

ÖZET
SERVİKAL KANSERİ İÇİN AŞI

Yağ asidinin bir kısmının lipid A'dan ayrıldığı toksik olmayan bir LOS'un
5 (lipooligosakkarid), tip 16 veya 18 HPV'nin L1 VLP'si kullanılarak immünizasyonunda
bir immüno-adjüvan olarak kullanılabildiği keşfedilmiş; bu şekilde HPV immün
yanıtları, geleneksel VLP bazlı aşılar ile elde edilenden çok daha dikkate değer bir
şekilde tetiklenmektedir; bu da, bir insan servikal kanserini önlemek üzere üstün bir
aşı olarak işlev görmesini sağlamaktadır. Buna bağlı olarak bir insan servikal kanseri
10 için farmasötik bir aşı sağlamak bu buluşun bir amacıdır.

İSTEMLER

1. Şunları içeren bir bileşim:

- 5 (a) (i) tip 16 insan papillomavirüsünün (HPV) virüs benzer bir L1 parçacığı (VLP), tip 18 HPV'nin bir L1 VLP'si, ya da bunların bir kombinasyonu; ve (ii) 2,000-4,000 Da aralığında bir moleküler ağırlığa sahip olan, KCCM 10374 erişim numarasına sahip, E.coli (Escheria coli) EG0021'den izole edilmiş olan lipopolisakkaridin lipid A'sının deasilasyonu ile detoksifiye edilmiş olan bir deasillenmiş toksik olmayan lipo-oligosakkarid (LOS), ve alüminyum hidroksit; ve
- 10 (b) farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı.

2. İstem 1'e göre bileşim olup, burada, tip 16 veya 18 HPV'nin L1 VLP'si, aşağıdaki aşamaları içeren bir saflaştırma prosedürü ile elde edilir: (i) tip 16 veya 18 HPV'nin L1'ini kodlayan bir nükleotid dizilimini barındıran mayaların kültürlenmesi; (ii)
- 15 kültürlenmiş mayanın lizlenmesi; (iii) maya lizatını amonyum sülfat ile çöktürerek safsızlıkların bertaraf edilmesi; ve (iv) saflıkların uzaklaştırılmış olduğu maya lizatında bir heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisi gerçekleştirilmesi.

3. İstem 1'e göre bileşim olup, burada, farmasötik bileşim ayrıca şöyle bir immüno-adjuvanı içerir: Mg, Ca, Sr, Ba ve Ra'dan oluşan gruptan seçilen bir II. grup elementi;
- 20 Ti, Zr, Hf ve Rf'den oluşan gruptan seçilen bir IV. grup elementi.

25

30

TARİFNAME
SERVİKAL KANSERİ İÇİN AŞI
TEKNİĞİN BİLİNER DURUMU

5 TEKNİK ALAN

Mevcut buluş bir insan servikal kanseri için bir farmasötik aşı bileşiminin üretimine yönelik bir bileşim ile ilgilidir.

10 İLGİLİ TEKNİĞİN AÇIKLANMASI

- 80in üzerinde İnsan Papillomavirüsünün (HPV) olduğu bilinmektedir ve bunların yaklaşık 30 türü cinsel temas ile servikal enfeksiyona yol açmaktadır; bu türlerden yarısı kadarının servikal kanser ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Zur Hausen H, Mol. Carcinogenesis 8: 147-150 (1988)). Bunların arasından, tip 16 ve 18 ile enfekte olmuş kadınlardaki kanser oranının, normal kadınlara oranla yaklaşık 50 kat daha yüksek olduğu bilinmektedir, ve tip 16 ve 18 HPV cinsel organın epitelyal hücrelerini enfekte etmekte; malen dönüşüm yoluyla servikal kansere yol açmaktadır (Zur Hausen H, Mol. Carcinogenesis 8: 147-150 (1988); Hausen, Biochemica. Biophysica. Acta. 1288: 55-78 (1996)).

- Servikal kanseri önlemek üzere mevcut olan güncel aşılar yüksek risk tipi HPV virüsü benzeri parçacıklar (VLPler) kullanılarak geliştirilmiştir. VLP HPV'nin bir majör kapsid proteinidir (L1 proteini, yaklaşık 55 kDa), ve bir aşı adayı olarak şunlar da dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir: (a) doğal HPV virionunda gözlenene benzer şekilde, başka bir virüsün gen ürünü olmadan kendiliğinden oluşan bir VLP kabiliyeti; (b) uzun vadeli bağışıklığın devamı; ve (c) bir gen türüne karşı tip spesifikliğine bağlı olarak yüksek etkililik.

- VLP kullanılarak elde edilen "Gardasil" (Merck & Co., Inc.), tip 6, 11 ve 18 HPV'ye karşı her antijeni ve en yaygın immüno-adjuvan olarak "Alum"u kullanarak geliştirilmiş olan bir aşıdır. 'Cervarix' (GlaxoSmithKline Plc.) bir servikal kanseri tetikleyen temsili bir faktör olarak tip 16 ve 18 HPV, ve bağımsız olarak geliştirilmiş bir immüno-adjuvan olarak "AS04" kullanılarak geliştirilmiş olan bir aşıdır.

"Gardasil" içinde bir immüno-adjüvan olarak kullanılan Alum; difteri, tetanos ve hepatit B için bir aşı olarak kullanılmaktadır, ve Alum'un antijen stabilitesini geliştirdiği ve sitokin salımını başlattığı bildirilmiştir. Ancak gardasilin kullanımı, şu nedenlerle

5 kısıtlıdır: (a) aşıyı liyofilize etmek veya dondurmak mümkün değildir; (b) tüm antijenlere karşı etkili değildir; ve (c) yalnızca hümmoral immün yanıtı teşvik etmektedir.

GSK, Cervarix'in içinde bulunan AS04, potent ve kalıcı immün yanıtlar başlatmak amacıyla geliştirilmiştir, ve alüminyum hidroksit ve monofosforil lipid A'dan (MPL) oluşmaktadır. Burada kullanılan "MPL" terimi, aşının içinde bulunan bir antijene karşı immün yanıtın geliştirilmesine bir rol oynayan, kritik bir immün yanıtı direkt olarak etkinleştirme kabiliyetine sahip olan bir immüno-uyarıcı maddeye karşılık gelmektedir.

Yakın zamanda immüno-adjüvanlara yeni yeni odaklanılmış ve bunlar servikal kanser aşıları ve influenza aşıları gibi çeşitli aşılar da kullanılmıştır. Bunların arasından, 1960'lardan beri bir anti-kanser ajanı olarak bakteriyel DNA ilgi çekmiş, ve şimdiye dek birbiri ardına araştırılmıştır. Ancak, düşük etkililiğinden dolayı bakteriyel DNA bir

20 anti-kanser ajanı olarak kullanılmamıştır (Glick, J. L. The specificity of inhibition of tumor cell viability by DNA. Cancer Res. 27: 2338 (1967)). Bu kusuruna rağmen, bakteriyel DNA'nın, ciddi yan etkiler olmaksızın çeşitli immün hücreleri etkinleştirdiğinin, ve bir adjüvan olarak birçok avantajının bulunduğu bilindiği gösterilmiştir (McCluskie MJ, et al., CpG DNA is a potent enhancer of systemic and

25 mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. J Immunol. Nov1; 161 (9): 4463-6 (1998)).

Bakteriyel DNA'nın bu etkileri için, Japonya'da Yamamoto ve arkadaşları, GC içeren palindromik dizilimlerin, bakteriyel DNA'nın Krieg ve arkadaşları tarafından

30 gösterilmiş olan etkilerinde hayati bir rol oynadığını tartışmaktadır (Yamamoto S. et al. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. J. Immunol. 148: 4072 (1992); Krieg AM, Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. Curr. Oncol. Rep. Mar; 6 (2): 88-95 (2004)). 1990'ların

ortalarında yapılan CpG ile ilgili çalışmalara dayalı olarak, DNA anti-kanser ajanına karşı ilgi, bir anti-kanser ajanı olarak metillenmemiş CG barındıran bir sentetik DNA (CpG-ODN) olasılığının ortaya çıkarılmasına yol açmıştır; örneğin kısa sentetik DNA degradasyonunu inhibe etmek için diester bağlarında S ikamesine yönelik bir çalışma. Bu bağlamda CpG-ODN ile ilişkili ürünler klinik deneylerde, bir anti-kanser ajanı ve aynı zamanda bir adjuvan olarak kullanılmıştır (<http://www.coleypharma.com>).

Ancak immünojenisite ve CpG-ODN'nin diester bağlarındaki S ikamesinin halen düşük olan anti-kanser aktivitesi de dahil olmak üzere bazı sorunlar çözülmeyi beklemektedir. Güncel klinikte, CpG 7909, anti-DNA Ab'yi tetikleyen bir fosfatolat oligonükleotiddir (Clin Immunol. Ağustos; 100 (2) 157-63 (2001)), ve SLE (sistemik lupus eritematozu) gibi oto-immün hastalıklar ile yakından ilişkilidir (J Clin Immunol. Temmuz; 6 (4): 292-8 (1986)). Buna ek olarak fosfatolat struktürünün, enfeksiyonlara karşı immün koruma bozukluğuna katkı yapacak şekilde TI Ag olarak işlev gördüğü bilinmektedir (Mol Immunol. Aralık; 35 (18): 1161-70 (1998)).

Anti-kanser etkisi olduğu 1950'lerden beri bilinen LPS'de, ng mertebesindeki LPS'nin sepsis ile ölüme yol açmasından ötürü LPS kullanımı zor olmuştur. LPS ve DNA arasındaki bağın ciddi sito-toksisiteye neden olduğuna dair genel bir kanı bulunmaktadır, ve bundan dolayı LPS'nin bertaraf edilmesi, DNA ile ilişkili ilaçlarda oldukça önemli bir proses olarak addedilmektedir (Gao JJ. et. al, Bacterial DNA and lipopolysaccharide induce synergistic production of TNF-alpha through a post-transcriptional mechanism. J Immunol 166 (11): 6855-60 (2001)). Etkililik bağlamında, LPS'nin bir anti-kanser ajanı olarak uygun olmadığı varsayıldığında, LPS ile tetiklenen immün yanıtların, anti-kanser için nemli olan Th1 tipi olmayan, Th2 tipi yanıtlar olan DNA ile tetiklenenlerden çok daha kuvvetli olduğu düşünülmelidir (Lebman DA et al Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. J Exp Med. 1 Eylül; 168 (3): 853-62 (1988)). Th2 tipi immün aktivitenin Th1 tipi immün aktiviteyi inhibe ettiği düşünüldüğünde, LPS ile tetiklenen Th2 tipi immün aktiviteden dolayı, bir anti-kanser ajanı olarak LPS'yi kullanmak oldukça zor olmuştur (Rengarajan J et al. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization, Immunol Today. Ekim; 21 (10): 479-83 (2000)).

LPS'nin detoksifike edilmesine yönelik çeşitli girişimler üzerine çalışılmıştır; bu da polisakkarid zincirinin uzaklaştırılması ya da lipid A'nin deasillenmesi yoluyla başarılı biçimde sito-toksisitesinin azaltılmasına yol açmıştır (Katz SS et al Deacylation of lipopolysaccharide in whole Escherichia coli during destruction by cellular and extracellular components of a rabbit peritoneal inflammatory exudate. J Biol Chem. Aralık 17; 274 (51): 36579-84 (1999)). Örneğin, monofosforil lipid A (MPL) lipid A'nın fosforilasyonu ile elde edilir; burada, bir immüno-terapötik anti-kanser ajanı geliştirmek üzere LPS'nin polisakkarid zinciri bertaraf edilir. Ancak etkililiğinin oldukça düşük olduğu bilinmektedir (<http://www.corixa.com>).

10

Diğer yandan mevcut buluşun başvuru sahipleri, yukarıda bahsedilen immüno-adjuvanların eksiklerini tamamlamak için yeni bir immüno-adjuvan geliştirmiştir (0740237 sayılı Kore Patenti (2007.07.10)).

15 WO 2007/068907 A2, bir adjuvan ile kombinasyon halinde bir antijen ya da antijenik preparasyon içeren bir insani immünojenik bileşim dozunu açıklamaktadır; burada bahsedilen adjuvan bir lipozom ve bir lipopolisakkarid halinde sunulmuş olan Quilaya saponaria molina kabuğundan elde edilen immünolojik olarak aktif bir saponin fraksiyonu içermektedir; burada bahsedilen saponin fraksiyonu ve bahsedilen
20 lipopolisakkaridin her ikisi de 30 µg'ın altındaki bir seviyedeki söz konusu insani dozda mevcuttur.

WO 2006/114312 A2i kanserler de dahil olmak üzere, HPV enfeksiyonu ve/veya hastalığının önlenmesine yönelik bir yöntemi açıklamaktadır; bu yöntem en azından
25 HPV16 ve HPV18'den bir L1 proteini veya onun immünojenik bir fragmanını içeren birinci bir HPV aşısının, ve birinci aşısındaki HPV16 ve HPV18 L1 bileşenlerini içermeyen ikinci bir HPV aşısının dağıtımını içerir; ve bu ikinci aşı en azından bir tane onkojenik HPV tipinden bir L1 proteini veya onun immünojenik bir fragmanını içerir; burada birinci ve ikinci aşılar herhangi bir sırada verilebilir ve dağıtım uygun bir
30 zaman aralığı ile ayrılmıştır.

BU BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Mevcut buluş sahipleri, yukarıda tarif edildiği şekilde bir servikal kanser için olan geleneksel aşılardan problemlerinin üstesinden gelebilen yeni bir aşı geliştirmek üzere yoğun çalışmalar yapmışlardır. Sonuç olarak, yağ asidinin bir kısmının lipid A'dan ayrıldığı toksik olmayan bir LOS'un (lipooligosakkarid), tip 16 veya 18 HPV'nin L1 VLP'si kullanılarak immünizasyonunda bir immüno-adjuvan olarak kullanılabildiğini keşfetmişlerdir; bu şekilde HPV immün yanıtları, geleneksel VLP bazlı aşılardan elde edilenden çok daha dikkate değer bir şekilde tetiklenmektedir; bu da, bir insan servikal kanserini önlemek üzere üstün bir aşı olarak işlev görmesini sağlamaktadır.

Buna bağlı olarak bir insan servikal kanseri için farmasötik bir aşı sağlamak bu buluşun bir amacıdır.

Mevcut buluşun diğer amaçları ve avantajları, ekli istemler ve çizimler ile beraber aşağıdaki detaylı tarifname ışığında daha anlaşılır hale gelecektir.

Bu buluşun bir halinde, bir insan servikal kanseri için şunları içeren bir farmasötik aşı sağlanmaktadır:

- (a) (i) tip 16 insan papilloma virüsünün (HPV) bir L1 virüs benzeri parçacığı (VLP), tip 18 HPV'nin bir L1 VLP'si, veya bunların bir kombinasyonu; ve
- (ii) KCCM 10374 erişim numarasına sahip olan, E.coli (Escherichia coli) EG0021'den izole edilmiş olan lipopolisakkaridin lipid A'sinin deasillenmesi ile detokdifiye edilmiş 2,000-4,000 Da aralığında bir moleküler ağırlığa sahip olan deasillenmiş toksik olmayan bir lipooligosakkarid (LOS), ve alüminyum hidroksit; ve
- (b) farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı.

Tercih edilen bir düzenlemede tip 16 veya 18 HPV'nin L1 VLP'si, aşağıdaki aşamaları içeren bir saflaştırma prosedürü ile elde edilir: (i) tip 16 veya 18 HPV'nin L1'ini kodlayan bir nükleotid dizilimini barındıran mayaların kültürlenmesi; (ii) kültürlenmiş mayanın lizlenmesi; (iii) maya lizatını amonyum sülfat ile çöktürerek safsızlıkların bertaraf edilmesi; ve (iv) saflıkların uzaklaştırılmış olduğu maya lizatında bir heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisi gerçekleştirilmesi.

Başka bir düzenlemede farmasötik bileşim ayrıca şöyle bir immüno-adjuvan içerir: Mg, Ca, Sr, Ba ve Ra'dan oluşan gruptan seçilen bir II. Grup elementi; ya da Ti, Zr, Hf ve Rf'den oluşan gruptan seçilen bir IV. Grup elementi.

- 5 Mevcut buluş sahipleri, yukarıda tarif edildiği şekilde bir servikal kanser için olan geleneksel aşılardan problemlerinin üstesinden gelebilen yeni bir aşı geliştirmek üzere yoğun çalışmalar yapmışlardır. Sonuç olarak, yağ asidinin bir kısmının lipid A'dan ayrıldığı toksik olmayan bir LOS'un (lipooligosakkarid), tip 16 veya 18 HPV'nin L1 VLP'si kullanılarak immünizasyonunda bir immüno-adjuvan olarak kullanılabildiğini
- 10 keşfetmişlerdir; bu şekilde HPV immün yanıtları, geleneksel VLP bazlı aşılardan elde edilenden çok daha dikkate değer bir şekilde tetiklenmektedir; bu da, bir insan servikal kanserini önlemek üzere üstün bir aşı olarak işlev görmesini sağlamaktadır.

- Mevcut buluşun farmasötik bileşiminde kullanılan VLP, tip 16 ya da 18 HPV'nin L1
- 15 VLP'sinden türetilmiştir. Tip 16 ya da 18 HPV'nin, yüksek riskli HPV tipleri olduğu bilinmektedir, ve bunlar bir servikal kanseri tetikleyen temsili HPV'lerdir.

- Burada kullanılan "HPV L1 proteini" terimi, HPV'nin bir L1 geninden ekspres edilen, HPC kapsidi içindeki bir majör proteine karşılık gelir. L1 proteini kendi içinde ya da
- 20 HPV kapsidini teşkil eden başka bir minör protein olan L2 proteini ile, uygun koşullar altında kendiliğinden oluşabilir.

- Mevcut buluşta kullanılan VLP, tip 16 veya 18 HPV'nin doğal olarak meydana gelen L1 proteinini, ve onun fonksiyonel bir L1 proteini türevini kodlayan toplam dizilimleri
- 25 içerir. Burada kullanıldığı haliyle, "fonksiyonel HPV L1 türevi" terimi, VLP oluşturma kabiliyetine sahip olan ve, her ne kadar dizilimi doğal olarak meydana gelen bir HPV L1 proteinini kodlayan toplam dizilimlere eşdeğer değilse de immün yanıtlar ortaya çıkan doğal olarak meydana gelen bir HPV L1 proteini anlamına gelmektedir. Örneğin fonksiyonel HPV L1 türevi, içinden bir nükleer lokalizasyon sinyalinin
- 30 uzaklaştırıldığı kesilmiş bir L1 proteindir. Mevcut buluşta kullanılabilmek kabiliyetine sahip olan başka bir HPV L1 Proteini örneği, C terminalinin 34 amino asidinin uzaklaştırıldığı bir tip 16 HPV L1 proteinini, ya da C terminalinin 35 amino asidinin bertaraf edildiği bir tip 18 HPV L1 proteinini kapsar. Tip 16 ya da 18 HPV'nin L1

VLP'sini kodlayan amino asit diziliminin açıklayıcı örneği, sırasıyla SEQ ID NO:2 ve SEQ ID NO:4'te tarif edilmektedir.

5 Bu buluşun farmasötik bileşiminde immün yanıtı tetikleyen bir antijen olarak, HPV16 L1 VLP ya da HPV18 L1 VLP, tercihen her ikisi de kullanılmaktadır.

Alternatif olarak HPV16 L1 VLP ya da HPV18 L1 VLP'ye ek olarak, bir antijen olarak L1 VLP ayrıca, tip 31 HPV, tip 45 HPV, tip 6a HPV, tip 6b HPV, tip 11 HPV, tip 33 HPV, tip 35 HPV, tip 39 HPV, tip 51 HPV, tip 52 HPV, tip 56 HPV, tip 58 HPV ve tip 10 68 HPV'nin L1 VLP'lerinden oluşan gruptan seçilen en az bir tane L1 VLP içerebilir.

Alternatif olarak, mevcut buluşta kullanılan L1 VLP başka bir protein ile, örneğin L2 proteini ile kaynaştırılabilir.

15 Bir immüno-adjuvan olarak deasillenmiş toksik olmayan bir LOS (lipooligosakkarid) kullanmak mevcut farmasötik bileşimin en önemli özelliğidir. İlk olarak burada uyarlanmış olan "LOS (lipooligosakkarid)" terimi, doğal olarak meydana gelen LPS'den daha kısa gliko zincirleri olan, düşük moleküler ağırlıklı bir LPS (lipooligosakkarid) modifiye ediciye karşılık gelir. LOS, deasillenmeden önce, 5000- 20 10000 Da aralığında bir moleküler ağırlığa sahiptir. Burada kullanılan "deasillenmiş LOS" terimi, lipid A'nin glikozaminine $-C(O)O-$ bağı ile bağlı olan bir yağ asidinin LOS'tan uzaklaştırılmış olduğu – ki bu LOS'a kıyasla sitotoksisitede ciddi bir azalmaya yol açar- bir LOS formu anlamına gelir. Yağ asidi, Lipid A'nin glikozaminine $-C(O)O-$ bağı ve $-C(O)NH-$ bağı ile bağlıdır. Mevcut buluşun 25 deasillenmiş LOS'u, $-C(O)O-$ bağı ile bağlı olan yağ asidinin, lipid A'nin deasillenmesi ile uzaklaştırıldığı bir LOS'tur.

Mevcut buluşun deasillenmiş toksik olmayan LOS'u, örneğin mevcut buluş sahiplerinin, Kore Patenti 0456681 ; WO 2004/039413 ; Kore Patenti 0740237 ; ve 30 WO 2006/121232 de dahil olmak üzere önceki patentlerinde açıklanmış olan yöntemlere göre olduğu gibi, çeşitli yöntemlere göre hazırlanabilir. Örneğin LOS'taki yağ asidinin bir kısmı uzaklaştırılır ve kuvvetli baz (örn. 2N NaOH) muamelesi ile deasilasyon yoluyla lipid A'dan LPS'ye (lipopolisakkarid) detoksifiye edilir.

Tercih edilen bir düzenlemeye göre, mevcut buluşta bir immünoadjuvan olarak kullanılan deasillenmiş toksik olmayan LOS, LPS'ye (lipopolisakkarid) doğru alkali işlem yoluyla, lipid A'nın deasillenmesi ile detoksifiye edilir. Tercih edilen alkali işlem örnekleri şunları kapsar: NaOH, KOH, Ba(OH)₂, CsOH, Sr(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH, RbOH ve Mg(OH)₂, daha tercihen NaOH, KOH, Ba(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH ve Mg(OH)₂, çok daha tercihen NaOH, KOH ve Mg(OH)₂, ve en çok tercih edildiği haliyle de NaOH.

LPS'nin detoksifiye edilme derecesi, teknik alanda sıradan uzmanlığa sahip kişilerce bilinen çeşitli yöntemlere göre analiz edilebilir. Örneğin detoksifiye etme, LPS ile işlem görmüş olan THP-1'de (akut monositik lösemi) salgılanan TNF- α (tümör nekroz faktörü- α) miktarı ölçülerek belirlenebilir. Mevcut buluş konusu deasillenmiş toksik olmayan LOS, geleneksel LPS'ler ile kıyaslandığı nispeten düşük miktarda TNF- α salgısını tetikler.

Mevcut buluş konusu deasillenmiş toksik olmayan LOS'un, genelde kullanılan geleneksel LPS'den daha düşük bir moleküler ağırlığa sahip olması da başka bir özelliktir. Tercihen, mevcut buluşta kullanılan deasillenmiş toksik olmayan LOS 1,500-10,000 Da aralığında, daha tercihen 2,000-5,000 Da aralığında, daha tercihen 2,000-4,000 Da aralığında, çok daha tercihen 3,000-4,000 Da aralığında, ve en çok tercih edildiği haliyle de 3,200-3,700 Da aralığında bir moleküler ağırlığa sahiptir. Moleküler ağırlığın ölçülmesi, geleneksel bir yöntem, örneğin MALDI-MASS kullanılarak yürütülebilir.

Tercih edilen bir düzenlemeye göre, bu buluşun deasillenmiş toksik olmayan LOS'u, Escherichia coli'den (E. coli), ve en çok tercih edildiği haliyle de mevcut buluş sahipleri tarafından izole edilmiş olan E. coliEG0021'den (KCCM 10374) türetilir.

Mevcut buluşta kullanılan deasillenmiş toksik olmayan LOS, geleneksel immüno-adjuvanlarla kıyaslandığında çok daha üstün immüno-uyarıcı etkisinden ve ciddi derecede düşük sito-toksisitesinden dolayı bu buluşun aşı bileşimi için oldukça uygundur. Aşağıda Örnekler kısmında gösterilmiş olduğu üzere, bu buluşun deasillenmiş toksik olmayan LOS'u, LPS sito-toksisitesini azaltmak üzere LPS'nin bir

polisakkarid zincirinin uzaklaştırılmış olduğu lipid A fosforilasyonu ile elde edilen monofosforil lipid A'dan (MPL) çok daha düşük sito-toksositeye sahiptir.

Aşağıda Örnekler kısmında gösterildiği gibi (Bkz. Şekiller 23 ve 24), HPV L1 VLP ile beraber mevcut buluş konusu deasillenmiş toksik olmayan LOS'un verilmesi de yine Th2-türü immün yanıt (hümmoral bağışıklık) ile ilgili olan IgG1 seviyesini ve aynı zamanda Th1-türü immün yanıt (hüccresel bağışıklık) ile ilgili olan IgG2a seviyesini de tetikler; bu da, mevcut buluş konusu deasillenmiş toksik olmayan LOS'un, immün yanıtları HPV L1 VLP ile beraber sinerjik olarak tetikleyebildiğini göstermektedir.

10

Mevcut buluş konusu aşı bileşimi, HPV 16 L1 VLP, HPV 18 L1 VLP ya da bunların bir kombinasyonunu, ve deasillenmiş toksik olmayan LOS içeren yalnızca temel bir bileşim ile, bir servikal kanser üzerinde önleyici bir etkilige katkıda bulunabilir. Alternatif olarak mevcut buluş konusu aşı bileşimi ayrıca, örneğin, Mg, Ca, Sr, Ba ve Ra'dan oluşan gruptan seçilen bir II. Grup elementi; Ti, Zr, Hf ve Rf'den oluşan bir IV. Grup elementi; ya da bir alüminyum tuzu ya da onun bir hidratı da dahil olmak üzere, başka immüno-adjuvan barındırabilir. Tercihen tuz, oksit, peroksit, hidroksit, karbonat, fosfat, piropofat, hidrojen fosfat, dihidrojen fosfat, sülfat ya da silikat ile oluşturulur. Örneğin mevcut buluş konusu aşı bileşiminde ek olarak kullanılabilen immüno-adjuvan magnezyum hidroksit, magnezyum karbonat hidroksit, pentahidroksit, titanyum dioksit, kalsiyum karbonat, baryum oksit, baryum hidroksit, baryum peroksit, baryum sülfat, kalsiyum sülfat, kalsiyum pirofosfat, magnezyum karbonat, magnezyum oksit, alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat ve hidratlanmış alüminyum potasyum sülfatı (Alum) kapsar. En çok tercih edildiği haliyle, mevcut buluş konusu aşı bileşiminde ek olarak kullanılabilen immüno-adjuvan alüminyum hidroksittir.

15

20

25

Tercih edilen bir düzenlemeye göre, tip 16 veya 18 HPV'nin L1 VLP'si, aşağıdaki aşamaları içeren bir saflaştırma prosedürü ile elde edilir: (i) tip 16 veya 18 HPV'nin bir HPV L1'ini kodlayan bir nükleotid dizilimini barındıran mayaların kültürlenmesi; (ii) kültürlenmiş mayanın lizlenmesi; (iii) safsızlıkların bertaraf edilmesi için maya lizatının amonyum sülfat ile çöktürülmesi; ve (iv) saflıkların uzaklaştırılmış olduğu maya lizatında bir heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisi gerçekleştirilmesi.

30

Safılaştırma prosedürünün detaylı açıklaması aşıağıda tarif edilmektedir.

5 Bu buluşun farmasötik aşı bileşimlerinde, farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı, formülasyon için geleneksel olan bir tane olabilir; bunlara laktoz, dekstroz, sükroz, sorbitol, mannitol, nişasta, işlenebilir kauçuk, potasyum fosfat, arginat, jelatin, potasyum silikat, mikrokristalli selüloz, polivinilpirolidon, selüloz, su, şuruplar, metil selüloz, metilhidroksi benzoat, propilhidroksi benzoat, talk, magnezyum sterat, ve mineral yağlar dahildir; ancak bunlarla kısıtlı değildir. Mevcut buluşa göre olan 10 farmasötik bileşim ayrıca bir kayganlaştırıcı, bir nem tutucu, bir tatlandırıcı, bir aroma verici ajan, bir emülgatör, bir süspansiyon haline getirici ajan, ve bir koruyucu içerebilir. Uygun farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcıların detayları, buraya referans olarak dahil edilmiş olan Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington'un Farmasötik Bilimleri) (19. Basım, 1995), içinde bulunabilir.

15

Mevcut buluşa göre olan farmasötik bileşim oral veya parenteral olarak verilebilir. Mevcut buluş konusu farmasötik bileşim parenteral olarak verildiği zaman, intravenöz, sübkutan, intramüsküler, abdominal ve transdermal veriliş ile yapılabilir.

20

Mevcut buluşun farmasötik bileşiminin uygun bir dozu, farmasötik formülasyon yöntemleri, veriliş yöntemleri, hastanın yaşı, vücut ağırlığı, cinsiyeti, hastalıkların şiddeti, diyet, veriliş zamanı, veriliş yolu, atılım hızı, ve kullanılan farmasötik bileşime yönelik hassasiyete bağılı olarak değişebilir. Tercihen, mevcut buluş konusu farmasötik bileşim günlük 0.0001-1,000 mg/kg (vücut ağırlığı) dozu ile verilir.

25

Teknik alanda uzman kişilerce bilinen geleneksel tekniklere göre, farmasötik bileşim yukarıda tarif edildiği gibi; nihayetinde bir birim doz formu ya da bir çoklu doz formu da dahil olmak üzere çeşitli formlar ortaya çıkararak, bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ve/veya araç ile formüle edilebilir. Formülasyon yağ ya da sulu bir 30 ortam, resüspansiyon veya emülsiyon, ekstrakt, toz, granül, tablet ve kapsül olabilir ve ayrıca dağıtıcı (dispersan) veya stabilizatör olabilir.

Mevcut buluş konusu farmasötik aşı bileşimi HPV'ye karşı, Cervrix™ ve Gardasil™ de dahil olmak üzere, geleneksel aşılardan daha kuvvetli immün yanıtları

tetiklemekte, ve bu nedenle de bir servikal kanseri önlemede üstün potans sergilemektedir. Buna ek olarak, mevcut buluş konusu farmasötik bileşim üstün stabiliteye sahiptir çünkü mevcut buluşta bir immüno-adjuvan olarak kullanılan deasillenmiş toksik olmayan LOS neredeyse hiç sitotoksiteye sahip değildir.

5

Aşağıdaki Örneklerde gösterildiği üzere, yalnızca Th1-türü immün yanıt (hücrel bağışıklık) ile ilişkili interferon- γ , IgG2a ve IgG2b seviyesi değil, aynı zamanda Th2-türü immün yanıt (hümmoral yanıt) ile ilişkili IgG1 seviyesi de, Cervrix™ ve Gardasil™ verilisinde olduğuna kıyasla, mevcut buluş konusu farmasötik aşı bileşiminin verilisinde çarpıcı şekilde gelişmiştir. Başka bir deyişle, mevcut buluş konusu farmasötik aşı bileşimi, HPV karşısında, Cervrix™ ve Gardasil™'e göre daha üstün, Th1-türü immün yanıt (hücrel bağışıklık) ve Th2-türü immün yanıt (hümmoral bağışıklık) tetikleyebilmektedir.

10

15 Bu buluşun yine başka bir yönünde, bir insan papillomavirüsü (HPV) L1 virüs benzeri parçacık (VLP) hazırlamak üzere, aşağıdaki aşamaları içeren bir yöntem sağlanmaktadır:

- (i) bir HPV L1 kodlayan nükleotid dizilimi barındıran mayaların kültürlenmesi;
- (ii) kültürlenmiş mayanın lizlenmesi;

20

- (iii) safsızlıkların bertaraf edilmesi için maya lizatının amonyum sülfat ile çöktürülmesi; ve
- (iv) saflıkların uzaklaştırılmış olduğu maya lizatında bir heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisi gerçekleştirilmesi.

25

Mevcut buluş sahipleri, HPV VLPlerin üretilmesine yönelik bir prosedürün basitleştirilmiş olduğu bir HPV'ye karşı bir aşı hazırlamak üzere HPV VLPlerin kazanç oranının, HPV VLPlerin maya ekspresyonu sisteminde geliştirilmiş olduğu bir saflaştırma yöntemi geliştirmek üzere yoğun çalışmalar yapmışlardır. Sonuç olarak, bir maya lizatının amonyum sülfat ile çöktürüldüğü ve ardından bir heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisinin yürütüldüğü üstün bir saflaştırma etkililiğinin (kazanç oranı ve saflık) elde edilebileceğini keşfetmişlerdir.

30

Aşağıda, bu buluş şu aşamaya göre detaylı olarak tarif edilmiştir:

(i) bir HPV L1 proteini ekspres eden dönüştürülmüş mayanın kültürlenmesi

Mevcut buluşun yöntemine göre, L1 proteini kaynaklı HPV türü özel olarak sınırlandırılmamaktadır; ve sayılanlarla sınırlı olmamak üzere şunları kapsar: tip 6a HPV, tip 6b HPV, tip 11 HPV, tip 16 HPV, tip 18 HPV, tip 31 HPV, tip 33 HPV, tip 35 HPV, tip 39 HPV, tip 45 HPV, tip 51 HPV, tip 52 HPV, tip 56 HPV, tip 58 HPV ve tip 68 HPV. Tercihen mevcut buluş konusu L1 proteini, tip 6a HPV, tip 6b HPV, tip 11 HPV, tip 16 HPV, tip 18 HPV, tip 31 HPV, tip 33 HPV, ve tip 45 HPV'den oluşan gruptan, ve daha tercihen, tip 16 HPV ve tip 18 HPV'den seçilir.

10

Mevcut buluşta bir konak hücre olarak kullanılan hücreler, örneğin, ekmek mayası, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces pombe*, ve benzerleri de dahil olmak ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, mayadır. En çok tercih edildiği haliyle, bu buluş konusu konak maya *Saccharomyces cerevisiae*'dir.

15

HPV L1 proteini ekspres eden dönüştürülmüş maya, bir HPV L1 proteinini başarılı biçimde ekspres eden bir ekspresyon vektörü ile dönüştürülmüş bir maya hücresine karşılık gelir. Teknik alanda uzman kişilerce çeşitli başlatıcılar (promötör) bilinmektedir; bunlara şunlar dahildir: GAL1 başlatıcı, GAL10 başlatıcı (Johnson, M., and Davies, R. W., Mol. and Cell. Biol., 4: 1440-1448 (1984)), ADH2 başlatıcı (Russell, D., et al., J. Biol. Chem., 258: 2674-2682, (1983)), PH05 başlatıcı (EMBO J. 6: 675-680, (1982)) veya MFal başlatıcı, ekspresyon vektörün ekspres edilecek olan HPV L1 geninin öncesinde bağlı olabilir, ve ADHI, MFal veya TPI-kökenli poli A dizilimi (Alber, T. and Kawasaki, G., J. Mol. & Appl. Genet. 1: 419-434 (1982)) ekspresyon vektöründe yer alabilir. Bir maya ekspresyon vektörü YEp6, YEp13, YEp4 ve YEGa (S.N. Kim, et al., J. Virol. Methods 139 (2007) 24-30 ; R. Kirnbauer, et al., J Virol 67 (1993) 6929-6936) teknik alanda iyi bilinmektedir. HPV L1 proteini ekspres edecek olan dönüştürülmüş maya, teknik alanda uzman kişilerce bilinen çeşitli yöntemlere göre hazırlanabilir; bunlara örn. US 7250170 , US 6613557 , US 5888516 , US 5871998 , US 5618536 ve US 5437951 patenti de dahil olup; bunlar buraya referans olarak dahil edilmiştir.

20

25

30

Tercih edilen bir düzenlemeye göre, dönüştürülmüş maya bir ya da daha fazla glikoz ve galaktoz karbon kaynağı ile takviye edilmiş bir ortamda kültürlenir. Tercih edilen başka bir düzenlemeye göre, glikoz ve galaktoz oranı, glikoz: galaktoz = 0-1:3-4'lük bir ağırlık oranı, daha tercihen glikoz: galaktoz = 0.5-1:3.5-4'lük, ve en çok tercih edildiği haliyle de glikoz: galaktoz = 1:3'lük bir ağırlık oranıdır. HPV L1 proteinin ekspresyonu, mevcut buluşun ortamı içinde kullanılan glikoz ve galaktozun ağırlık oranının, yukarıda tarif edilen aralıkta olduğu yerde maksimize edilebilir.

Dönüştürülmüş maya kültürü içinde kullanılan örneklendirilmiş ortam, maya ekstraktı, pepton, glikoz ve galaktoz da dahil olmak üzere bir YPDG ortamıdır.

(ii) Kültürlenmiş mayanın lizlenmesi

Mevcut buluştaki kültürlenmiş mayanın liz yöntemi, belirli bir yöntem ile sınırlı olmayıp, tercihen maya hücrelerinin tüm lizatını elde etmeye yönelik bir liz yöntemidir. Örneğin, mevcut buluşta kullanılabilen liz yöntemi, cam boncuklar kullanılarak bir homojenizasyonu ya da selenlemeyi kapsar ancak bununla sınırlı değildir.

(iii) Maya lizatının safsızlıklarını bertaraf etmek üzere amonyum sülfat çöktürmesi

Ekspres edilmiş proteinler çöktürülmüş ve safsızlıklar, maya lizatına amonyum sülfat eklenerek uzaklaştırılmıştır.

Tercih edilen düzenlemeye göre, eklenecek olan amonyum sülfatın konsantrasyonu ağırlık %20-60, daha tercihen ağırlık %40-50, ve en çok tercih edildiği haliyle de ağırlık %42-48 aralığındadır. Amonyum sülfat konsantrasyonunun ağırlık %40'tan yüksek olmayan bir aralıkta olduğu yerlerde bu buluştaki HPV L1 proteinin çöktürme etkililiği düşmüştür. Bu buluşta ekspres edilen HPV L1 proteinin çökme etkililiği, amonyum sülfat konsantrasyonunun ağırlık %5'ten daha az olmadığı bir aralıkta, amonyum sülfat artışına bağlı olarak gelişmiştir.

Alternatif olarak, amonyum sülfat ile elde edilen protein peleti lizlenir, ve 0.5 M'den daha az olmayan NaCl ile karıştırılır, bunu 4°C'de en az 12 saatlik inkübasyon izler.

(iii-2) Düşük konsantrasyonlu tuzdaki safsızlıkların bertaraf edilmesi (örn. NaCl)

- 5 (iii) aşamasından elde edilen çözelti, düşük konsantrasyonlu tuz (örn. NaCl) barındıran bir tampon içinde diyaliz edilir, ve ardından safsızlıkların çözünmez bir halde uzaklaştırılması için oda sıcaklığında inkübe edilir.

10 Mevcut buluşun pratik bir örneğine göre, düşük konsantrasyonu tuzun konsantrasyonu 0.001-0.3 M aralığında, daha tercihen 0.01-0.2 M aralığında, ve en çok tercih edildiği haliyle de 0.1-0.8 M aralığında kullanılır, ve kullanılacak olan tuz NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, Na₂SO₄ ve (NH₄)₂SO₄'ten oluşan gruptan, en en çok tercihen de NaCl'den seçilir.

15 Tercih edilen bir düzenlemeye göre, düşük konsantrasyonu tuzu işlemeye yönelik proses, non-iyonik bir yüzey aktif madde varlığında yürütülür. Örneğin, non-iyonik yüzey aktif madde şunları kapsar: polioksialkilen sorbitan yağ asidi esteri, sorbitan yağ asidi esteri, alkilen glikol yağ asidi esteri, polialkilen yağ asidi esteri, yağ asidi esteri, polioksialkilen yağ asidi eteri, C₁₆₋₂₄ yağ asidi, yağ asidi mono-, di- veya poli-gliserit, polioksialkilen alkil fenol, alkil fenil eter, polioksietilen-polioksipropilen blok
20 kopolimeri, yağ asidi amin oksit, yağ asidi alkanolamid, alkil selüloz, karboksialkil selüloz ya da polioksialkilen kastor yağı türevleri, ve tercihen, polioksietilen sorbitan mono- ya da tri-loril, palmitil, steril, veya oleil ester; örn. polioksietilen (20 sorbitan monolorat (Tween-20), polioksietilen (4) sorbitan monolorat (Tween-21), polioksietilen (20) sorbitan monopalmitat (Tween-40), polioksietilen (20) sorbitan
25 monosterat (Tween-60), polioksietilen (20) sorbitan tristerat (Tween-65), veya polioksietilen (20) sorbitan monooleat (Tween-85) gibi. Buna ek olarak, bir non-iyonik yüzey aktif maddeyi, %0.001-0.01'lik bir konsantrasyonla işleme tabi tutmak tercih edilir.

30 Yukarıda tarif edildiği gibi düşük konsantrasyonlu NaCl'yi işleme aşaması, safsızlıkları bertaraf etmek üzere oldukça etkilidir, ve prosedürün kısaltılmasına ve mevcut buluş konusu yöntemin saflaştırma etkililiğinin geliştirilmesine ciddi derecede katkıda bulunur.

Bu aşamada üretilen çözünmez proteinler santrifüj ile uzaklaştırılır; bu da, bir heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisi ile yıkanacak olan VLP'nin saflığını dikkate değer derecede artırır. Dolayısıyla bu aşamanın, safsızlıkların basit bir şekilde uzaklaştırılmasıyla, saflaştırmanın geliştirilmesinde üstün bir rol oynadığı gösterilmiştir.

(iv) Heparin kromatografisi ve katyon değişimi kromatografisi

Heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisi, safsızlıkların uzaklaştırıldığı çözeltide yürütülür.

Safsızlıkların, yukarıda tarif edilen şekilde bir heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisi kullanılarak uzaklaştırıldığı çözeltinin saflaştırılmasında, safsızlıklar oldukça etkili bir biçimde bertaraf edilebilir.

Bir heparin kromatografisi yürütme aşamasında (iii). Veya (iii-2). aşama çözeltisi, heparin reçinesi için uygun olan bir bağlayıcı tampon ile, bir heparin reçine kolonuna yüklenmeden önce dengelenir. Tercihen bağlayıcı tampon NaCl ve non-iyonik yüzey aktif maddeyi (örn. Tween-80) kapsar ve NaCl, düşük konsantrasyonda kullanılır (0.1-0.2 M). Bundan sonra numune bir heparin kromatografisine uygulanır, ve ardından proteinler reçineden yıkanarak ayrıştırılır. Ayrıştırma yönteminde lineer NaCl gradyanı kullanılması tercih edilir. Daha tercihen safsızlıklar lineer bir NaCl gradyanı içinde ayrıştırılır (0.33-0.66 M), ve ardından arzu edilen L1 proteini, lineer bir NaCl gradyanı (0.66-2 M) içinde ayrıştırılır.

Katyon değişimi kromatografisi çeşitli reçineler, tercihen sülfö, sülföalkil (örn. sülfometil, sülföetil ve sülföpropil), fosfat veya fosfat alkil fonksiyonel grubu, ve en çok tercih edildiği haliyle de fosfat fonksiyonel grubu ile bağlı bir katyon değiştirici kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bir katyon değişimi kromatografisi yürütme aşamasında (iii). Veya (iii-2). aşama çözeltisi, heparin reçinesi için uygun olan bir bağlayıcı tampon ile, bir heparin reçine kolonuna yüklenmeden önce dengelenir. Tercihen bağlayıcı tampon NaCl ve non-iyonik yüzey aktif maddeyi (örn. Tween-80) kapsar ve NaCl, düşük konsantrasyonda kullanılır (0,3-0,4 M). Sonrasında numune bir katyon değişimi kromatografisine uygulanır, ve ardından proteinler reçineden

yıkanarak ayrıştırılır. Ayrıştırma yönteminde NaCl gradyanı aşaması kullanılması tercih edilir. Daha tercihen, arzu edilen L1 proteini, 0.6 M, 0.7 M, 0.8 M ve 1 M'lik NaCl içeren bir ayrıştırma tamponu kullanılarak ayrıştırılır.

5 (v) Konsantrasyon

Tercih edilen bir düzenlemeye göre, yukarıda tarif edildiği gibi kromatografi ile elde edilen L1 protein fraksiyonu, bir membran filtre ile konsantre edilir. Tercihen kromatografi fraksiyonu, 50100 kDa'lık moleküler ağırlıktaki proteinleri kesip ayırma işlevine sahip olan bir membrandan geçirilerek konsantre edilir. Yaklaşık 50 nm'lik bir ortalama boyuta sahip olan VLP, diğer proteinler ile kıyaslandığında büyük bir protein olduğundan, membrandan geçirmeden konsantre edilirken, kalan safsızlıkların çoğu membrandan geçirilerek uzaklaştırılır. Dolayısıyla bu aşama yalnızca HPV 16 L1 proteininin saflığını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda HPV 16 L1 proteininin konsantrasyonunu da geliştirir.

Mevcut buluşun hazırlama yöntemi, safsızlıkları, bu buluştaki kromatografi aşamasını gerçekleştirmeden önce belirli koşullar altında bir hücre homojenatını işleme tabi tutarak uzaklaştıran bir yöntemi kullanmıştır ki bu da L1 proteininin saflaştırılma etkililiğini maksimize etmeye yol açmıştır. Hücre homojenatı, birincil olarak safsızlıkları bertaraf etmek üzere amonyum sülfat ile çöktürülür, ve ardından safsızlıkları ikincil olarak uzaklaştırmak üzere düşük konsantrasyonlu tuz koşullarında inkübe edilir. Yukarıda tarif edilen yöntem, safsızlıkların yaklaşık %80'ini uzaklaştırmaya ve L1 proteinini %80'den az olmamak üzere kurtarmaya olanak verebilir; bu da saflığın basit bir şekilde iyileştirilmesine katkıda bulunur. Dolayısıyla mevcut buluş konusu yöntem, şunlar gibi çeşitli avantajlara sahiptir:

(a) L1 proteininin çeşitli kromatografi aşamaları kullanılmaksızın yüksek saflıkta saflaştırılması; (b) bu yöntemin pilot ve endüstriyel ölçekte üretime ve saflaştırmaya uygulandığı yerlerde protein üretimi için gerekli olan süre, maliyet ve iş gücünden ciddi derecede tasarruf edilmesi.

Bu buluşun başka bir yönünde, SEQ ID NO:1'e ait bir nükleotid dizilimi içeren bir tip 16 insan papillomavirüsünün (HPV) bir L1 virüsü benzeri parçacığını (VLP) kodlayan bir nükleik asit dizilimi sağlanmaktadır. Buna ek olarak bu buluş, SEQ ID NO:3'e ait

bir nükleotid dizilimi içeren bir tip 18 insan papillomavirüsünün (HPV) bir L1 virüsü benzeri parçacığını (VLP) kodlayan bir nükleik asit dizilimi sağlanmaktadır.

5 Bu buluşun yine başka bir yönünde, yukarıda tarif edildiği gibi, tip 16 insan papillomavirüsünün (HPV) L1 virüsü benzeri bir parçacığını (VLP) kodlayan nükleik asit dizilimi ile dönüştürülmüş olan bir *Saccharomyces cerevisiae* (kayıt no: KCCM11036P) sağlanmaktadır. Buna ek olarak bu buluş ile, yukarıda tarif edildiği gibi, tip 18 insan papillomavirüsünün (HPV) L1 virüsü benzeri bir parçacığını (VLP) kodlayan nükleik asit dizilimi ile dönüştürülmüş olan bir *Saccharomyces cerevisiae* 10 (kayıt no: KCCM11037P) sağlanmaktadır.

SEQ ID NO:1 ve SEQ ID NO:3'ün nükleotid dizilimi, HPV L1 proteinini oldukça yüksek verimlilikle kodlayan bir nükleotid dizilimini ekspres etmek üzere optimize edilir.

15

Mevcut buluşun özellikleri ve avantajları şu şekilde özetlenecektir:

(a) Bir insan servikal kanseri için olan farmasötik aşı bileşimi bir antijen olarak HPV 16 L1 VLP, HPV 18 L1 VLP, ya da HPV 16 L1 VLP ve HPV 18 L1 VLP, ve bir 20 immüno-adjüvan olarak deasillenmiş bir toksik olmayan LOS kullanır.

(b) Deasillenmiş toksik olmayan LOS, HPV'ye karşı immün yanıtta üstün bir immüno-uyarıcı etkiye, ve neredeyse hiç sitotoksosite göstermemesine bağlı olarak daha yüksek bir stabiliteye sahiptir.

(c) Buna ek olarak, deasillenmiş toksik olmayan LOS, hem Th1-türü immün yanıtı 25 (hücrel bağışıklık) hem de Th2-türü immün yanıtı (hümmoral bağışıklık) geliştirerek, HPV'ye karşı immün yanıtı sinerjik olarak tetikler.

(d) Mevcut buluş konusu farmasötik aşı bileşimi, HPV karşısında, hem Th1-türü immün yanıtta (hücrel bağışıklık) hem de Th2-türü immün yanıtta (hümmoral bağışıklık) Cervrix™ ve Gardasil™'e göre daha üstün olup; bir insan servikal kanseri 30 için bir aşı olarak üstün bir etkililik sergilemektedir.

(e) Mevcut buluşun HPV L1 VLP'sini hazırlama yöntemi L1 proteinini bir kromatografi aşaması ile yüksek saflıkta saflaştırmaya olanak verir, ve bu yöntemin pilot ve endüstriyel ölçekte üretime ve saflaştırmaya uygulandığı yerlerde protein üretimi için

gerekli olan süre, maliyet ve iş gücünden tasarruf sağlamada kayda değer etkisi vardır.

ÇİZİMLERİN KISA AÇIKLAMASI

5

Şekil 1 ve 2, tip 16 HPV ve tip 18 L1 VLP proteinini ekspres eden YEP'in (maya ekspresyon vektörü) DNA haritalarıdır. AmpR ampisiline dirençli gen, Ura3 orotidin 5-fosfat dekarboksilaz sentezlemeye yönelik bir gen, 2-mikron replikasyon orijini ve gösterilen diğerleri restriksiyon enzim yerleridir.

10

Şekil 3, HPV 16 L1 ve HPV 18 L1'i saflaştırmak üzere kullanılan deneysel prosedürleri gösteren bir iş akışı çizgesidir.

Numuneler amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve iki saflaştırma yöntemi ile izole edilmeden önce çözünmeyen kontaminantların uzaklaştırılması için düşük konsantrasyonlu NaCl ile inkübe edilmiştir. 1. yöntem bir heparin kromatografisi ve 2. yöntem bir katyon değişimi kromatografisi yöntemidir.

15

Şekil 4-6, HPV 16 L1'in saflaştırılmasını gösteren elektroforetik diyagramlardır. Şekil 4, çözünmeyen kontaminantların uzaklaştırılması aşaması olmadan, heparin kromatografisi sonrasında elde edilmiş olan numunelerin SDS-PAGE sonucunu göstermektedir. Şekil 5, Şekil 3'teki 1. yöntemle göre olan heparin kromatografisinin SDS-PAGE sonucudur. Şekil 6, heparin kromatografisinden sonraki Western blot sonucudur. 1 ve 2. kulvarlar yükleme numuneleri ve serbest numunelerdir. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ve 16. kulvarların her biri, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 ve 48. numune fraksiyonlarını temsil etmektedir.

20

25

Ok, L1 proteininin moleküler ağırlığını göstermektedir.

Şekil 7 ve 8, HPV 16 L1'in saflaştırılmasını gösteren elektroforetik diyagramlardır. Şekil 7, Şekil 3'teki 2. yöntemle göre olan katyon değişimi kromatografisi ile elde edilen numunelerin SDS-PAGE sonucunu göstermektedir. Şekil 8, katyon değişimi kromatografisinden sonraki Western blot sonucudur. 1, 2, ve 3. kulvarlar sırasıyla yükleme numuneleri, serbest numuneler ve yıkama numuneleridir. 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. kulvarların her biri, 1, 2, 3, 4, 5, 6. numune fraksiyonunun temsil etmektedir. 1, 2, ve 3.

30

numune fraksiyonları, sırasıyla 0.6, 0.7 ve 0.8 M NaCl barındıran tampon ile ayrıştırılmıştır. 4, 5, ve 6. numune fraksiyonları, 1 M NaCl içeren tampon ile ayrıştırılmıştır. Ok, L1 proteininin moleküler ağırlığını göstermektedir.

- 5 Şekil 9, heparin kromatografisi ve katyon değişimi kromatografisinden gelen L1 fraksiyonlarının toplanmasından sonra, 50-100 kDa'lık kesip ayırma boyutu ile membran filtre ile konsantre edilmiş olan saflaştırılmış HPV 16 L1 numunelerini gösteren elektroforetik diyagramdır. Panel A, SDS-PAGE sonucu, ve Panel B, Western blot sonucudur. 1, 2, ve 3. kulvarlar sırasıyla, BSA, 1. yöntem ile saflaştırılmış HPV 16 L1 ve 2. yöntem ile saflaştırılmış HPV 16 L1'i temsil etmektedir. Numuneler, Bradfor tayini kullanılarak kantifiye edilmiş ve her kulvar 200 ng numune ile yüklenmiştir.

- 15 Şekil 10 ve 11, Şekil 3'teki 1. yöntem ve 2. yönteme göre saflaştırılmış olan HPV 16 L1 proteininin elektron mikroskobu görüntülerini temsil etmektedir. Saflaştırılmış HPV 16 L1 proteini, bir karbon kaplı ızgara üzerine uygulanmış ve fosfoungstik asit ile negatif olarak boyanmıştır. Foto-mikrografikler transmisyon elektron mikroskobu ile, 41,000 X'lik bir nihai büyütmede alınmıştır. Ölçek çubuğu 100 nm'dir.

Şekil 12-14, HPV 18 L1'in saflaştırılmasını gösteren elektroforetik diyagramlardır.

- 20 Şekil 12, çözünmeyen kontaminantların uzaklaştırılması aşaması olmadan, heparin kromatografisi sonrasında elde edilmiş olan numunelerin SDS-PAGE sonucunu göstermektedir. Şekil 13, Şekil 3'teki 1. yönteme göre olan heparin kromatografisinin SDS-PAGE sonucudur. Şekil 14, heparin kromatografisinden sonraki Western blot sonucudur. 1 ve 2. kulvarlar yükleme numuneleri ve serbest numunelerdir. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ve 16. kulvarların her biri, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 ve 48. numune fraksiyonlarını temsil etmektedir.

Ok, L1 proteininin moleküler ağırlığını göstermektedir.

- 30 Şekil 15 ve 16, HPV 18 L1'in saflaştırılmasını gösteren elektroforetik diyagramlardır. Şekil 15, Şekil 3'teki 2. yönteme göre olan katyon değişimi kromatografisi ile elde edilen numunelerin SDS-PAGE sonucunu göstermektedir. Şekil 16, katyon değişimi kromatografisinden sonraki Western blot sonucudur. 1, 2, ve 3. kulvarlar sırasıyla yükleme numuneleri, serbest numuneler ve yıkama numuneleridir. 4, 5, 6, 7, 8 ve 9.

kulvarların her biri, 1, 2, 3, 4, 5, 6. numune fraksiyonunun temsil etmektedir. 1, 2, ve 3. numune fraksiyonları, sırasıyla 0.6, 0.7 ve 0.8 M NaCl barındıran tampon ile ayrıştırılmıştır. 4, 5, ve 6. numune fraksiyonları, 1 M NaCl içeren tampon ile ayrıştırılmıştır. Ok, L1 proteininin moleküler ağırlığını göstermektedir.

5

Şekil 17, heparin kromatografisi ve katyon değişimi kromatografisinden gelen L1 fraksiyonlarının toplanmasından sonra, 50-100 kDa'lık kesip ayırma boyutu ile membran filtre ile konsantre edilmiş olan saflaştırılmış HPV 18 L1 numunelerini gösteren elektroforetik diyagramdır. Panel A, SDS-PAGE sonucu, ve Panel B, Western blot sonucudur. 1, 2, ve 3. kulvarlar sırasıyla, BSA, 1. yöntem ile saflaştırılmış HPV 18 L1 ve 2. yöntem ile saflaştırılmış HPV 18 L1'i temsil etmektedir. Numuneler, Bradford tayini kullanılarak kantifiye edilmiş ve her kulvar 200 ng numune ile yüklenmiştir.

10

Şekil 18 ve 19, Şekil 3'teki 1. yöntem ve 2. yöntemle göre saflaştırılmış olan HPV 18 L1 proteininin elektron mikroskobu görüntülerini temsil etmektedir. Saflaştırılmış HPV L1 proteini, bir karbon kaplı ızgara üzerine uygulanmış ve fosfotungstik asit ile negatif olarak boyanmıştır. Foto-mikrografikler transmisyon elektron mikroskobu ile, 41,000 X'lik bir nihai büyütmede alınmıştır. Ölçek çubuğu 100 nm'dir.

20

Şekil 20 ve 21, her biri heparin kromatografisi ve katyon değişimi kromatografisi ile saflaştırılmış olan saflaştırılmış HPV 16 ve 18 L1'in nötralizasyonunu gösteren grafiklerdir. Saflaştırılmış L1 proteini, 3 kez, 3 haftalık aralıklarla immünize edilmiştir. Serumdaki nötralizasyon antikoru, SEAP bazlı nötralizasyon tayini ile ölçülmüştür. X ekseninde kontrol, yalnızca adjuvan ile immünize edilmiş olan grup; heparin, heparin kromatografisi ile saflaştırılmış olan L1 proteini ile immünize edilmiş olan grup; ve katyon değişimi, katyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmış L1 proteini ile immünize edilmiş gruptur. Y eksen, serum seyreltme faktörleridir.

25

Şekil 22, yeni adjuvan CIA05'in MPL'den daha az toksisitesi olduğunu gösteren bir grafikdir.

30

Şekil 23 ve 24, kombinasyon karışımındaki değişen yeni CIA05, HPV 16 L1 VLP ve alüminyum peroksit (Alum) konsantrasyonlarına bağlı olarak, anti-HPV 16 L1 HPV

antikoru titresini (Şekil 23) ve onun kat artışını (Şekil 24) gösteren bir grafikdir. Açık çubuk toplam IgG, verev çizgili çubuk IgG1 ve kapalı çubuk ise IgG2a'dır.

- 5 Şekil 25, kombinasyon karışımındaki değişen yeni CIA05, HPV 16 L1 VLP ve alüminyum peroksit (Alum) konsantrasyonlarına bağlı olarak, dalak hücrelerinden gelen INF- γ salgılanma seviyesini gösteren bir grafikdir. Verev çizgili çubuk, 2 günlüğüne HPV 16 L1 VLP ile işlem görmüş olan numune; kapalı çubuk ise 3 günlüğüne HPV 16 L1 VLP ile işlem görmüş olan numunedir.
- 10 Şekil 26 ve 27, kombinasyon karışımındaki değişen yeni CIA05, HPV 16 L1 VLP ve alüminyum peroksit (Alum) konsantrasyonlarına bağlı olarak, toplam IgG titresinin analizini gösteren grafiklerdir. Şekil 26, HPV 16 L1 VLP için toplam IgG titre verileridir ve Şekil 27 HPV 18 L1 VLP için toplam IgG titre verileridir.
- 15 Şekil 28 ve 29, kombinasyon karışımındaki değişen yeni CIA05, HPV 16 L1 VLP ve alüminyum peroksit (Alum) konsantrasyonlarına bağlı olarak, anti-HPV 16 L1 HPV'ye karşı serumlardan gelen IgG1 titresinin (Şekil 28) ve IgG2a titresinin (Şekil 29) analizini gösteren grafiklerdir.
- 20 Şekil 30, kombinasyon karışımındaki değişen yeni CIA05, HPV 16/18 L1 VLP ve alüminyum peroksit (Alum) konsantrasyonlarına bağlı olarak, dalak hücrelerinden gelen INF- γ salgılanma seviyesini gösteren bir grafikdir.

- Mevcut buluş, şimdi örneklerle daha detaylı olarak açıklanacaktır. Bu örneklerin, 25 daha somut bir şekilde açıklayıcı olmaya yönelik olduğu ve mevcut buluşun ekli istemlerde ortaya koyulan kapsamının bu örnekler ile sınırlı olmadığı teknik alanda uzman kişilerce aşıkardır.

ÖRNEKLER

30

Örnek 1: Tip 16 ve 18 VLP L1 insan papillomavirüsünün protein ekspresyonu ve saflaştırılması

Tip 16 ve 18 HPV L1 proteini üreten rekombinant maya ekspresyon sisteminin yapılandırılması

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) optimal kodon/ekspresyonu kullanılarak, dizilim 1, tip 16 HPV L1 DNA için olan dizilim listesinden seçilmiş ve dizilim 3, tip 18 HPV L1 DNA için olan dizilim listesinden seçilmiştir. "Synthesis in BHB Standard Vectors" servisi (www.blueheronbio.com) kullanılarak DNA sentezlenmiştir (dizilim listesinden dizilim 1 ile dizilim 3'ü kıyaslayınız). HindIII (AAGCTT) ve ClaI (ATCGAT) restriksiyon yerleri, optimized DNA dizilimlerinin her iki ucuna bağlanmıştır.

Rekombinant HPV16L1 ve HPV18L1 proteinlerini ekspres etmek için olan maya ekspresyon vektörleri, YEG α -HPV16L1 ve YEG α -HPV 18L1, DNA klonlanması ile yapılandırılmıştır (Şekil 1a). Şunlar klonlama yöntemleridir: Tip 16 HPV L1 DNA'yı (dizilim 1, dizilim listesi) veya Tip 18 HPV L1 DNA'yı (dizilim 3, dizilim listesi) kodlayan pUCminusMCS vektörü (Invitrogen) ve YEG-MCS maya ekspresyon vektörü HindIII ve ClaI ile sindirilmiştir. Sindirilmiş DNA, elektroforezden sonra HiYieldTM Gel/PCR DNA Extraction Kit (ekstraksiyon kiti) (#YDF100, RBC) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Tip 16 HPV ya da tip 18 HPV ve YEG-MCS vektörü, ligaz (TAKARA, 2011a) kullanılarak bağlanmış ve dam(-) *E. coli* kompetan hücrelerine (TAKARA, 9129) dahil edilmiştir. Kolonileri oluşturan dönüştürülmüş hücreler toplanmış, inkübe edilmiş, ve boyutları, saflaştırılmış plazmidi enzimler ile sindirerek doğrulanmıştır. Boyutları doğrulanmış olan plazmid mayaya (*Saccharomyces cerevisiae*) dönüştürülmüş ve bir SD (-ura) plakası üzerine yayılmıştır. Koloniler büyümeye başladığı zaman 25 koloni toplanmış ve YPDG ortamında inoküle edilmiştir (250 rpm, 30°C, 2 gün karıştırılarak). Inkübasyondaki O.D.'sine, hücre lizinden sonraki toplam protein miktarına, saflaştırmadan sonraki ELISA ve Western Blot analizine bağlı olarak (yöntem aşağıda tarif edilmiştir) en iyi suş seçilmiştir.

Rekombinant HPV16L1 ve HPV18L1'i kodlayan YEG α -HPV16L1-ORS ve YEG α -HPV 18L1-YEG-ORS vektörleri ile dönüştürülmüş olan suşların her biri 8 Ekim 2009 tarihinde Kore Mikroorganizma Kültürü Merkezine (Korean Culture Center of Microorganisms) KCCM11036P ve KCCM11037P erişim numaraları ile kaydedilmiştir (KCCM11036P - *Saccharomyces cerevisiae* EF0216; KCCM11037P - *Saccharomyces cerevisiae* EG0218).

Hücre Kültürü

Dönüştürülmüş maya suşları inoküle edilmiş ve urasil içermeyen sentetik tam ortam içinde (SD-ura; Clontech), 30°C'de bir siperli şişe (flask) kullanılarak yetiştirilmiştir.

- 5 GAL10 başlatıcıdan HPV16 L1 ve HPV18 L1 proteinini ekspres etmek üzere YPDG ortamı kullanılmıştır. Tüm ortamlar %1 maya ekstraktı (DIFCO Laboratories, ABD), %2 pepton (DIFCO Laboratories, ABD), %1 glikoz ve %3 galaktoz içermiştir. Plazmid ile dönüştürülmüş olan maya suşu 3L YPDG ortamında inoküle edilmiş ve 48 saat 30°C'de inkübe edilmiştir.

10

Hücre lizatının hazırlanması

Kültürler santrifüj ile toplanmış ve peletler kullanılabilecek şekilde -70°C'de saklanmıştır. Şu deneylerin tümü 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Hücre peletleri, proteaz inhibitör kokteylinin (Roche, ABD) eklenmesinden önce 100 ml soğuk kırılma tamponu (20 mM sodium fosfat, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1.7 mM EDTA, %0.01 Tween 80) içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Hücreler, 5 dakika girdaplı karıştırılarak bir Bead-Beater (Biospec Products, ABD) içinde cam boncuklar ile (Sigma, ABD) ayrılmıştır.

- 20 Ardından bozulmamış hücreleri almak üzere ham ekstrakt 10 dakikalığına 4°C'de 10,000g santrifüjlenmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi

- 25 HPV L1 proteini, amonyum sülfat çöktürmesi ile temizlenmiş hücre lizatından elde edilmiştir. Protein peleti, %43 ya da %45 amonyum sülfat eklenmesi ile ve 4°C'de 30 dakika karıştırılarak, ardından 12,000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek elde edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesinden ortaya çıkan pelet, 0.5 veya daha yüksek bir nihai konsantrasyona kadar NaCl eklenmesinden önce PBS tamponu + %0.1 Tween-80 içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Çözelti 4°C'de en az 12 saat inkübe edilmiştir.
- 30

Düşük konsantrasyonda NaCl ile inkübe edilerek kontaminantların uzaklaştırılması

Yüksek konsantrasyonda NaCl ile inkübe edilmiş olan çözelti PBS tamponu + %0.01 Tween 80 ile diyaliz edilmiş ve 0.15 M NaCl ve %0.01 Tween 80 içeren sodyum fosfat tamponu (pH 7.2) ile seyreltilmiş; nihai protein konsantrasyonu 2-5 mg/ml olmuştur. Bu çözelti, çözünmeyen proteinin oluşması için, 2 saatten daha fazla süreliğine oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır. Çözünmeyen protein çökeltileri, 10 dakikalığına 10,000 g'da santrifüjden sonra ekarte edilmiştir.

10 Heparin kromatografisi

Düşük konsantrasyonlu NaCl ile inkübe edilmiş olan çözelti santrifüjlenmiş ve yüzen kısım bağlayıcı tampon (PBS tamponu + 0.2 M NaCl pH 7.0, %0.01 Tween 80) ile diyaliz edilmiştir. Heparin reçinesi (5 ml veya 20 ml) ile paketlenmiş kolon, 5 reçine hacminde bağlayıcı tampon ile dengelenmiştir. Diyaliz edilmiş numune çözeltisi, 5 reçine hacminde bağlayıcı tampon ile yıkanmadan önce bağlanmak üzere heparin kolonu üzerine yüklenmiştir. Kontaminantlar, 0.33 M'den başlayarak ve 35 dakika sonra 0.66 M'ye erişerek, lineer bir NaCl gradyanı ile ayrılmıştır. L1 proteini, 0.66 M ila 2 M konsantrasyon aralığında değişen bir lineer NaCl gradyanı ile ayrılmıştır.

20

Katyon değişimi kromatografisi

Düşük konsantrasyonlu NaCl ile inkübe edilmiş olan çözelti santrifüjlenmiş ve yüzen kısım bağlayıcı tampon (PBS tamponu + 0.2 M NaCl pH 7.0, %0.01 Tween 80) ile diyaliz edilmiştir. P-11 selüloz fosfat reçine (Whatman, UK) ile paketlenmiş olan 8 cm×4 cm Poly-Prep reçine kolonu, 5 reçine hacminde bağlayıcı tampon ile dengelenmiştir. Diyaliz edilmiş numune çözeltisi, 5 reçine hacminde bağlayıcı tampon ile yıkanmadan önce bağlanmak üzere P-11 kolonu üzerine yüklenmiştir. Bağlayıcı tampon ile yıkandıktan sonra L1 proteini, 0.6 M, 0.7 M, 0.8M ve 1M NaCl içeren bağlayıcı tampon olan akan 4-5 ml ayırıcı tampon ile adım adım ayrılmış.

30

Membran filtre kullanılarak VLP konsantrasyonu

Heparin kromatografisi veya katyon değişimi kromatografisinden toplanmış olan HPV

16 L1 veya HPV 18 L1 fraksiyonları, 0.1-0.325 M NaCl konsantrasyonu barındıran PBS tamponu + %0.01 Tween 80 ile diyaliz edilmiştir.

Diyaliz edilmiş numune, üreticinin talimatları doğrultusunda amicon ultra YM-50 ya da YM-100 (Millipore, ABD) ile konsantre edilmiştir.

5

SDS-PAGE ve Western Blot

Numuneler, %12 poliakrilamid jeller kullanılarak, Laemmli yöntemi takip edilerek, SDS-PAGE elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrılmıştır (M.P. McCarthy, W.I. White, F. Palmer-Hill, S. Koenig, J.A. Suzich, J Virol 72 (1998) 32-41). Western blot analizi için, HPV 16 L1 ya da HPV 18 L1 içeren numuneler SDS-PAGE'dan, 120 dakikalığına 200 mA'da çalışan PVDF membranına (Q-Biogene, ABD) aktarılmıştır. Primer antikorlar olarak anti-HPV 16 L1 ya da anti-HPV 18 L1 antikor (PIERCE, ABD) kullanılarak L1 proteini tespit edilmiştir. Keçi anti-tavşan IgG-HRP konjügesi (PIERCE, ABD) sekonder antikor olarak kullanılmıştır. Bantlar, Western blot lüminal reaktifi kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Santa Cruz Biotechnology, ABD).

Elektron mikroskobu

Saflaştırılmış HPV L1 proteini, bir karbon kaplı ızgara üzerine uygulanmış ve %2 fosfotungstik asit ile negatif olarak boyanmıştır. Foto-mikrografikler transmisyon elektron mikroskobu TEM200CX ile, 41,000 X'lik bir nihai büyütmede alınmıştır (S. N. Kim, et al., J. Virol. Methods 139 (2007) 24-30).

Bir psödo-virüsün (sözde virüs) yapılandırması

HPV 16 veya HPV 18 L1 proteinleri ve L2 proteinlerini ekspres etmeye yönelik plazmidler, p16SheLL (National Cancer Insitute tarafından sağlanmış) ve p18SheLL (National Cancer Insitute tarafından sağlanmış), ve raportör geni pYSEAP (National Cancer Insitute tarafından sağlanmış) taşıyan plazmidler (National Cancer Insitute tarafından sağlanmış) Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ABD) kullanılarak 293TT hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfekte edilmiş 293TT hücreleri, liz tamponu ile ayrılmadan önce 72 saatliğine inkübe edilmiştir (PBS+ %0.5 Brij58, %0.2 Benzonaz, %0.2 plasmidsiz ATP-bağımlı Dnaz). Hücre yıkıntısı, 12,000 g'de 10 dakika

santrifüjden sonra çöktürülmüş ve belirginleşen hücre yüzen kısmı nötralizasyon tayini için kullanılmıştır.

Fare immünizasyonu

5

Altı haftalık erkek Balb/c fareleri sübkutan olarak 3 kez 3 haftalık aralıklar ile immünize edilmiştir. Heparin kromatografisi ve katyon değişimi kromatografisinden saflaştırılmış olan L1 proteinin her birinden iki µg, immünizasyon için kullanılmıştır. Freund's complete adjuvant (Freund tam adjuvanı) (Sigma) birinci veriliş için kullanılmış, bunu Freund's incomplete adjuvant (Freud tamamlanmamış adjuvanı) (Sigma) ile iki uygulama izlemiştir. Kontrol grubuna, aynı oranda seyreltilmiş ve karıştırılmış Freund complete adjuvanı ve Freund incomplete adjuvanı verilmiştir. İkinci uygulamadan on gün sonra hayvanlar kuyruk damarından kanatılmış, ve toplanan serumlar nötralizasyon tayini için kullanılmıştır.

15

SEAP-bazlı nötralizasyon tayini

293TT hücreleri 3×10^4 hücre/göz oranında 96 gözlü kültür plakaları içinde tohumlanmış ve 4 saatliğine 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Tip 16 HPV ve tip 18 HPV L1 proteinleri ile immünize edilmiş olan farelerin serumları 1:100'den 1:10,000,000'a seri olarak seyreltilmiştir. Bunun ardından serumlar 1:4 oranında, tip 16 HPV ve tip 18 psödo-virüsü ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş serum psödo-virüz karışımları 96 gözlü plakada yetiştirilmiş olan 293TT hücrelerine eklenmiş ve 4 saatliğine 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. 72 saatlik inkübasyondan sonra ortamdaki SEAP ekspresyonu seviyesi, bir sübstrat olarak p-nitrofil fosfat disodyum tuzu hekzahidrat kullanılarak (Sigma, ABD) belirlenmiştir. Nötralizasyon antikoru titresi, tek başına psödo-virüs ile enfekte olmuş olan 293TT hücreli gözden O.D. değerinin yarısı belirlenerek ölçülmüştür.

Deney sonuçları

1. HPV 16 L'nin saflaştırma sonuçları

Heparin kromatografisi

HPV 16 L1 proteini için heparin kromatografisinin saflaştırma özelliği analiz edilmiştir. Aşağıda, Şekil 1c'deki 1. yönteme göre olan heparin kromatografisi sonucu bulunmaktadır. Şekil 2a'da gösterildiği üzere, düşük konsantrasyonu NaCl

5 inkübasyon aşaması ile çözünmeyen kontaminantların uzaklaştırılması yapılmadığı zaman, heparin kromatografisi sonucu yüksek seviyelerde çözünmez kontaminant göstermiştir. Ancak numune düşük konsantrasyonlu NaCl ile ön işleme tabi tutulduğu zaman heparin kromatografisi sonucu L1 proteini saflığında artış göstermiştir (Şekil 2b). Heparin kolonuna bağlı olan proteinler ilk olarak 0.325 M'den

10 0.66 M'ye giden lineer bir NaCl gradyanı ile ayrıştırılmış, bunu 0.66'dan 2M'ye giden NaCl gradyanı izlemiştir. Kontaminantların çoğu 0.325 M ila 0.66 M NaCl aralığında (Şekil 2b) ayrıştırılmış ve HPV 16 L1 proteini, 0.5 M ila 1.3 M'lık NaCl gradyanından ayrıştırılmıştır (Şekil 2c). Sonuç, düşük konsantrasyonlu NaCl ile inkübe ederek çözünmeyen kontaminantların uzaklaştırılmasının, heparin kromatografisi

15 deneyinden sonra L1 proteininin saflığını arttırdığını önermektedir. Heparin kromatografisi kolonunu çözünmeyen kontaminantlardan temizlenmiş olan numuneler ile yüklemek, L1 proteinini saflaştırmanın etkili bir yoludur.

Katyon değişimi kromatografisi

20

HPV 16 L1 proteini için katyon değişimi kromatografisinin saflaştırma özelliği analiz edilmiştir. Aşağıda, Şekil 1c'deki 2. Yönteme göre olan katyon değişimi kromatografisi sonuçları bulunmaktadır. Şekil 3'te gösterildiği üzere kontaminantların çoğu, kolon reçinesine bağlanarak uzaklaştırılmıştır (Şekil 3a). HPV 16 L1, 0.7 M ila

25 1 M'lık NaCl gradyanından ayrıştırılmıştır (Şekil 3b). Sonuç, düşük konsantrasyonlu NaCl ile inkübe ederek çözünmeyen kontaminantların uzaklaştırılmasının, katyon değişimi kromatografisi ile L1 proteininin saflığını arttırdığını önermektedir.

İzole edilmiş HPV 16 L1'in saflığı

30

İzole L1 protein fraksiyonları toplanmış ve 50-100 kDa'lık bir kesip atma boyutuyla bir membran (YM-50 veya YM-100) ile konsantre edilmiştir. Şekil 4'te gösterildiği gibi, L1 proteinin saflığı ticari olarak temin edilebilir olan BSA standardına neredeyse benzer olmuştur (%96'nın üzerinde saflık) (Şekil 4, A paneli). SDS-PAGE üzerinde

görünür olan 55kDa, Western Blot ile bir monomer olarak tespit edilmiştir. BSA bandı görünür olmamıştır (Şekil 4, B Paneli). Bu sonuç, yüksek oranda saflaştırılmış olan HPV 16 L1'in bu saflaştırma prosesi ile izole edilmiş olduğunu göstermektedir.

5 İzole HPV 16 L1 proteininin kendiliğinden oluşması

- Şekil 10 ve 11'de gösterildiği üzere, yukarıdaki iki prosedüre göre izole edilmiş olan HPV 16 L1 proteini, şekli ve boyutça tutarlı olan homojen 35 nm veya 64 nm parçacıkları (ortalama çap: 49 nm) ile kendiliğinden VLP'leri oluşturmuştur (K. A. Aires, et al., Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 745-752). Bu sonuç, iki saflaştırma yönteminin, L1 proteininin kendiliğinden oluşma kabiliyeti üzerinde bir etkisi olmadığını göstermektedir ki bu da, bu iki saflaştırma yönteminin HPV 16 L1 proteinini saflaştırmak için uygun olduğunu önermektedir.
- 15 Her bir saflaştırma aşaması için protein kazancı sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Hücre lizi, amonyum sülfat çöktürmesi ve düşük konsantrasyonlu NaCl ile inkübasyon ile ortalama %80 kalıntı uzaklaştırılmıştır. Bu aşamalardan sonra L1 proteininin ortalama kazanım oranı %81 olmuştur (Tablo 1 ve Tablo 2). L1'in saflığı hücre lizi aşamasında %0.2 olmuş, fakat amonyum sülfat çöktürmesi ile kontaminantların uzaklaştırılmasından sonra %0.8-1'e çıkmıştır. Protein saflığı da 4-5 kat artmıştır (Tablo 1 ve Tablo 2).

Tablo 1

Aşamalar	Toplam protein (mg)	Toplam L1 (mg)	Kazanım oranı (%)	Saflık (%)
Hücre lizatı	3199.7	7.9	100	0.2
Amonyum sülfat çöktürmesi	1914	7.2	92	0.4
Çözünmeyen proteinin uzaklaştırılması	642.1	6.7	84	1

Heparin kromatografisi	6	6.6	83	109
Membran filtresi konsantrasyonu	5	5	64	100

Tablo 2

Aşamalar	Toplam protein (mg)	Toplam L1 (mg)	Kazanım oranı (%)	Saflık (%)
Hücre lizati	3199.7	7.9	100	0.2
Amonyum sülfat çöktürmesi	1914	7.2	92	0.4
Çözünmeyen proteinin uzaklaştırılması	713.5	5.7	72	0.8
Katyon değişimi kromatografisi	5.1	4.9	62	96
Membran filtresi konsantrasyonu	4.8	4.9	62	101

5

Ancak, heparin kromatografisinden elde edilen saflaştırılmış L1 proteininin toplam kazanım oranı %64 olmuş (Tablo 1) ve katyon değişimi kromatografisinden elde edileninki ise %62 olmuştur (Tablo 2). %64 ve %62 bildirilen en yüksek kazanım oranlarıdır.

10

2. HPV 18 L1'in saflaştırma sonuçları

Heparin kromatografisi

HPV 18 L1 proteini için heparin kromatografisinin saflaştırma özelliği analiz edilmiştir. Aşağıda, Şekil 1c'deki 1. yönteme göre olan heparin kromatografisi sonucu bulunmaktadır. Şekil 6a'da gösterildiği üzere, düşük konsantrasyonu NaCl

5 inkübasyon aşaması ile çözünmeyen kontaminantların uzaklaştırılması yapılmadığı zaman, heparin kromatografisi sonucu yüksek seviyelerde çözünmez kontaminant göstermiştir. Ancak düşük konsantrasyonlu NaCl ile ön işlem görmüş olan numune, heparin kromatografisinden sonra L1 proteininin saflığında artış göstermiştir (Şekil 6b). Heparin kolonuna bağlı olan proteinler ilk olarak 0.325 M'den 0.66 M'ye giden

10 lineer bir NaCl gradyanı ile ayrıştırılmış, bunu 0.66'dan 2M'ye giden NaCl gradyanı izlemiştir. Kontaminantların çoğu 0.325 M ila 0.5 M NaCl aralığında (Şekil 6b) ayrıştırılmış ve HPV 18 L1 proteini, 0.5 M ila 1.3 M'lik NaCl gradyanından ayrıştırılmıştır (Şekil 2c). Bu sonuç, HPV 16 L1 saflaştırmasına uygun olarak, heparin kromatografisinin, HPV 18 L1'in saflaştırılmasında etkili bir yöntem olduğunu

15 önermektedir.

Kasyon değişimi kromatografisi

HPV 18 L1 proteini için kasyon değişimi kromatografisinin saflaştırma özelliği analiz edilmiştir. Aşağıda, Şekil 1c'deki 2. Yönteme göre olan kasyon değişimi

20 kromatografisi sonuçları bulunmaktadır. Şekil 7a'da gösterildiği gibi, kontaminantların çoğu kolon reçinesine bağlanarak uzaklaştırılmış, HPV 18 L1, 0.8 M ila 1 M'lik NaCl gradyanı ile ayrıştırılmıştır (Şekil 7b). Sonuç, düşük konsantrasyonlu NaCl ile inkübe ederek çözünmeyen kontaminantların uzaklaştırılmasının, kasyon değişimi

25 kromatografisi ile izole edilmiş L1 proteininin saflığını arttırdığını önermektedir.

İzole edilmiş HPV 18 L1'in saflığı

İzole L1 protein fraksiyonları toplanmış ve 50-100 kDa'lık bir kesip atma boyutuyla bir

30 membran (YM-50 veya YM-100) ile konsantre edilmiştir. Şekil 17'te gösterildiği gibi, L1 proteinin saflığı ticari olarak temin edilebilir olan BSA standardına neredeyse benzer olmuştur (%96'nın üzerinde saflık) (Şekil 8, A paneli). SDS-PAGE üzerinde görünür olan 55kDa, Western Blot ile bir monomer olarak tespit edilmiştir. BSA bandı görünür olmamıştır (Şekil 17, B Paneli). Bu sonuç, yüksek oranda saflaştırılmış olan

HPV 18 L1'in yukarıdaki iki saflaştırma prosesi ile izole edilmiş olduğunu göstermektedir.

İzole HPV 18 L1 proteininin kendiliğinden oluşması.

5

Şekil 18 ve 19'da gösterildiği üzere, yukarıdaki iki prosedüre göre izole edilmiş olan HPV 18 L1 proteini, şekli ve boyutça tutarlı olan homojen 35 nm veya 64 nm parçacıkları (ortalama çap: 49 nm) ile kendiliğinden VLP'leri oluşturmuştur (K. A. Aires, et al., Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 745-752). Bu sonuç, iki saflaştırma yönteminin, L1 proteininin kendiliğinden oluşma kabiliyeti üzerinde bir etkisi olmadığını göstermektedir ki bu da, bu iki saflaştırma yönteminin HPV 18 L1 proteinini saflaştırmak için uygun olduğunu önermektedir.

10

Ozetle deney, HPV 16 L1 ve HPV 18 L1 proteinlerinin izole edilmesine yönelik olarak daha yüksek saflık ve daha yüksek kazanım oranı ile bir saflaştırma yöntemi için kanıt sağlamıştır. Bu saflaştırma yöntemi, örneğin süroz cushion ve boyut dışlamalı kromatografi yöntemleri gibi diğer saflaştırma yöntemlerine göre daha az karmaşık aşamalar içerir ve daha az zaman alır.

15

20

3. Saflaştırılmış tip 16 ve tip 18 HPV L1 proteininin nötralizasyon tayinleri

Nötralize edici antikor titresinin test edilmesi için fareler saflaştırılmış tip 16 ve tip 18 HPV L1 proteinleri ile immünize edilmiştir. Nötralize edici antikor, heparin kromatografisi ve katyon-değişimi kromatografisi ile saflaştırılmış olan tip 16 HPV L1 proteininin ortalama 1:18,000 oranında seyreltilmesi ile tetiklenmiştir (Şekil 10a). Tip 18 HPV L1 olması durumunda nötralize edici antikor, heparin kromatografisi ile saflaştırılmış olan L1 için ortalama 1:5,000'lik seyreltmede ve katyon değişimi kromatografisi ile saflaştırılmış olan L1 için ortalama 1:170,000'lik seyreltmede geliştirilmiştir (Şekil 10b). Bu sonuçlar saflaştırılmış tip 16 HPV ve tip 18 HPV L1 proteinlerinin yüksek seviyede nötralize edici antikor tetikleyebileceğini göstermektedir.

25

30

Örnek 2. Çok kısa bir lipopolisakkarid (LPS) adjuvanı CIA05'in üretilmesi

Buluş sahipleri sağlıklı insanların bağırsaklarında yaşayan *Escheria coli*’den gelen çok kısa bir lipopolisakkarid şeker zincirine sahip olan bir suşu (*E. coli* EG0021) görüntülemiş ve *E. coli* EG0021 suşunu Kore Mikroorganizma Kültürü Merkezine (Korean Culture Center of Microorganisms) (KCCM) 2 Mayıs 2002 tarihinde, KCCM 10374 erişim numarası ile kaydetmiştir (Kore Pat. No. 0456681; WO 2004/039413 ; 5 Kore Pat. No. 0740237; WO 2006/121232’yi kıyaslayınız). LPS’nin bu suştan saflaştırılması, Kore Pat. No. 0456681; WO 2004/039413; Kore Pat. No. 0740237; ve WO 2006/121232 dokümanlarında açıklanan yöntemlere göre yapılmıştır. LPS’in moleküler ağırlığı, MALDI-MASS ile belirlendiği üzere 3,500 Da olmuştur (Shimadzu, 10 Axima-LNR V 2.3.5 (Mode Liner, Power: 106)). Saflaştırılmış LPS’nin toksisitesi, Kore Pat. No. 0456681; WO 2004/039413; Kore Pat. No. 0740237; ve WO 2006/121232 dokümanlarında açıklanan protokoller izlenerek uzaklaştırılmıştır. Saflaştırılmış *E. coli* lipopolisakkaridi 3 mg/ml’lik konsantrasyona ayarlanmış, ve 0.2 N NaOH 1:1’lik karıştırma oranında lipopolisakkarid ile karıştırılmış (hacimce), her 10 15 dakikada bir 60°C’de çalkalanarak 140 dakika deasetillenmiştir. Başlangıçtaki 0.2 N NaOH’ın yaklaşık 1/5’lik bir hacimdeki 1N asetik asit, pH’ı 7.0’a titre etmek üzere eklenmiştir. Titrasyondan sonra ortaya çıkan karışım, toksik olmayan lipopolisakkarid (CIA05) elde etmek üzere etanol ile çöktürülmüştür.

20 **Örnek 3. Yeni adjuvan CIA05’in toksisitesinin geleneksel adjuvan MPL ile kıyaslanması**

Servikal kanserin aşılması için kullanılacak olan, bu buluşta geliştirilmiş yeni CIA05 adjuvanı, toksisitesi bakımından geleneksel MPL (Monofosforil lipid A) ile 25 kıyaslanmıştır. Sağlıklı erkek donörlerden alınan insan PBMC’si (periferik kan mononükleer hücresi) 24 gözlü doku kültürü plakasında 5×10^5 hücre/ml yoğunluğunda tohumlanmıştır. Her bir göze bir ml yetiştirme ortamı, RPMI 1640 + %10 FBS eklenmiştir. Karışım şunlar ile işleme tabi tutulmuştur 1) negatif kontrol: BSS (dengelenmiş tuz çözeltisi) 100 pl; 2) deasillenmiş toksik olmayan LOS (CIA05) 30 10 ug/100 ul; 3) MPL (*E. coli* F583 MPL) 10 ug/100 ul. İşlenmiş ortam 12 saat sonra toplanmış, santrifüjlenmiş ve THP-1 tarafından salgılanan THF-a seviyesi (Akut monositik lösemi) ELISA kiti (R&D sistemi, DY210) kullanılarak kantifiye edilmiştir. Şekil 22’de gösterildiği üzere CIA05, geleneksel adjuvan, MPL’ye kıyasla 1/3 daha az toksisite göstermiştir.

Örnek 4: Servikal kanser aşısının etkililiği

Farenin immünizasyonu

5

Saflaştırılmış protein antijeni ve yeni adjuvan CIA05, bir immün yanıtı tetiklemek üzere farelere verilmiştir. Altı haftalık dişi Balb/c fareleri (SLC, Japonya) rastgele seçilmiş ve 5 farelik gruplara ayrılmıştır. Fareler 3 kez 2 haftalık aralıklarla tek başına CIA05 ile, tek başına Alum (alüminyum hidroksit; Brentag, Almanya) ile ya da her iki bileşiğin karışımı ile, HPV16 L1 VLP 2 µg (Şekil 23-25), HPV16/18 L1 VLP 1 µg ya da 4 µg (her bir tip 0.5 µg veya 2 µg) (Şekil 26-30) intramüsküler olarak immunize edilmiştir. Kontrol farelerine PBS enjekte edilmiştir. Kıyaslamak maksadıyla, ticari olarak temin edilebilir olan Cervarix™ ve Gardasil™ farelere, 1/10 insan dozajında verilmiştir. Üçüncü enjeksiyondan beş hafta sonra, uç nokta ELISA yöntemi kullanılarak anti-L1 VLP IgG titresini belirlemek üzere kan serumları toplanmıştır.

15

Uç nokta ELISA kullanılarak immüno-jenisitenin analiz edilmesi (IgG titresinin analizi)

20

25

30

Nalge Nunc 96 gözlü mikro plaka (Nalge Nunc International) 100 µl kaplama tamponu (50 mM karbonat, pH 9.6, 4°C), 0.5 µg/ml saflaştırılmış tip 16 HPV ya da tip 18 VLP antijeni –tampon içinde seyreltilmiş - ile kaplanmıştır. Inkübasyon gece boyu 4°C’de gerçekleşmiştir. Her bir göz yıkama tamponu (PBS, %0.05 Tween 20) ile üç kez yıkanmış ve 300 µl bloklayıcı tampon ile 1 saatliğine 37°C’de bloklanmıştır (%1 BSA’lı PBS). Fare serumlar 1:2 oranında seri olarak seyreltilmiş ve göz başına 100 µl’de kaplanmış mikro plakaya eklenmiştir. Plakalar 2 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. Reaksiyondan sonra plakalar iki kez yıkama tamponu ile yıkanmış, ardından 100 µl HRP (yaban turpu peroksidaz) işaretli keçi anti-fare IgG (Zymed, 81-6520), keçi anti-fare IgG1 (Serotec, STAR81P) ya da keçi anti-fare IgG2a (Serotec, STAR82P) mikro plakaya eklenmiştir. Plakalar 2 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. Plakalar yıkama tamponu ile iki kez yıkanmış ve ardından renk gelişimi için 100 µl HRP süstratı TMB (tetrametilbenzidin, BD Bio Science, 55555214) ile inkübe edilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında 10 dakika yürütülmüş, ve 100 µl 1 N H₂SO₄ ile durdurulmuştur. Absorbans (konsantrasyon) 450 nm’de bir mikrolaka okuyucu

(BioTek, ABS) ile okunmuştur. Uç nokta titresinin kesilip atma değeri 0.1 olmuştur; bu, immünize edilmemiş serumda 2 kat absorbands artışına neden olan en yüksek serum seyreltiği olarak belirlenmiş ve ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir.

- 5 Şekiller 23 ve 24'te gösterildiği üzere IgG, IgG1 ve IgG2a'nın antikor titreleri, CIA05, HPV6 L1 VLP antijeni ile birleştirildiği zaman dikkate değer derecede artmıştır. Titredeki kat artışı Şekil 12b'de açıkça bu artış modelini temsil etmektedir. CIA05, alum ile kıyaslandığında daha yüksek bir immün uyarıcı etkiye sahip olmuştur. Dolayısıyla HPV'ye karşı başarılı bir immünizasyon, bu buluş konusu temel aşı
10 bileşimleri, HPV L1 HPV antijeni ve CIA05 ile gerçekleştirilebilmiştir.

- Ek olarak, Şekiller 25 ve 26'da gösterildiği üzere, toplam HPV16/18 L1 VLP spesifik IgG titresini, adjuvan CIA05 ve Alum'un beraber verildiğinde, Alum'un yalnız verildiği zaman göre daha yüksek olmuştur. IgG titresini, Cervarix™ ve Gardasil™ ile işlem
15 gören gruplardan ciddi derecede daha yüksek olmuştur.

- IgG alt tipleri titrasyon için kullanıldığı zaman, Şekil 27 ve 28'de gösterildiği üzere, HPV 16 L1 VLP spesifik IgG1 titresini, adjuvan CIA05 ve Alum'un beraber verildiğinde, Alum'un yalnız verildiği zaman göre daha yüksek olmuştur. IgG1 titresini, Cervarix™ ve
20 Gardasil™ ile işlem gören gruplardan daha yüksek olmuştur (Şekil 27). IgG2 olması durumunda, IgG2 titresini, adjuvan CIA05 ve Alum beraber verildiğinde, Alum'un yalnız verildiği zaman göre daha yüksek olmuştur. IgG2 titresini, Cervarix™ ve Gardasil™ ile işlem gören gruplardan ciddi derecede daha yüksek olmuştur (Şekil 28).

25 Fare dalak hücreleri kullanılarak INF- γ seviyelerinin analizi

- İmmünize edilmiş farelerden gelen dalak, aseptik olarak uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Dalak üzerinde, ortam içinde 5 ml şırınga (50 μ M β -merkaptotanol, 1 M HEPES tamponu, %10 FBS, 1 x RPMI1640 antibiyotik ile) kullanılarak on delik
30 açılmıştır. Dalak hücreleri, şırınganın hücre süspansiyonunun geçirilmesiyle ayrılmıştır. Bu süspansiyonlar 1500 rpm'de 10 dakikalığına 4°C'de santrifüjlenmiştir. Yüzen kısım uzaklaştırılmış ve hücre peletleri %10 FBS'li RPMI1640, 100 μ g/ml streptomisin ve 50 mM β -merkaptotanol ortamı ile yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Dalak hücreleri her bir göze ve HPV16 L1 dağıtılmıştır. VLP 15 μ g/ml

konsantrasyonda eklenmiş ve 37°C'de 48-72 saatliğine inkübe edilmiştir. Fare dalak hücrelerinden salgılanmış olan INF- γ seviyeleri, ELISA kit kullanılarak belirlenmiştir (BD OptEIA faresi ELISA kiti).

- 5 Şekil 25'te gösterildiği üzere, HPV16 L1 ile CIA05 eklenmesi, INF- γ seviyelerini ciddi derecede arttırmış, ve CIA05, alum ile kıyaslandığında daha yüksek immün uyarıcı etki göstermiştir. Dolayısıyla HPV'ye karşı başarılı bir immünizasyon, bu buluş konusu temel aşı bileşimleri, HPV L1 VLP antijeni ve CIA05 ile gerçekleştirilebilmiştir.

10

Buna ek olarak, Şekil 30'da gösterildiği gibi, fare dalak hücrelerinden salgılanan INF- γ seviyesi, adjuvan CIA05 ve Alum birlikte verildiği zaman, Alum'un tek başına verildiği zaman göre daha yüksek olmuştur. INF- γ ekspresyon seviyesi, Cervarix™ ve Gardasil™ ile işlem gören gruplardan daha yüksek olmuştur.

15

Şekiller 26-29'da, aşı HPV16 L1 VLP ve HPV18 L1 VLP, alüminyum hidroksit ve CIA05 içermiş, CIA05 ise, GSK tarafından üretilen Cervarix içinde MPL ile ikame edilmiştir. Dolayısıyla, bu buluştaki CIA05'in, MPL ile kıyaslandığı zaman daha az toksisitesi ve daha yüksek immün uyarıcı etkisi olduğu açıktır.

20

Ozetle, sonuç, buluş sahipleri tarafından geliştirilmiş olan adjuvan CIA05 ile birleştirilmiş HPV16 L1 VLP ve HPV18 L1 VLP ile işlem görmüş olan deneysel grubun, geleneksel servikal kanser aşısı ile immünize olmuş grup ile kıyaslandığında daha büyük bir immünizasyon etkisi olduğunu göstermektedir. Geleneksel servikal kanser aşısının uzatılmış etkisi üzerindeki tartışma düşünüldüğünde, bir adjuvan ile birleştirerek immün uyarıcı etkiyi arttırmak, bu sorunu çözmede yaratıcı ve geliştirilmiş bir yöntemdir.

25

30

Mevcut buluşun tercih edilen bir düzenlemesini tarif ettikten sonra, buluş konusu kapsamına giren varyasyonların ve modifikasyonların teknik alanda uzman kişilerle aşikar olacağı, ve buluşun kapsamının ekli istemler ve eşdeğerleri ile belirleneceği anlaşılabacaktır.

<110> EyeGene, Inc.
 <120> Servikal Kanser için Aşılar
 <160> 4
 <170> Kopatentln 1.71
 <210> 1
 <211> 1518
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim
 <220>
 <223> YEG-HPV16-ROS
 <221> CDS
 <222> (1)..(1515)
 <400> 1

atg tcg tta tgg tta cct tca gaa gct acc gtt tat ctt cct cca gta	48
Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val	
1 5 10 15	
cca gtt tcc aaa gtc gtt tct aca gat gaa tac gtt gct aga act aac	96
Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn	
20 25 30	
att tac tac cat gca ggc act tcc agg tta tta gct gtc ggt cat ccc	144
Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro	
35 40 45	
tat ttc cca att aaa aag ccc aac aat aat aag ata tta gtt cca aaa	192
Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys	
50 55 60	
gtt tcc ggc tta caa tac aga gtc ttt aga ata cat tta cca gat cct	240
Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro	
65 70 75 80	
aac aag ttc ggt ttt cca gat aca agt ttt tat aac cct gat aca caa	288
Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln	
85 90 95	
cgt tta gtt tgg gca tgt gtt ggt gtt gaa gtg ggc cgt ggt caa cct	336
Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro	
100 105 110	
ctt ggc gtc ggg att tct ggt cac cca tta ttg aat aag tta gac gat	384
Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp	
115 120 125	
act gaa aac gcc tcc gcc tac gct gct aac gca gga gtc gac aat agg	432
Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg	
130 135 140	
gaa tgc att tca atg gac tat aaa caa act caa cta tgc tta att ggt	480
Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly	
145 150 155 160	
tgt aaa cct cca att ggt gaa cat tgg ggt aaa gga tct ccc tgc acg	528
Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr	
165 170 175	

aat gtt gca gtt aat cct ggt gat tgt cca ccc tta gaa ttg att aat Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn 180 185 190	576
act gtt ata caa gat ggt gac atg gtc gat acc ggc ttc gga gct atg Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met 195 200 205	624
gac ttt act aca tta caa gcg aat aaa tca gaa gtt ccg cta gat att Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile 210 215 220	672
tgt act tcc att tgt aaa taa cca gat taa att aag atg gtg tct gaa Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu 225 230 235 240	720
cct tat ggt gat tca cta ttt ttc tac ctg cgt cgt gaa caa atg ttt Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe 245 250 255	768
gtt aga cat ctt ttc aat cgt gct gga gcc gta gga gaa aat gta cca Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro 260 265 270	816
gat gat tta tat ata aaa ggt tcc ggt tct aca gca aat tta gcc tca Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser 275 280 285	864
tca aat tat ttc cca acc cca tca ggt tca atg gtt act tca gac gcg Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala 290 295 300	912
caa att ttt aat aaa ccc tat tgg ctt caa agg gct caa ggt cat aac Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn 305 310 315 320	960
aat ggt att tgt tgg ggc aat cag tta ttc gtc aca gtc gtc gat act Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr 325 330 335	1008
act aga tca act aat atg agt tta tgt gca gca ata tcc act tca gaa Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu 340 345 350	1056
acc act tat aag aat acc aac ttt aaa gaa tac ttg aga cac ggt gaa Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu 355 360 365	1104
gaa tat gac ttg caa ttc atc ttt caa tta tgc aaa atc act tta aca Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr 370 375 380	1152
gca gac gta atg aca tat att cat tca atg aac tct aca att tta gaa Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu 385 390 395 400	1200
gat tgg aac ttc gga cta caa cct cct cca ggc gga aca cta gaa gac Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp 405 410 415	1248
act tat aga ttt gtt acc tca cag gcc atc gca tgt caa aag cat aca Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr 420 425 430	1296

cca cca gcg ccg aaa gaa gac ccc ttg aaa aaa tac act ttc tgg gaa 1344
Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu
435 440 445

gtt aac ttg aaa gaa aaa ttc tct gct gat tta gat caa ttt cca tta 1392
Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu
450 455 460

gga cgt aaa ttt tta cta caa gca ggt tta aaa gct aag cca aaa ttc 1440
Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys Phe
465 470 475 480

acc cta ggc aaa aga aaa gca aca cct act act tct tcc aca tct aca 1488
Thr Leu Gly Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr
485 490 495

act gcc aaa aga aaa aag aga aaa ttg taa 1518
Thr Ala Lys Arg Lys Lys Arg Lys Leu
500 505

<210> 2

<211> 505

<212> PRT

<213> Yapay Dizilim

<400> 2

Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val
1 5 10 15

Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn
20 25 30

Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro
35 40 45

Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys
50 55 60

Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro
65 70 75 80

Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln
85 90 95

Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro
100 105 110

Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp
115 120 125

Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg
130 135 140

Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly
145 150 155 160

Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr
165 170 175

Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn
180 185 190

Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met
195 200 205

Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile
 210 215 220
 Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe
 245 250 255
 Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro
 260 265 270
 Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser
 275 280 285
 Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala
 290 295 300
 Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn
 305 310 315 320
 Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr
 325 330 335
 Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu
 340 345 350
 Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu
 355 360 365
 Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr
 370 375 380
 Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu
 385 390 395 400
 Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp
 405 410 415
 Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr
 420 425 430
 Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu
 435 440 445
 Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu
 450 455 460
 Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys Phe
 465 470 475 480
 Thr Leu Gly Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr
 485 490 495
 Thr Ala Lys Arg Lys Lys Arg Lys Leu
 500 505

<210> 3

<211> 1524

<212> DNA

<213> Yapay Dizilim

<220>

<223> YEG-HPV18L1-ROS

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1521)

5

10

<400> 3

atg gcc ctt tgg aga cct tca gac aat act gtg tac ctt ccc cct cct	48
Met Ala Leu Trp Arg Pro Ser Asp Asn Thr Val Tyr Leu Pro Pro Pro	
1 5 10 15	
tct gtc gct aga gta gta aac aca gat gat tac gta act aga aca tct	96
Ser Val Ala Arg Val Val Asn Thr Asp Asp Tyr Val Thr Arg Thr Ser	
20 25 30	
att ttt tac cac gcc ggt agc tca aga tta tta aca gta ggt aat cct	144
Ile Phe Tyr His Ala Gly Ser Ser Arg Leu Leu Thr Val Gly Asn Pro	
35 40 45	
tat ttc cgt gtc cca gca ggc ggc ggt aat aaa caa gac att cct aaa	192
Tyr Phe Arg Val Pro Ala Gly Gly Gly Asn Lys Gln Asp Ile Pro Lys	
50 55 60	
gtc tca gcc tac caa tat aga gta ttc aga gtc caa ctt ccc gat ccc	240
Val Ser Ala Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Arg Val Gln Leu Pro Asp Pro	
65 70 75 80	
aac aaa ttt gga ttg cca gac acg tcg ata tat aac cca gaa aca cag	288
Asn Lys Phe Gly Leu Pro Asp Thr Ser Ile Tyr Asn Pro Glu Thr Gln	
85 90 95	
aga cta gtt tgg gcc tgt gca gga gtt gaa ata gga aga gga caa ccc	336
Arg Leu Val Trp Ala Cys Ala Gly Val Glu Ile Gly Arg Gly Gln Pro	
100 105 110	
ttg ggc gta ggt tta tca ggt cac ccc ttc tac aat aaa tta gac gat	384
Leu Gly Val Gly Leu Ser Gly His Pro Phe Tyr Asn Lys Leu Asp Asp	
115 120 125	
aca gaa tct agc cat gca gcc aca agt aat gtt tca gag gat gta agg	432
Thr Glu Ser Ser His Ala Ala Thr Ser Asn Val Ser Glu Asp Val Arg	
130 135 140	
gac aat gtt tcc gta gac tat aaa cag acc caa cta tgt ata tta ggt	480
Asp Asn Val Ser Val Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Ile Leu Gly	
145 150 155 160	
tgt gct cca gca att ggc gaa cac tgg gct aag gga act gcg tgc aaa	528
Cys Ala Pro Ala Ile Gly Glu His Trp Ala Lys Gly Thr Ala Cys Lys	
165 170 175	
tca agg ccc cta tca caa ggc gat tgt ccc ccc tta gaa tta aaa aac	576
Ser Arg Pro Leu Ser Gln Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Lys Asn	
180 185 190	
aca gtc tta gaa gat gga gat atg gtc gat acc ggt tat ggc gca atg	624
Thr Val Leu Glu Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Tyr Gly Ala Met	
195 200 205	
gat ttt tca aca tta caa gac acg aag tgt gaa gtg ccc cta gat att	672
Asp Phe Ser Thr Leu Gln Asp Thr Lys Cys Glu Val Pro Leu Asp Ile	
210 215 220	
tgt caa tca att tgt aaa tac cct gac tac tta caa atg tct gcc gac	720

Cys Gln Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ser Ala Asp	
225 230 235 240	
cca tat ggc gac tcc atg ttt ttt tgc ttg aga aga gaa caa tta ttt	768
Pro Tyr Gly Asp Ser Met Phe Phe Cys Leu Arg Arg Glu Gln Leu Phe	
245 250 255	
gct cgt cat ttt tqg aac cgt qca gga aca atg qgt gat aca gtt cct	816
Ala Arg His Phe Trp Asn Arg Ala Gly Thr Met Gly Asp Thr Val Pro	
260 265 270	
caa tct tta tat ata aac ggc aca ggc atg cgt gct tcc cct ggt tcg	864
Gln Ser Leu Tyr Ile Lys Gly Thr Gly Met Arg Ala Ser Pro Gly Ser	
275 280 285	
tgc gta tat tct cct tca ccg tca ggt tct att gtc acg tca gat agt	912
Cys Val Tyr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Ile Val Thr Ser Asp Ser	
290 295 300	
caa tta ttt aac aaa cca tat tgg tta cat aaa gct caa ggt cat aat	960
Gln Leu Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu His Lys Ala Gln Gly His Asn	
305 310 315 320	
aat ggt gta tgt tgg cac aat caa tta ttc gta act gta gtc gat aca	1008
Asn Gly Val Cys Trp His Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr	
325 330 335	
acc aga tcc act aat tta aca ata tct qca tca act caq tca ccc gtt	1056
Thr Arg Ser Thr Asn Leu Thr Ile Cys Ala Ser Thr Gln Ser Pro Val	
340 345 350	
cca ggt caa tat gac gca aca aaa ttc aaa caa tac tcc aga cat gta	1104
Pro Gly Gln Tyr Asp Ala Thr Lys Phe Lys Gln Tyr Ser Arg His Val	
355 360 365	
gaa gaa tac gac tta caa ttc att ttc caq cta tgt act atc acg tta	1152
Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Thr Ile Thr Leu	
370 375 380	
aca gcc gat gtc atg tct tat att cac tct atg aac tcc tct att tta	1200
Thr Ala Asp Val Met Ser Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Ser Ile Leu	
385 390 395 400	
gaa gat tqg aac ttt ggc gtt cca cca cct ccc act aca tca tta gtc	1248
Glu Asp Trp Asn Phe Gly Val Pro Pro Pro Pro Thr Thr Ser Leu Val	
405 410 415	
gat aca tac cgt ttc gtt caa tct gtt gcc atc act tgt caa aaa gac	1296
Asp Thr Tyr Arg Phe Val Gln Ser Val Ala Ile Thr Cys Gln Lys Asp	
420 425 430	
gca gcc ccc gca gaa aat aaa gac cca tac gat aaa tta aaa ttt tgg	1344
Ala Ala Pro Ala Glu Asn Lys Asp Pro Tyr Asp Lys Leu Lys Phe Trp	
435 440 445	
aat gta gat ctt aag gaa aaa ttt agt tta gac tta gat cag tat cct	1392
Asn Val Asp Leu Lys Glu Lys Phe Ser Leu Asp Leu Asp Gln Tyr Pro	
450 455 460	
tta gga aga aaa ttt ctt gtt caa gca ggt ctg aga aga aaa cca acc	1440
Leu Gly Arg Lys Phe Leu Val Gln Ala Gly Leu Arg Arg Lys Pro Thr	
465 470 475 480	
atc gcc cca aga aaa aga tcc qca cct tct gcc act aca tca tca aaa	1488
Ile Gly Pro Arg Lys Arg Ser Ala Pro Ser Ala Thr Thr Ser Ser Lys	
485 490 495	
cca gcc aaa aga gta aga gta aga gct aga aag taa	1524
Pro Ala Lys Arg Val Arg Val Arg Ala Arg Lys	
500 505	

<210> 4

<211> 507

<212> PRT

<213> Yapay Dizilim

<400> 4

```

Met Ala Leu Trp Arg Pro Ser Asp Asn Thr Val Tyr Leu Pro Pro Pro
 1          5          10          15

Ser Val Ala Arg Val Val Asn Thr Asp Asp Tyr Val Thr Arg Thr Ser
          20          25          30

Ile Phe Tyr His Ala Gly Ser Ser Arg Leu Leu Thr Val Gly Asn Pro
 35          40          45

Tyr Phe Arg Val Pro Ala Gly Gly Gly Asn Lys Gln Asp Ile Pro Lys
 50          55          60

Val Ser Ala Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Arg Val Gln Leu Pro Asp Pro
 65          70          75          80

Asn Lys Phe Gly Leu Pro Asp Thr Ser Ile Tyr Asn Pro Glu Thr Gln
          85          90          95

Arg Leu Val Trp Ala Cys Ala Gly Val Glu Ile Gly Arg Gly Gln Pro
          100          105          110

Leu Gly Val Gly Leu Ser Gly His Pro Phe Tyr Asn Lys Leu Asp Asp
 115          120          125

Thr Glu Ser Ser His Ala Ala Thr Ser Asn Val Ser Glu Asp Val Arg
 130          135          140

Asp Asn Val Ser Val Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Ile Leu Gly
 145          150          155          160

Cys Ala Pro Ala Ile Gly Glu His Trp Ala Lys Gly Thr Ala Cys Lys
          165          170          175

Ser Arg Pro Leu Ser Gln Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Lys Asn
          180          185          190

Thr Val Leu Glu Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Tyr Gly Ala Met
          195          200          205

Asp Phe Ser Thr Leu Gln Asp Thr Lys Cys Glu Val Pro Leu Asp Ile
 210          215          220

Cys Gln Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ser Ala Asp
 225          230          235          240

Pro Tyr Gly Asp Ser Met Phe Phe Cys Leu Arg Arg Glu Gln Leu Phe
          245          250          255

Ala Arg His Phe Trp Asn Arg Ala Gly Thr Met Gly Asp Thr Val Pro
          260          265          270

Gln Ser Leu Tyr Ile Lys Gly Thr Gly Met Arg Ala Ser Pro Gly Ser

```

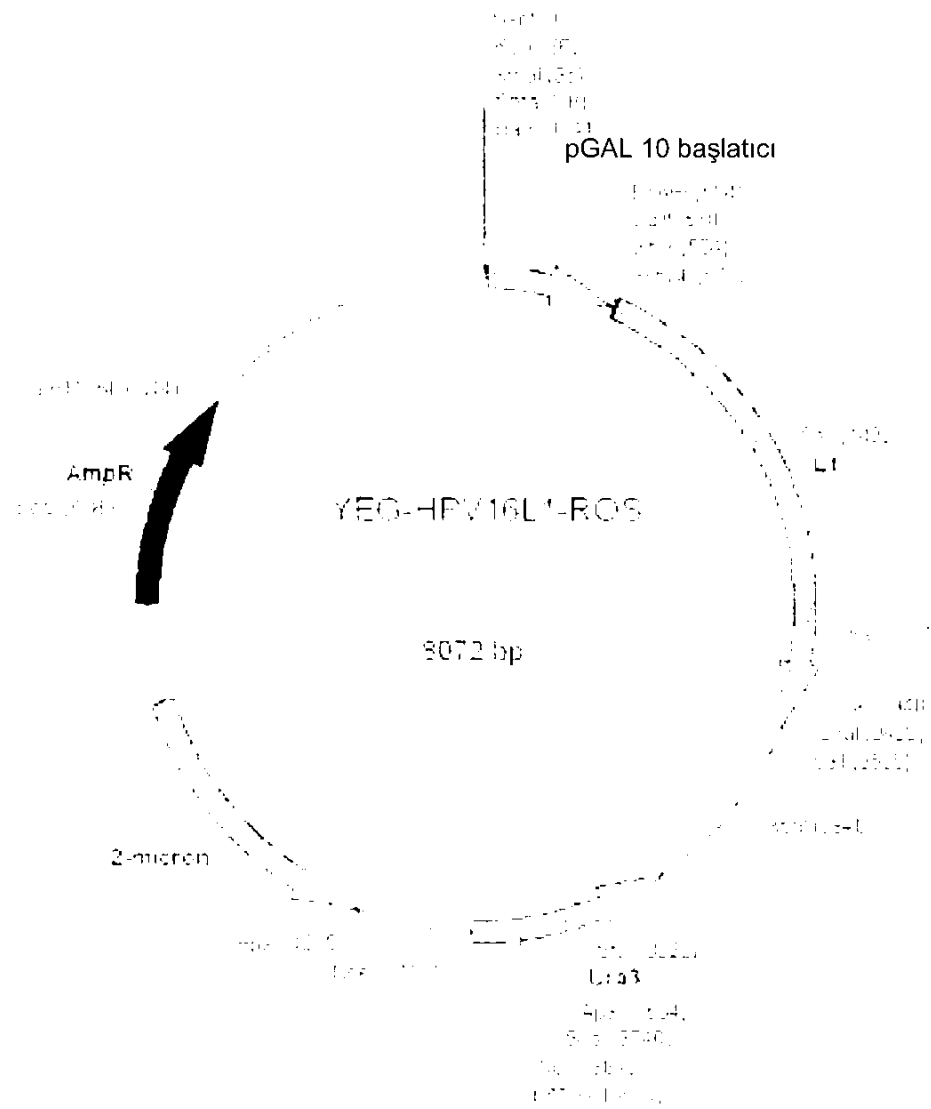
275					280					285						
Cys	Val	Tyr	Ser	Pro	Ser	Pro	Ser	Gly	Ser	Ile	Val	Thr	Ser	Asp	Ser	
290					295					300						
Gln	Leu	Phe	Asn	Lys	Pro	Tyr	Trp	Leu	His	Lys	Ala	Gln	Gly	His	Asn	
305					310					315					320	
Asn	Gly	Val	Cys	Trp	His	Asn	Gln	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	
				325					330					335		
Thr	Arg	Ser	Thr	Asn	Leu	Thr	Ile	Cys	Ala	Ser	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	
				340				345						350		
Pro	Gly	Gln	Tyr	Asp	Ala	Thr	Lys	Phe	Lys	Gln	Tyr	Ser	Arg	His	Val	
		355					360					365				
Glu	Glu	Tyr	Asp	Leu	Gln	Phe	Ile	Phe	Gln	Leu	Cys	Thr	Ile	Thr	Leu	
	370					375					380					
Thr	Ala	Asp	Val	Met	Ser	Tyr	Ile	His	Ser	Met	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	
385				390						395					400	
Glu	Asp	Trp	Asn	Phe	Gly	Val	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Leu	Val	
				405					410					415		
Asp	Thr	Tyr	Arg	Phe	Val	Gln	Ser	Val	Ala	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Asp	
			420					425						430		
Ala	Ala	Pro	Ala	Glu	Asn	Lys	Asp	Pro	Tyr	Asp	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	
		435					440					445				
Asn	Val	Asp	Leu	Lys	Glu	Lys	Phe	Ser	Leu	Asp	Leu	Asp	Gln	Tyr	Pro	
	450					455					460					
Leu	Gly	Arg	Lys	Phe	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Leu	Arg	Arg	Lys	Pro	Thr	
465					470					475					480	
Ile	Gly	Pro	Arg	Lys	Arg	Ser	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	
				485				490						495		
Pro	Ala	Lys	Arg	Val	Arg	Val	Arg	Ala	Arg	Lys						
			500				505									

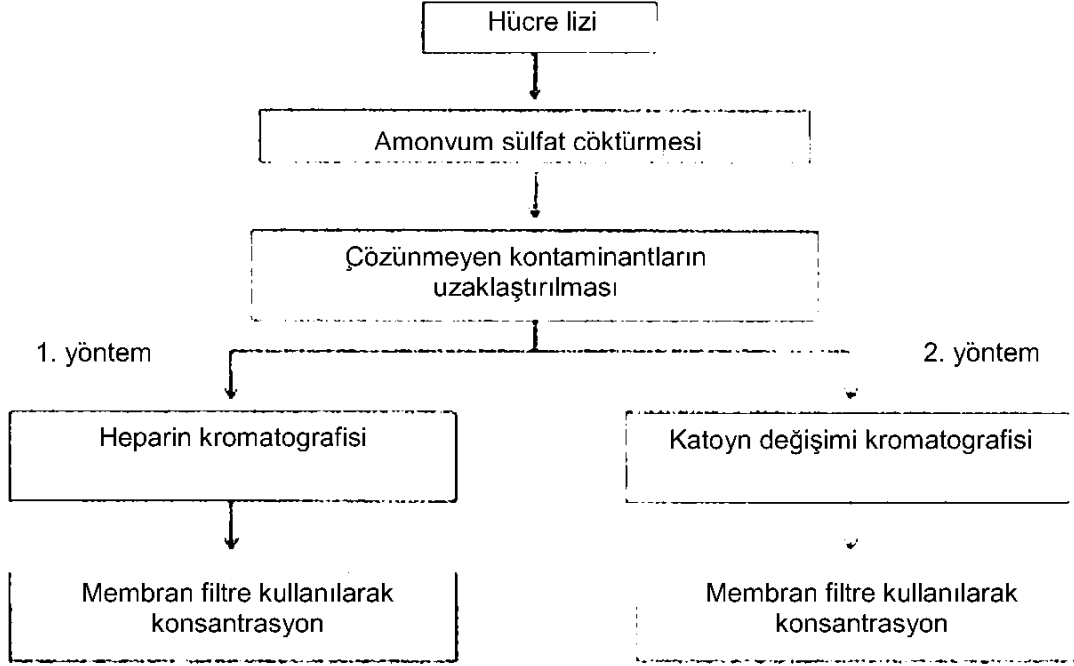
5

10

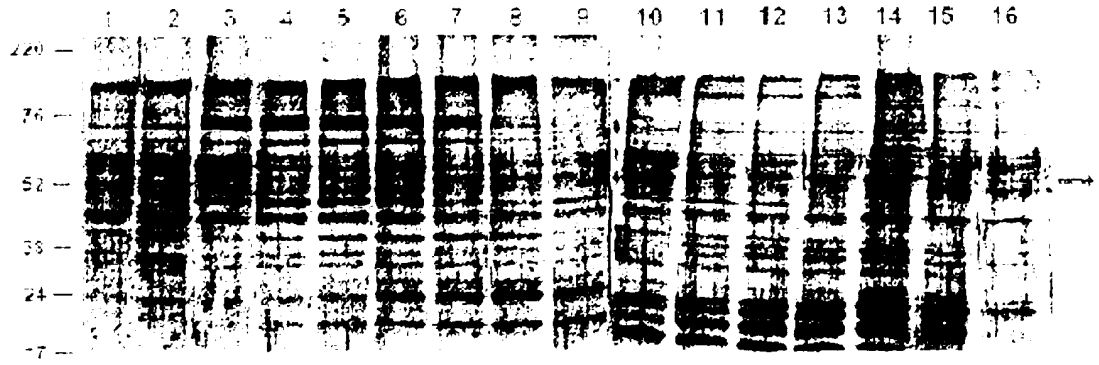
15

Şekil 1

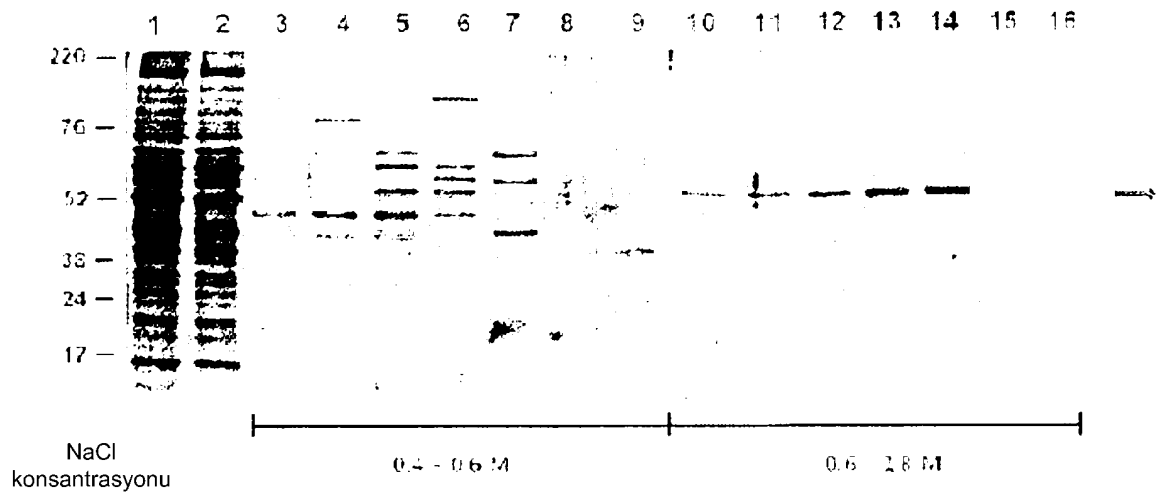


Şekil 3

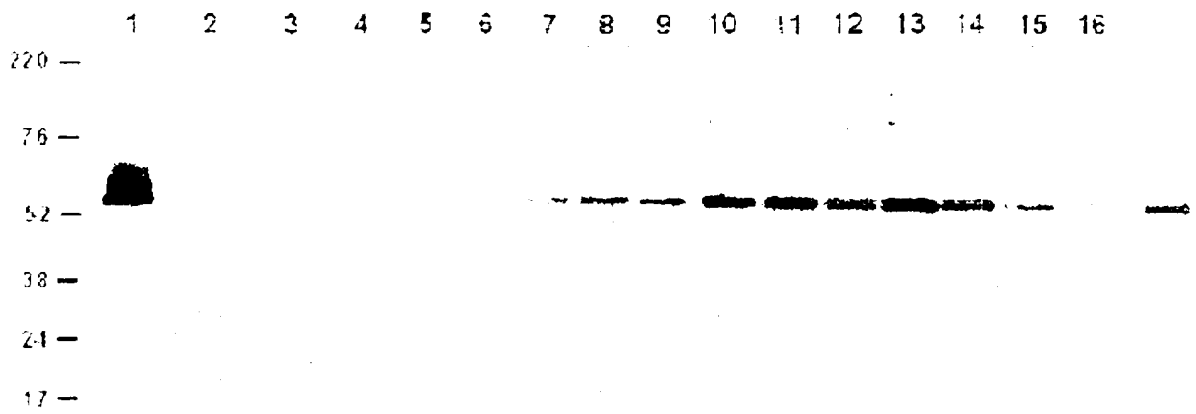
Şekil 4



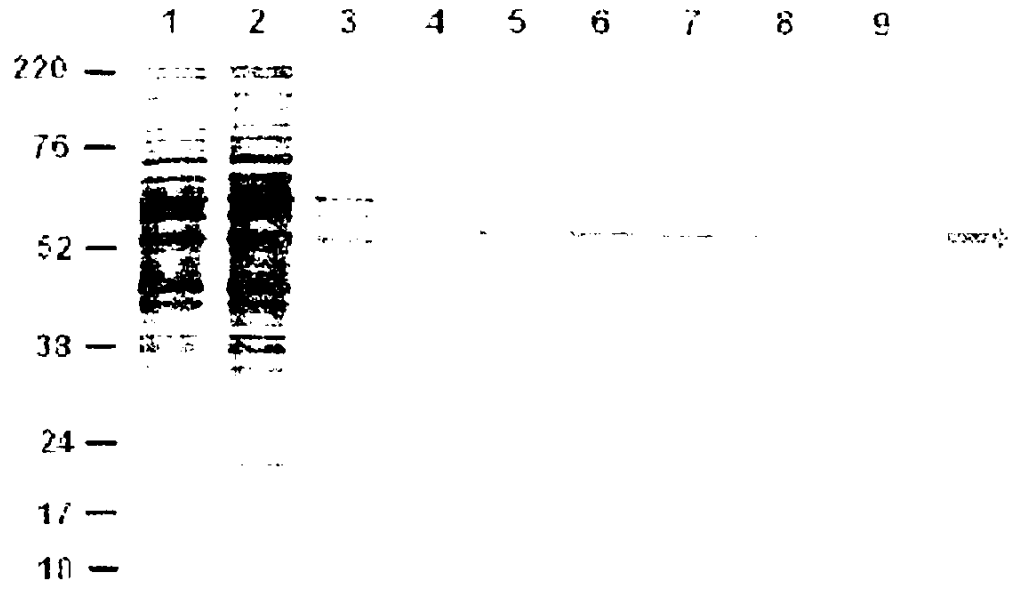
Şekil 5



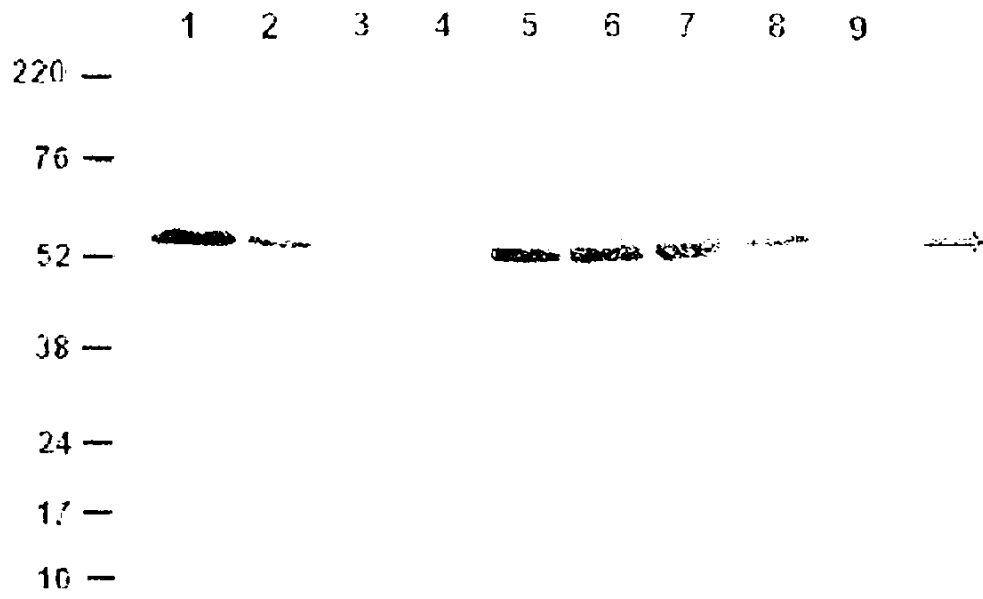
Şekil 6



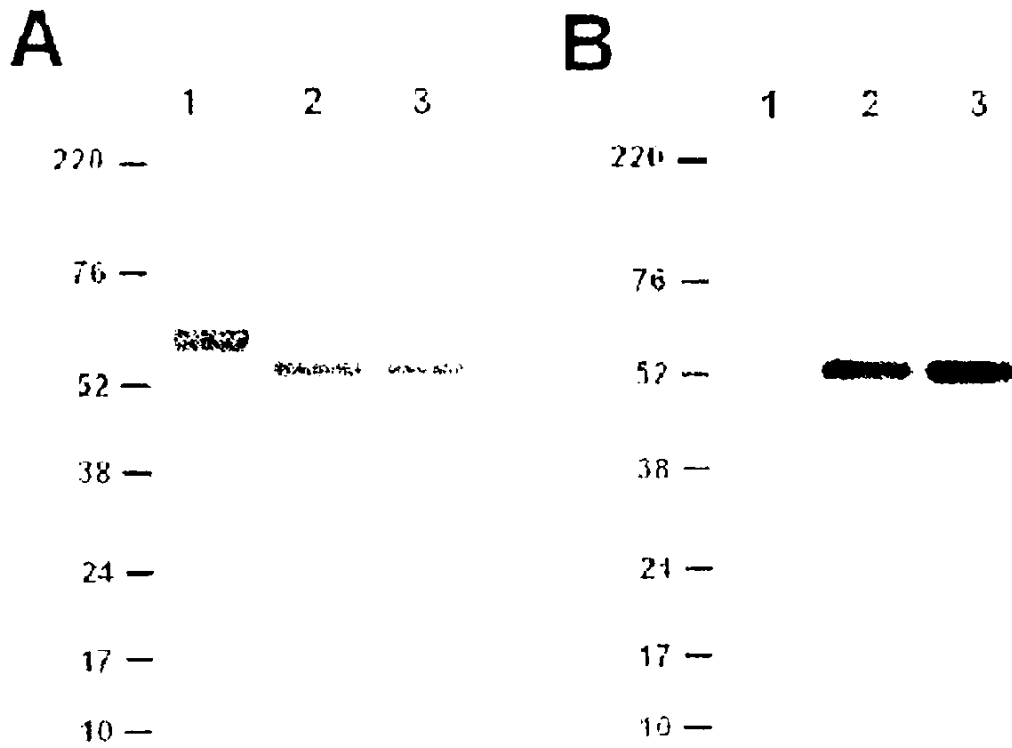
Şekil 7



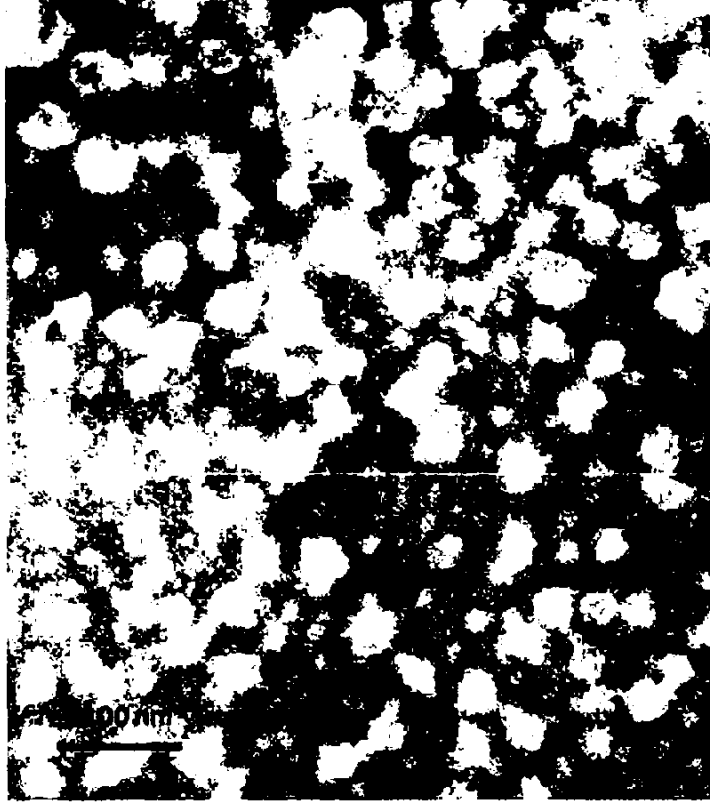
Şekil 8



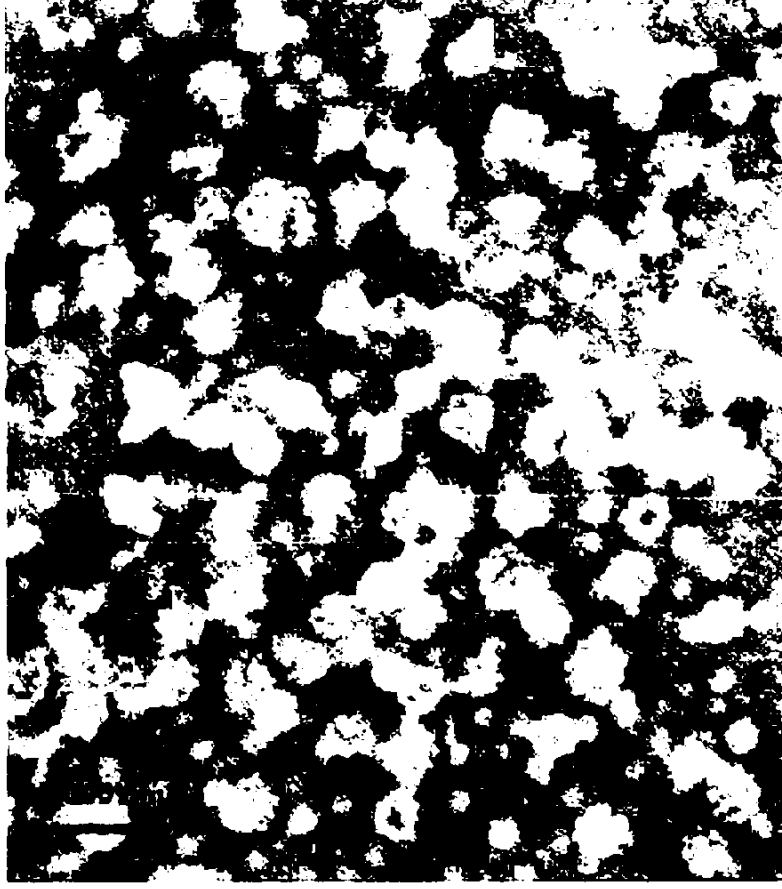
Şekil 9



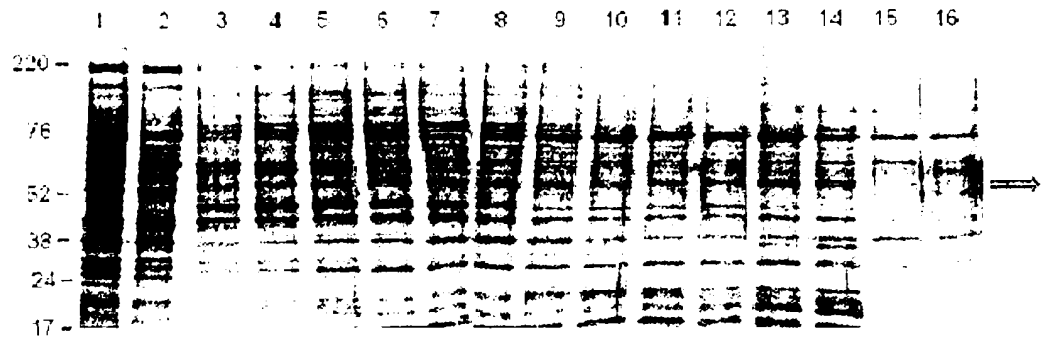
Şekil 10



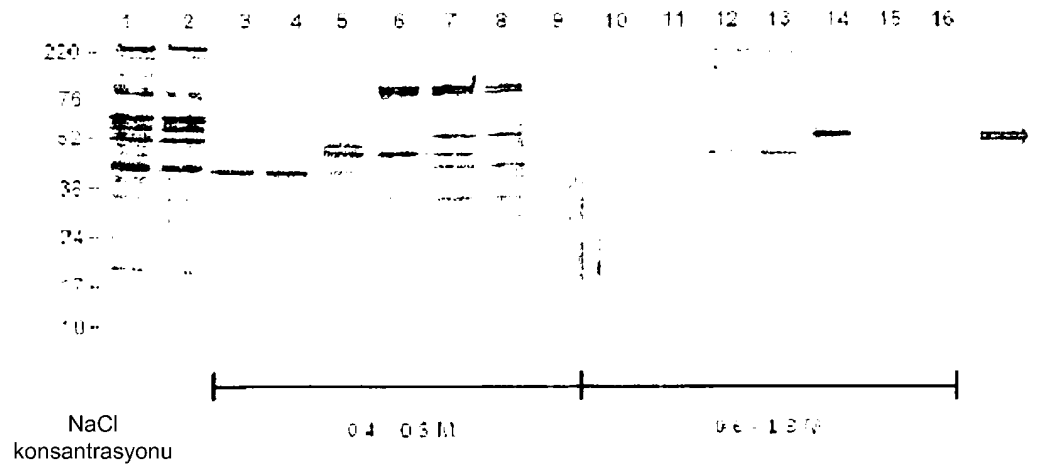
Şekil 11



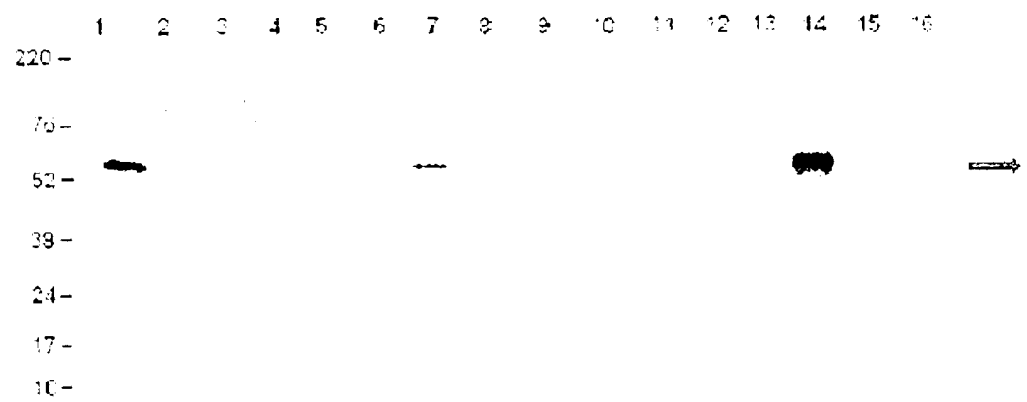
Şekil 12

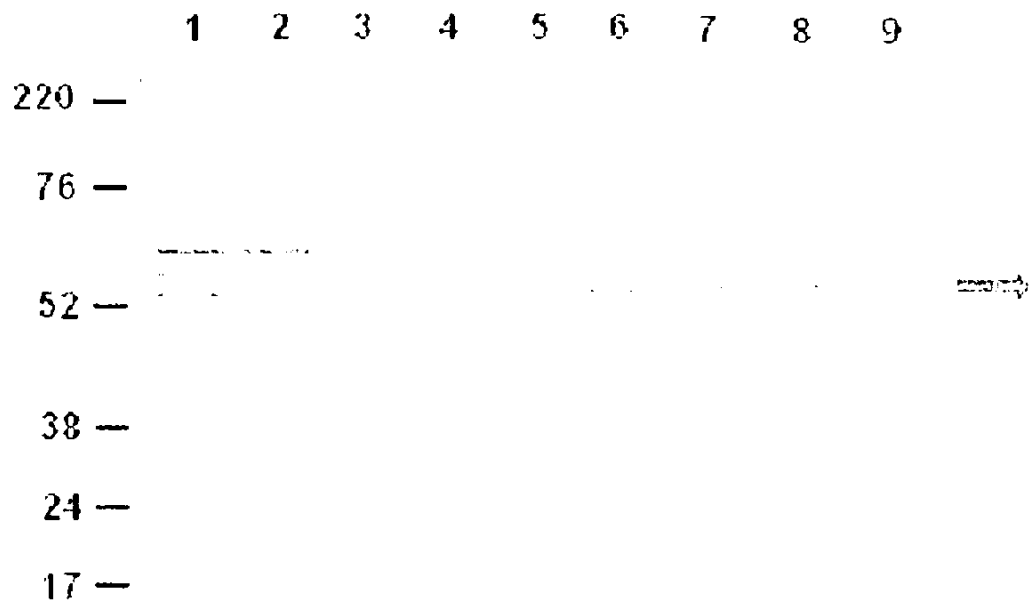


Şekil 13

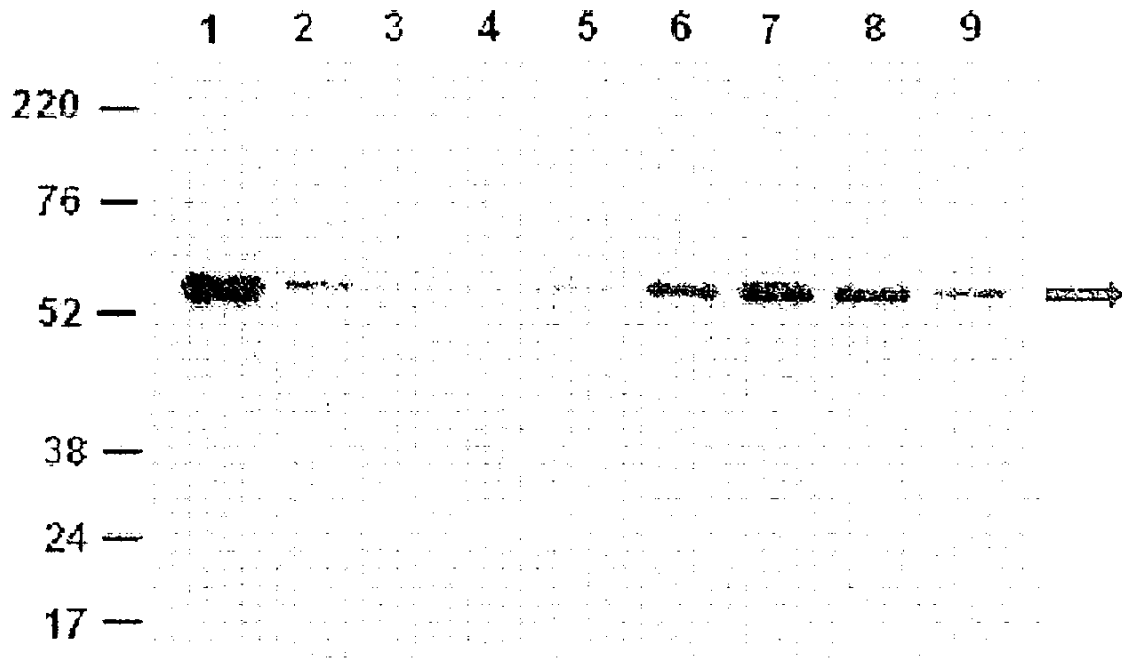


Şekil 14

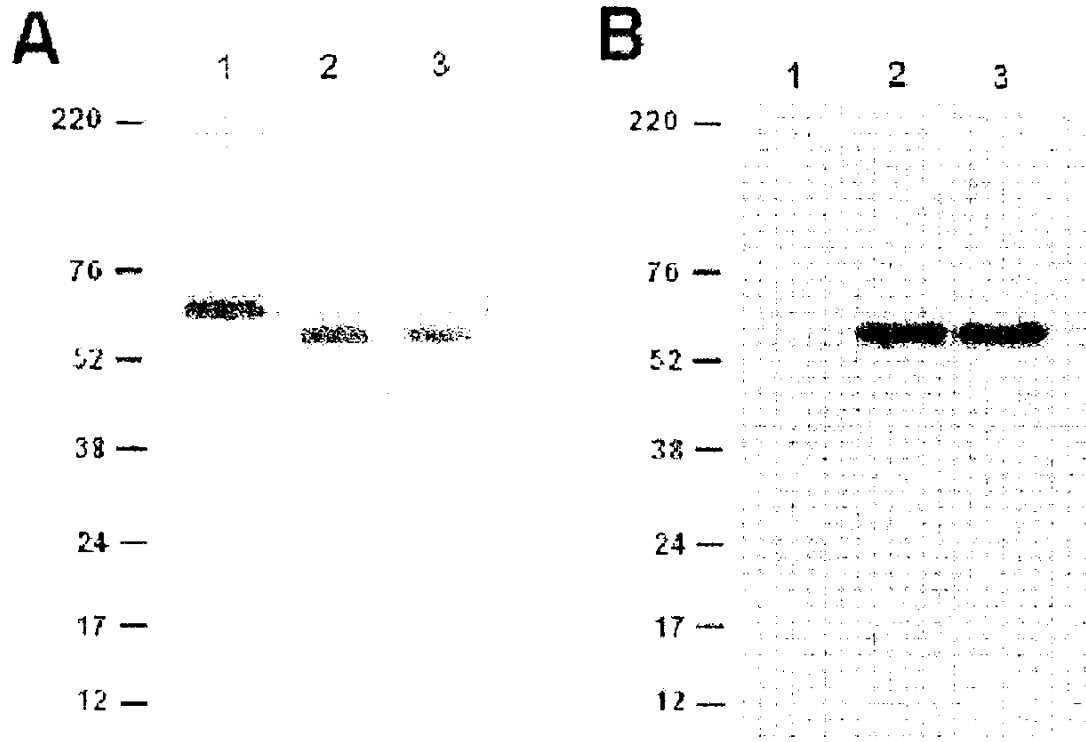


Şekil 15

Şekil 16



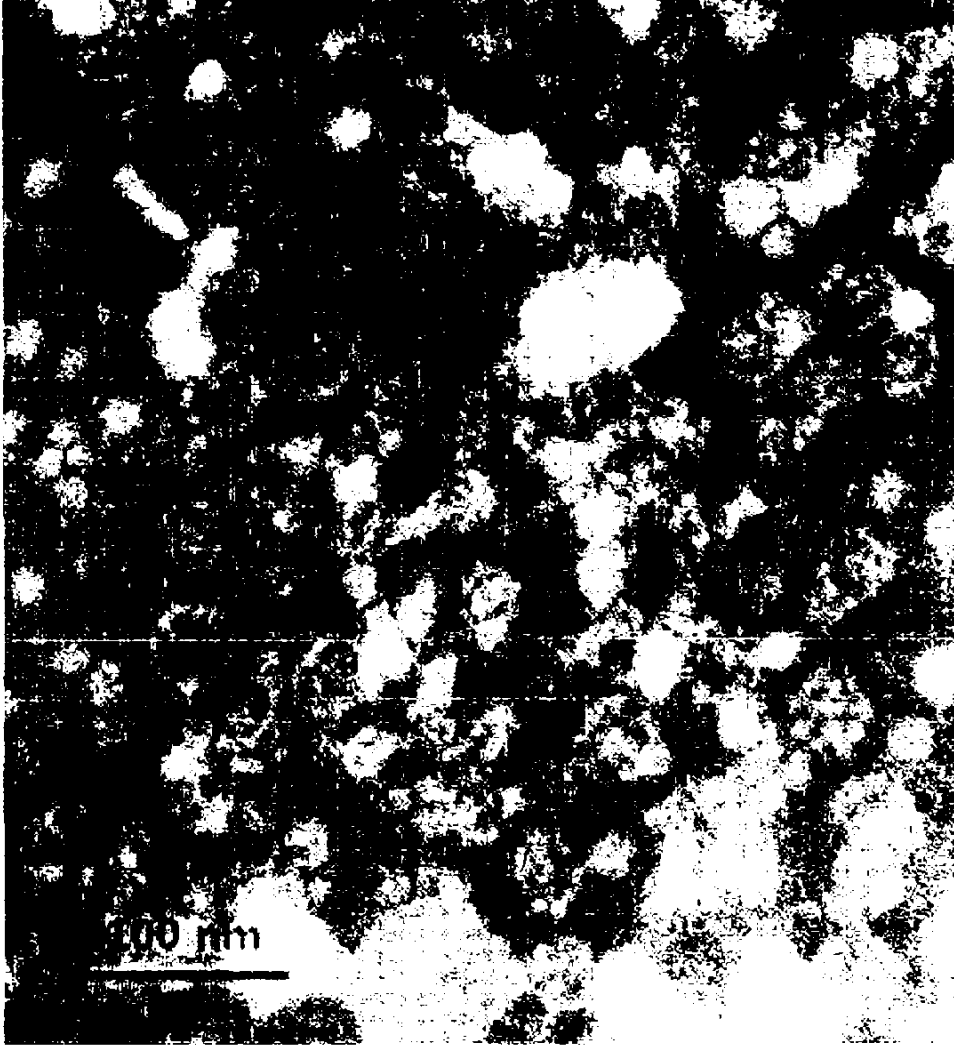
Şekil 17



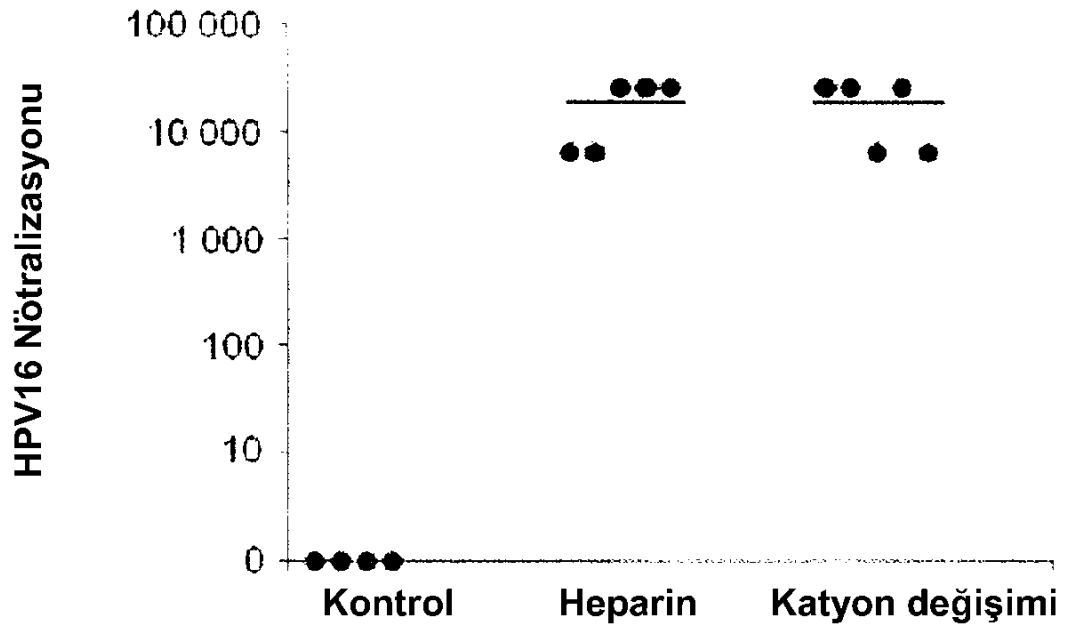
Şekil 18



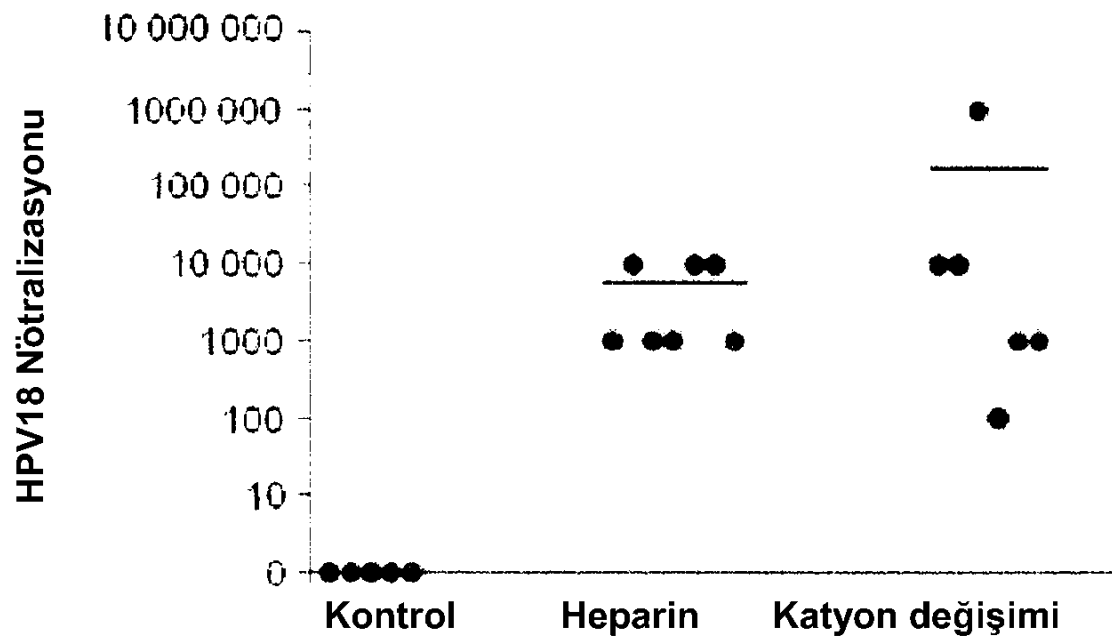
Şekil 19



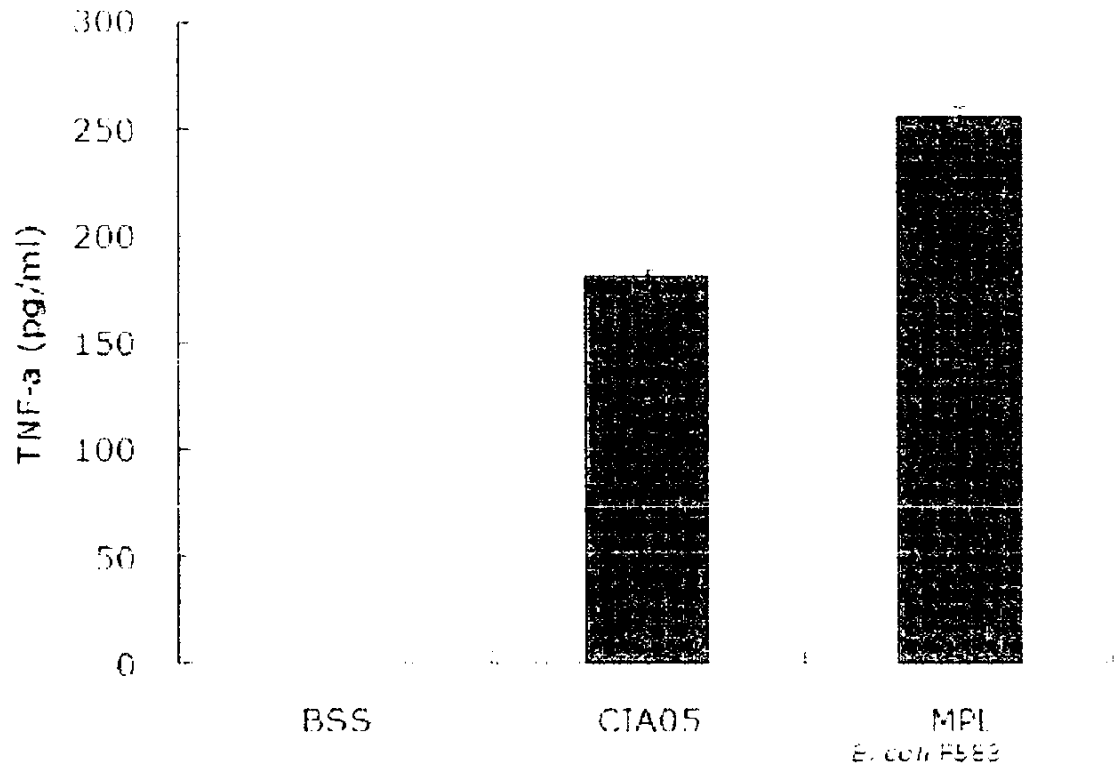
Şekil 20



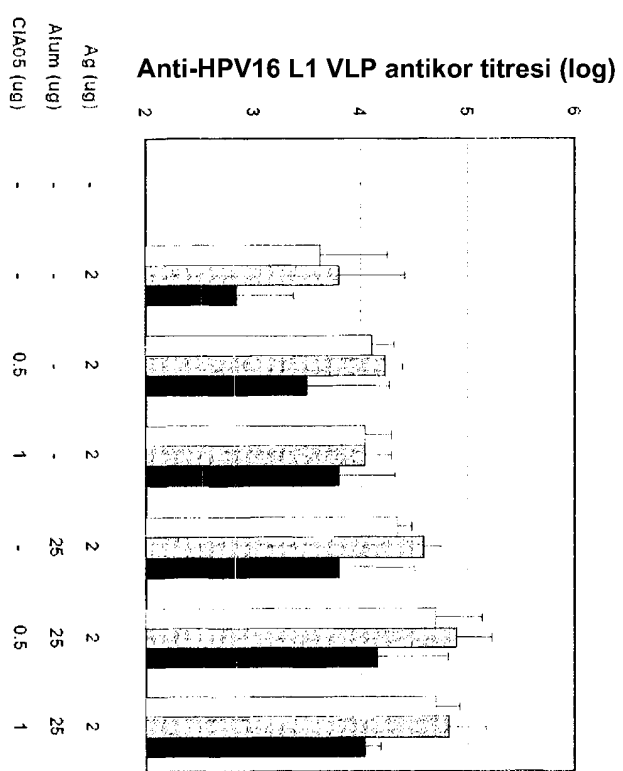
Şekil 21



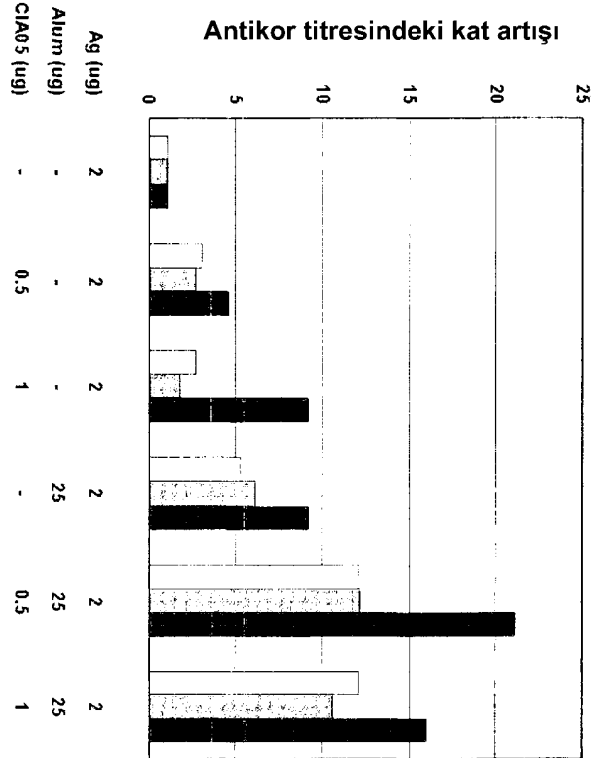
Şekil 22



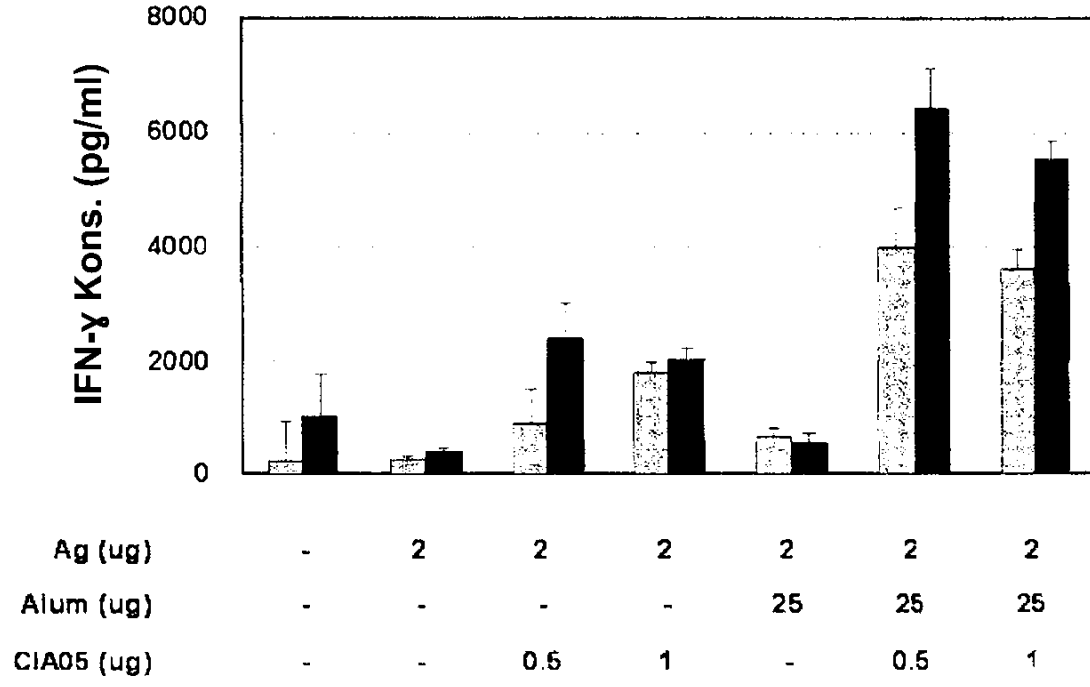
Şekil 23



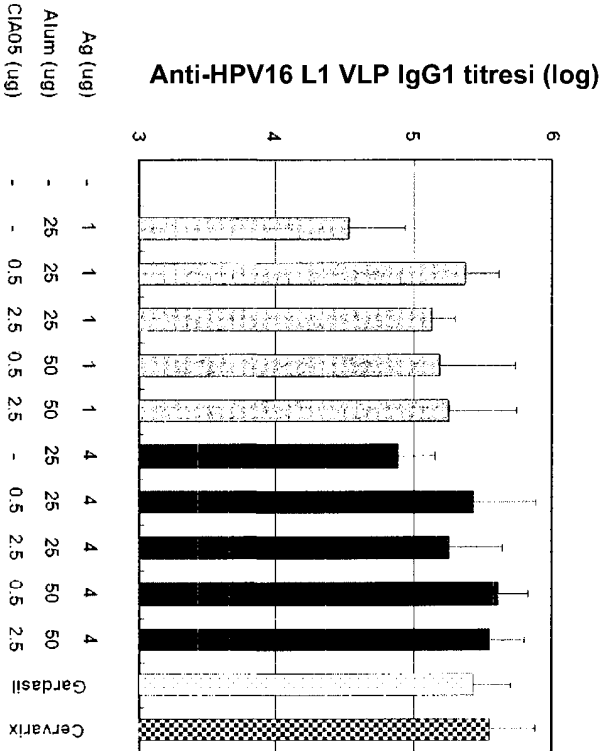
Şekil 24



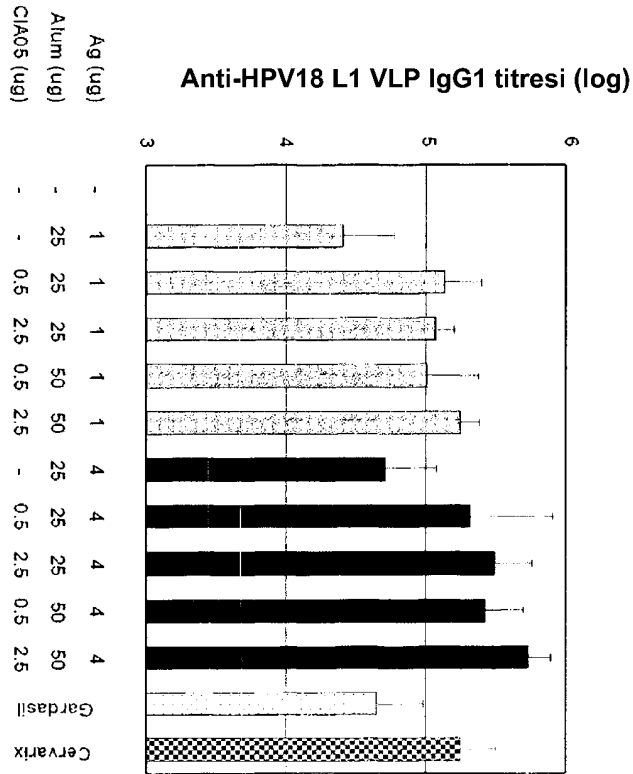
Şekil 25



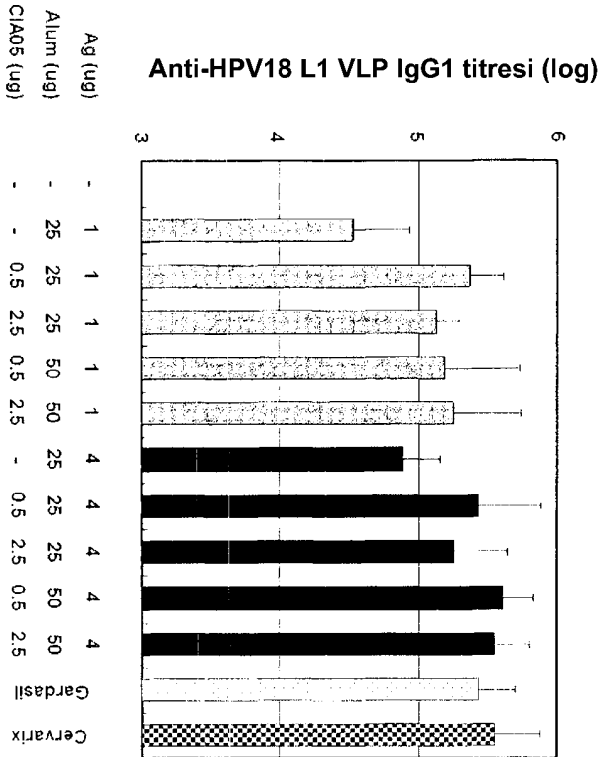
Şekil 26



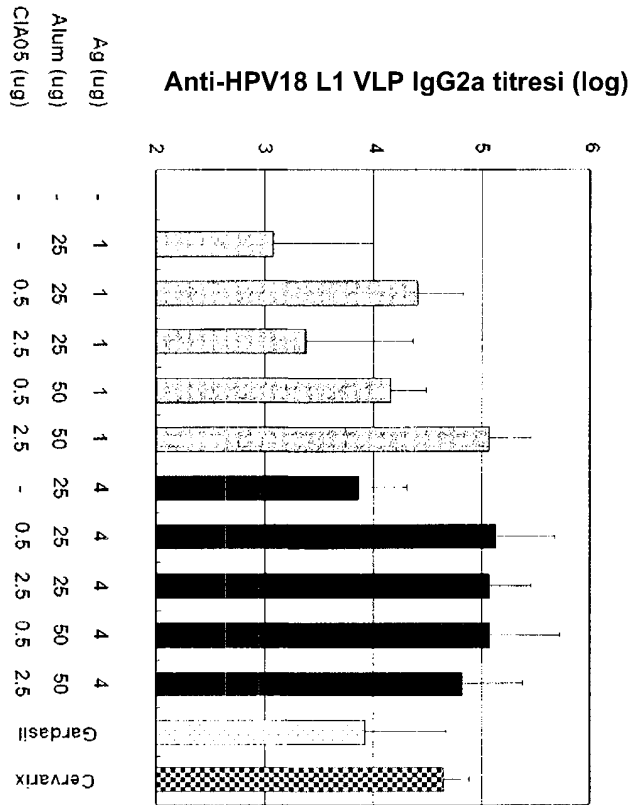
Şekil 27



Şekil 28



Şekil 29



Şekil 30

