

ÖZET

BİR İNAKTİVE RGD BÖLGESİNE SAHİP MODİFİYE OSTEOPONTİN PEPTİTLERİ VE BUNLARIN KULLANIMLARI

5

Bir memelide kıl uzamasının uyarılmasına yönelik bir bileşim, bir RGD bölgesinin inaktive edildiği bir modifiye osteopontin polipeptidi ve farmasötik olarak kabul edilebilir ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya

10 seyrelticiyi içerir. Buluş ayrıca kıl uzamasının uyarılmasının yöntemlerini ve alopesi veya kellik gibi kıl dökülmesi ile bağlantılı bir hastalığın tedavi edilmesi veya önlenmesinin yöntemlerini sağlar.

İSTEMLER

1. Bir polipeptit olup, özelliği; SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansını veya SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansının bir kıl uzamasını uyarıcı aktivitesini muhafaza eden bir parçasını içermesidir.
2. İstem 1'e göre polipeptit olup, özelliği; SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansının bir parçasını içermesi veya bundan oluşmasıdır.
3. İstem 1 veya 2'ye göre polipeptit olup, özelliği; söz konusu polipeptidin, SEQ ID NO: 64, 66, 67, 70, 71, 75, 76, 81, 82 ve 88'den oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansını içermesi veya bundan oluşmasıdır.
4. Önceki istemlerden herhangi birine göre polipeptit olup, özelliği; söz konusu polipeptidin izole edilmesidir.
5. Bir bileşim olup, özelliği; aşağıdakileri içermesidir:
(a) önceki istemlerden herhangi birine göre bir polipeptit ve
(b) farmasötik olarak kabul edilebilir ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici.
6. İstem 5'e göre bileşim olup, özelliği; topikal veya intrakütanöz uygulamaya yönelik olmasıdır.
7. İstem 5 veya 6'ya göre bileşim olup, özelliği; tıbbi amaçlı kullanıma yönelik olmasıdır.
8. İstem 5 veya 6'ya göre bileşim olup, özelliği; radyoterapi ve/veya kemoterapi ile indüklenen kıl dökülmesinin tedavisinde veya önlenmesinde tıbbi amaçlı kullanıma yönelik olmasıdır.
9. İstem 5 veya 6'ya göre bileşim olup, özelliği; alopesinin tedavisinde veya önlenmesinde tıbbi amaçlı kullanıma yönelik olmasıdır.
10. İstem 5 veya 6'ya göre bir bileşim olup, özelliği; kozmetik amaçlı kullanılmasıdır

TARİFNAME

BİR İNAKTİVE RGD BÖLGESİNE SAHİP MODİFİYE OSTEOPONTİN PEPTİTLERİ VE BUNLARIN KULLANIMLARI

5

Buluş Sahası

Mevcut açıklama, memelilerde kıl uzamasının uyarılmasına yönelik ajanlar ile ilgilidir. Özellikle memelilerde (insanlar dahil) kıl uzamasının uyarılmasına yönelik bir modifiye osteopontin polipeptidini içeren bileşimler ve bunların farmasötik ve kozmetik amaçlı kullanımı sağlanır.

Altyapı

Kıl uzaması, üç aşamada meydana gelmek üzere döngülüdür: anajen, aktif uzama fazı; katajen, dejeneratif faz; ve telojen, dinlenme fazı. Telojenden sonra eski kıl lifi dökülür ve tekrar eden döngünün bir parçası olarak yeni bir kıl üretilir.

Alopesi veya kıl dökülmesi hem erkekler hem de kadınlarda meydana gelir ve yaşlanma, hormon seviyeleri, stres ve kemoterapi dahil olmak üzere birçok nedene bağlanır. Bu durumlarda kıl lifi uzunluğu ve çapının kademeli azalması ile sonuçlanmak üzere telojen aşamasında çok daha fazla kıl folikülü kalır, son olarak kısmi veya tam kellik aşamasına ulaşılır.

Alopesi areata, androgenetik alopesi, anajen effluvium, kendiliğinden indüklenen kıl dökülmesi, telojen effluvium ve yara bırakan alopesi dahil olmak üzere çeşitli kıl dökülmesi türleri bilinmektedir. Bir oto-immün rahatsızlığı olduğu düşünülen alopesi areata, kafa derisi üzerinde yuvarlak bir yamada kıl dökülmesi ile başlar. Alopesi areata, alopesi totalis olarak bilinen tüm kafa derisi kıllarının dökülmesi ve alopesi universalis olarak bilinen tüm kafa derisi ve vücut kıllarının dökülmesinin yanı sıra kafa derisi üzerinde hafif yamalı kıl dökülmesini içerir. Erkek ve dişi kellik modeli dahil olmak üzere androgenetik alopesiye, genetik yatkınlık, yaşlanma ve androjen hormonu seviyelerinin bir kombinasyonunun neden olduğu

düşünülür. Androjenetik alopesi, kıl foliküllerini olumsuz şekilde etkileyen artan androjen uyarımı ile bağlantılıdır. Artan androjen uyarımı, diğer mekanizmaların arasında, testosteronu dihidrotestosterona dönüştüren bir enzim olan 5-
5 alfa-redüktazın yükseltilmiş seviyeleri ile meydana getirilebilir. Anajen effluvium, kansere yönelik kemoterapi veya radyasyon tedavisi gibi kimyasallar veya radyasyondan dolayı kıl dökülmesidir. Kendiliğinden indüklenen kıl dökülmesi, kıla yönelik bilinçli veya bilinçsiz kendi kendine olan hasarın neden
10 olduğu kıl dökülmesini içerir. Kendi kendine olan kıl dökülmesinin iki ortak türü, birinin kendi saçını sürekli olarak çekmesi veya koparması durumunda sonuç olarak ortaya çıkan trikotilomani veya kıl dökülmesi ve sürekli olarak saçı çeken at kuyrukları veya örgüler gibi saç şekillerinin neden olduğu
15 traksiyon alopesidir. Telojen effluvium, örneğin ameliyat, çocuk doğurma veya gebeliğin sonlandırılması gibi olayların neden olduğu stres ile bağlantılı kıl dökülmesidir. Telojen effluviumun diğer nedenleri, oral kontraseptifler veya diğer reçeteli ilaçların kullanımı, tiroid anormalliği, diyabet, lupus
20 ve duygusal stresi içerir. Yara bırakana alopesi, kıl foliküllerine yönelik enfeksiyon ve inflamasyonun neden olduğu kıl dökülmesi ve yanıklar veya diğer travmaların neden olduğu kıl dökülmesini içerir.

Kıl dökülmesi, bazıları tarafından kozmetik olarak hoş olmadığı
25 düşünülen ve genellikle ilgili kişi için duygusal strese neden olan yaygın bir problemdir. Sonuç olarak alopesi tedavilerine büyük bir talep vardır. Birçok bileşim, örneğin anajenin desteklenmesi veya uzatılması yoluyla kıl uzamasını uyarma yeteneklerine yönelik olarak test edilmiştir. Bu tür
30 bileşimlerin örnekleri, minoksidil (Regaine RTM., Pharmacia Corp.) ve diazoksid gibi potasyum kanalı açıcılar; ve finasterid (Propecia RTM., Merck & Co.) gibi 5-alfa-redüktaz inhibitörleri; ve immün baskılayıcı siklosporin A'yı içerir.

Ancak kıl uzamasının uyarılmasına yönelik olarak bilinen bu tür
35 tedaviler, sınırlı etkinlik sergiler ve istenmeyen yan etkilere

neden olur. Örneğin istenmeyen diğer yan etkilerin arasında potasyum kanalı açıcılar, kardiyovasküler etkilere neden olur, finasteridi hamile olan veya hamile olabilen kadınlar için güvenli değildir ve siklosporin A, immün sistemini baskılar.

5 Ayrıca kıl uzamasının istendiği alanlara topikal olarak uygulandığında dahi, alopesiye yönelik olarak bilinen tedaviler genellikle, kadınlarda yüzdeki kıllar gibi vücutta istenmeyen alanlarda kıl uzamasına neden olur. Alopesinin tedavi edilmesine yönelik olarak bilinen bileşimlerin bu tür dezavantajları, kıl
10 dökülmesi yaşayan birçok kişinin takma saçlar ve peruklara güvenmesine yol açar. Diğer kişiler, pahalı olan, tam olarak etkili olmayan ve bazen de örneğin kemoterapi hastalarına yönelik olarak mümkün olmayan saç ektirme ameliyatını istemektedirler.

15 Dolayısıyla hem tıbbi hem de kozmetik uygulamalarda kullanılmaya yönelik olarak uygun olmak üzere kıl uzamasını uyarmak amacıyla yeni tedavilere yönelik bir ihtiyaç vardır.

EP1375518 sayılı yayında sekans RGD ve OPN'yi veya bir parçasını tanıyan bir integrin arasındaki bağlanmayı inhibe eden bir anti-
20 osteopontin antikoru açıklanır.

WO/2008/086449 sayılı yayında modifiye osteopontin polipeptitleri açıklanır ve burada RGD bölgesi, inme ve diğer iskemik yaralar gibi terapötik kullanıma yönelik olarak silme yoluyla inaktive edilmiştir.

25 Da-Wen Yu vd., yayınında anajen ve telojen fazlarından ziyade katajen sırasında pelajin dermal papilla hücreleri tarafından osteopontin gen ekspresyonu açıklanır.

Yohko U Katagiri vd., yayınında modifiye osteopontin polipeptitleri açıklanır ve burada RGD bölgesi, silme yoluyla
30 inaktive edilmiştir.

Donald Courter vd., yayınında mutasyona uğratılmış veya silinmiş RGD ile OPN izoformlarının ekspresyonu açıklanır.

WO/2005/066339 yayınında Alicycloba- cillus genomunda bulunan polinükleotitler tarafından kodlanan polipeptitler, bu

polipeptitlerin üretilmesine yönelik yöntem ve bu polipeptitleri içeren bileşimler açıklanır.

WO/2001/84159 sayılı yayında LDL reseptör sinyalleşmesinin indüklenmesi ve saptanmasına yönelik yöntemler açıklanır.

- 5 WO/1996/32961 sayılı yayında osteopontinin foliküler kıl uzamasını modüle etmesi açıklanır.

Buluşun Kısa Açıklaması

10 Mevcut açıklamanın birinci yönü, SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansını veya SEQ ID No: 63'e ait amino asit sekansını bir kıl uzamasını uyarıcı aktivitesini muhafaza eden bir parçasını içeren bir polipeptit sağlar. Mevcut açıklamanın ikinci yönü, aşağıdakileri içeren bir bileşim sağlar:

- 15 (a) daha önceki istemlerden herhangi birine göre bir polipeptit ve
(b) farmasötik olarak kabul edilebilir ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici.

20 Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Buluş, ekteki istemlerle tanımlandığı gibidir. Ekteki istemlerin kapsamına giren herhangi bir düzenleme, buluşun parçasını oluşturmaz.

25 Açıklamanın bileşimlerinin aktif bileşeni, doğal olarak görülen bir osteopontin proteininden derive edilir (*diğer bir deyişle* polipeptit, doğal olarak görülen bir osteopontin proteininin modifiye, örneğin mutasyona uğratılmış bir versiyonunkine karşılık gelen bir amino asit sekansını içerir.

30 Kemik siyaloprotein I (BSP-1 veya BNSP), erken T-lenfosit aktivasyonu (ETA-1), salgılanan fosfoprotein 1 (SPP1) 2ar ve Rickettsia direnci (Ric) olarak bilinen osteopontin, çeşitli memeli türlerinde korunan bir gen ürünüdür.

Gen, yedi eksona sahiptir, uzunluk olarak 5 kilobaz kapsar ve insanlarda kromozom 4 bölgesinin 13 (4q13) uzun kolu üzerinde
35 konumlandırılır. Protein, ~300 amino asit kalıntısından oluşur

ve asidik kalıntı bakımından zengindir: %30-36 aspartik veya glutamik asittir. Osteopontin, Golgi cisimciğindeki post-translasyonel modifikasyon sırasında proteine bağlanan, 10 siyalik asit kalıntısını içeren ~30 bağlı karbohidrat kalıntısına sahiptir.

Osteopontin ilk olarak, mineralize kemik matrisi (Franzen & Heinegard, 1985, Biochem. J. 232(3)715-24) üzerinde kemik bağlama osteoklastlarındaki yeni bir siyaloprotein olarak keşfedilmiştir. Osteopontin ismi, kemikteki (osteo-) proteinin varlığı ve kemik hücreleri ile mineral fazı arasındaki bir köprü (-ponlar) oluşturma yeteneğinden gelir. Sekans analizi ve akabindeki yapısal çalışmalar osteopontinin, osteopontinin mineral bağlanma özelliklerine aracılık ettiği düşünülen birkaç on aspartik asit kalıntısının yüksek oranda asidik bir bölgesinden oluşan 32 kDa'lık bir glikoprotein olduğunu göstermiştir. Ayrıca osteopontin molekülünün orta kısmında ayrıca bir R-G-D sekansı boyunca aracılık edilen bir hücre bağlanma bölgesi vardır (Oldberg vd., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(23):8819-23).

Osteopontin temel olarak, osteopontinin birçok vücut sıvısında salgılanması ile sonuçlanmak üzere osteoblastlar ve çeşitli epitelyal hücre tiplerinde ifade edilir. Kemik, osteopontinin depolandığı ve bunun büyük miktarlarda geri kazanabildiği doku tipidir. Osteopontinin ifadesi ayrıca vasküler düz kas hücrelerinde, farklı kanser hücresi tiplerinde ve inflamatuvar hücreler arasında (spesifik olarak makrofajlar ve T lenfositler) indüklenebilir. Adezyon, proliferasyon, göç, anti-apoptoz ve kemo atraksiyon gibi çeşitli önemli hücresel fonksiyon osteopontine atfedilmiştir. Bu fonksiyonların bazılarının, farklı integrinler ile, çoğunlukla $\alpha\beta3$, fakat aynı zamanda $\alpha\beta1$ ve $\alpha\beta5$ ile etkileşim kuran RGD hücre adezyonu bölgesi aracılığıyla aracılık edildiğine inanılır (incelemek üzere bakınız, Scatena vd., 2007, Arterio. Thromb. Vasc. Biol. 27:2302-2309).

Son zamanlarda osteopontin, inflamasyon ve immün yanıtlarında yer alan birkaç hücre tipini modüle edebilen etkili bir sitokin olarak ortaya çıkmıştır. Osteopontine atfedilen fonksiyonların geniş aralığı karıştırılmıştır ve tümü tekli hücre bağlayıcı RGD sekansı tarafından açıklanamaz. Osteopontin R¹⁴⁵-G-D-S-L-A-Y-G-L-R-S¹⁵⁵'te **(SEQ ID NO:122)** (UniProt kodu P10923'e sahip amino asitler 144 ila 154'e karşılık gelir) on bir amino asit peptidinin tanımlanması ve daha sonra fonksiyonel olarak eşleştirilmesi durumunda açıklama gelmiştir. $\alpha_v\beta_3$ integrine bağlanmaya aracılık eden, bilinen R¹⁴⁵ -G-D¹⁴⁷ bölgesine ek olarak osteopontin molekülündeki iki ek temel bölge, diğer bir deyişle yüksek oranda spesifik bir trombin klevaj bölgesi, *diğer bir deyişle* R¹⁵⁴ -S¹⁵⁵ ve $\alpha_9\beta_1$ integrine (bakınız Scatena vd., *yukarıda yer almaktadır*) bağlanan bir kriptin integrin bağlanma bölgesi, *diğer bir deyişle* S¹⁴⁸-L-A-Y-G-L-R¹⁵⁴ **(SEQ ID NO:123)** keşfedilmiştir. $\alpha_4\beta_1$ 'e yönelik bir ek bağlanma bölgesi ayrıca tanımlanmıştır (bakınız Scatena vd., *yukarıda yer almaktadır*). Açıklamanın bileşimlerindeki osteopontinden derive edilen polipeptidin karakterize edici bir özelliği, osteopontinde doğal olarak bulunan RGD bölgesinin, fonksiyonel olmayacak (en azından kısmen) şekilde inaktive edilmesidir. Örneğin RGD bölgesinin inaktivasyonu, osteopontinden derive edilen polipeptidin, doğal olarak görülen osteopontin proteinine bağlanan integrinlerin biri veya daha fazlasına bağlanmasını önleyebilir.

Böylece "modifiye osteopontin polipeptidi" ile, RGD bölgesinin fonksiyonel olmadığı (en azından kısmen) doğal olarak görülen bir osteopontin proteininin modifiye edilmiş bir formuna karşılık gelen polipeptitlerin yanı sıra 'tam uzunluktaki' modifiye osteopontinin kıl uyarıcı özelliğini koruyan parçaları ve varyantları da dahil edilir. Örneğin modifiye osteopontin polipeptidinin fonksiyonel olmayan RGD bölgesi integrin $\alpha_v\beta_3$ 'e bağlanamayabilir (bakınız, Scatena vd., *yukarıda yer almaktadır*).

Avantajlı bir şekilde, doğal olarak görülen osteopontin proteini memeliye, *örneğin* insana aittir.

Açıklamanın bileşimlerinde bulunan modifiye osteopontin polipeptitleri, memelilerde kıl uzamasını uyarabilir.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde polipeptit, insan kılının uzamasını uyarabilir.

- 5 Mevcut açıklamanın diğer bir düzenlemesinde polipeptit, kıl uzamasını *in vivo* olarak uyarabilir.

Mevcut açıklamanın diğer bir düzenlemesinde polipeptit, doğal suş insan osteopontinden daha fazla etkinlik ile kıl uzamasını *in vivo* olarak uyarabilir. Bu bağlamda "daha büyük etkinlik" ile

- 10 daha düşük bir dozda etki ve/veya etkinliğin daha hızlı başlangıcı ve/veya daha büyük maksimum etki (örneğin, daha fazla sayıda yeni folikül veya kıl yoğunluğu) dahil edilir. Mevcut açıklamanın diğer bir düzenlemesinde polipeptit, aynı dozdaki doğal suş insan osteopontinden daha hızlı bir etki başlangıcı ve
15 daha büyük bit maksimum kıl uzama etkisi ile kıl uzamasını *in vivo* olarak uyarabilir (örneğin bakınız Örnek B).

Teknikte uzman kişiler tarafından, kıl uzamasının uyarımına, mevcut kıl foliküllerinin etkisi tarafından ve/veya yeni kıl foliküllerinin oluşumunun indüklenmesi yoluyla aracılık
20 edilebileceği kabul edilecektir.

Bu nedenle mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde modifiye osteopontin polipeptidi, mevcut kıl foliküllerinin uyarabilir örneğin anajen fazının uzatılması yoluyla ve/veya dinlenen foliküller aktif olacak şekilde telojen fazının kısaltılması
25 yoluyla).

Mevcut açıklamanın diğer bir düzenlemesinde polipeptit, aynısının üretilmesine yönelik olarak yeni kıl foliküllerinin veya kök hücrelerin oluşumunu indükleyebilir.

Doğal olarak görülen osteopontin proteinleri tipik olarak
30 yaklaşık 300 amino asit uzunluğundadır. Ancak, teknikte uzman kişilerce açıklamanın bileşimlerinde bulunan modifiye osteopontin polipeptitleri uzunluk bakımından değişiklik gösterir.

Tipik olarak polipeptit, 500 amino asit uzunluğunda, örneğin
35 400, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 200,

150, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 veya daha az amino asit uzunluğundadır.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde polipeptit, 250 ile 350 amino asit uzunluğunda, örneğin 280 ile 300 amino asit

5 uzunluğundadır (örn. 293 amino asit uzunluğunda).

Mevcut açıklamanın alternatif bir düzenlemesinde polipeptit, 10 ile 20 amino asit uzunluğunda, örneğin 12 ile 18 amino asit uzunluğundadır (örn. 15 amino asit uzunluğunda).

Yukarıda tartışıldığı üzere modifiye osteopontin polipeptitler, 10 normalde doğal olarak görülen osteopontin proteinlerinde bulunan aktif tripeptit sekansı "arjinin-glisin-aspartik aside" sahip değildir. Bu RGD bölgesinin birçok farklı strateji ile inaktive edilebileceği kabul edilecektir.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde RGD bölgesi, doğal olarak 15 görülen bir osteopontin proteinine göre bir veya daha fazla silme, ornatım ve/veya ekleme veya bunların kombinasyonlarını içerecek şekilde modifiye osteopontin polipeptitinde bir veya daha fazla amino asitte mutasyona uğratılır.

Örneğin RGD bölgesi, arjinin ve/veya glisin ve/veya aspartik 20 asit kalıntısı olmayacak şekilde en azından kısmen silinebilir. Alternatif olarak veya buna ek olarak RGD bölgesi, bir veya daha fazla amino asitte ornatılabilir. Örneğin arjinin ve/veya glisin ve/veya aspartik asit kalıntısı, başka bir amino asit ile ornatılabilir. Bu ornatımlar, korunumlu olabilir veya 25 olmayabilir.

Benzer şekilde RGD bölgesi, aşağıdakiler dahil ornatımlar ve silmelerden oluşan bir kombinasyon yoluyla inaktive edilebilir:

- (a) arjinin kalıntısının ornatımı ve glisin ve aspartik asit kalıntılarının silinmesi;
- 30 (b) arjinin ve glisin kalıntılarının ornatımı ve aspartik asit kalıntısının silinmesi (örneğin -RGD- tripeptit, dipeptit sekansı -DI- ile değiştirilebilir);
- (c) arjnin ve aspartik asit kalıntılarının ornatımı ve glisin kalıntısının silinmesi; veya

(d) arjinin ve aspartik asit kalıntılarının silinmesi ve glisin kalıntısının ornatımı.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde tripeptit -RGD- sekansı, dipeptit -DI- sekansı ile değiştirilir.

5 Herhangi bir teoriye bağlı kalmak istemeksizin, RGD sekansı inaktivasyonunun, çevredaki ortamda yeni bir alanın oluşmasına/maruz bırakılmasına neden olan bir osteopontin polipeptidindeki konformasyonel bir değişime (karşılık gelen doğal olarak görülen osteopontin proteinine göre) neden
10 olabildiği düşünülür.

Tercih edilen bir düzenlemede modifiye osteopontin polipeptidi, aşağıda yer alan SEQ ID NO: 1'e ait amino asit sekansını veya SEQ ID NO:1'e ait amino asit sekansının bir kıl uzamasını uyarıcı aktivitesini (en azından kısmen) muhafaza eden bir parçasını,
15 varyantı, türevi veya füzyonu (veya söz konusu parçanın, varyantının veya türevinin bir füzyonu) içerir veya bunlardan oluşur (inaktive RGD bölgesini kapsayan bölgenin altı çizilmiştir):

```
MRLAVICFCLFGIASSLPVYVTDGGSSREKLYSLHFDPIATNLVDPDQKQNLAPQNAVCSREKDDFKQRT  
LPSSNSHESHDMDDDDDDDDDDGSDHAESGDSVDSDESDSHHSDSDDETVTASTQADTFPIVPTVDPNGD  
IGLAYGLRCKGRGCFQVDEQYPDATDEDLTCHMKGGEGKESLDVTPVAQLLCKPDDQDUNGKGGHGGQQLDE  
RGLETHREHSGKESQESADQGGDVIDGQAGCKASLEHQSHKFKSHKDKLVLDPKSKEDDRLKFRISHELESS  
GCEVN
```

SEQ ID NO: 1

20 Burada kullanıldığı şekliyle 'amino asit' terimi, standart yirmi adet genetik olarak kodlanmış amino asit ve bunların 'D' formunda karşılık gelen stereoizomerler (doğal 'L' formuna kıyasla), omega-amino asitleri ve diğer doğal olarak görülen amino asitler, konvansiyonel olmayan amino asitler (örn. α,α -diornatik
25 amino asitler, N-alkil amino asitler vb.) ve kimyasal olarak türetilmiş amino asitleri içerir (aşağıya bakınız).

Bir amino asit, spesifik olarak numaralandırıldığında, örneğin 'alanin' veya 'Ala' veya 'A', söz konusu terim, aksi özellikle belirtilmedikçe hem L-alanin hem D-alanin'i ifade eder. Diğer
30 konvansiyonel olmayan amino asitler, istenen fonksiyonel özellik

polipeptit tarafından muhafaza edildiği sürece ayrıca mevcut açıklamanın polipeptitleri için uygun bileşenler olabilir. Gösterilen polipeptitler için, kodlanmış her bir amino asit kalıntısı, uygun olan yerlerde, konvensiyonel amino asidin alışılmış adına karşılık gelen tek bir harf gösterimi ile temsil edilir. Alışılmışı uygun olarak, burada açıklanan amino asit dizileri, N-terminal ucunda C-terminal ucu yönünde sağlanır.

Tipik olarak açıklamanın bileşimlerinde kullanılan modifiye osteopontin polipeptitleri, L-amino asitlerini içerir veya bundan oluşur.

"Parça" terimi ile SEQ ID NO: 1'e ait amino asit sekansının en az 6 bitişik amino asitini, örneğin SEQ ID NO: 1'e ait en az 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 286, 287, 288, 289 290, 291 veya 292 bitişik amino asiti içerir.

Örneğin parça veya varyant, SEQ ID NO: 63 ila 120'ten herhangi birine göre bir amino asit sekansını içerebilir veya bundan oluşur (aşağıda ayrıntılı bir şekilde verildiği üzere).

Mevcut açıklamanın belirli bir düzenmesinde polipeptit, aşağıda yer alan SEQ ID NO:63'e ait amino asit sekansını içerir veya bundan oluşur.

VDTYDGDISVVYGLR SEQ ID NO: 63 ["FOL-005"]

Örneğin polipeptit, SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansının bir türevini içerebilir veya bundan oluşabilir.

Bir veya daha fazla amino asitin kimyasal türevleri, fonksiyonel bir yan grubu ile tepkime yoluyla gerçekleştirilebilir. Söz konusu türevlendirilmiş moleküller arasında örneğin amin hidroklorürler, *p*-tolüen sülfonil grupları, karboksibenzoksi grupları, *t*-butiloksikarbonil grupları, kloro asetil grupları veya formil gruplarını oluşturmak üzere serbest amino grupların türetilmiş olduğu moleküller bulunur. Serbest karboksil grupları, tuzları, metil ve etil esterleri veya esterlerin veya hidrazitlerin diğer türlerini oluşturmak üzere

türevlendirilebilir. Serbest hidroksil grupları, O-asil veya O-alkil türevlerini oluşturmak üzere türevlendirilebilir. Ayrıca kimyasal türevler olarak yirmi adet standart amino asitin doğal olarak görülen amino asit türevlerini içeren peptitler dahil edilmiştir. Örneğin: 4-hidroksiprolin, prolin için ornatılabilir; 5-hidroksilizin, lizin için ornatılabilir; 3-methilhistidin, histidin için ornatılabilir; homoserin, serin için ornatılabilir ve lizin için ornitin ornatılabilir. Türevler ayrıca, gerekli aktivite muhafaza edildiği sürece bir veya daha fazla ekleme veya silme içeren peptitleri içerir. Diğer dahil edilen modifikasyonlar arasında amidasyon, amino terminal asilasyonu (örn. asetilasyon veya tioglikolik asit amidasyonu), terminal karboksilamidasyonu (örn. amonyak veya metilamin) ve benzer terminal modifikasyonları bulunur.

15 Teknikte uzman kişilerce, aşağıda ayrıntılı olarak verilen modifiye osteopontin polipeptitlerin konformasyonunu ve istenilen özelliklerini taklit edebilen peptidomimetik bileşiklerin yararlı olabileceği takdir edilecektir. Örneğin açıklamanın polipeptitleri, sadece amino asit kalıntılarının peptit (-CO-NH-) bağlantıları yoluyla birleştirildiği molekülüleri değil ayrıca peptit bağına tersine döndürüldüğü molekülüleri içerir. Söz konusu retro-ters peptidomimetikleri, teknikte bilinen yöntemler, örneğin Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237 yayınında tarif edilen yöntemler gibi yöntemler kullanılarak oluşturulabilir. Bu yaklaşım, omurgayı kapsayan değişiklikleri içeren, ancak yan zincirlerin oryantasyonunu içermeyen psödopeptitleri kapsar. CO-NH peptit bağlarının yerine NH-CO bağlarını içeren retro-ters peptitler, proteolize çok daha dirençlidir. Alternatif olarak açıklamanın polipeptidi, amino asit kalıntılarının birinin veya daha fazlasının, konvansiyonel amit bağlantısı yerine bir - γ (CH₂NH)-bağı ile bağlandığı bir peptidomimetik bileşik olabilir.

Başka bir alternatifte peptit bağı, amino asit kalıntılarının karbon atomları arasındaki aralığı muhafaza eden uygun bir bağlayıcı parçanın kullanılması şartıyla dağılabilir; bağlayıcı

parçanın bir peptit bağı ile aynı yük dağılımına ve büyük ölçüde aynı düzlemselliğe sahip olması avantajlı olabilir.

Poliipeptitin, eksoproteolitik sindirimine olan duyarlılığın indirilmesine yardımcı olmak için N veya C terminallerinde

5 klasik olarak bloke edilebildiği takdir edilecektir.

Çeşili kodlanmış veya modifiye amino asitler, örneğin D-amino asitleri ve N-metil amino asitleri ayrıca memeli polipeptitleri modifiye etmek için kullanılmıştır. Ayrıca farzedilen bir bioaktif konformasyon, bir kovalent modifikasyon, örneğin
10 siklizasyon veya laktam veya diğer türde köprülerin katılmasıyla stabilize edilebilir; örneğin bkz. Veber vd., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2636 ve Thursell vd., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111:166.

Birçok sentetik strateji arasındaki ortak tema, bir peptit bazlı
15 çerçeveye bir miktar siklik parçanın katılması olmuştur. Siklik parça, peptit yapısının konformasyonel boşluğunu kısıtlar ve bu, sık sık belirli bir biyolojik reseptör için peptidin artmış bir spesifikliğine neden olur. Bu stratejinin ilave bir avantajı, bir siklik parçasının bir peptide katılması ayrıca hücrel
20 peptidazlara azalmış bir duyarlılığa sahip peptite neden olması olabilir.

Bu nedenle açıklamanın örnek niteliğindeki polipeptitleri, terminal sistein amino asitlerini içerir. Böyle bir polipeptit, terminal sistein amino asitlerindeki merkaptid gruplarının
25 disülfid bağı oluşumu yoluyla bir heterodetik siklik formda veya terminal amino asitler arasındaki amit peptit bağı oluşumu yoluyla bir homodetik formda meydana gelebilir. Yukarıda belirtildiği gibi, N ve C terminal bölge sisteinleri arasındaki disülfid veya amit bağları yoluyla siklikleşen küçük peptitler,
30 kimi zaman doğrusal peptitlerde görülen spesifiklik ve yarı ömür problemlerini proteolizin azaltılması ve ayrıca yapının rijitliğini arttırılması yoluyla çözer ve böylece yüksek düzeyde spesifik bileşikler elde edilebilir. Disülfid bağlar ile siklikleştirilen polipeptitler, hala proteolitik bozunmaya karşı
35 duyarlı olabilen serbest amino ve karboksi terminallere

sahipken, N terminal amin ve C terminal karboksil arasındaki bir amit bağının oluşumu yoluyla siklikleştirilen peptitler dolayısıyla artık serbest amino veya karboksi terminallerini içermez. Bu nedenle mevcut açıklamanın peptitleri, bir C-N 5 bağlantısı veya bir disülfid bağlantısı yoluyla bağlanabilir. Mevcut açıklama, peptit siklizasyonu yöntemi ile herhangi bir şekilde sınırlandırılmaz, ancak siklik yapısının uygun herhangi bir sentez yöntemi yoluyla elde edilebildiği peptitleri kapsar. Bu nedenle heterodetik bağlantılar, bunlarla sınırlı olmamak 10 üzere disülfid, alkilen veya sülfid köprüleri yoluyla oluşumu içerebilir. Disülfid, sülfid ve alkilen köprüler dahil siklik homotetik peptitlerin ve siklik heterodetik peptitlerin sentez yöntemleri, US 5,643,872 yayınında açıklanmıştır. Siklizasyon yöntemlerinin diğer örnekleri arasında klik kimyası, epositler, 15 aldehitamin tepkimeleri yoluyla ve aynı zamanda US 6,008,058 sayılı yayında açıklanan yöntemlerle siklizasyon bulunur. Bu terminal modifikasyonları, proteinaz sindirimi yoluyla duyarlılığın azaltılması ve dolayısıyla çözeltelerde, özellikle proteazların bulunduğu biyolojik sıvılarda peptitlerin 20 yarıömrünün uzatılması için yararlıdır ve aynı zamanda iyi bilinir. Polipeptit siklizasyonu ayrıca siklizasyon yoluyla oluşturulan stabil yapılar ve siklik peptitlerde görülen biyolojik aktiviteler nedeniyle yararlı bir modifikasyondur. Bu nedenle mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde, mevcut 25 açıklamanın birinci yönünün polipeptidi sikliktir. Ancak mevcut açıklamanın alternatif bir düzenlemesinde polipeptit doğrusaldır. Ancak mevcut açıklamanın tercih edilen bir düzenlemesinde, modifiye osteopontin polipeptidi, PEGilasyon, amidasyon, 30 esterifikasyon, asilasyon, asetilasyon ve/veya alkilasyon yoluyla modifiye edilmiş veya türevlendirilmiş bir veya daha fazla amino asit içerir. Teknikte uzman kişiler, modifiye osteopontin polipeptidinin bir veya daha fazla amino asitte glikosile edilebileceğini kabul 35 edecektir. Örneğin polipeptit, bir karbohidrat grubuna

bağlanabilen, karşılık gelen ('parent') osteopontin proteininin glikosilasyon bölgelerinin biri veya daha fazlasını muhafaza edebilir.

Örneğin polipeptit, SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansının bir füzyonunu içerebilir.

Örneğin söz konusu polipeptit, söz konusu polipeptidin saflaştırılmasını kolaylaştırmak amacıyla glutathion-S-transferaz (GST) veya protein A gibi bir polipeptide kaynaştırılabilir. Söz konusu füzyonların örnekleri, teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir. Benzer şekilde söz konusu polipeptit, His6 gibi bir oligo-histidin etiketine veya iyi bilinen Myc etiket epitopu gibi bir antikor tarafından tanınan bir epitopa kaynaştırılabilir. Söz konusu polipeptidin herhangi bir varyantına veya türevine füzyonlar, açıklamanın kapsamına dahil edilir.

Füzyon, açıklamanın söz konusu polipeptidi üzerinde istenen bir etki kazandıran başka bir parçayı içerebilir; örneğin söz konusu parça, kıl uzamasını uyarıcı etkinin arttırılmasında veya uzatılmasında yararlı olabilir. Örneğin mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde, füzyon, insan serum albümini veya benzer bir protein (US 2009/0005312 sayılı yayında açıklandığı gibi) içerir.

Alternatif olarak kaynaşmış parça, teknikte uzman kişilerce bilindiği gibi polipeptidinin hücrel alımını arttırılabilen bir lipofilik molekül veya polipeptit bölgesi olabilir.

Mevcut açıklamanın başka bir düzenlemesinde, modifiye osteopontin polipeptidi, bir amino asit sekansının tandem tekrarlarını içerir veya bunlardan oluşur. Alternatif olarak polipeptit, SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansının tandem tekrarlarını içerir veya bunlardan oluşur.

Mevcut açıklamanın tercih edilen başka bir düzenlemesinde, modifiye osteopontin polipeptidi, sadece SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansını içerir veya bundan oluşur. Örneğin polipeptit, SEQ ID NO: 63'e göre polipeptidden oluşabilir.

Açıklamanın bileşimlerinde kullanılmaya yönelik olarak uygun olan modifiye osteopontin polipeptitleri, teknikte uzman kişilerce iyi bilinen *in vitro* hücre bazlı ifade yöntemleri ile oluşturulabilir (örneğin, bakınız, buraya referans yoluyla dahil edilen Sambrook & Russell, 2000, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor, New York). Kullanılacak olan ifade vektörü ve konakçı hücrenin seçimi, birçok faktöre bağlı olabilir. Örneğin modifiye osteopontin polipeptidinin glikosile edilecek olması halinde bir memeli ifade sistemi gerekli olacaktır.

Uygun ifade vektörleri ve konakçı hücreler birçok kaynaktan ticari olarak temin edilebilir.

Alternatif olarak modifiye osteopontin polipeptitleri, sıvı faz ve katı faz sentezi (örneğin, t-Boc katı faz peptit sentezi ve BOP-SPPS) gibi bilinen yollarla sentezlenebilir.

Teknikte uzman kişiler tarafından, mevcut açıklamanın ayrıca yukarıda açıklanan modifiye osteopontin polipeptidinin farmasötik olarak ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir bir ilave asit veya baz tuzlarını içerir. Bu açıklamada yararlı olan yukarıda bahsedilen baz bileşiklerinin farmasötik olarak ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir ilave asit tuzlarını hazırlamak üzere kullanılan asitler, toksik olmayan ilave asit tuzlarını, diğer bir deyişle diğerlerinin arasında hidroklorid, hidrobromid, hidroiyodid, nitrat, sülfat, bisülfat, fosfat, asit fosfat, asetat, laktat, sitrat, asit sitrat, tartrat, bitartrat, süksinat, maleat, fumarat, glukonat, sakkarat, benzoat, metansülfonat, etansülfonat, benzensülfonat, p-toluensülfonat ve pamoat [diğer bir deyişle 1,1'-metilen-bis-(2-hidroksi-3 naftoat)] tuzları gibi farmasötik olarak ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir anyonları içeren tuzları oluşturan asitlerdir. Farmasötik olarak ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir ilave baz tuzları ayrıca, modifiye osteopontin polipeptitlerinin farmasötik olarak ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir tuz formlarını üretmek üzere kullanılabilir. Doğada asidik olan, mevcut bileşiklerin farmasötik olarak ve/veya kozmetik olarak

kabul edilebilir baz tuzlarını oluşturmak üzere reaktifler olarak kullanılabilen kimyasal bazlar, bu tür bileşikler ile toksik olmayan baz tuzlarını oluşturan bazlardır. Toksik olmayan bu tür baz tuzları, bunlarla sınırlı olmamak üzere, diğerlerinin arasında alkali metal katyonlar (örneğin potasyum ve sodyum) ve toprak alkali metal katyonlar (örneğin kalsiyum ve magnezyum) gibi farmasötik olarak ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir bu tür katyonlar, N-metilglukamin-(meglumin) ve düşük alkanolalüminyum gibi amonyum veya suda çözülebilen ilave amin tuzları ve farmasötik olarak kabul edilebilir organik aminlerin diğer baz tuzlarından derive edilenleri içerir.

Ayrıca açıklamanın modifiye osteopontin polipeptidinin, kullanılmadan önce uygun bir taşıyıcıda depolanmaya yönelik olarak liyofilize edilebildiği ve yeniden sulandırılabilirdiği kabul edilecektir. Herhangi bir uygun liyofilizasyon yöntemi (örneğin püskürtmeli kurutma, kek kurutma) kullanılabilir. Teknikte uzman kişiler tarafından, liyofilizasyon ve yeniden sulandırmanın, çeşitli aktivite kaybı seviyelerine neden olabileceği ve kullanım seviyelerinin yukarı doğru dengelemek üzere ayarlanmak zorunda olabileceği kabul edilecektir. Tercihen liyofilize (dondurularak kurutulmuş) polipeptit, rehidre edilmesi durumunda aktivitesinin yaklaşık %20'sinden daha fazlasını veya yaklaşık %25'inden daha fazlasını veya yaklaşık %30'undan fazlasını veya yaklaşık %35'inden fazlasını veya yaklaşık %40'ından fazlasını veya yaklaşık %45'inden fazlasını veya yaklaşık %50'sinden fazlasını (liyofilizasyondan önce) kaybetmez.

Modifiye osteopontin polipeptidi, hedeflenen uygulama yolu ve standart farmasötik veya farmasötik uygulamaya göre seçilen, polipeptit ve farmasötik olarak kabul edilebilir ve/veya kozmetik olarak kabul edilebilir bir ekspan, taşıyıcı veya seyrelticiyi içeren bir bileşim formunda sağlanır (örneğin, bakınız: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19. baskı, 1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA).

"Farmasötik olarak kabul edilebilir" ile, formülasyonun steril olduğu ve pirojen içermediği dahil edilir. Uygun farmasötik taşıyıcılar, kimya tekniğinde iyi bilinmektedir. Taşıyıcı(lar), açıklamanın bileşiği ile uyumlu olma ve alıcıları için zararlı olmama bakımından "kabul edilebilir" olmalıdır. Tipik olarak taşıyıcılar, steril olacak ve pirojen içermeyecek olan su veya salin olacaktır; ancak diğer kabul edilebilir taşıyıcılar da kullanılabilir. Böylece "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı" ve "farmasötik olarak kabul edilebilir ekspiyan", sadece bir taşıyıcı olarak etki etmesi hedeflenen, *diğer bir deyişle* biyolojik aktiviteye sahip olması hedeflenmeyen formülasyonunun bir kısmının oluşturulmasında kullanılan herhangi bir bileşiği (bileşikleri) içerir. Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı veya ekspiyan genellikle güvenlidir, toksik değildir ve biyolojik olarak veya başka şekilde istenebilir. Burada kullanıldığı üzere farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı veya ekspiyan, bu türdeki bir taşıyıcı veya ekspiyanın biri veya daha fazlasını içerir.

Aynı şekilde "kozmetik olarak kabul edilebilir" terimi, kozmetik ürünleri ile kullanılmaya yönelik olarak uygun formülasyonları göstermek üzere kullanılır. Yaygın olarak şampuanlar, losyonlar, kremler ve bu türdeki diğer ürünlerde kullanılanlar gibi uygun kozmetik taşıyıcılar teknikte iyi bilinmektedir.

Ekspiyan, karbohidratlar, polimerler, lipidler ve minerallerin biri veya daha fazlası olabilir. Karbohidratların örnekleri, örneğin liyofilizasyonun kolaylaştırılmasında yönelik olarak bileşime eklenen laktoz, sukroz, mannitol ve siklodekstrinleri içerir. Polimerlerin örnekleri, tümü farklı moleküler ağırlığa sahip olan, örneğin viskozite kontrolüne yönelik olarak, biyoadesyonun sağlanmasına yönelik olarak veya lipidin kimyasal ve proteolitik bozunmadan korunmasına yönelik olarak bileşime eklenen nişasta, selüloz eterler, selüloz karboksimetilselüloz, hidroksipropilmetil selüloz, hidroksietil selüloz, etilhidroksietil selüloz, aljinatlar, karajenanlar, hiyalüronik asit ve deriveleri, poliakrilik asit, polisülfonat,

polietilenglikol/polietilen oksit, polietilenoksit/polipropilen oksit kopolimerleri, farklı hidroliz derecelerine sahip polivinilalkol/polivinilasetat ve polivinilpirolidondur. Lipidlerin örnekleri, polimerlere yönelik olanlar ile benzer nedenlerden dolayı bileşime eklenen, tümü farklı asil zinciri uzunluğu ve satürasyonuna sahip olan mono-, di- ve trigliseritler, seramidler, sfingolipidler ve glikolipidler, yumurta lesitini, soya lesitini, hidrojenize yumurta ve soya lesitinidir. Minerallerin örnekleri, sıvı birikiminin azaltılması veya avantajlı pigment özellikleri gibi faydaları elde etmek üzere bileşime eklenen talk, magnezyum oksit, çinko oksit ve titanyum oksittir.

"Seyreltici" teriminin, peptidin farmasötik preparatta seyreltilmesi amacı ile aköz veya aköz olmayan bir solüsyon anlamına gelmesi hedeflenir. Seyreltici, salin, su, polietilen glikol, propilen glikol, etanol veya yağların (aspir yağı, mısır yağı, yer fıstığı yağı, pamuk tohumu yağı veya susam yağı gibi) biri veya daha fazlası olabilir.

Seyreltici ayrıca bir tampon olarak işlev görebilir. "Tampon" teriminin, pH'nin stabilize edilmesi amacı ile bir asit-baz karışımını içeren bir aköz solüsyon anlamına gelmesi hedeflenir. Tamponların örnekleri, Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfat, karbonat, asetat, sitrat, glikolat, laktat, borat, ACES, ADA, tartrat, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, kakodilat, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamin, glisin, HEPPSO, imidazol, imidazollaktik asit, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO ve TES'dir.

İsteğe bağlı olarak bileşim bir adjuvanı içerebilir. "Adjuvan" teriminin, peptidin biyolojik etkisini arttırmak üzere formülasyona eklenen herhangi bir bileşik anlamına gelmesi hedeflenir. Adjuvan, farklı anyonlar, örneğin bunlarla sınırlı olmamak üzere florid, klorid, bromid, tiyosiyanat, sülfid, hidroksit, fosfat, karbonat, laktat, glikolat, sitrat, borat, tartrat ve farklı asil bileşimlerinin asetatlarına sahip çinko, bakır veya gümüş tuzlarının biri veya daha fazlası olabilir.

Açıklamanın farmasötik bileşimleri ayrıca biyobozunur mikro küreler formunda olabilir. Poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), PLA ve PGA (PLGA) kopolimerleri veya poli(kaprolakton) (PCL) ve polianhidritler gibi alifatik poliestерler, mikro kürelerin üretiminde biyobozunur polimerler olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu tür mikro kürelerin hazırlanışları, US 5,851,451 ve EP0213303'te bulunabilir.

Açıklamanın farmasötik bileşimleri ayrıca polimer jelleri formunda olabilir, burada nişasta, selüloz eterler, selüloz karboksimetilselüloz, hidroksipropilmetil selüloz, hidroksietil selüloz, etilhidroksietil selüloz, aljinatlar, karajenanlar, hiyalüronik asit ve deriveleri, poliakrilik asit, polisülfonat gibi polimerlerdir. Modifiye osteopontin polipeptidi, kullanılan belli polipeptitlerin etkinliği/toksisitesine bağlı olarak çeşitli konsantrasyonlarda formüle edilebilir. Tercihen bileşim, 1 nM ile 1 M arasında, örneğin 0,1 µM ile 1 mM arasında, 1 µM ile 100 µM arasında, 5 µM ile 50 µM arasında, 10 µM ile 50 µM arasında, 20 µM ile 40 µM arasında ve isteğe bağlı olarak yaklaşık 30 µM'lik bir konsantrasyonda modifiye osteopontin polipeptidi içerir. *Ex vivo* ve *in vitro* uygulamalara yönelik olarak bileşimler, örneğin 0,0025 µM ile 1 µM arasında olmak üzere modifiye osteopontin polipeptidinin daha düşük bir konsantrasyonunu içerebilir.

Teknikte uzman kişiler tarafından, açıklamanın bileşimlerinin örneğin topikal, transdermal, parenteral veya oral uygulama olmak üzere çeşitli yollar aracılığıyla uygulanabileceği kabul edilecektir.

Avantajlı olarak açıklamanın bileşimleri, topikal uygulama veya intrakütanöz uygulamaya yönelik olarak uygundur.

Bu nedenle açıklamanın bileşimleri, deriye (örneğin kafa derisine) topikal olarak uygulanabilir. Örneğin bileşim, örneğin aşağıdakilerin biri veya daha fazlası ile bir karışım içinde süspanse edilen veya çözölen aktif polipeptidi içeren bir merhem formunda sağlanabilir: mineral yağı, sıvı vazelin, beyaz vazelin, propilen glikol, polioksietilen polioksipropilen

bileşiği, emülsiyonlaştıracı vaks ve su. Alternatif olarak polipeptit, örneğin aşığıdakilerin biri veya daha fazlasının bir karışımında süspanse edilen veya çözülen, uygun bir losyon veya krem olarak formüle edilebilir: mineral yağı, sorbitan

5 monostearat, bir polietilen glikol, sıvı parafin, polisorbitat 60, setil esterler, vaks, setearil alkol, 2-oktildodekanol, benzil alkol ve su.

İsteğe bağlı olarak topikal uygulamaya yönelik bileşim, bir penetrasyon arttırıcıyı (örneğin Osborne & Henke, 1997,

10 Pharmaceutical Technology, Kasım: 58-82 ve Pathan & Setty, 2009, Tropical Journal of Pharmaceutical Research 8 (2): 173-179'da açıklanan gibi) içerebilir.

Alternatif olarak açıklamanın bileşimleri, parenteral olarak, örneğin intrakütanöz olarak uygulanabilir. Bu tür bileşimler en

15 iyi şekilde, diğer maddeleri, örneğin solüsyonu kan ile izotonik yapmak üzere yeterli tuz veya glukoz içerebilen steril bir aköz solüsyon formunda kullanılır. Aköz solüsyonlar, gerekli olması halinde uygun şekilde tamponlanmalıdır (tercihen 3'ten 9'a kadar olan bir pH'ye kadar). Steril koşullar altında uygun parenteral

20 formülasyonların hazırlanışı, teknikte uzman kişilerce iyi bilinen standart farmasötik teknikler ile kolay bir şekilde sağlanabilir.

Parenteral uygulamaya yönelik olarak uygun bileşimler, anti-oksidanlar, tamponlar, bakteriyostatlar ve formülasyonu

25 hedeflenen alıcının kanı ile izotonik hale getiren solütleri içerebilen aköz ve aköz olmayan steril enjeksiyon solüsyonları; ve süspanse edici ajanlar ve kıvamlaştıracı ajanları içerebilen aköz ve aköz olmayan steril süspansiyonları içerir. Formülasyonlar, tek dozlu veya çok dozlu kaplarda, örneğin

30 kapalı ampuller ve şişelerde sunulabilir ve kullanılmadan hemen önce sadece steril sıvı taşıyıcının, örneğin enjeksiyonlara yönelik olarak suyun eklenmesini gerektiren dondurularak kurutulmuş (liyofilize edilmiş) bir durumda depolanabilir. Ekstamporane enjeksiyon solüsyonları ve süspansiyonları, daha

önceden açıklanan türdeki steril tozlar, granüller ve tabletlerden hazırlanabilir.

Modifiye osteopontin polipeptitlerinin uygulanmasına yönelik olarak mikro küre formülasyonları gibi yavaş salımlı bir

5 sistemin kullanılması faydalı olabilir.

Alternatif olarak bileşimler, aktif polipeptidi direkt olarak gerekli bölgeye (*diğer bir deyişle* epidermis) salan cerrahi olarak implante edilmiş bir cihaz ile uygulanabilir.

Açıklamanın bileşimleri ayrıca transdermal metodolojiler ile
10 uygulanabilir.

Örneğin, elektroporasyon terapisi (EPT) ve/veya iyontoforez sistemleri, proteinler ve polipeptitlerin uygulanmasına yönelik olarak kullanılabilir. Bu tür yöntemlerde, hücre membranlarının ilaca yönelik artan geçirgenliği ve hücre içi ilaç dağılımının
15 önemli artışı ile sonuçlanmak üzere, darbeli elektrik alanını hücrelere uygulamak üzere bir cihaz kullanılır.

Bir alternatif transdermal yöntem, elektroinkorporasyon, elektroporasyonda kullanılan ile aynı veya buna benzer elektrik darbelerine maruz kalan deri yüzeyinde çap olarak 30 mikrona
20 kadar olan küçük partikülleri kullanır. Partiküller korun içinden derinin daha derin katmanlarına yönlendirilir. Partiküller, ilaçlar veya genler ile yüklenebilir veya kaplanabilir ve basit bir şekilde, içinden ilaçların girebildiği deride gözenekleri oluşturan "mermiler" olarak hareket
25 edebilir.

Ek transdermal metodolojiler ayrıca, PowderJect Pharmaceuticals (şimdilerde sahibi Novartis AG'dir) tarafından geliştirilmiştir. Açıklamanın polipeptitleri ve bileşimlerinin uygulanmasına yönelik uygun yöntemler teknikte iyi bilinmektedir, örneğin
30 bakınız Therapeutic Protein and Peptide Formulation and Delivery, Zahra Shahrokh vd. (Eds), 1997, American Chemical Society, ISBN13: 9780841235281.

Mevcut açıklamanın ikinci bir yönü, SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansını veya SEQ ID NO: 63'e ait amino asit sekansının
35 bir kıl uzamasını uyarıcı aktivitesini muhafaza eden bir

parçasını, varyantını, türevini veya füzyonunu (veya söz konusu parça, varyant veya türevin bir füzyonu) içeren veya bunlardan oluşan bir polipeptidi sağlar.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde polipeptit izole edilir (örneğin memeli vücudunun dışında).

"Parça", "varyant", "türev" veya "füzyon" terimleri, mevcut açıklamanın birinci yönü ile ilgili olarak yukarıda tanımlandığı gibidir.

Mevcut açıklamanın ilgili bir yönünde polipeptit, inaktive edilen (RGD bölgesinin amino asitlerinden birinin veya daha fazlasının ornatılması veya silinmesi yoluyla ve/veya RGD bölgesinde bir veya daha fazla amino asidin eklenmesi yoluyla) bir RGD bölgesini içeren bir insan osteopontin parçasıdır.

Örneğin yabani tip insan osteopontin proteininin "R-G-D" bölgesinin üç amino asidi, iki amino asit "D-I" ile değiştirilebilir. Tercihen parça, beş ila otuz amino asit uzunluğunda, örneğin on ile yirmi amino asit uzunluğundadır.

Örneğin polipeptit, SEQ ID NO: 63 ila 120'den herhangi birine ait bir amino asit sekansını veya bunun bir parçasını, varyantını, türevini veya füzyonunu içerebilir veya bundan oluşabilir.

Tercih edilen 15 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

<u>VDTYDGD</u> <u>ISVVYGLR</u>	["FOL-005"]	SEQ ID NO: 63
<u>VDTYDGD</u> <u>ISVVYGLS</u>		SEQ ID NO: 64

Tercih edilen 14 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

<u>VDTYDGD</u> <u>ISVVYGL</u>	SEQ ID NO: 65
<u>DTYDGD</u> <u>ISVVYGLR</u>	SEQ ID NO: 66
<u>TYDGD</u> <u>ISVVYGLRS</u>	SEQ ID NO: 67

Tercih edilen 13 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

<u>VDTYDGD</u> <u>ISVVYG</u>	SEQ ID NO: 68
<u>DTYDGD</u> <u>ISVVYGL</u>	SEQ ID NO: 69
<u>TYDGD</u> <u>ISVVYGLR</u>	SEQ ID NO: 70
<u>YDGD</u> <u>ISVVYGLRS</u>	SEQ ID NO: 71

Tercih edilen 12 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

VDTYDGD <u>ISVY</u>	SEQ ID NO: 72
DTYDGD <u>ISVY</u> G	SEQ ID NO: 73
TYDGD <u>ISVY</u> GL	SEQ ID NO: 74
YDGD <u>ISVY</u> GLR	SEQ ID NO: 75
DGD <u>ISVY</u> GLRS	SEQ ID NO: 76

Tercih edilen 11 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

VDTYDGD <u>ISV</u>	SEQ ID NO: 77
DTYDGD <u>ISVY</u>	SEQ ID NO: 78
TYDGD <u>ISVY</u> G	SEQ ID NO: 79
YDGD <u>ISVY</u> GL	SEQ ID NO: 80
DGD <u>ISVY</u> GLR	SEQ ID NO: 81
G <u>DISVY</u> GLRS	SEQ ID NO: 82

Tercih edilen 10 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

VDTYDGD <u>ISV</u>	SEQ ID NO: 83
DTYDGD <u>ISV</u>	SEQ ID NO: 84
TYDGD <u>ISVY</u>	SEQ ID NO: 85
YDGD <u>ISVY</u> G	SEQ ID NO: 86
DGD <u>ISVY</u> GL	SEQ ID NO: 87
G <u>DISVY</u> GLR	SEQ ID NO: 88
<u>DISVY</u> GLRS	SEQ ID NO: 89

5

Tercih edilen 9 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

VDTYDGD <u>IS</u>	SEQ ID NO: 90
DTYDGD <u>ISV</u>	SEQ ID NO: 91
TYDGD <u>ISVY</u>	SEQ ID NO: 92
YDGD <u>ISVY</u>	SEQ ID NO: 93
DGD <u>ISVY</u> G	SEQ ID NO: 94
G <u>DISVY</u> GL	SEQ ID NO: 95
<u>DISVY</u> GLR	SEQ ID NO: 96
<u>ISVY</u> GLRS	SEQ ID NO: 97

Tercih edilen 8 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

VDTYDGD <u>I</u>	SEQ ID NO: 98
DTYDGD <u>IS</u>	SEQ ID NO: 99
TYDGD <u>ISV</u>	SEQ ID NO: 100
YDGD <u>ISVY</u>	SEQ ID NO: 101
DGD <u>ISVY</u>	SEQ ID NO: 102
G <u>DISVY</u> G	SEQ ID NO: 103
<u>DISVY</u> GL	SEQ ID NO: 104
<u>ISVY</u> GLR	SEQ ID NO: 105

10

Tercih edilen 7 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

VDTYDGD	SEQ ID NO: 106
DTYDGD <u>I</u>	SEQ ID NO: 107
TYDGD <u>IS</u>	SEQ ID NO: 108
YDGD <u>ISV</u>	SEQ ID NO: 109
DGD <u>ISVV</u>	SEQ ID NO: 110
G <u>DISVVY</u>	SEQ ID NO: 111
<u>DISVVY</u> G	SEQ ID NO: 112
<u>ISVVYGL</u>	SEQ ID NO: 113

Tercih edilen 6 amino asitlik peptitler aşağıdaki gibidir:

DTYDGD	SEQ ID NO: 114
TYDGD <u>I</u>	SEQ ID NO: 115
YDGD <u>IS</u>	SEQ ID NO: 116
DGD <u>ISV</u>	SEQ ID NO: 117
G <u>DISVV</u>	SEQ ID NO: 118
<u>DISVVY</u>	SEQ ID NO: 119
<u>ISVVY</u> G	SEQ ID NO: 120

Mevcut açıklamanın tercih edilen bir düzenlemesinde polipeptit,
5 SEQ ID NO: 63'e ait bir amino asit sekansını içerir veya bundan oluşur.

Açıklamanın polipeptitleri, kıl dökülmesi (aşağıda detaylı olarak açıklanan şekilde) ile bağlantılı bir hastalık veya durumun tedavisi veya önlenmesinde tıbbi kullanıma yönelik
10 olabilir.

Açıklama ayrıca, bir memelide kıl uzamasının uyarılmasına yönelik olarak açıklamanın bir polipeptidinin kullanılmasını sağlar, burada kullanım, kozmetik veya ticaridir (aşağıda detaylı olarak açıklanan şekilde).

15 Mevcut açıklamanın bir üçüncü yönü, bir memelide kıl uzamasının uyarılmasında kullanılmaya yönelik olarak açıklamanın birinci yönüne göre bileşimler sağlar.

Bu nedenle bileşimler, mevcut kış foliküllerinin uyarılmasında ve/veya yeni kıl foliküllerinin (veya aynısının üretilmesine
20 yönelik olarak kök hücrelerinin) büyümesinin indüklenmesinde kullanılmaya yönelik olabilir.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde bileşim, alopesi gibi kıl dökülmesi ile bağlantılı bir hastalık veya durumun tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yönelik olabilir.

Alopesi tipik olarak anajen kılların dökülmesi ile bağlantılıdır. Ancak açıklamanın bileşimlerinin ayrıca telojen kılların dökülmesi ile bağlantılı durumların tedavisine yönelik olarak kullanılabileceği kabul edilecektir.

5 Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde alopesi, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir:

- (a) androgenik alopesi (ayrıca androgenetik alopesi, *alopesi androgenetika*, erkek kellik modeli veya dişi kellik modeli olarak da bilinir);
- 10 (b) traksiyon alopesi;
- (c) anajen effluvium;
- (d) telojen effluvium;
- (e) alopesi areata;
- (f) alopesi totalis;
- 15 (g) alopesi universalis;
- (h) alopesi barba;
- (i) alopesi müsinoza;
- (j) alopesi neoplastika;
- (k) sikatrisyel alopesi; ve
- 20 (l) yara bırakan alopesi.

Örneğin alopesi androgenik alopesi olabilir.

Alternatif olarak alopesi anajen effluvium olabilir. Kılların erken telojen fazına girmesinden kaynaklanan bu durum, yeme bozuklukları, ateş, bebek doğurma, kronik hastalık, majör cerrahi, anemi, ciddi duygusal rahatsızlıklar, şok diyetler, hipertiroidizm ve ilaçlar dahil olmak üzere çeşitli nedenlerden dolayı olabilir.

Bu nedenle mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde kıl dökülmesi, radyoterapi ve/veya kemoterapi ajanları tarafından indüklenebilir. Örneğin kıl dökülmesi, sisplatin, etoposid ve paklitaksel gibi kemoterapötik ilaçlar ile tedavinin yaygın ve acı verici bir yan etkisidir.

Klasik olarak memeli bir insandır.

Mevcut açıklamanın ilgili bir dördüncü yönü burada açıklanan, bir memelide kıl uzamasının uyarılmasına yönelik bir ilacın

hazırlanmasında mevcut açıklamanın birinci yönüne göre yukarıda tanımlanan şekilde bir modifiye osteopontin polipeptidinin kullanılmasını sağlar.

Böylece ilaç, mevcut kıl foliküllerinin uyarılmasına ve/veya yeni kıl foliküllerinin (aynısının üretilmesine yönelik kök hücrelerinin) uzamasının indüklenmesine yönelik olabilir.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde ilaç, kıl dökülmesi ile ilişkili bir hastalığın veya durumun, örneğin alopesinin (örneğin anajen kullarının dökülmesi ile ilişkili) tedavi edilmesi veya önlenmesine yöneliktir. Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde alopesi, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir:

(a) androgenik alopesi (ayrıca androgenetik alopesi, *alopesi androgenetika*, erkek kellik modeli veya dişi kellik modeli olarak da bilinir);

(b) traksiyon alopesi;

(c) anajen effluvium;

(d) telojen effluvium;

(e) alopesi areata;

(f) alopesi totalis;

(g) alopesi universalis;

(h) alopesi barba;

(i) alopesi müsinoza;

(j) alopesi neoplastika;

(k) sikatrisyel alopesi; ve

(l) yara bırakan alopesi.

Örneğin alopesi, androgenik alopesi olabilir.

Alternatif olarak alopesi, örneğin radyoterapi ve/veya kemoterapi yoluyla indüklenen anajen effluvium olabilir (yukarıya bakınız).

Klasik olarak memeli bir insandır.

Mevcut açıklamanın bir ilgili, beşinci yönü, mevcut açıklamanın birinci yönüne göre yukarıda tanımlanan şekilde bir modifiye osteopontin polipeptidinin etkili bir miktarının uygulanmasını içermek üzere bir memelide kıl uzamasının uyarılmasına yönelik bir yöntem sağlar.

Bu nedenle yöntem, mevcut kıl foliküllerinin uyarılmasına ve/veya yeni kıl foliküllerinin (aynısının üretilmesine yönelik kök hücrelerinin) uzamasının indüklenmesine yönelik olabilir.

Açıklamanın polipeptit bileşimi, hastaya etkili bir miktarda uygulanır. 'Terapötik olarak etkili bir miktar", veya 'etkili miktar' veya 'terapötik olarak etkili", burada kullanıldığı üzere, kıl uzaması üzerinde uyarıcı bir etki sağlayan miktara refere eder. Bu, istenen terapötik etkiyi üretmek üzere hesaplanan aktif materyalin önceden belirlenmiş bir miktarıdır.

10 Teknikte uzman kişi tarafından kabul edildiği üzere bir bileşiğin miktarı, bunun spesifik aktivitesine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Uygun doza miktarları, gerekli olan seyreltici ile bağlantılı olarak istenen terapötik etkiyi meydana getirmek üzere hesaplanan aktif bileşimin önceden
15 belirlenmiş bir miktarını içerebilir. Açıklamanın bileşimlerinin üretimine yönelik yöntemler ve kullanımlarda aktif bileşenin terapötik olarak etkili bir miktarı sağlanır. Terapötik olarak etkili bir miktar, teknikte iyi bilindiği üzere, yaş, kilo, cinsiyet, durum, komplikasyonlar, diğer hastalıklar, vb. gibi
20 hastanın karakteristiklerine bağlı olarak teknikte uzman tıp veya veteriner çalışanı tarafından belirlenebilir.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde yöntem, alopesi (örneğin anajen kılların dökülmesi ile bağlantılı) gibi kıl dökülmesi ile bağlantılı bir hastalık veya durumun tedavisi veya önlenmesine
25 yönelik olabilir.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde alopesi, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir:

- (a) androgenik alopesi (ayrıca androgenetik alopesi, alopesi androgenetika, erkek kellik modeli veya dişi kellik modeli olarak da bilinir);
- (b) traksiyon alopesi;
- (c) anajen effluvium;
- (d) telojen effluvium;
- (e) alopesi areata;
- 35 (f) alopesi totalis;

- (g) alopesi universalis;
- (h) alopesi barba;
- (i) alopesi müsinoza;
- (j) alopesi neoplastika;
- 5 (k) sikatrisyel alopesi; ve
- (l) yara bırakan alopesi.

Örneğin alopesi, androgenik alopesi olabilir.

Alternatif olarak alopesi, örneğin radyoterapi ve/veya kemoterapi yoluyla indüklenen anajen effluvium olabilir
10 (yukarıya bakınız).

Klasik olarak memeli bir insandır.

Teknikte uzman kişiler tarafından, mevcut açıklamanın birinci yönünün bileşiminin, tıbbi kullanımlar ile sınırlı olmadığı, fakat aynı zamanda kozmetik ajanlar olarak (bunların herhangi
15 bir fiziksel sağlık gelişmesi sağlamaması, fakat sadece memeli için bir estetik fayda sağlaması bakımından) kullanılabileceği kabul edilecektir.

Bu nedenle mevcut açıklamanın bir yönü, bir memelide kıl uzamasının uyarılmasına yönelik olarak açıklamanın birinci
20 yönüne göre bir bileşimin kullanımını sağlar, burada kullanım kozmetiktir.

Bu nedenle kozmetik bileşimi, mevcut kıl foliküllerinin uyarılmasına ve/veya yeni kıl foliküllerinin (aynısının üretilmesine yönelik kök hücrelerinin) uzamasının indüklenmesine
25 yönelik olabilir.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde kozmetik bileşim, açılan bir alın bölgesi ve/veya incelen kıl ile bağlantılı olabilen kelliğin tedavisi veya önlenmesine yönelik olarak kullanılır.

Bu tür bileşimler, kafa derisi üzerine uygulama ile sınırlı değildir, fakat ayrıca vücudun başka bir yerine de uygulanabilir
30 (sakal, kirpikler, kaşlar, vb.'nin uzamasını desteklemek üzere yüz dahil).

Klasik olarak memeli bir insandır.

Teknikte uzman kişiler tarafından, açıklamanın bileşimlerinin
35 tek başına veya diğer terapötik veya kozmetik ajanlar ile

kombinasyon halinde kullanılabileceği kabul edilecektir. Örneğin minoksidil Regaine RTM., Pharmacia Corp.) ve diazoksit gibi potasyum kanalı açıcılar; finasterid (Propecia RTM., Merck & Co.) gibi 5-alfa-redüktaz inhibitörleri; ve immün baskılayıcı siklosporin A gibi olmak üzere açıklamanın bileşimleri, mevcut kılların kaybını önlemek üzere ve/veya yeni kılların uzamasını uyarmak üzere mevcut tedaviler ile bir kombinasyon terapisinde kullanılabılır.

Ayrıca teknikte uzman kişiler tarafından açıklamanın bileşimlerinin *in vivo*, *ex vivo* veya *in vitro* kullanılabileceği kabul edilecektir.

Bu nedenle direkt olarak bir memeliye kullanılması veya uygulanmasına ek olarak bileşimler, kıl uzamasını *ex vivo* olarak, örneğin derinin memeliye greftlenmesinden önce bir deri eksplantında uyarmak üzere kullanılabılır.

Alternatif olarak bileşimler, örneğin akabinde bir hastaya transplante edilebilen hücre kültüründe kıl foliküllerinin *in vitro* olarak uzatmak üzere kullanılabılır.

Dolayısıyla mevcut açıklamanın bir başka yönü, kıl uzamasının *in vitro* veya *ex vivo* uyarılmasına yönelik olarak mevcut açıklamanın bir yönüne göre bir polipeptidin kullanımını sağlar.

Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde polipeptit, kıl foliküllerinin (veya aynısının kök hücre prekursorlarının) uzamasını uyarmak üzere kullanılabılır.

Mevcut açıklamanın belli açılarını kapsayan tercih edilen, sınırlayıcı olmayan örnekler bu noktada aşağıdaki şekillerin referansı ile açıklanacaktır:

Şekil 1, fareler üzerindeki derinin numune alma alanının bir şematik temsilini gösterir.

Şekil 2, bir modifiye osteopontin polipeptidi ile tedavi edilmesinden 48 saat sonra bir faredeki derinin bir kesitinin temsili bir fotoğrafıdır. Epidermis içindeki foliküller ok ile gösterilir. Foliküllerin lineer yoğunluğu, mm başına 18.3 foliküldür (epidermisin 32.65 mm'sinde 598 folikül).

Şekil 3, bir negatif kontrol bileşimi ile tedavi edilmesinden 48 saat sonra bir faredeki derinin bir kesitinin temsili bir fotoğrafıdır. Epidermis içindeki foliküller ok ile gösterilir. Foliküllerin lineer yoğunluğu mm başına 11.7 foliküldür (epidermisin 32.50 mm'sinde 379 folikül).

Şekil 4, (a) 0 olan bir kıl uzama skoruna sahip olan 14. günde kontrol ile tedavi edilen bir hayvan, (b) 1.5 olan bir kıl uzama skoruna sahip olan 14. günde örnek niteliğindeki 'tam uzunluktaki' polipeptit "Cx" (SEQ ID NO:1'e karşılık gelir, fakat ilk on altı amino asit sinyali peptidi yoktur, 60 nM) ile tedavi edilen bir hayvan, (c) 2.5 olan bir kıl uzama skoruna sahip olan 5. günde örnek niteliğindeki kısa peptit "FOL-004" (SEQ ID NO: 5, 60 nM) ile tedavi edilen bir hayvan ve (d) 2.0 olan bir kıl uzama skoruna sahip olan 5. günde örnek niteliğindeki kısa peptit "FOL-005" (SEQ ID NO: 5, 63 nM) ile tedavi edilen bir hayvanın temsili fotoğraflarını gösterir.

Şekil 5, ek niteliğindeki 'tam uzunluktaki' polipeptit "Cx" ve açıklamanın SEQ ID NO: 5 ve 63 polipeptitlerinin kıl uzaması üzerindeki etkisini gösterir.

Şekil 6, doğal suş fare osteopontinden karşılık gelen SEQ ID NO :121'e kıyasla örnek niteliğindeki SEQ ID; NO: 5'in kıl uzaması üzerindeki etkisini gösterir.

ÖRNEK A - Farelerde mutasyona uğratılmış fare osteopontinin kıl uzama etkisinin *in vivo* incelenmesi

Materyaller ve Yöntemler

Test polipeptidinin oluşturulması ve üretimi

Modifiye osteopontin polipeptidi sekansı SEQ ID. NO:1, *XhoI* ve *BamHI* restriksiyon enzim bölgelerinin kullanımı ile bir pCEP4 ifade vektöründe klonlanmıştır. pCEP4 ifade vektörü, bakterilerde ifadeye yönelik bir ampisilin direnç geni ve ökaryotik EBNA hücrelerinde ifadeye yönelik bir hidromisin direnç genini içerir. Polipeptit içeren vektör, kompetan XL-10

bakteri hücrelerine dönüştürülmüştür, çoğaltılmıştır ve Qiagen midi hazırlama kiti ile izole edilmiştir. İzole edilen vektörler akabinde, üreticinin protokolüne (Invitrogen) göre Eugene transfeksiyon reaktifinin kullanımı yoluyla insan EBNA 5 hücrelerinde işleme tabi tutulmuştur.

Test polipeptidinin izolasyonu

Üretilen polipeptidi içeren EBNA hücre kültüründeki ortam, kültürlemeden üç ile dört gün sonra toplanmıştır. pCEP4 plazmidi 10 tarafından üretilen polipeptitler, Ni-sefaroj jel kromatografisi (Invitrogen) ile izolasyonu kolaylaştırmak üzere kullanılan yerleştirilmiş bir His-etiketini içerir. Toplanan ortam, bağlama tamponu (20 mM sodyum fosfat, 500 mM sodyum klorid, pH 7,8) ile seyreltilmiştir. Ni-sefaroj süspansiyonu, 4 °C'de bir gece 15 çalkalayıcı üzerindeki inkübasyondan önce eklenmiştir. Ni-sefaroj jeli, yedi dakika 1000 g'de santrifugasyon yoluyla pellet haline getirilmiştir ve tek kullanımlık bir BioRad mini kolonuna dökülmüştür. Bağlı olmayan proteinler, yıkama 20 akabinde bağlama tamponu ile uzaklaştırılmıştır. Polipeptitler, 500 mM imidazol ile kolondan ayrıştırılmıştır.

Genel çalışma tasarımı

Çalışma, her biri beş erkek wtC57BL/6N faresini içeren dört deney 25 grubundan oluşmuştur.

1. günde katılan tüm farelerin boyunları, yaklaşık olarak 1,5 x 1,0 cm'lik kareler halinde dikkatli bir şekilde tıraş edilmiştir ve kalan küçük kıl parçaları uzaklaştırılmıştır. Sonraki gün (0. gün), her bir hayvan, tıraşlı üçgendeki (bakınız Şekil 1) ayrı 30 konumlarda (her biri yaklaşık olarak 0,5 x 0,5 cm) her biri 25 µl'lik dört intrakütanöz enjeksiyon almıştır.

Her bir hayvan, SEQ ID NO: 1'e ("Test polipeptidi" veya "Cx", PBS içinde 60 nmol/l) ait örnek niteliğindeki bir modifiye osteopontin polipeptidi ve 25 µl PBS'lik (Tablo 1'de ana hatları

ile açıklanan şemaya göre) iki negatif kontrol enjeksiyonunu içeren bir bileşimin 25 µl'lik iki enjeksiyonunu almıştır.

Tablo 1: Çalışma Tasarımı

Grup	İntrakütanöz Uygulama			Hayvan sayısı
	Hacim	Uygulamadan sonraki zaman çizelgesi		
1	Test polipeptidi + PBS	25µl	24 saat (1. gün) sonra otopsi	5
2	Test polipeptidi + PBS	25µl	48 saat (2. gün) sonra otopsi	5
3	Test polipeptidi + PBS	25µl	96 saat (4. gün) sonra otopsi	5
4	Test polipeptidi + PBS	25µl	336 saat (14. gün) sonra otopsi	5

Tedavi Grupları 1 ila 4'teki hayvanlar, bileşik uygulamasından sırasıyla 24 saat (1. Grup), 48 saat (2. Grup), 96 saat (3. Grup) ve 336 saat (14 gün, 4. Grup) sonra öldürülmüştür.

5

Tüm durumlarda boyunda işaretlenen deri alanı çıkarılmıştır ve aşağıdaki şekilde işlenmiştir: Polipeptit ile tedavi edilen deri numunelerinin biri ve PBS ile tedavi edilen kontrol deri numunelerinin biri, %4 paraformaldehit içinde sabitlenmiştir ve akabinde parafin içine gömülmüştür. Diğer iki deri numunesi (polipeptit ile tedavi edilen ve PBS ile tedavi edilen), sıvı nitrojen içinde hızlı dondurulmuştur ve yaklaşık olarak -80°C'de depolanmıştır.

10

Parafin ile gömülmüş bölümlerin bir hematoksinin lekelemesi gerçekleştirilmiştir.

15

Hayvanlar

Temel	Çalışmanın amacına yönelik olarak kabul edilen test sistemi
Suş	erkek wtC57BU6N
Kaynak	Charles River GmbH Sandhofer Weg 7 D 97633 Sulzfeld
Toplam hayvan sayısı	20
Uygulama yaşı	5-6 hafta
Vücut ağırlığı ve aralığı	Yaklaşık olarak 30g
(uyum sağlamada)	
Tanımlama	Kulak işareti ile etiketleme
Uyum sağlama	17 Şubat ila 1 Mart 2011

Hayvancılık

Koşullar	Optimum hijyenik koşullar, saatte 10-15 hava değişimi ile iklimlendirme ve 22 ± 3 °C'lik sıcaklığa ve %30-70 bağıl neme yönelik hedef aralıkları ile sürekli olarak izlenen ortam, 12 saat yapay floresan ışığı/12 saat karanlık
Yerleştirme	kafes başına maksimum 3 hayvan
Diyet	M-Zucht ssniff Spezialdiäten GmbH Ferdinand Gabriel Weg 16 D-59494 Soest
Su	Ortak musluk suyu (otoklavlanmış)

Test polipeptidi

Tanım	SEQ ID NO:1'e ait modifiye osteopontin polipeptidi
Depolama koşulları	4°C'de Hepes tamponunda depolanmıştır
Güvenlik önlemleri	Yemenin, solumanın önlenmesi, eldiven ve yüz maskesi giyilmesi, deri temasından sonra sabun ve su ile yıkama; herhangi bir özel önlemin olmaması
Numunenin hazırlanması	Uygulanan stok solüsyonu, enjeksiyondan önce 60 nm çalışma solüsyonunu elde etmek üzere PBS ile 15x seyreltilmiştir.

Araç

Tanım	PBS pH 7.4
-------	------------

Tedavi

Uygulama Yolu:	İntrakütanöz olarak
Uygulama sıklığı	0. günde tek uygulama
Doz hacmi	25 µl

5

Gözlemler

Aşağıdaki parametreler kaydedilmiştir:

Canlılık/Mortalite	günlük olarak
Klinik belirtiler	günlük olarak

10

1. Grubun parafin ile gömülmüş bölümlerinin Hematoksilin lekelemesine yönelik protokol

1. 5 dakika ksilen banyosu
2. 5 dakika ksilen banyosu

3. 5 dakika EtOH %100 banyosu
4. 5 dakika EtOH %95 banyosu
5. 5 dakika EtOH %70 banyosu
6. 5 dakika PBS banyosu
- 5 7. Yaklaşık 20 saniye Hematoksilin banyosu (Harrys Hematoksilin)^{a),b)}
8. 3 dakikada 3 kez su banyosu
9. 5 dakika EtOH %70 banyosu
- 10.5 dakika EtOH %95 banyosu
- 10 11.5 dakika EtOH %100 banyosu
- 12.5 dakika ksilen banyosu
- 13.5 dakika ksilen banyosu
14. Permount ve lamel kullanılarak lamın monte edilmesi.
- a) zaman, kullanılan hematoksilin türüne bağlıdır, 20
- 15 saniye ile 10 dakikadır (test lamlarının kullanımı yoluyla belirlenebilir)
- b) kullanılmadan önce filtreden geçirilir.

Sonuçlar

- 20 Bir modifiye osteopontin polipeptidi (SEQ ID NO:1) ile tedavinin kış folikülü yoğunluğu üzerindeki etkisi aşağıdaki Tablo 1(a) ve (b)'de kısaca açıklanır.

Tablo 1(a) - Polipeptit ile tedavi edilen hayvanlar

Polipeptit ile tedavi edilen Lam 1	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	18	0.90
bölge a2	21	0.90
bölge a3	25	0.95
bölge b1	13	0.90
bölge b2	21	0.90
bölge b3	26	0.95
Toplam	124	5.50

Poliipeptit ile tedavi edilen Lam 2	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	16	0.90
bölge a2	18	0.90
bölge a3	25	0.95
bölge b1	14	0.90
bölge b2	18	0.90
bölge b3	19	0.95
Toplam	110	5.50
Poliipeptit ile tedavi edilen Lam 3	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	18	0.90
bölge a2	13	0.90
bölge a3	19	0.95
bölge b1	20	0.90
bölge b2	17	0.90
bölge b3	14	0.90
Toplam	101	5.45
Poliipeptit ile tedavi edilen Lam 4	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	18	0.90
bölge a2	17	0.90
bölge a3	15	0.90
bölge b1	18	0.90
bölge b2	17	0.90
bölge b3	13	0.90
Toplam	98	5.40

Polipeptit ile tedavi edilen Lam 5	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	13	0.90
bölge a2	10	0.90
bölge a3	21	0.90
bölge b1	12	0.90
bölge b2	10	0.90
Polipeptit ile tedavi edilen Lam 5	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge b3	16	0.90
Toplam	82	5.40
Polipeptit ile tedavi edilen Lam 6	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	18	0.90
bölge a2	10	0.90
bölge a3	10	0.90
bölge b1	18	0.90
bölge b2	17	0.90
bölge b3	10	0.90
Toplam	83	5.40
Polipeptit ile tedavi edilen Lam7	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
Lam 34	124	5.50
Lam 38	110	5.50
Lam 42	101	5.45
Lam 46	98	5.40
Lam 50	82	5.40
Lam 54	83	5.40

Toplam	598	32.65
--------	-----	-------

Tablo 1(b) - Kontrol ile tedavi edilen hayvanlar

Kontrol ile tedavi edilen Lam 1	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	9	0.90
bölge a2	17	0.90
bölge a3	7	0.90
bölge b1	11	0.90
bölge b2	14	0.95
bölge b3	10	0.90
Toplam	68	5.45
Kontrol ile tedavi edilen Lam 2	Kıl foliküllerinin sayısı	epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	12	0.90
bölge a2	17	0.90
bölge a3	7	0.90
bölge b1	12	0.90
bölge b2	13	0.90
bölge b3	10	0.90
Toplam	71	5.40
Kontrol ile tedavi edilen Lam 3	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	8	0.90
bölge a2	7	0.90
bölge a3	11	0.90
bölge b1	19	0.95
bölge b2	8	0.90

bölge b3	14	0.90
Toplam	67	5.45
Kontrol ile tedavi edilen Lam 4	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	21	0.90
bölge a2	5	0.90
bölge a3	2	0.90
bölge b1	16	0.90
bölge b2	11	0.90
bölge b3	3	0.90
Toplam	58	5.40
Lam 5		
bölge a1	13	0.90
bölge a2	2	0.90
bölge a3	9	0.90
bölge b1	12	0.90
bölge b2	7	0.90
bölge b3	15	0.90
Toplam	58	5.40
Kontrol ile tedavi edilen Lam 6	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
bölge a1	7	0.90
bölge a2	11	0.90
bölge a3	10	0.90
bölge b1	6	0.90
bölge b2	8	0.90
bölge b3	15	0.90
Toplam	57	5.40

Kontrol ile tedavi edilen Lam 7	Kıl foliküllerinin sayısı	Epidermis uzunluğu, mm
Lam 18	68	5.45
Lam 22	71	5.40
Lam 26	67	5.45
Lam 34	58	5.40
Lam 38	58	5.40
Lam 42	57	5.40
Toplam	379	32.50

Sonuçların kısa açıklaması aşağıdaki Tablo 2’de gösterilir.

Tablo 2

	Analiz edilen foliküllerin numarası	mm başına foliküllerin numarası
SEQ ID NO: 1 ile tedavi	356	18.3
Kontrol grubu	356	11.7

- 5 Tedavi edilen ve kontrol hayvanlarındaki folikülleri gösteren temsili doku bölümleri Şekiller 2 ve 3’te gösterilmektedir. Karşılaştırma yoluyla doğal suş fare osteopontinin, kıl uzaması üzerinde saptanabilir herhangi bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir (veriler gösterilmemiştir).

10

Çıkarımlar

Veriler, SEQ ID NO: 1’e ait örnek niteliğindeki modifiye osteopontin polipeptidi ile tedavinin, kıl foliküllerinin sayısı/mm epidermisi yaklaşık %60 arttırdığını gösterir.

- 15 Bu bulgular, açıklamanın osteopontin benzeri polipeptitlerinin kıl uzamasının uyarılmasındaki yararını doğrulamaktadır.

ÖRNEK B - Farelerde SEQ ID NO: 5 ve 63'e ait kıl uzama etkisinin in vivo incelenmesi

Materyaller ve Yöntemler

5 Hayvanlar

Fareler (C57BU6) 6 ila 8 haftalıkken kullanılmıştır.

Çalışma Tasarımının Genel Değerlendirmesi

- Kıl uzamasının telojen fazındaki hayvanların seçilmesi.
- 10 • hayvanların dorsal arka kısmının kesilmesi
- Test peptidi/aracının subkütanöz enjeksiyonu
- Görsel analiz: Anajen indüksiyonu yüzdesi; Ortalama kıl uzama skoru; Görsel melanojeniz:
- Histolojik analiz: Subkütanöz dokudaki folikül sayımı; Deri
- 15 kalınlığına yönelik morfometri.

Tedavi grupları

- Hayvanlar, tedavi gruplarına rastgele bir şekilde ayrılmıştır (bakınız Tablo 3).

20

Tablo 3

<i>Tedavi</i>	<i>Hayvan sayısı</i>	<i>Doz</i>	<i>Hacim</i>
"Cx"	5	60 nM	25 µl
"FOL-004" (= SEQ ID NO:5)	5	60 nM	25 µl
"FOL-005" (= SEQ ID NO:63)	5	60 nM	25 µl
Araç kontrolü	5	-	25 µl

- Hayvanlara 1, 5 ve 9. günde belirtilen tedavi uygulanmıştır.
- Tedavi, dorsal kırpılmış deriye subkütanöz olarak uygulanmıştır.

25

Skorlama kriterleri

- Tedavilerin etkisi gözlenmiştir ve Tablo 4'teki kriterlere göre günlük olarak skorlanmıştır.

Tablo 4

Dorsal deri gözlemi	Kıl uzaması skoru
Kıl uzaması yoktur, deri pembedir	0
Deri rengi görülebilir kıl uzaması olmadan pembeden griye döner	0.5
Deri rengi, anajen başlangıcını göstermek üzere görülebilir kıl uzaması olmadan pembeden griye döner	1
Seyrek kıl uzaması	1.5
Yaygın kısa kıl uzaması	2
Orta derecede kıl uzaması	2.5
Yoğun, normal tüysü kıl	3

5

Sonuçlar

Açıklamanın örnek niteliğindeki polipeptitlerinin kıl uzaması üzerindeki etkisi Tablo 5'te gösterilir.

10

Tablo 5

	Gün											
Hayvan	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
(A) Araç (kontrol)												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
5	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1	NA	NA
Ortalama	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.1	0.	0.	-	-
a	0	0	0	0	0	0	0		2	2		

(B) "Cx" (SEQ ID NO:1 başlangıçtaki 16 amino asit sinyal peptidi eksik)												
1	0	0	0	1	1.5	2	2.5	3	3	3	NA	NA
2	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	NA	NA
3	0	0	0	0.5	0.5	0.5	1	1.5	1.5	1.5	NA	NA
4	0	0	0	0.5	0.5	0.5	1	1.5	1.5	1.5	NA	NA
5	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1.5	2	NA	NA
Ortalama	0.0	0.0	0.0	0.5	0.6	0.7	1.1	1.6	1.7	1.8	-	-
(C) FOL-004 (SEQ ID NO: 5)												
1	0	0	0.5	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2.5	3
2	0	0	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3	3	3
3	0	0	2.5	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3	3
4	0	0	1.5	2.5	3	3	3	3	3	3	3	3
5	0	0	1.5	2	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3
Ortalama	0.0	0.0	1.7	2.1	2.4	2.5	2.6	2.7	2.7	2.7	2.9	3.0
Hayvan	Gün											
	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
(D) FOL-005 (SEQ ID NO: 63)												
1	0	0	2	2.5	3	3	3	3	3	3	3	3
2	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3

3	0	0	0.5	0.5	1	1	1.5	2.5	2.5	2.5	3	3
4	0	0	2	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3	3
5	0	0	0	0	0	0.5	1	2	2.5	2.5	3	3
Ortalama	0.0	0.0	1.3	1.7	1.9	2.1	2.3	2.7	2.8	2.8	3.0	3.0

Şekil 4, (a) 0 olan bir kıl uzama skoruna sahip 14. günde kontrol ile tedavi edilen bir hayvan, (b) 1.5 olan bir kıl uzama skoruna sahip 14. günde örnek niteliğindeki 'tam uzunluktaki' polipeptit "Cx" (SEQ ID NO: 1, 60 nM) ile tedavi edilen bir hayvan, (c) 2.5 olan bir kıl uzama skoruna sahip 5. günde örnek niteliğindeki kısa peptit "FOL-004" (SEQ ID NO: 5, 60 nM) ile tedavi edilen hayvan ve (d) 2.0 olan bir kıl uzama skoruna sahip 5. günde örnek niteliğindeki kısa peptit "FOL-005" (SEQ ID NO: 5, 63 nM) ile tedavi edilen bir hayvanın temsili fotoğraflarını gösterir.

Sonuçlar Şekil 5'te kısaca açıklanmaktadır.

Örnek niteliğindeki polipeptitler FOL-004 (SEQ ID NO: 5) ve FOL-005'in (SEQ ID NO: 63) her ikisi de, 5. günden itibaren belirgin olan ve değerlendirme periyodunun sonuna (16. gün) kadar devam ettirilmek üzere hızlı kıl uzamasını indüklemiştir.

Açıklamanın "tam uzunluktaki" bir polipeptidi ("Cx") ayrıca FOL-004 (SEQ ID NO: 5) veya FOL-005'ten (SEQ ID NO: 63) daha yavaş bir başlangıca rağmen belirgin kıl uzamasını indüklemiştir.

Araç kontrolü ile tedavi edilen hayvanlar, deney periyodu başına küçük bir kıl uzama belirtisi göstermiştir.

Test edilen polipeptitlerin herhangi biri, hayvanlarda herhangi bir olumsuz etkiye yol açmamıştır (herhangi bir kilo kaybı veya herhangi bir diğer fark edilebilir semptom yoktur).

Çıkarımlar

Test edilen mutasyona uğratılmış tüm osteopontin polipeptitleri, belli bir hızlı etki başlangıcı sergilemek üzere daha kısa örnek

niteliğindeki polipeptitler FOL-004 (SEQ ID NO: 5) ve FOL-005 (SEQ ID NO: 63) ile in vivo kıl uzaması etkileri göstermiştir.

ÖRNEK C - SEQ ID NO: 5'ya eşdeğer olan doğal suş osteopontin parçasının kıl uzama etkisinin farelerde in vivo incelenmesi

Materyaller ve Yöntemler

Örnek B'de yukarıda açıklandığı üzere hayvanlar Tablo 6'da açıklanan şekilde tedavi edilmiştir:

10

Tablo 6

Tedavi	Hayvan sayısı	Doz	Hacim
"FOL-001"* (= SEQ ID NO:121)	6	60 nM	25 µl
* "FOL-001" aşağıdaki amino asit sekansından oluşur: VDVPNGRGDSLAYGLR [SEQ ID NO: 121]			

Bu sekans, doğal suş fare osteopontinin bir parçasıdır ve "FOL-004"'ün derive edildiği proteinin bölgesine karşılık gelir (diğer bir deyişle "FOL-004" doğal suş parçasının "FOL-001" mutasyona uğratılmış bir versiyonudur).

- Hayvanlara 1, 5 ve 9. günlerde belirtilen tedavi uygulanmıştır
- Tedavi dorsal kırpılmış deriye subkütanöz enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır.

20

Skorlama kriterleri

- Tedavilerin etkisi gözlenmiştir ve Örnek B'de açıklanan şekilde günlük olarak skorlanmıştır.

25

Sonuçlar

Polipeptit "FOL-001"'in kıl uzaması üzerindeki etkisi Tablo 7'de ve Şekil 6'da gösterilmektedir.

Tablo 7

Hayvan	Gün											
	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
FOL-001 (SEQ ID NO: 121, 60nM)												
1	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	1	2	2	2.5	2.5	NA
2	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	1	2	2	2.5	2.5	NA
3	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1	1	1	NA
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA
5	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1	1	1	NA
6	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1	1	1	NA
Ortalama	0	0	0.17	0.17	0.17	0.17	0.58	1.17	1.17	1.33	1.33	-

5 FOL-001 (SEQ ID NO: 121) peptidi, yaklaşık olarak 9. günde belirgin olmak ve yaklaşık olarak 1.3'lük bir skorda bir düzlüğe ulaşmak üzere farelerde geciktirilmiş, fakat saptanabilir bir kıl uzama etkisi meydana getirmiştir.

10 **Çıkarımlar**

Açıklamanın karşılık gelen mutasyona uğratılmış peptit sekansına kıyasla (FOL-004; SQE ID NO:5), eşdeğer mutasyona uğratılmamış doğal suş sekansı, FOL-004 ile gözlenenin %50'sinden az bir maksimum etki ile kıl uzamasının uyarımının geciktirilmiş başlangıcını sergilemiştir.

Böylece örnek niteliğindeki polipeptit, eşdeğer mutasyona uğratılmış doğal suş sekansından çok daha fazla etkinlik gösterir.

20

ÖRNEK D - Soyulmuş deride anajen indüksiyonunun in vivo incelenmesi

Materyaller ve Yöntemler

25 Hayvanlar ve tedaviler yukarıda Örnek B'de açıklanan şekildedir.

Tüm hayvanlar 16. günde öldürülmüştür.

Melanojenez gözlemi

- 5 Örnek B'ye yönelik kıl uzama değerlendirmesi süresinin tamamlanmasının akabinde hayvanlar ötenazi edilmiştir ve dorsal derisi soyulmuştur ve iç yüzeyin gözlenmesine yönelik olarak çıkarılmıştır.

Histolojik analiz

- 10 Soyulan deri bölümleri, Örnek A'da açıklanan şekilde histolojik analize yönelik olarak hazırlanmıştır. Subkütanöz dokudaki folikül sayımı ve deri kalınlığı akabinde ölçülmüştür.

Sonuçlar

- 15 Sonuçlar, aşağıdaki Tablolar 8 ve 9'da kısaca açıklanır.

Tablo 8

<u>Melanojenez gözlemi</u>					
Grup	Deri rengi (dış)	% anajen indüksiyonu *	Soyulmuş derideki siyah renk (16. gün)	% anajen indüksiyonu **	Kıl uzaması gösteren hayvanların sayısı
Cx (60nM)	Siyah (5/5 hayvan)	100	3/5	60	5/5
FOL-004 (60nM)	Siyah (5/5 hayvan)	100	1/5	20	5/5

FOL-005 (60nM)	Siyah (5/5 hayvan)	100	3/5	60	5/5
Araç	Pembe (4/5 ani hayvan)	20	1/5	20	1/5
* pembeden siyaha dış deri rengi değişimine göre					
** soyulmuş derideki siyah renge göre					

Tablo 9a (tüm hayvanlar)

Grup	Düşünülen hayvan sayısı	Ortalama $\pm$ sem	
		Subkütanöz dokudaki folikül sayımı (numara)	Deri kalınlığı
Cx (60nM)	5	22.20 $\pm$ 10.69	308.8 $\pm$ 21.94
FOL-004 (60nM)	5	6.20 $\pm$ 5.80	312.2 $\pm$ 15.60
FOL-005 (60nM)	5	34.80 $\pm$ 14.58	348.80 $\pm$ 40.05
Araç	4*	0 $\pm$ 0	246.5 $\pm$ 8.35
* 5 Numara hayvanın önemli bir aykırı gözlem olduğu bulunmuştur (p<0/05, Grubb's test) ve bu nedenle analizde göz ardı edilmiştir.			

Tablo 9b (sadece anajendeki hayvanlar)

Grup	Düşünülen hayvan sayısı	Ortalama $\pm$ sem	
		Subkütanöz dokudaki folikül sayımı (numara)	Deri kalınlığı

Cx (60nM)	3/5	36.67 ± 10.69	308.8 ± 21.94
FOL-004 (60nM)	1/5	29 ± 5.8	312.2 ± 15.60
FOL-005 (60nM)	3/5	58 ± 14.58	348.80 ± 40.05
Araç	0/4*	0 ± 0	246.5 ± 8.35

Kıl uzama döngüsü üç fazdan oluşur: bir dinlenme telojen fazı (C57BU6 deri açık pembe rengindedir), bir aktif kıl uzaması anajen fazı (burada deri koyu gri veya siyahtır) ve son olarak bir katajen fazı (burada kıl uzaması durur ve deri telojen fazı geri geçiş yapar, böylece açık pembe bir renge döner).

Mevcut çalışmada hayvanlar, pembe deriye (telojen fazı) yönelik olarak önceden seçilmiştir ve Test polipeptidi subkütanöz/topikal yol ile uygulanmıştır. Uygun bir kıl uzama promotörü, dinlenme telojen fazından aktif anajen fazına geçişi ve böylece açık renk deriden koyu renk deriye geçişi tetikler. Bu koyu pigmentasyon, anajen fazında yeni kıl uzamasına yönelik hazırlıkta kıl foliküllerinde melanin toplanmasından kaynaklanabilir. Foliküler melanositlerin melanin sentezi anajen fazına sıkı şekilde bağlanır, katajen sırasında durur ve telojen fazında bulunmaz. Bu nedenle uygun bir kıl uzaması promotörü dorsal derinin kararmasına neden olur. Sonlandırılmasının üzerine hayvanların dorsal derisi akabinde soyma yoluyla kesilip çıkarılmıştır ve soyulan deri ters çevrilmiştir ve görsel kararma ile gösterilen melanojenenezin indüksiyonuna yönelik olarak gözlenmiştir. Histolojik analiz, folikül sayısı ve deri kalınlığını ortaya çıkarır Uygun bir kıl uzama promotörü, subkütanöz dokudaki foliküllerin sayısını ve deri kalınlığını arttırır.

Mevcut çalışmada üç test polipeptidinin tümü, subkütanöz enjeksiyondan sonra yoğun kıl uzaması görüntüsüne neden olmuştur (bakını yukarıdaki Örnek B). Ayrıca hayvanların bazılarında

kılın tam uzamasının akabinde, katajen fazının bir karakteristiği olmak üzere deri renginin siyahtan griye ve pembeye döndüğü gözlenmiştir. Çalışmada toplanan soyulmuş deri, melanosit ayrılmasından dolayı kıl uzama döngüsün anajen fazının (aktif faz) bir göstergesi olmak üzere siyah yama şeklinde kendini göstermiştir. Bu hayvanlarda histolojik sonuçlar, büyük bir kıl folikülü sayısı ve deri kalınlığında artış göstermiştir. Fakat bazı hayvanlarda katajen fazının meydana geldiği yerde soyulmuş derinin, tüsü kılın bozulmamış olmamasına rağmen pembe renkli olduğu bulunmuştur. Bu nedenle bu türdeki soyulmuş deri bölümlerinin analizi, subkütanöz dokuda folikül eksikliği, fakat deri kalınlığında yine de iyi bir artış göstermiştir.

Çıkarımlar

Açıklamanın örnek niteliğindeki mutasyona uğratılmış osteopontin polipeptitleri, subkütanöz dokudaki kıl foliküllerinin sayısındaki bir artış ve/veya artan deri kalınlığı ile gösterildiği üzere anajenin belirgin indüksiyonunu göstermiştir.

SEKANS LİSTESİ

<110> FOLLICUM AB

<120> Yeni bileşimler ve bunların kullanımları

<130> FOLBA/P51811PC

25

<140> PCT/GB2012/051955

<141> 10 Ağustos 2012

<150> GB 1113770.0

30 <151> 10 Ağustos 2011

<160> 123

<170> SeqWin99

35

<210> 1
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

5

<220>
 <223> Modifiye osteopontin

<400> 1

```

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

```

10

Gln	Leu	Leu	Ser	Met	Pro	Ser	Asp	Gln	Asp	Asn	Asn	Gly	Lys	Gly	Ser
	195						200					205			
His	Glu	Ser	Ser	Gln	Leu	Asp	Glu	Pro	Ser	Leu	Glu	Thr	His	Arg	Leu
	210					215					220				
Glu	His	Ser	Lys	Glu	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Asp	Gln	Ser	Asp	Val	Ile
	225				230					235					240
Asp	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Lys	Ala	Ser	Leu	Glu	His	Gln	Ser	His	Lys
				245					250					255	
Phe	His	Ser	His	Lys	Asp	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Pro	Lys	Ser	Lys	Glu
			260					265					270		
Asp	Asp	Arg	Tyr	Leu	Lys	Phe	Arg	Ile	Ser	His	Glu	Leu	Glu	Ser	Ser
		275					280					285			
Ser	Ser	Glu	Val	Asn											
	290														

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> İnaktive RGD bölgesi

10 <400> 2

Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Leu	Arg	Ser
1				5					10

<210> 3

<211> 299

<212> PRT

15 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Modifiye osteopontin

20 <400> 3

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
- 5 10
Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Gln Gln Lys Gln Leu
20 25 30
Tyr Asn Lys Tyr Phe Asp Ala Val Ala Thr Tip Leu Asn Phe Asp Phe
35 40 45
Ser Gln Lys Gln Asn Ser Ser Ala Pro Gln Phe Ser Pro Ser Lys Ser
50 55 60
Asn Gln Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Gln Asp Asp Asp
65 70 75 80
Asp His Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp
85 90 95
Val Asp Asp Phe Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Gln Ser His His Ser
100 105 110 115
Asp Gln Ser Asp Gln Leu Val Thr Asp Phe Phe Thr Asp Leu Phe Ala
120 125 130
Phe Gln Val Phe Phe Pro Val Val Pro Phe Val Asp Phe Lys Asp Gly
135 140 145
Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg
150 155 160
Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Phe Asp Ala Thr Asp Gln Asp Ile Thr Ser
165 170 175
His Met Gln Ser Gln Gln Ser Asn Gly Ala Lys Lys Ala Ile Pro Val
180 185 190
Ala Gln Asp Leu Asn Ala Phe Ser Asp Tip Asp Ser Arg Gly Lys Asp
195 200 205
Ser Tyr Gln Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Gln Thr His Ser
210 215 220
His Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Gln Ser Asn
225 230 235 240
Gln His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Gln Leu Ser Lys Val Ser Arg
245 250 255
Gln Phe His Ser His Gln Phe His Ser His Gln Asp Met Ser Val Val
260 265 270
Asp Pro Lys Ser Lys Gln Gln Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser
275 280 285
His Gln Leu Asp Ser Ala Ser Ser Gln Val Asn
290 295

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> İnaktive RGD bölgesi

5 <400> 4

Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 5

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 15 amino asitlik peptit (FOL-004)

15

<400> 5

Val Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5 10 15

<210> 6

20 <211> 15

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

25 <223> Tercih edilen 15 amino asitlik peptit

<400> 6

Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10 15

30 <210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 14 amino asitlik peptit

5

<400> 7

Val Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu
1 5 10

<210> 8

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

15 <223> Tercih edilen 14 amino asitlik peptit

<400> 8

Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

20 <210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

25 <220>

<223> Tercih edilen 14 amino asitlik peptit

<400> 9

Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

30

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 13 amino asitlik peptit

5

<400> 10

Val Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly
1 5 10

<210> 11

10 <211> 13

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

15 <223> Tercih edilen 13 amino asitlik peptit

<400> 11

Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu
1 5 10

20 <210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

25 <220>

<223> Tercih edilen 13 amino asitlik peptit

<400> 12

Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

30

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 13 amino asitlik peptit

5

<400> 13

Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 14

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

15 <400> 14

Val Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr
1 5 10

<210> 15

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

25 <400> 15

Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly
1 5 10

<210> 16

<211> 12

30 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit
<400> 16

Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu
1 5 10

5 <210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

<400> 17

Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

<210> 18

15 <211> 12

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

20 <223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

<400> 18

Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

25 <210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

30 <220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 19

Val	Asp	Val	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 20

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 20

Asp	Val	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Tyr
1				5					10	

15 <210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

20 <220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 21

Val	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly
1				5					10	

25

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

30

<220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 22

Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu
1 5 10

5 <210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

10 <220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 23

Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

15

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

20

<220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 24

Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

25

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit

<400> 25

Val	Asp	Val	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu
1				5					10

5 <210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

10 <220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit

<400> 26

Asp	Val	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala
1				5					10

15

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

20

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit

<400> 27

Val	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Tyr
1				5					10

25

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit

<400> 28

Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly
1				5					10

5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

10

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit

<400> 29

Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Leu
1				5					10

15

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit

25 <400> 30

Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Leu	Arg
1				5					10

<210> 31

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit
<400> 31

Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

5 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

10 <220>
<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit
<400> 32

Val Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser
1 5

15 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

20 <220>
<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit
<400> 33

Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu
1 5

25 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

30 <220>
<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit
<400> 34

Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala
1 5

<210> 35

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

10

<400> 35

Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr
1 5

<210> 36

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

20 <223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 36

Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly
1 5

25 <210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

30 <220>

<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 37

Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu
1 5

<210> 38

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 38

Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5

15 <210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

20 <220>

<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 39

Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5

25

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

30

<220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 40

Val Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile
1 5

<210> 41

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 41

Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser
1 5

15 <210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

20 <220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 42

Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu
1 5

25

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

30

<220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 43

Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala
1 5

<210> 44

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 44

Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr
1 5

15 <210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

20 <220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 45

Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly
1 5

25

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

30

<220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 46

Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu
1 5

<210> 47

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 47

Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5

15 <210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

20 <220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 48

Val Asp Val Pro Asn Gly Asp
1 5

25

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

30

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 49

Asp Val Pro Asn Gly Asp Ile
1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 50

Val Pro Asn Gly Asp Ile Ser
1 5

10

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

15

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 51

Pro Asn Gly Asp Ile Ser Leu
1 5

20

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

25

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 52

Asn Gly Asp Ile Ser Leu Ala
1 5

<210> 53

30

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

5 <400> 53

Gly Asp Ile Ser Leu Ala Tyr
1 5

<210> 54

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

15 <400> 54

Asp Ile Ser Leu Ala Tyr Gly
1 5

<210> 55

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

25 <400> 55

Ile Ser Leu Ala Tyr Gly Leu
1 5

<210> 56

<211> 6

30 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 6 amino asitlik peptit

<400> 56

5

Asp Val Pro Asn Gly Asp
1 5

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

10

<220>

<223> Tercih edilen 6 amino asitlik peptit

<400> 57

15

Val Pro Asn Gly Asp Ile
1 5

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 6 amino asitlik peptit

<400> 58

25

Pro Asn Gly Asp Ile Ser
1 5

<210> 59

<211> 6

30 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 6 amino asitlik peptit

<400> 62

Ile Ser Leu Ala Tyr Gly
1 5

5 <210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

10 <220>

<223> Tercih edilen 15 amino asitlik peptit

<400> 63

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5 10 15

15 <210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

20 <220>

<223> Tercih edilen 15 amino asitlik peptit

<400> 64

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Ser
1 5 10 15

25 <210> 65

<211> 14

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

30 <220>

<223> Tercih edilen 14 amino asitlik peptit

<400> 65

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu
1 5 10

5 <210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

10 <220>

<223> Tercih edilen 14 amino asitlik peptit

<400> 66

Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

15 <210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

20 <223> Tercih edilen 14 amino asitlik peptit

<400> 67

Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 68

25 <211> 13

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

30 <223> Tercih edilen 13 amino asitlik peptit

<400> 68

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly
1 5 10

<210> 69

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 13 amino asitlik peptit

10 <400> 69

Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu
1 5 10

<210> 70

<211> 13

15 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 13 amino asitlik peptit

20 <400> 70

Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

<210> 71

<211> 13

25 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 13 amino asitlik peptit

30 <400> 71

Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

5

<220>

<223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

<400> 72

10 Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr
 1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

15

<220>

<223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

<400> 73

20

Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly
1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

<400> 74

30 Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu
 1 5 10

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

5 <400> 75

Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

<210> 76

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 12 amino asitlik peptit

15

<400> 76

Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 77

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

25 <223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 77

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val
1 5 10

30 <210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

5 <400> 78

Asp	Thr	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Val	Tyr
1				5					10	

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

15 <400> 79

Thr	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Val	Tyr	Gly
1				5					10	

<210> 80

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

25

<400> 80

Tyr	Asp	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Val	Tyr	Gly	Leu
1				5					10	

<210> 81

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 81

5

Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 11 amino asitlik peptit

<400> 82

15

Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit

25 <400> 83

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val
1 5 10

<210> 84

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit
<400> 84

Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val
1 5 10

5

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

10

<220>
<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit
<400> 85

Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr
1 5 10

15

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

20

<220>
<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit
<400> 86

Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly
1 5 10

25

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

30

<220>

<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit
<400> 87

Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu
1 5 10

5 <210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

10 <220>
<223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit
<400> 88

Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5 10

15 <210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Yapay Sekans
<220>

20 <223> Tercih edilen 10 amino asitlik peptit

<400> 89

Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

25 <210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Yapay Sekans
<220>

30 <223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit
<400> 90

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser
1 5

<210> 91

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 91

10

Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 92

20

Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 93

30

Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

5

<220>
<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit
<400> 94

Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly
1 5

10

<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

15

<220>
<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 95

20

Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT

25 <213> Yapay Sekans

<220>
<223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit
<400> 96

30

Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 97
<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

5 <223> Tercih edilen 9 amino asitlik peptit

<400> 97

Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5

10 <210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

15 <220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 98

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile
1 5

20

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

25

<220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 99

Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser
1 5

30

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

5 <223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 100

Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val
1 5

10 <210> 101

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

15 <220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 101

Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val Val
1 5

20

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

25

<220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 102

Asp Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr
1 5

30

<210> 103

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

5

<400> 103

Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly
1 5

<210> 104

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

15 <223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 104

Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu
1 5

20 <210> 105

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

25 <220>

<223> Tercih edilen 8 amino asitlik peptit

<400> 105

Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5

30

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

5

<400> 106

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Asp
1 5

<210> 107

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

15 <223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 107

Asp Thr Tyr Asp Gly Asp Ile
1 5

20 <210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

25 <220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 108

Thr Tyr Asp Gly Asp Ile Ser
1 5

30 <210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

5

<400> 109

Tyr Asp Gly Asp Ile Ser Val
1 5

<210> 110

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

15 <223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 110

Asp Gly Asp Ile Ser Val Val
1 5

<210> 111

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

25 <223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 111

Gly Asp Ile Ser Val Val Tyr
1 5

30 <210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

5 <400> 112

Asp Ile Ser Val Val Tyr Gly
1 5

<210> 113

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 7 amino asitlik peptit

<400> 113

15

Ile Ser Val Val Tyr Gly Leu
1 5

<210> 114

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Tercih edilen 6 amino asitlik peptit

25 <400> 114

Asp Thr Tyr Asp Gly Asp
1 5

<210> 115

<211> 6

30 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<400> 118

Gly Asp Ile Ser Val Val
1 5

<210> 119

5 <211> 6

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> Tercih edilen 6 amino asitlik peptit

<400> 119

Asp Ile Ser Val Val Tyr
1 5

<210> 120

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

20 <223> Tercih edilen 6 amino asitlik peptit

<400> 120

Ile Ser Val Val Tyr Gly
1 5

<210> 121

25 <211> 16

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

30 <223> FOL-001

<400> 121

Val	Asp	Val	Pro	Asn	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Leu	Arg
1				5					10					15	

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 122

Arg	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Leu	Arg	Ser
1				5					10	

<210> 123

10 <211> 7

<212> PRT

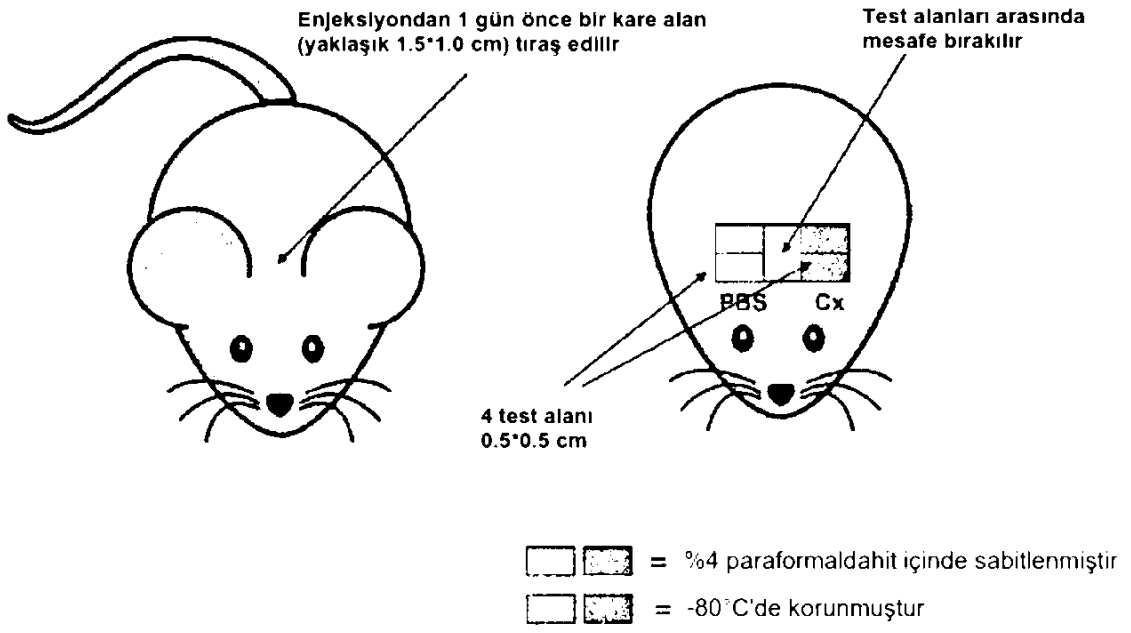
<213> Homo sapiens

<400> 123

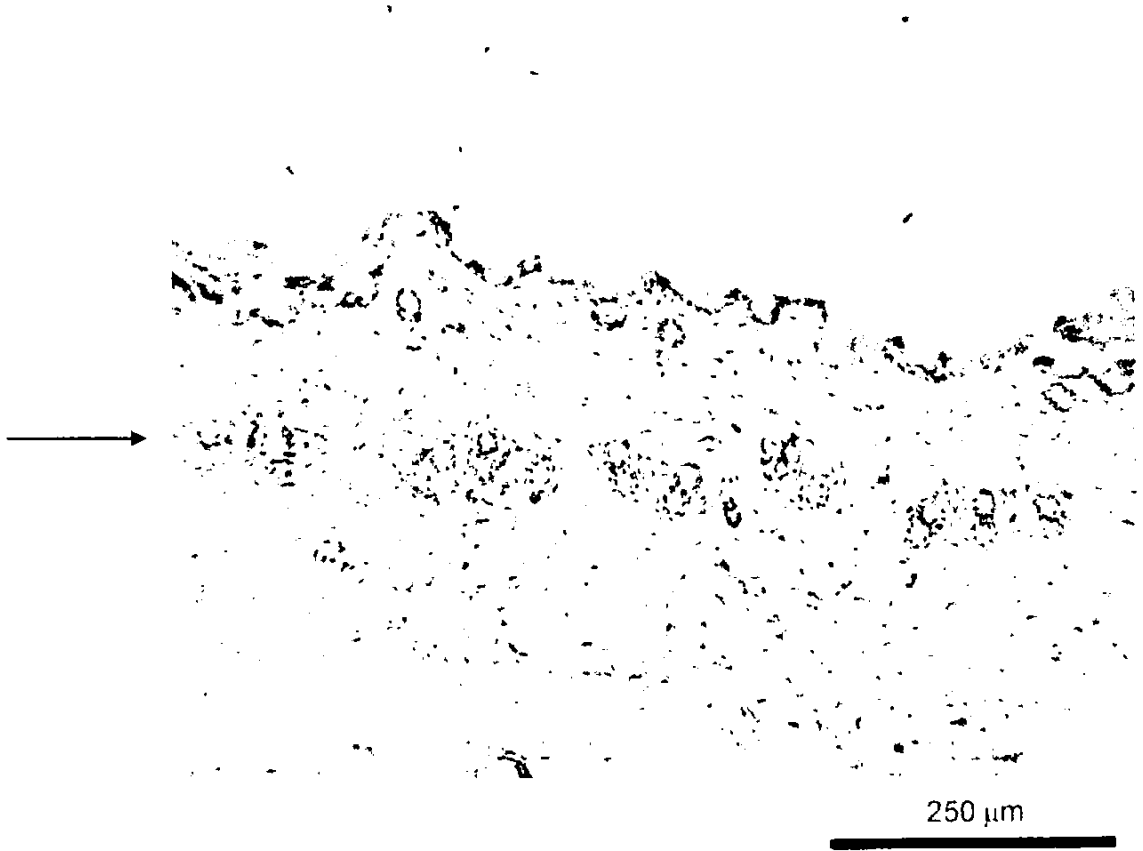
Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Leu	Arg
1				5		

15

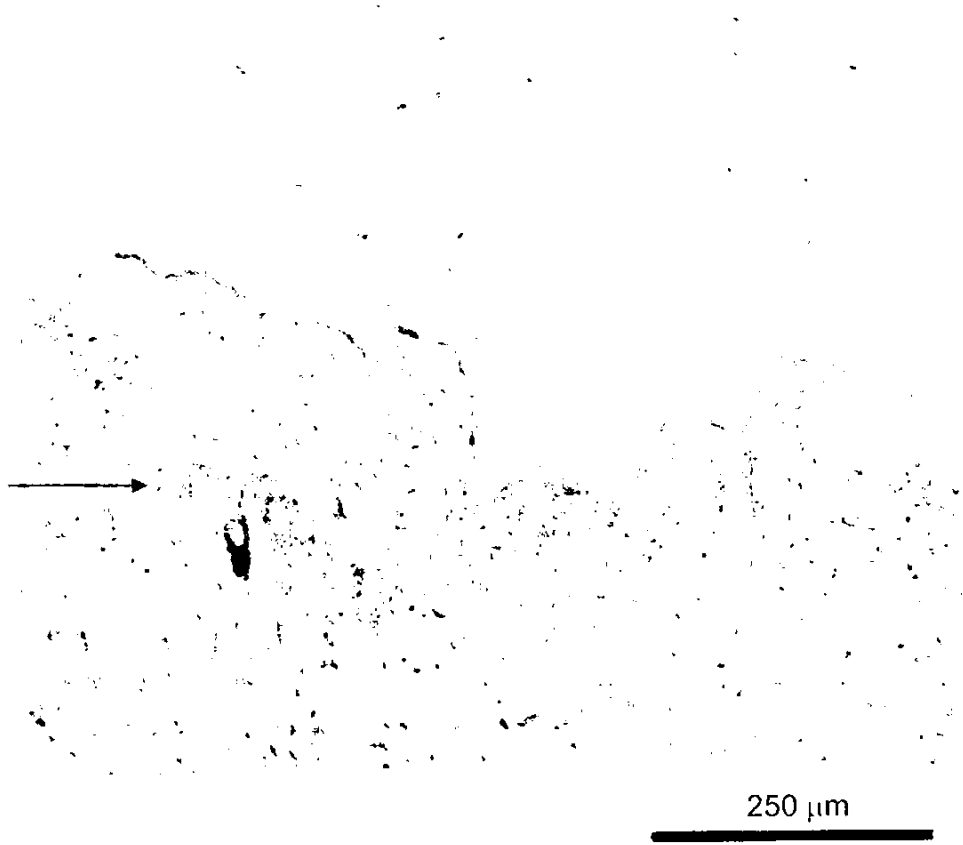
ŞEKİL 1



ŞEKİL 2



ŞEKİL 3



ŞEKİL (4A)



ŞEKİL (4B)



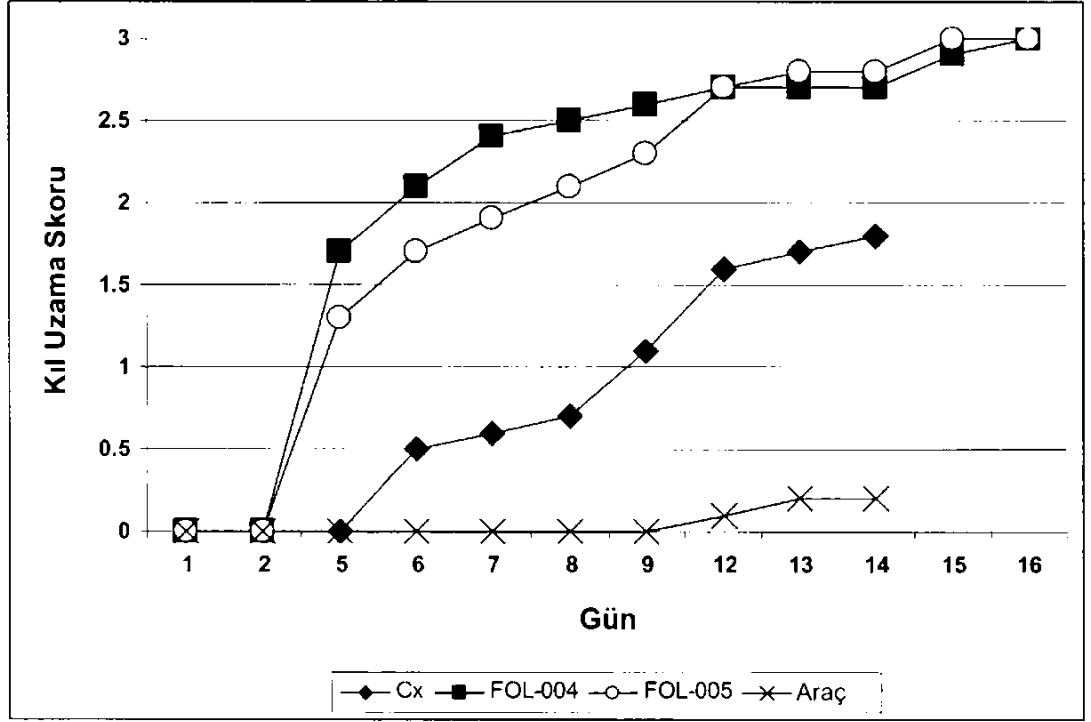
ŞEKİL (4C)



ŞEKİL (4D)



ŞEKİL 5



ŞEKİL 6

