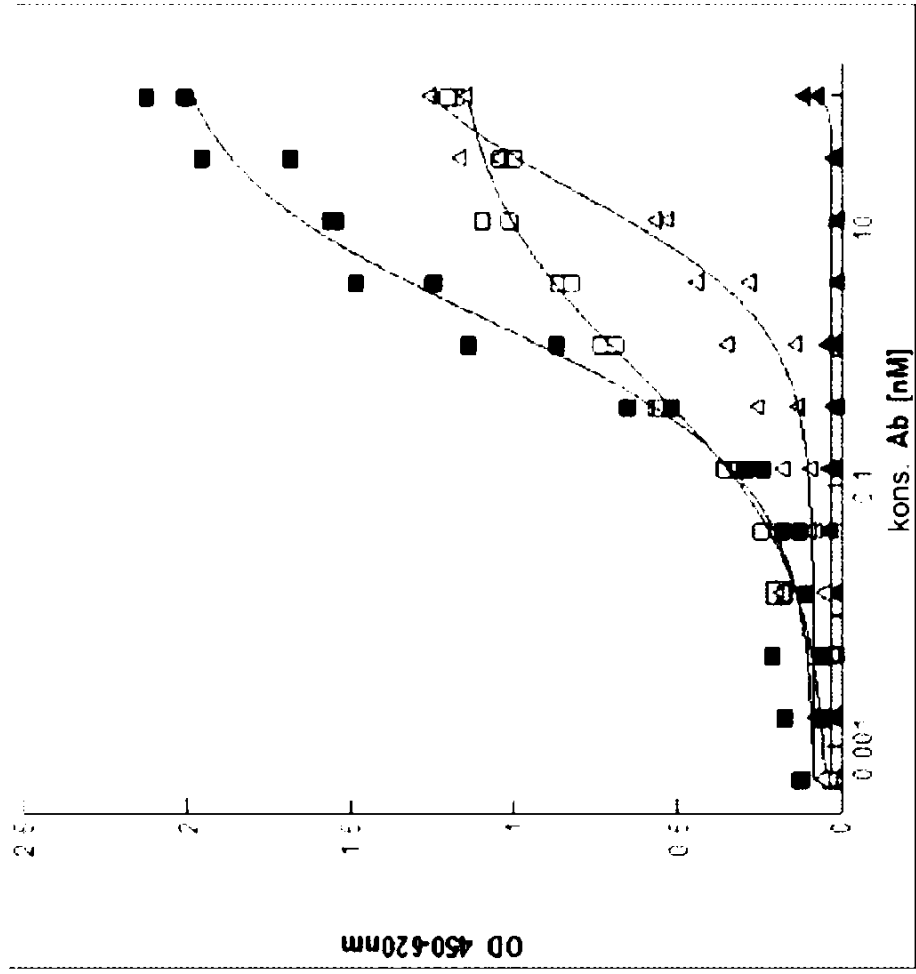
ŞEKİL 1C



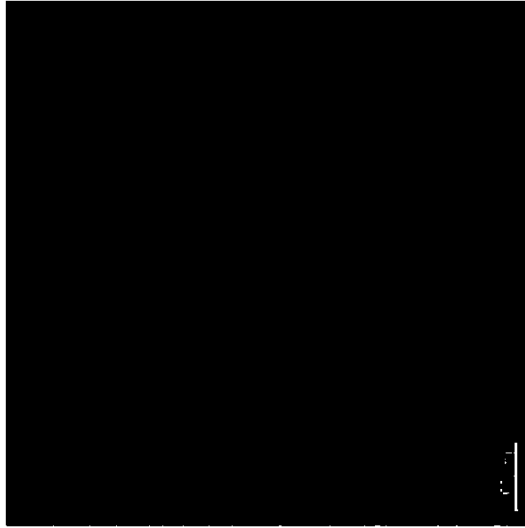
ŞEKİL 2



ŞEKİL 3

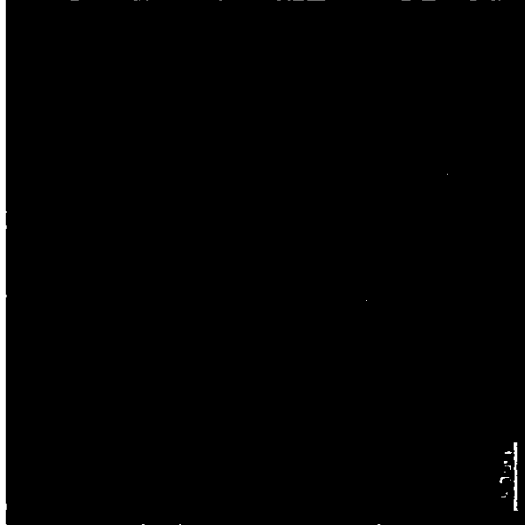


ŞEKİL 4A



mAb31

ŞEKİL 4B



sFab-mAb31

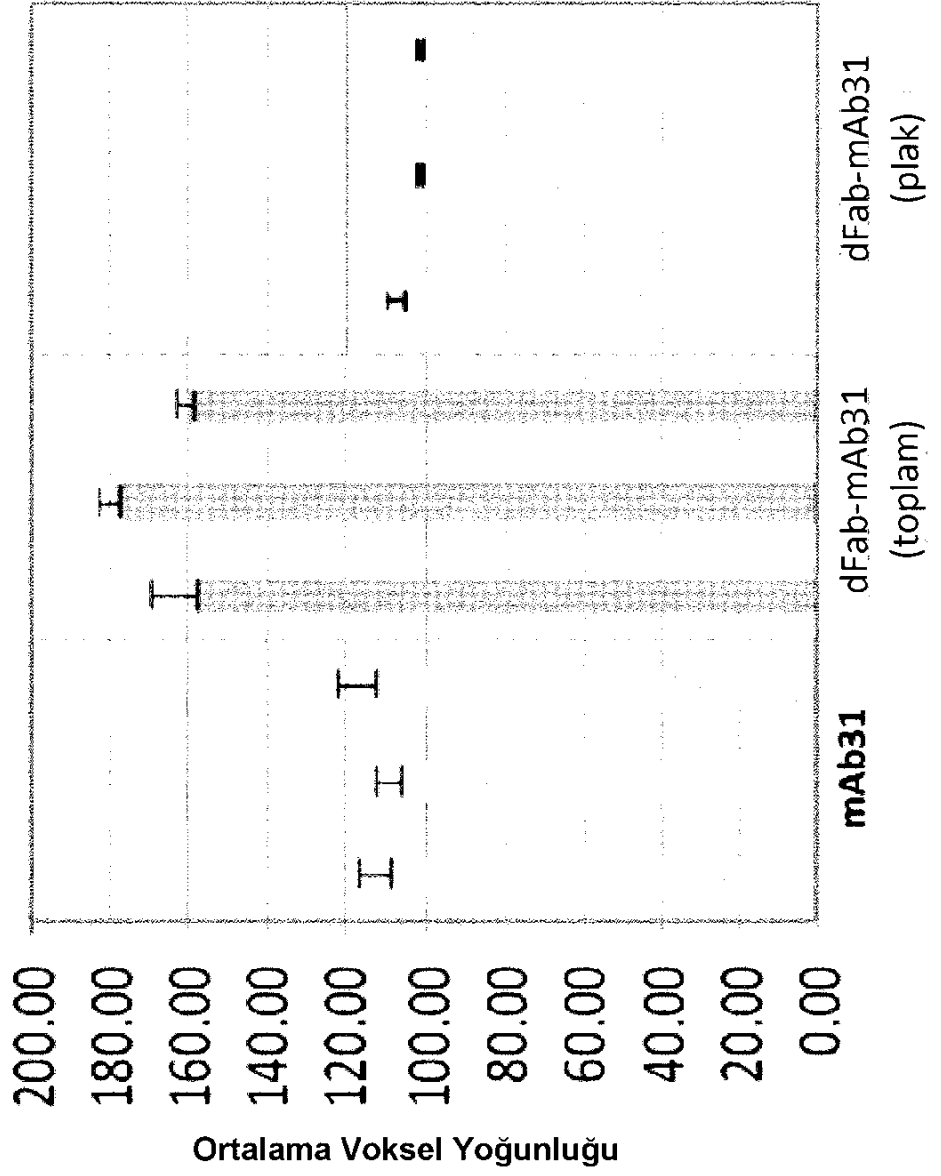
ŞEKİL 4C



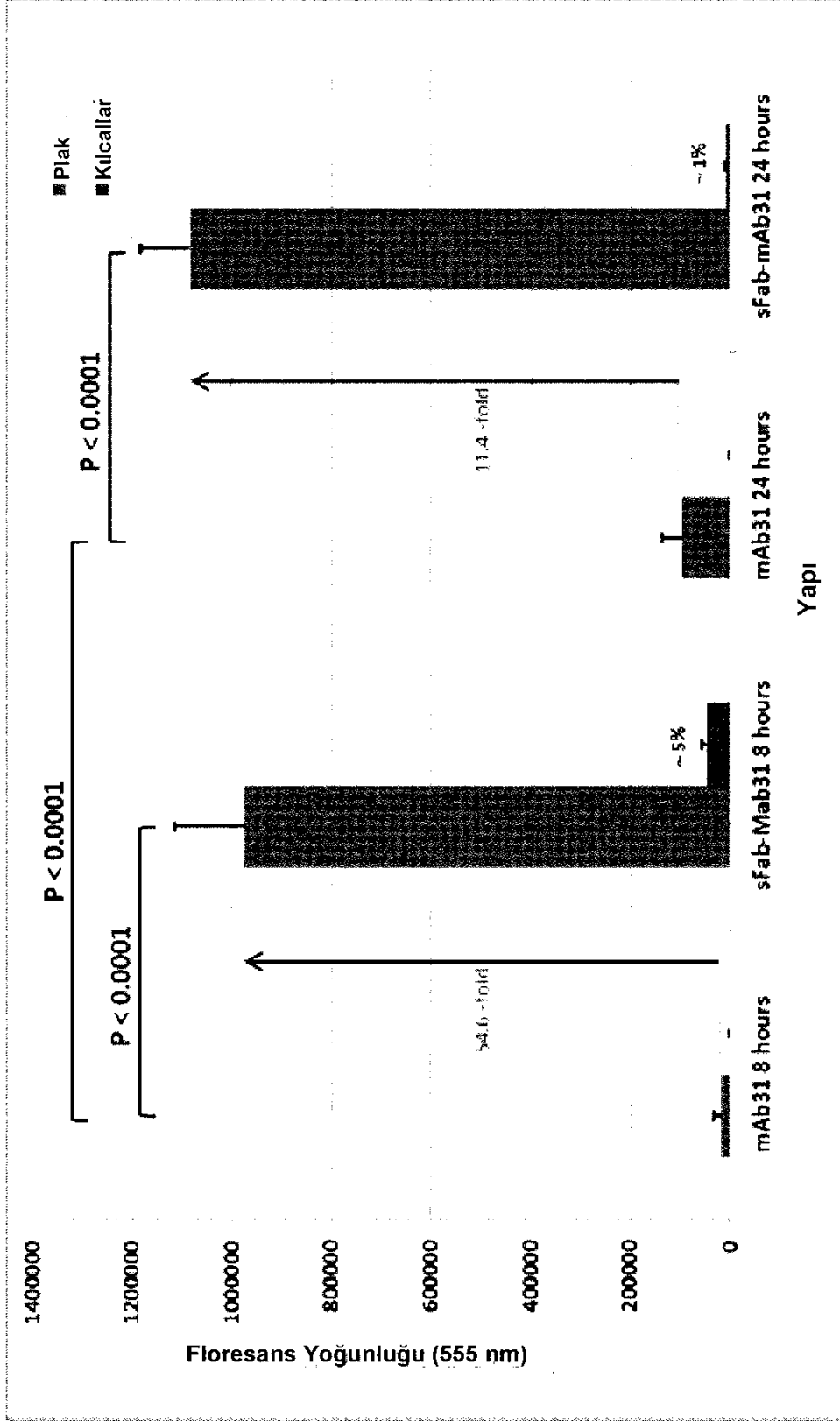
dFab-mAb31

ŞEKİL 5

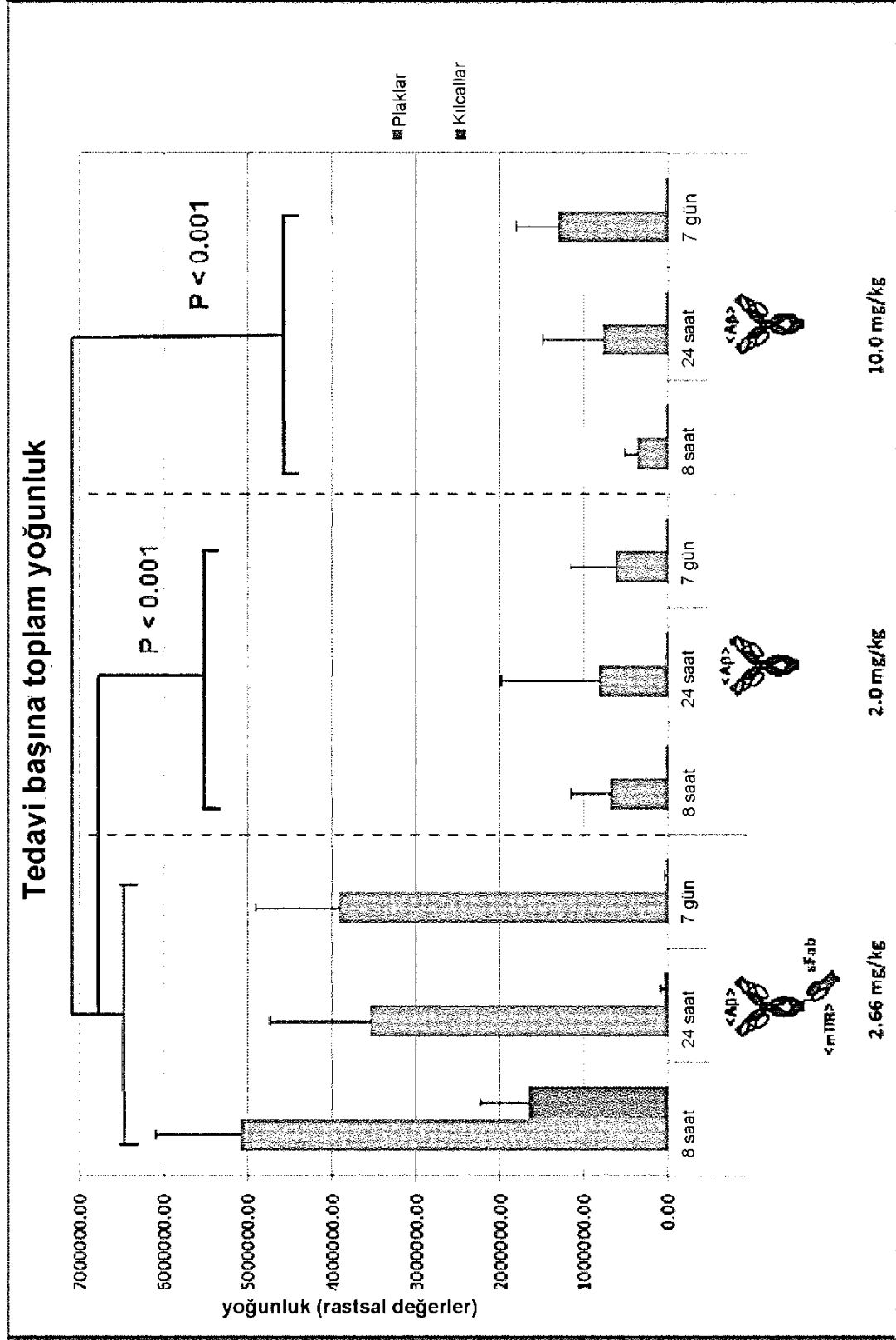
Kantifikasyon:
555 nm floresans yoğunluğu. dozdan 8 sa. sonra



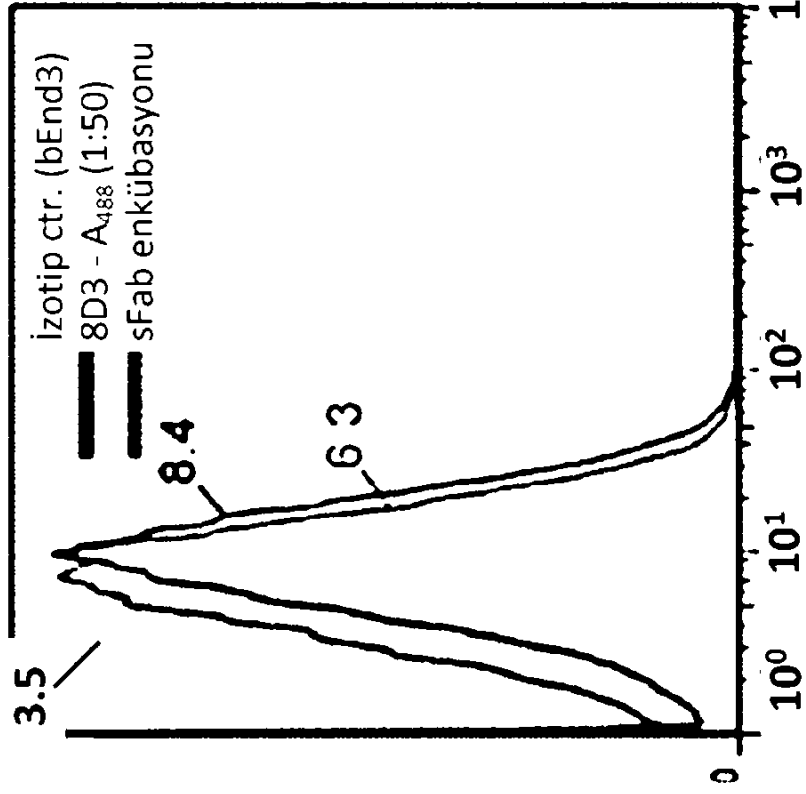
ŞEKİL 6



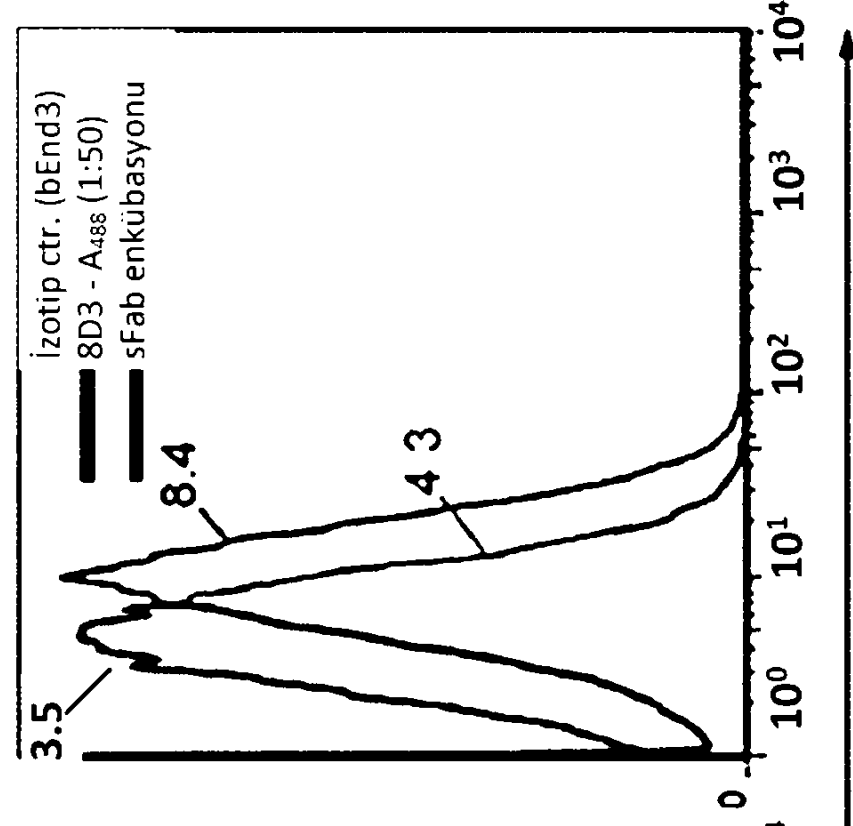
ŞEKİL 7



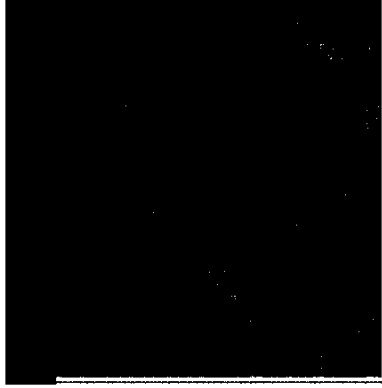
ŞEKİL 8A



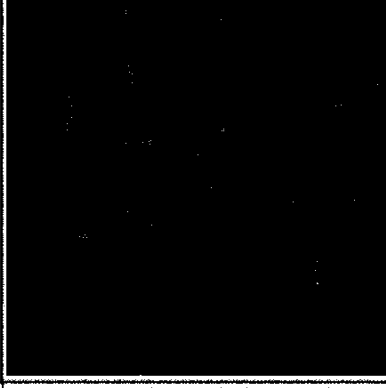
ŞEKİL 8B

8D3 - A₄₈₈

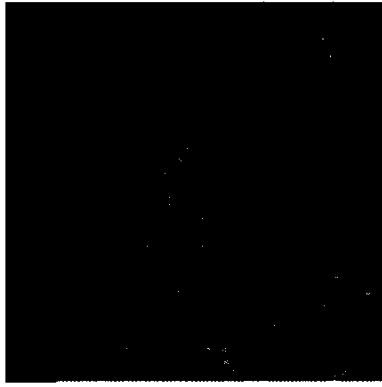
ŞEKİL 9B



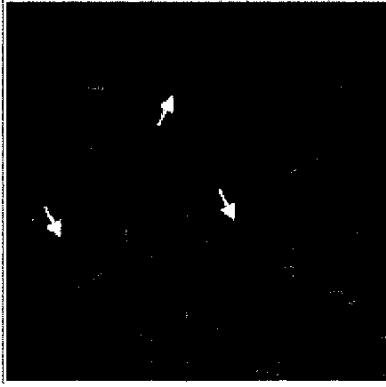
ŞEKİL 9D



ŞEKİL 9A



ŞEKİL 9C

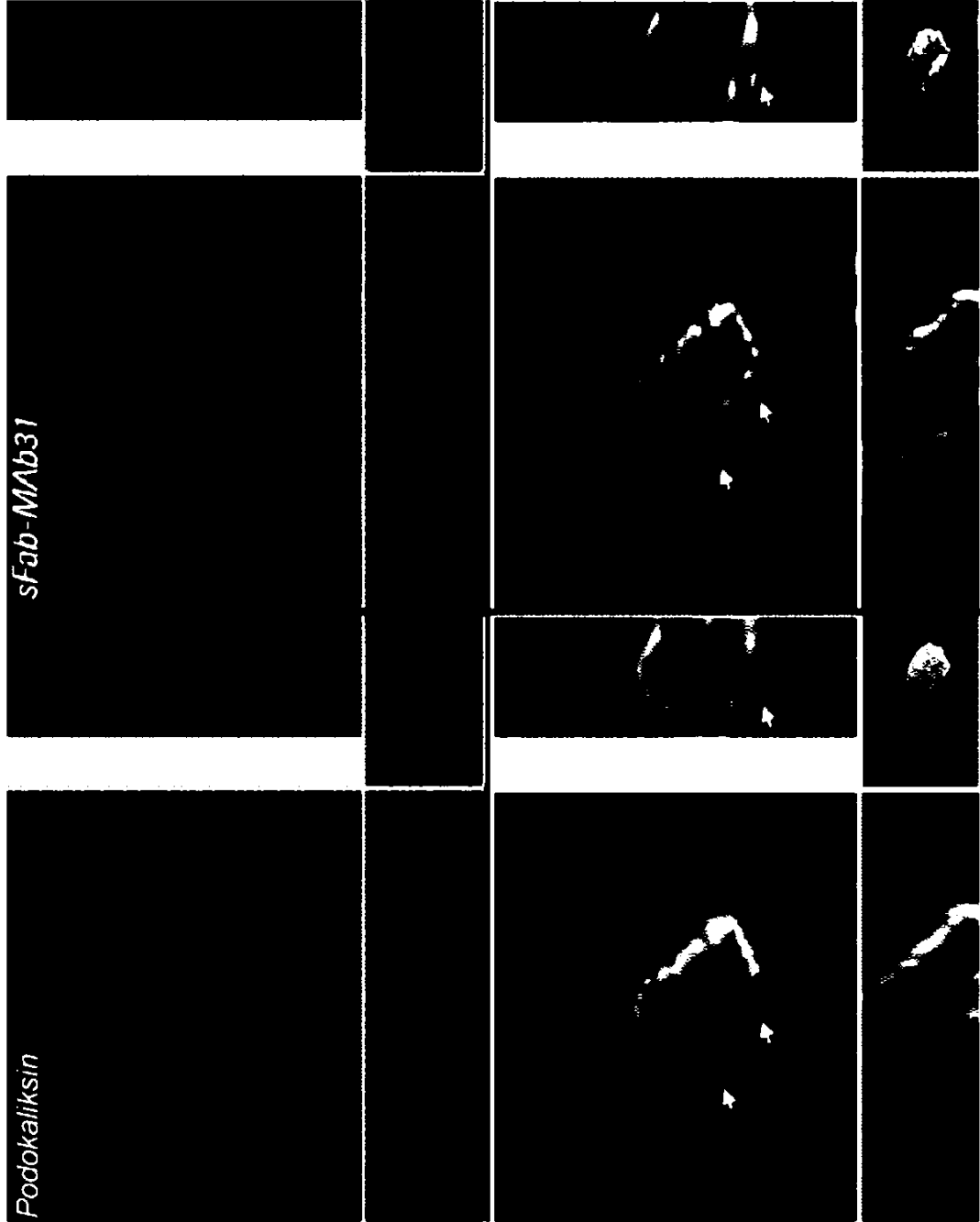


ŞEKİL 10A ŞEKİL 10B ŞEKİL 10C ŞEKİL 10D

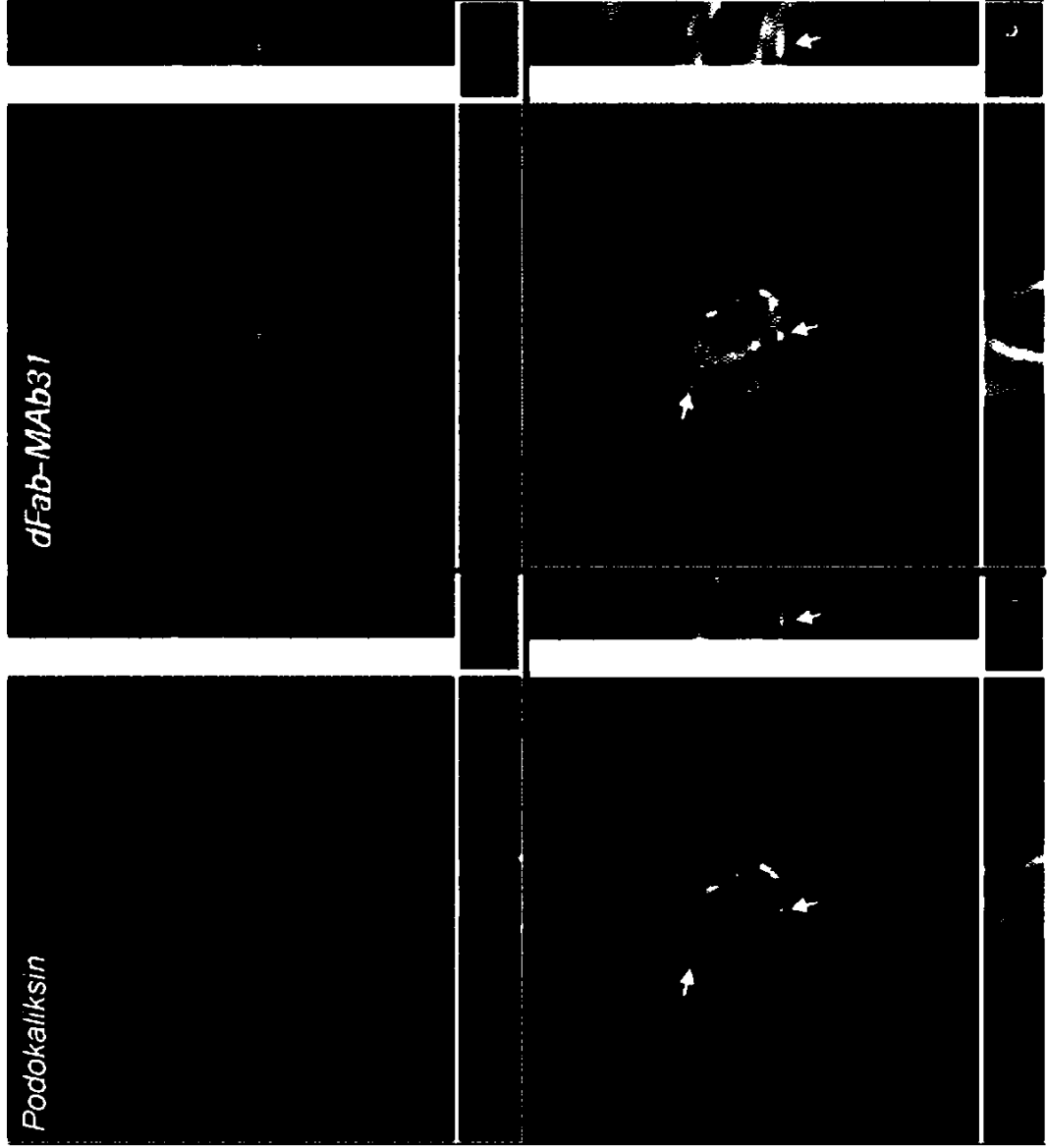


MAb31 sFab-MAb31 dFab-MAb31 Kontrol

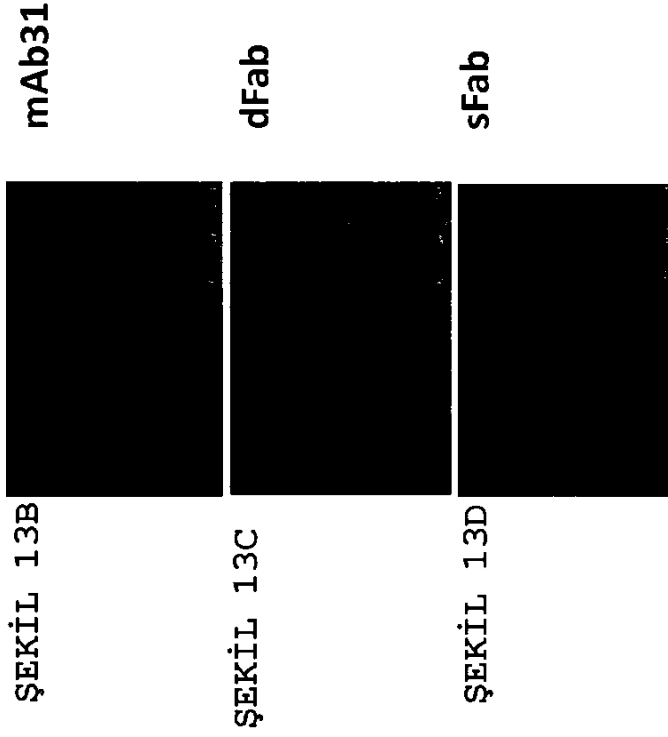
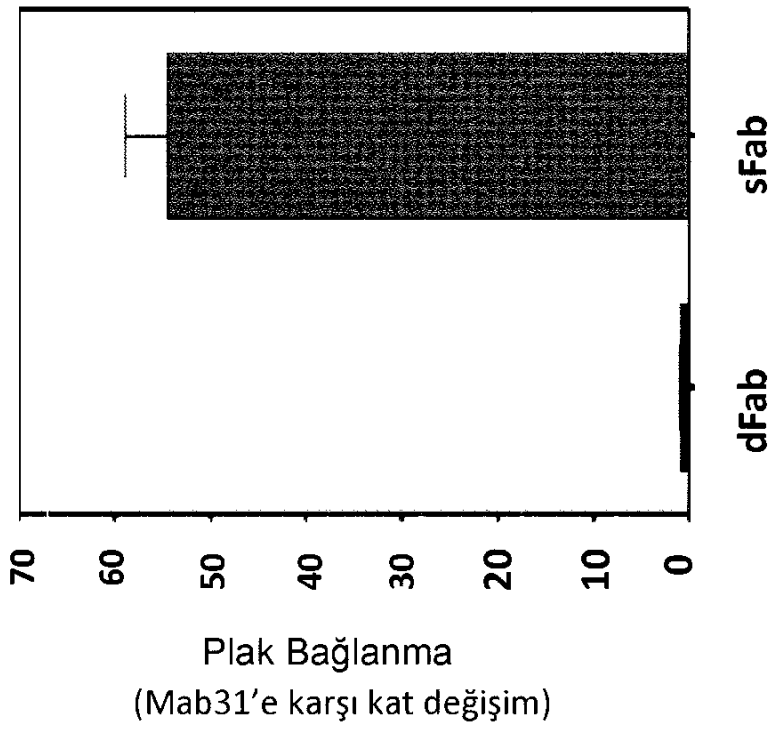
ŞEKİL 11



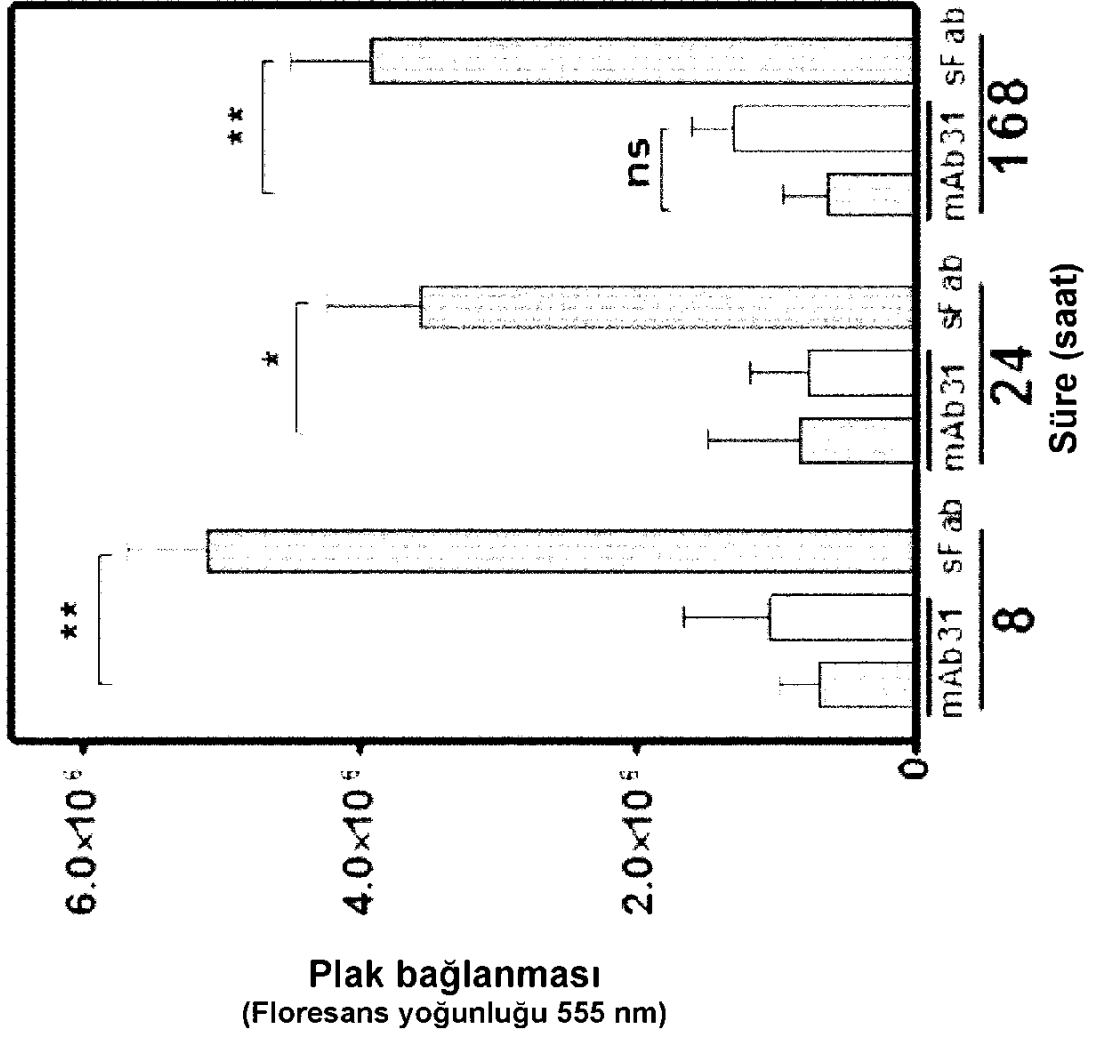
ŞEKİL 12



ŞEKİL 13A

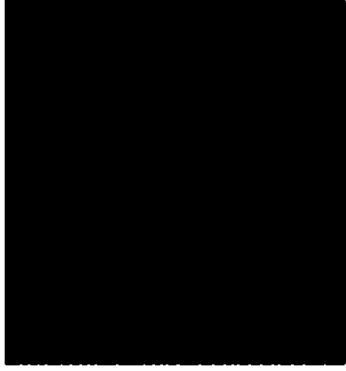


ŞEKİL 13E



ŞEKİL 13F

mAb31



ŞEKİL 13G

sFab



ŞEKİL 14A

Düşük doz mAb31



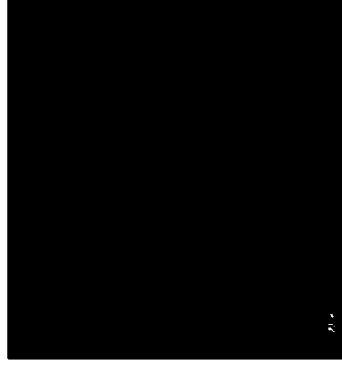
ŞEKİL 14B

Orta doz mAb31



ŞEKİL 14C

Düşük doz sFab

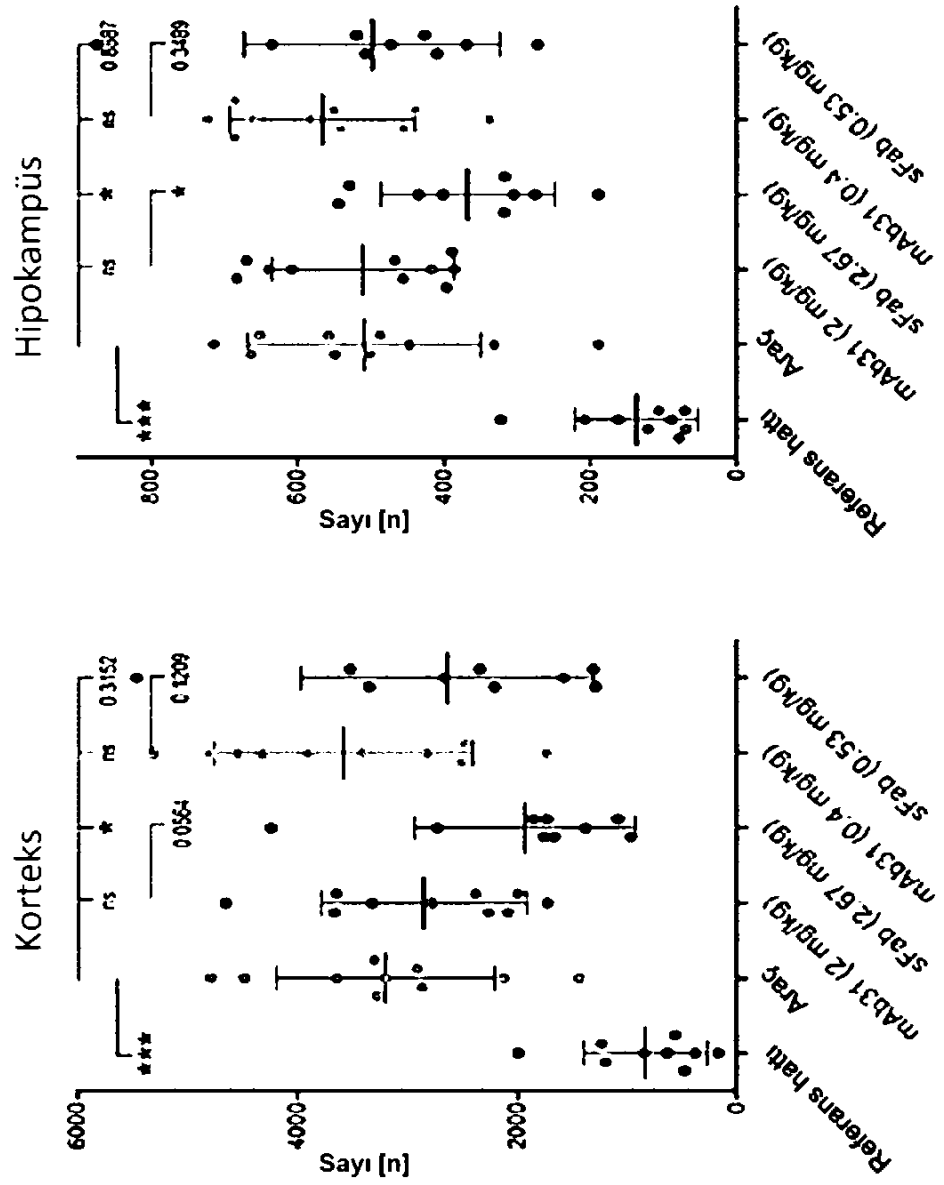


ŞEKİL 14D

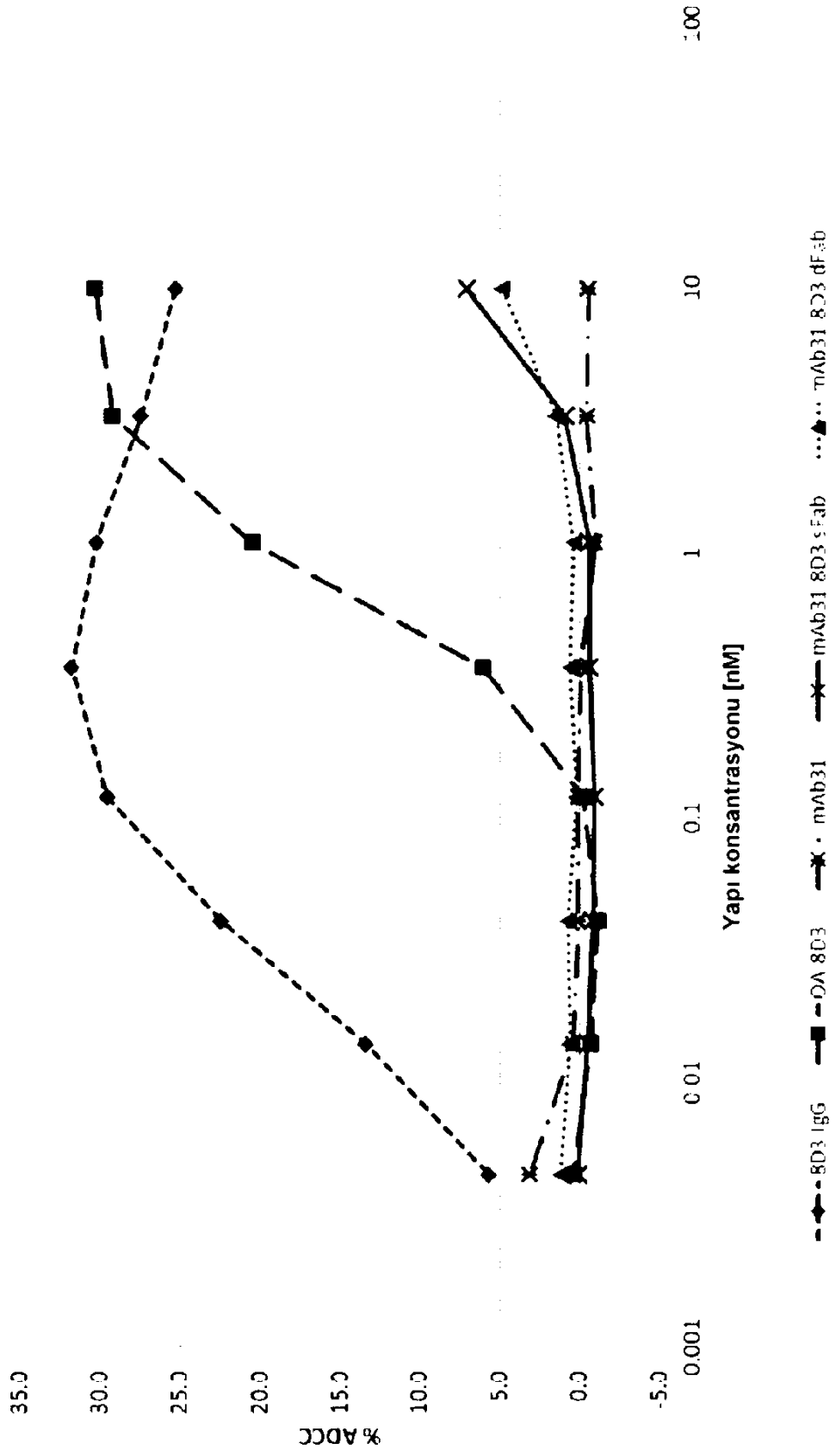
Orta doz sFab



ŞEKİL 14E

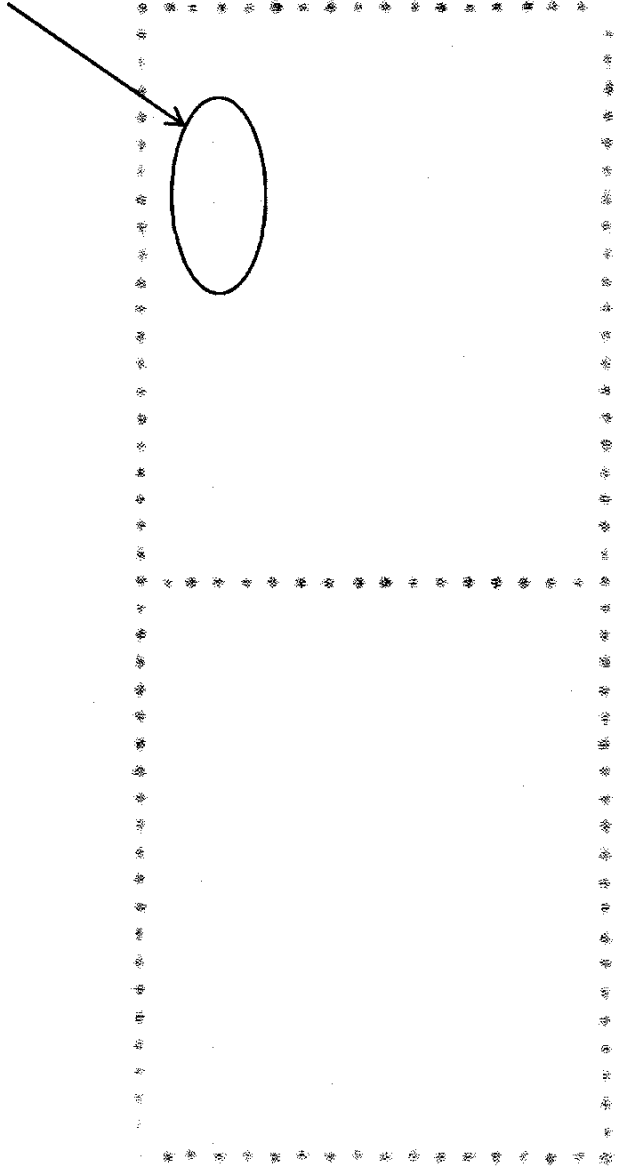


ŞEKİL 15



ŞEKİL 16

Peptidler #373, 374 ve 376



100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0