ÖZET

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNİ TEDAVİ ETMEK İÇİN AJANLAR

ER proteini ekspresyonu ve/veya PgR proteini ekspresyonu bulunmayan ve/veya HER2 proteini aşır ekspresyonu göstermeyen meme kanseri hücreleri (yani üçlü negatif meme kanseri hücreleri, bazal benzeri), bir anti-KAAG1 antikoru ile etkin bir şekilde hedef alınabilir ve o antikorla birlikte taşınan bir terapötik moietenin hücrelere teslim edilmesi yoluyla öldürülebilirler. Dolayısıyla, KAAG1'e spesifik bağlanan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanları, bahsi geçen markerlerden en az biri bakımından negatif olan meme kanseri hücrelerinin tespiti ve terapötik tedavisi için kullanılabilirler. Burada konu edilen ve açıklanan, üçlü negatif meme kanseri ve/veya bazal benzeri meme kanserinin tedavisinde antikor konjugatlarının kullanımıdır.

İSTEMLER

1. Üçlü negatif meme kanserinin tedavisinde kullanım için bir terapötik moieteye konjuge olan ve böbrek ile ilişkili antijen 1'e (KAAG1) spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan bir antikor veya onun bir antijen-bağlanma fragmanı olup, burada söz konusu antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı, SEKANS KOD NO.: 49'da gösterildiği gibi olan bir CDRH1, SEKANS KOD NO.: 50'de veya SEKANS KOD NO.: 212'de gösterildiği gibi olan bir CDRH2, SEKANS KOD NO.: 51'de gösterildiği gibi olan bir CDRH3, SEKANS KOD NO.: 52'de gösterildiği gibi olan bir CDRL1, SEKANS KOD NO.: 53'te gösterildiği gibi olan bir CDRL2 ve SEKANS KOD NO.: 54'te gösterildiği gibi olan bir CDRL3 içerir.

2. İstem 1'e uygun kullanım için antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı kanser hücrelerinin yüzeylerine bağlanır.

3. İstem 1 veya 2'ye uygun kullanım için antikor veya onun-antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı KAAG1'in 30 ilâ 84 sayılı amino asitleri arasında yer alan bir epitopa bağlanır.

4. İstemler 1 ilâ 3'ten herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun-antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı bir monoklonal antikor, bir

kimerik antikor, bir insan antikoru veya bir hümanize antikordur ya da bunlardan birinin bir antijen-bağlanma fragmanıdır.

5. İstemler 1 ilâ 4'ten herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun-antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı bir kemoterapötik veya bir sitotoksik ajan ile birlikte kullanılır.

6. İstemler 1 ilâ 5'ten herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun-antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı SEKANS KOD NO.: 48'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 46'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi içerir.

7. İstemler 1 ilâ 5'ten herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun-antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı, X ile gösterilen amino asitlerden en az birinin SEKANS KOD NO.: 48'de gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olduğu ve dolayısıyla bir amino asit ikamesini teşkil ettiği SEKANS KOD NO.: 186'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve X ile gösterilen amino asitlerden en az birinin SEKANS KOD NO.: 46'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olduğu ve dolayısıyla bir amino asit ikamesini teşkil ettiği SEKANS KOD NO.: 191'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi içerir.

8. İstemler 1 ilâ 5 ve 7'den herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun-antijen-bağlanma fragmanı olup, burada hafif zincir değişken bölgesi SEKANS KOD NO.: 187'de gösterildiği gibidir ve burada ağır zincir değişken bölgesi SEKANS KOD NO.: 192'de gösterildiği gibidir.

9. İstemler 1 ilâ 5, 7 ve 8'den herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun-antijen-bağlanma fragmanı olup, burada hafif zincir değişken bölgesi SEKANS KOD NO.: 188'de gösterildiği gibidir ve burada ağır zincir değişken bölgesi SEKANS KOD NO.: 193'te gösterildiği gibidir.

10. İstemler 1 ilâ 5 ve 7 ilâ 9'dan herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun antikor-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı şunları içerir:

a. SEKANS KOD NO.: 189 veya SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 194, SEKANS KOD NO.: 195, SEKANS KOD NO.: 196 veya SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

b. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

c. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

d. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

e. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

f. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

g. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi; veya

h. SEKANS KOD NO.: 199 veya SEKANS KOD NO.: 200'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 202, SEKANS KOD NO.: 203, SEKANS KOD NO.: 204 veya SEKANS KOD NO.: 205'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi.

11. İstemler 1 ilâ 5 ve 8 ilâ 10'dan herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun antikor-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı şunları içerir:

a. SEKANS KOD NO.: 199'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir ve SEKANS KOD NO.: 202'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir;

b. SEKANS KOD NO.: 199'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir ve SEKANS KOD NO.: 203'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir;

c. SEKANS KOD NO.: 199'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir ve SEKANS KOD NO.: 204'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir;

d. SEKANS KOD NO.: 199'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir ve SEKANS KOD NO.: 205'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir;

e. SEKANS KOD NO.: 200'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir ve SEKANS KOD NO.: 202'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir;

f. SEKANS KOD NO.: 200'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir ve SEKANS KOD NO.: 203'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir;

g. SEKANS KOD NO.: 200'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir ve SEKANS KOD NO.: 204'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir; veya

h. SEKANS KOD NO.: 200'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir ve SEKANS KOD NO.: 205'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir.

12. İstem 1'e uygun kullanım için antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı olup, burada terapötik moiete bir sitotoksik ajandır.

13. İstem 1'e uygun kullanım için antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı olup, burada terapötik moiete bir anti-mitotik bileşiktir.

14. İstemler 1 ilâ 5 ve 8 ilâ 10'dan herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı KAAG1'e yönelik 1 nM veya daha düşük ya da 0,1 nM veya daha düşük bir afiniteye sahiptir.

15. İstemler 1 ilâ 5, 8 ilâ 10 ve 12 ilâ 14'ten herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı bir hücrenin içine internalize edilir.

16. İstemler 1 ilâ 15'ten herhangi birine uygun kullanım için antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı olup, burada antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı bir anti-kanser ajanı ile birlikte kullanılır.

25494

TARİFNAME

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNİ TEDAVİ ETMEK İÇİN AJANLAR

ARKA PLAN

Günümüzde dünya genelinde her yıl bir milyondan fazla kadına meme kanseri tanısı konmaktadır. Meme kanseri, bir histolojik sınıflandırma sistemi yardımıyla birbirlerinden ayırt edilen düzinelerce farklı tipi bulunan epey heterojen bir hastalıktır. Büyük bir alt-tip ve vakaların büyük çoğunluğu histolojik bakımdan luminal A veya luminal B adıyla tanımlanmakta olup, bunları sırasıyla düşük dereceli veya yüksek dereceli bir histolojiyle östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu sergileyen gruplar olarak sınıflandırmak mümkündür (Santana-Davila and Perez, 2010). ER-pozitif durum ile birlikte söz konusu olduğunda bir tümörün hormona cevap veren bir tümör olarak sınıflandırılmasına neden olan progesteron reseptörü (PgR) ekspresyonunu ölçmek için immünohistokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, immünohistokimya veya floresans *in situ* hibridizasyona (FISH) başvurularak, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) aşırı ekspresyonunu veya amplifikasyonunu izlemek mümkündür. Genelde meme tümörlerinde bu üç markerin eksprese olduğunun gözlemlenmesi daha iyi bir klinik sonuç alınacağına dair bir bulgu olarak kabul edilir, çünkü hastaların yönlendirilebilecekleri, bu proteinleri hedef alan bir dizi tedavi seçeneği mevcuttur (de Ruijter et

al., 2011) ve bunlar arasında tamoksifen, Arimidex™ (anastrozol), Aromasin™ (eksemestan), Femara™ (letrozol), Faslodex™ (fulvestrant), Herceptin™ (trastuzumab) ve Tykerb™ (lapatinib) sayılabilir.

Meme kanserinin bir diğer histolojik alt-tipi, başka ortak bulgular da söz konusu olmakla birlikte temelde daha yüksek bir histolojik derece, mitotik indeks artışı ve yüksek bir Ki67 ekspresyonu ile ilişkilendirilen bazal benzeri kanserlerden oluşur (Santana-Davila and Perez, 2010). Bazal benzeri kanserlerin büyük çoğunluğu, tanı konmuş olan bütün meme kanseri vakalarının %15 ilâ %20'sine tekabül eden üçlü negatif meme kanseri (TNBC) vakalarından meydana gelir (Ismail-Khan and Bui, 2010). TNBC; ER ve PgR protein ekspresyonu yönünden eksikliğin söz konusu olduğu ve HER2 protein aşırı ekspresyonunun bulunmadığı vakaları tanımlamak için kullanılır. Bazal benzeri kanser ile TNBC arasındaki ilişki kolayca tarif edilemez, çünkü ne bütün TNBC vakaları bazal benzeridir ne de bütün bazal benzeri kanserler TNBC'dir, fakat bu kategorilere dâhil olan vakaların yaklaşık %75'i bu kategorilerin her ikisinin de karakteristiklerini taşır. TNBC, düşük beş yıllık sağ kalım oranları ve yüksek nüks riskinden meydana gelen zayıf bir prognoz ile ilişkilendirilir.

TNBC bulunan hastalar, diğer meme kanseri alt-tiplerine kıyasla bu hastalığa yaşamlarının daha erken bir safhasında yakalanırlar ve genelde menopoz öncesi dönemde tanı alırlar (Carey et al., 2006). Bazal benzeri meme kanseri alt-tipine benzer şekilde üçlü negatif meme kanseri de, diğer meme karsinomu alt-tiplerine kıyasla

tedaviden sonra daha yüksek bir nüks eğilimi gösterir ve diğer alt-tiplere göre genel olarak daha saldırgan bir profile sahiptir (Nofech-Mozes et al., 2009). Sonuç olarak, TNBC hastalarının genel beş yıllık sağ kalımı, diğer meme kanseri alt-tiplerinin bulunduğu hastalarda gözlemlenen sağ kalımdan istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde düşüktür. Günümüzde TNBC'ye özgü kabul edilebilir bir moleküler marker bulunmamaktadır. Bu eksikliğe rağmen, kemoterapi uygulandığında bu tümörlerden cevap alınmaktadır (Kriege et al., 2009). Hastalar, 5-florourasil, doksorubisin ve siklofosfamid gibi ajanlar kullanıldığında, hem adjuvan tedavide hem de neoadjuvan tedavide sitotoksik ajanlara karşı daha iyi bir cevap profili göstermişlerdir (Rouzier et al. 2005). Bir miktar etkinlik gösterdiği gözlemlenen diğer ajanlar arasında, sisplatin gibi platin bazlı bileşikler ve taksanlar gibi anti-tübülin bileşikleri bulunur (Santana-Davila and Perez, 2010).

Yukarıda belirtildiği gibi, TNBC için özel olarak hedef alınabilecek bir unsur yoktur, fakat bu eksiklik, hedef ajanlarla deneme yapılmasını, örneğin Poli [ADP-riboz] polimeraz 1'in (PARP1) inhibe edilmesine dayalı çalışmalar yapılmasını engellememiştir. PARP1, bozulmuş bulunan DNA iplikçikleri ile ilişki kurmak ve tek iplikçik kırıklarını onarmak için gerekli enzimlerin toplanmasına aracılık etmek suretiyle DNA tek iplikçik kırıklarının onarımında rol oynayan bir enzimdir (de Ruijter et al., 2011). Dolayısıyla bu enzime istinaden geliştirilen strateji, kanser hücrelerinin genetik kararsızlığa, mitotik arreste ve apoptoza yol açacak olan daha fazla sayıda DNA tek iplikçik kırığı biriktirmelerine olanak sağlamak adına PARP aktivitesini inhibe etmek olmuştur. Hücre bölünmesinin gerektiği gibi

gerçekleşmesi için gerekli önemli genetik idame ve homolog rekombinasyon aracıları olan *BRCA1* ve/veya *BRCA2*'de mutasyonlar sergileyen hastalarda ümit vadeden klinik sonuçlara ulaşılmıştır. Bu genetik kararlılık yolakları yönünden muhtemelen bir yetersizlik veya zayıflığın söz konusu olduğu *BRCA1* mutasyonları bulunan hastalar, *BRCA1* yönünden yabani tip olan kişilere kıyasla gerçekten de PARP1 inhibitörlerine karşı daha iyi bir cevap profili sergilemişlerdir (Fong et al.,2009). *BRCA* mutasyonu taşıyan TNBC hastalarında PARP1'i hedef almaya dayalı bir yaklaşımın ümit vadeden bir stratejiyi temsil ettiği açıktır. Dolayısıyla, ER/PgR/HER2 durumu ile *BRCA1/2* genlerinin genetik profilinin birlikte ele alındığı bir karakterizasyon süreci, TNBC hastaları için uygun tedavi seçeneklerinin belirlenmesi isteniyorsa en iyi tercih olabilir.

İster monoklonal antikorlar ister küçük moleküllü inhibitörler olsunlar EGFR inhibitörlerinin ya da VEGF'yi hedef alan anti-anjiyogenik bileşiklerin kullanıldığı başka stratejiler de mercek altına alınmıştır. Yapılan bir dizi klinik deney ile bu bileşiklerin etkinlikleri değerlendirilmiş, fakat bu bileşikler arasından herhangi bir bileşiğin tek başına uygulandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir cevap elde edilmesini sağlayabildiği gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte, bu inhibitörlerin başka sitotoksik ajanlar ile birlikte uygulandıkları hastalarda hafif bir etkinlik gözlemlenmiştir (Santana-Davila and Perez, 2010).

Son dönemde meme kanserinin çok daha iyi anlaşıldığı ve tedavi yönünden ilerlemeler kaydedilmiş olduğu gerçek olmakla birlikte, kemoterapi kullanımı her halükarda ciddi advers reaksiyonlara sebep

olmakta, bu da kemoterapinin kullanımını sınırlamaktadır. Sonuç olarak, antijen doku spesifitesinin monoklonal antikorların selektivitesi ile bir araya getirilmesi gibi daha spesifik stratejilere ihtiyaç vardır ve bu tür stratejiler sayesinde hedef dışı yan etkilerin görülmesinde anlamlı bir azalma sağlanacağı açıktır. Monoklonal antikorlar ile hedef alınabilecek terapötik unsurlar olarak günümüzde araştırma aşamasında olan TNBC'ye özgü herhangi bir antijen yoktur. Dolayısıyla, TNBC tümörlerinde eksprese olan belli bir protein markerini özel olarak hedef alan bir strateji geliştirmek günümüzde mümkün olmadığı için TNBC hastalarının fazla seçeneği yoktur. Yeni tanı markerleri olarak ve yeni spesifik hedefli tedavilerde istifade edilebilecek TNBC'de eksprese olan yeni proteinlerin belirlenip tanımlanmasına acil ihtiyaç vardır.

Sahip olduğu protein sekansı burada SEKANS KOD NO.: 2 olarak sunulmakta olan böbrek ile bağlantılı antijen 1 (KAAG1), ilk olarak bir histokompatibilite lökosit antijeni-B7 renal karsinom hücre hattından türetilmiş bir cDNA kütüphanesinden sitotoksik T lenfositlerine sunulan bir antijenik peptid olarak klonlanmıştır (Van den Eynde et al., 1999; Genebank erişim no. Q9UBP8; cDNA sekansı, SEKANS KOD NO.: 1'deki 738-992 sayılı nükleotidler ile temsil edilmektedir). *KAAG1*'i içeren lokusun zıt iplikçiklerde her iki yönde de transkribe olan iki geni kodladığı tespit edilmiştir. Sens iplikçiğin, DCDC2 adı verilen bir proteini kodlayan bir transkripti kodladığı saptanmıştır. Bu araştırmacılar tarafından yürütülen ekspresyon çalışmalarında, *KAAG1* antisens transkriptinin tümör-spesifik olduğu ve normal dokularda çok düşük bir ekspresyon seviyesi sergilediği, diğer yandan *DCDC2* sens transkriptinin ise her yerde eksprese

olduğu kaydedilmiştir (Van den Eynde et al., 1999). Kanser hastalıklarında ve özellikle de yumurtalık kanseri, böbrek kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, meme kanseri ve melanomda *KAAG1* transkripti ekspresyonu, WO 2007/147265 patent numarasıyla 27 Aralık 2007 tarihinde yayımlanmış olan PCT/CA2007/001134 sayılı uluslararası başvuruda ortaya konmuş ve açıklanmıştır. Van den Eynde ve arkadaşları, ayrıca böbrek karsinomları, kolorektal karsinomlar, melanomlar, sarkomlar, lösemiler, beyin tümörleri, tiroid tümörleri, meme karsinomları, prostat karsinomları, özofagus karsinomları, mesane tümörü, akciğer karsinomları ve baş ve boyun tümörlerinde de RNA ekspresyonu gözlemlemişlerdir. Kısa bir süre önce, *VMP/DCDC2/KAAG1* lokusunun disleksi ile ilişkili olduğunun saptanmış olduğu bağlantı dengesizliği çalışmalarında kuvvetli genetik kanıt ve bulgular elde edilmiştir (Schumacher et al., 2006; Cope et al., 2005). Bu raporlardan birinde, *DCDC2* markerinin disleksik hastalarda hastalıktan sorumlu protein olduğuna, zira bu proteinin kortikal nöron migrasyonundaki işlevinin sıklıkla anormal nöral migrasyon ve matürasyon sergiledikleri gözlemlenen bu tür hastaların semptomları ile uyumlu olduğuna dikkat çekilmiştir (Schumacher et al., 2006).

Başvuru Sahibi, KAAG1 proteinine bağlanan bir grup antikor ve antijen-bağlanma fragmanı elde etmiştir. Bu antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarının 1 ilâ 35 sayılı amino asitler, 36 ilâ 60 sayılı amino asitler ve 61 ilâ 84 sayılı amino asitlerden oluşan proteindeki üç bölgeyi hedef aldıkları ortaya konmuştur. Buluşu Sahibi, elde edilen antikorlar arasından 30 ile 84 sayılı amino asitler arasında kalan bir bölgeyi hedef alan antikorların, tümör hücrelerinin yüzeyi üzerinde

yer alan KAAG1'i tanıyıp algıladıkları için terapötik amaçlarla kullanım yönünden en faydalı ve avantajlı antikorlar olduklarını saptamıştır. Buluş Sahibi, bu antikorlar ile antijen-bağlanma fragmanlarından bazılarının antikor-bağımlı hücre sitotoksisitesine aracılık edebileceklerini ve/veya tümör hücreleri tarafından internalize edildiklerini, dolayısıyla bu antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarının tümör hücrelerine yük bindirmek için iyi birer aday olduklarını göstermiştir. Bunların yanı sıra, Buluş Sahibi, seçtiği antikor adayları temelinde kimerik ve hümanize antikorlar üretmiş ve bu antikorların tümör hücrelerinin oluşumunu ve işgalini inhibe edebileceklerini göstermiştir (bkz: WO 2010/060186 patent numarasıyla 3 Haziran 2010 tarihinde yayımlanmış olan PCT/CA2009/001586 ve WO 2011/054112 patent numarasıyla 12 Mayıs 2011 tarihinde yayımlanmış olan PCT/CA2010/001785). Ayrıca US 2011/0223107 sayılı patent yayınında da KAAG1'e spesifik bağlanan monoklonaal antikorlar tanımlanmakta ve açıklanmaktadır. Son olarak Buluş Sahibi, bu antikorların yumurtalık kanseri, cilt kanseri, böbrek kanseri, kolorektal kanser, sarkom, lösemi, beyin tümörü, tiroid tümörü, meme kanseri, prostat kanseri, özofagus tümörü, mesane tümörü, akciğer tümörü ve baş ve boyun tümörü ve bu kanser çeşitlerinin metastazlı formlarının tedavisi ve tanısında kullanılabileceklerini tespit etmiştir.

Buluş sahibi, yaptığı çalışmalar sonucunda, ER proteini ekspresyonu ve/veya PgR proteini ekspresyonu yönünden eksiklik sergileyen ve/veya HER2 proteini aşırı ekspresyonu bulunmayan meme kanseri hücrelerinin (yani üçlü negatif meme kanseri hücreleri, bazal benzeri), KAAG1'e spesifik bağlanan bir antikor veya antijen-bağlanma

fragmanı ile verimli bir şekilde hedef alınabileceklerine işaret eden beklenmedik bir bulguya ulaşmıştır. Dolayısıyla, anti-KAAG1 antikorları, bu markerlerden en az biri bakımından negatif durumda olan meme kanseri hücrelerinin tespitinde ve terapötik tedavisinde kullanılabilirler.

ŞEKİLLERE DAİR KISA AÇIKLAMALAR

Şekil 1a, murin ve hümanize hafif zincirlerin 3A4 değişken domainleri arasında yapılmış bir amino asit sekansı hizalamasıdır. Hafif zincirin iki hümanize varyantı (Lh1 ve Lh2) vardır. CDR'ler kalın yazı stili ile gösterilmekte olup, sırasıyla CDRL1, CDRL2 ve CDRL3 olarak adlandırılmışlardır. Hümanize sekanslarda insan çerçeve bölgelerinde bulunmakta olup murin amino asitlerini teşkil eden geri mutasyonların altı çizilidir.

Şekil 1b, murin ve hümanize ağır zincirlerin 3A4 değişken domainleri arasında yapılmış bir amino asit sekansı hizalamasıdır. Ağır zincirin dört hümanize varyantı (Hh1 ilâ Hh4) vardır. CDR'ler kalın yazı stili ile gösterilmekte olup, sırasıyla CDRH1, CDRH2 ve CDRH3 olarak adlandırılmışlardır. Hümanize sekanslarda insan çerçeve bölgelerinde bulunmakta olup murin amino asitlerini teşkil eden geri mutasyonların altı çizilidir.

Şekil 2a, ClustalW2 programı (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948) kullanılarak murin 3A4 hafif zincir değişken bölgesi (SEKANS KOD NO.: 4) ile bir hafif zincir değişken bölge varyantı (SEKANS

KOD NO.: 189) arasında yapılmış olan bir sekans hizalaması olup, burada "*" (yıldız işareti), tam olarak korunmuş tek bir artığın bulunduğu pozisyonlara işaret etmektedir, burada ":" (iki nokta üst üste), önemli ölçüde benzer özelliklere sahip olan, Gonnet PAM 250 matrisine göre > 0,5 skorlar veren gruplar arasında korunmanın söz konusu olduğu pozisyonlara işaret etmektedir ve burada "." (nokta), zayıf kuvvette benzer özelliklere sahip olan, Gonnet PAM 250 matrisine göre ≤ 0,5 skorlar veren gruplar arasında korunmanın söz konusu olduğu pozisyonlara işaret etmektedir.

Şekil 2b, ClustalW2 programı (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948) kullanılarak murin 3A4 ağır zincir değişken bölgesi (SEKANS KOD NO.: 2) ile bir ağır zincir değişken bölge varyantı (SEKANS KOD NO.: 194) arasında yapılmış olan bir sekans hizalaması olup, burada "*" (yıldız işareti), tam olarak korunmuş tek bir artığın bulunduğu pozisyonlara işaret etmektedir, burada ":" (iki nokta üst üste), önemli ölçüde benzer özelliklere sahip olan, Gonnet PAM 250 matrisine göre > 0,5 skorlar veren gruplar arasında korunmanın söz konusu olduğu pozisyonlara işaret etmektedir ve burada "." (nokta), zayıf kuvvette benzer özelliklere sahip olan, Gonnet PAM 250 matrisine göre ≤ 0,5 skorlar veren gruplar arasında korunmanın söz konusu olduğu pozisyonlara işaret etmektedir.

Şekil 3a, pKCR5-3A4-HC-Varyant 1'in plazmid haritasını temsil etmektedir. Hümanize 3A4 varyantlarının ağır zincirleri, pK-CR5'in *Hind*III yerine aynı şekilde klonlanmışlardır. Sonuç olarak elde edilen

plazmidler, ağır zincir immünoglobulin değişken domaininin sekansı dışında pKCR5-3A4-HC varyant 1 ile özdeştirler.

Şekil 3b, pMPG-CR5-3A4-LC-Varyant 1'in plazmid haritasını temsil etmektedir. 3A4 antikorunun hümanize varyantları 1 ile 2'nin hafif zincirleri, pMPG-CR5'in BamHI yerine aynı şekilde klonlanmışlardır. Sonuç olarak elde edilen plazmid, hafif zincir immünoglobulin değişken domaininin sekansı dışında pMPG-CR5-3A4-LC-Varyant 1 ile özdeştir.

Şekil 4, CHO hücrelerinde geçici transfeksiyondan sonra antikor üretimine dair yapılan bir analizi temsil etmektedir. Hümanize 3A4 antikorunun hafif ve ağır zincirlerinin farklı kombinasyonları ile transfekte edilen CHOcTA hücrelerinin (transfeksiyondan 13 gün sonra elde edilen) üst fazı, Western blot ile analiz edilmiştir. Western blot bantları bilinen bir standardın (insan saflaştırılmış IgG antikoru) seyreltisine karşı tarandıktan sonra üst fazlardaki üretilmiş antikor miktarı belirlenmiştir. Mr, molekül ağırlığı işaretidir (kDa).

Şekil 5, rekombinan KAAG1 numunesinde Superdex G75 ile yapılan jel filtrasyonunun sonuçlarının gösterildiği bir grafiktir. KAAG1, jel filtrasyonunun üzerine enjekte edilmiş ve 0,4 ml/dakika hızla ayrılmıştır. En büyük pik, 15-19 sayılı fraksiyonlar arasında yer almaktadır.

Şekil 6, 3A4 antikorunun murin ve hümanize varyantlarına ilişkin hız ve afinite sabitlerinin listelendiği bir Tablodur.

Şekil 7a, hümanize antikorların birleşme hızlarının (K_a) gösterildiği bir histogramdır.

Şekil 7b, hümanize antikorların ayrışma hızlarının (K_d) gösterildiği bir histogramdır.

Şekil 7c, hümanize antikorların afinite sabitlerinin (K_D) gösterildiği bir histogramdır.

Şekil 8a'da, bir ELISA bünyesinde KAAG1'e bağlanan hümanize 3A4 varyantları gösterilmektedir. Bu şekilde, 3A4 hümanize antikor varyantları ile murin 3A4'ünün bağlanma profilleri karşılaştırmalı olarak sergilenmektedir. Lh1 hafif zincir varyantı ile birleştirilmiş hümanize ağır zincirlerin (Hh1, Hh2, Hh3 ve Hh4) konsantrasyon-bağımlı bağlanma profilleri.

Şekil 8b'de, bir ELISA bünyesinde KAAG1'e bağlanan hümanize 3A4 varyantları gösterilmektedir. Bu şekilde, 3A4 hümanize antikor varyantları ile murin 3A4'ünün bağlanma profilleri karşılaştırmalı olarak sergilenmektedir. Lh2 hafif zincir varyantı ile birleştirilmiş hümanize ağır zincirlerin (Hh1, Hh2, Hh3 ve Hh4) konsantrasyon-bağımlı bağlanma profilleri.

Şekil 9'da, kanser hücrelerinin yüzeyi üzerinde bulunan KAAG1'e bağlanan hümanize 3A4 varyantları gösterilmektedir. Bu şekilde, hümanize ve murin 3A4 antikorlarının permeabilize edilmemiş SKOV-3 yumurtalık kanseri hücreleri üzerinde ortaya koydukları bağlanma aktiviteleri karşılaştırmalı olarak sergilenmektedir.

Şekil 10'da, meme kanseri hastalarından elde edilmiş 139 biyopsi numunesinin bulunduğu bir doku mikro-dizisinde yapılan bir tarama gösterilmektedir. Numuneler, 3A4 anti-KAAG1 antikoru ile blotlanmış olup, meme tümörlerinin büyük çoğunluğunun KAAG1 antijenini çok yüksek düzeylerde eksprese ettiği gözlemlenmiştir. Doğrulanan TNBC numuneleri, bir yıldız işareti ile işaretlenmişlerdir.

Şekil 11'de, 3A4 anti-KAAG1 antikoru (histogramdaki mavi çubuklar) veya bir kontrol IgG'si (kırmızı çubuklar) ile inkübe edilmiş olan MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, BT-20, BT-549, T47D, MCF-7 ve 293-6E hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilen akış sitometrisinin sonuçları gösterilmektedir. Bunlar, üç defa tekrarlanan bir deneyden elde edilen temsili sonuçlardır. TNBC hücre hatları, bir yıldız işareti ile işaretlenmişlerdir.

Şekil 12, akış sitometrisinde MDA-MB-231 hücrelerinin yüzeyleri üzerinde 3A4 anti-KAAG1 antikoru ile KAAG1 antijenine dair yapılan tespit ve tayini temsil etmektedir. Hücreler 37°C sıcaklıkta inkübe edildiklerinde floresans sinyalinin zaman içinde azaldığı görülmekte olup, bu bulgu, hücreler 3A4 ile birlikte inkübe edildiklerinde KAAG1/antikor kompleksinin inkübasyon esnasında internalize edilmiş olduğuna işaret etmektedir.

Şekil 13, akış sitometrisinde MDA-MB-436 hücrelerinin yüzeyleri üzerinde 3A4 anti-KAAG1 antikoru ile KAAG1 antijenine dair yapılan tespit ve tayini temsil etmektedir. Hücreler 37°C sıcaklıkta inkübe edildiklerinde floresans sinyalinin zaman içinde azaldığı

görülmekte olup, bu bulgu, hücreler 3A4 ile birlikte inkübe edildiklerinde KAAG1/antikor kompleksinin inkübasyon esnasında internalize edilmiş olduğuna işaret etmektedir.

Şekil 14, akış sitometrisinde BT-20 hücrelerinin yüzeyleri üzerinde 3A4 anti-KAAG1 antikoru ile KAAG1 antijenine dair yapılan tespit ve tayini temsil etmektedir. Hücreler 37°C sıcaklıkta inkübe edildiklerinde floresans sinyalinin zaman içinde azaldığı görülmekte olup, bu bulgu, hücreler 3A4 ile birlikte inkübe edildiklerinde KAAG1/antikor kompleksinin inkübasyon esnasında internalize edilmiş olduğuna işaret etmektedir.

Şekil 15, akış sitometrisinde T47D hücrelerinin yüzeyleri üzerinde 3A4 anti-KAAG1 antikoru ile KAAG1 antijenine dair yapılan tespit ve tayini temsil etmektedir. Hücreler 37°C sıcaklıkta inkübe edildiklerinde floresans sinyalinin zaman içinde azaldığı görülmekte olup, bu bulgu, hücreler 3A4 ile birlikte inkübe edildiklerinde KAAG1/antikor kompleksinin inkübasyon esnasında internalize edilmiş olduğuna işaret etmektedir.

Şekil 16, 3A4 anti-KAAG1 antikoru ve anti-LAMP1 antikoruyla canlı MDA-MB-231 hücrelerinde elde edilen immünofloresans verilerini temsil etmektedir. Sol panelde anti-KAAG1 antikoru ile ilişkili immünofloresans sinyali, orta panelde LAMP1 ile ilişkili immünofloresans sinyali ve sağ panelde söz konusu iki görüntünün birleştirilmiş hali gösterilmektedir. Bu veriler, KAAG1 ile LAMP1'in peri-nükleer alan yakınlarında birlikte bulunduklarını göstermektedir.

Şekil 17, 3A4 anti-KAAG1 antikoru ve anti-LAMP1 antikoruyla canlı MDA-MB-231 hücrelerinde elde edilen immünofloresans verilerini temsil etmektedir. Sol panelde anti-KAAG1 antikoru ile ilişkili immünofloresans sinyali, orta panelde LAMP1 ile ilişkili immünofloresans sinyali ve sağ panelde söz konusu iki görüntünün birleştirilmiş hali gösterilmektedir. Bu veriler, KAAG1'in bir geç endozom/lizozom markeri olan LAMP1 ile birlikte bulunduğunu göstermektedir.

BULUŞUN ÖZETİ

Bu buluş, üçlü negatif meme kanserinin tedavisinde kullanım için bir terapötik moieteye konjuge olan ve böbrek ile ilişkili antijen 1'e (KAAG1) spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan bir antikor veya onun bir antijen-bağlanma fragmanı ortaya koymakta olup, burada söz konusu antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı, SEKANS KOD NO.: 49'da gösterildiği gibi olan bir CDRH1, SEKANS KOD NO.: 50'de veya SEKANS KOD NO.: 212'de gösterildiği gibi olan bir CDRH2, SEKANS KOD NO.: 51'de gösterildiği gibi olan bir CDRH3, SEKANS KOD NO.: 52'de gösterildiği gibi olan bir CDRL1, SEKANS KOD NO.: 53'te gösterildiği gibi olan bir CDRL2 ve SEKANS KOD NO.: 54'te gösterildiği gibi olan bir CDRL3 içerir.

Buluşun tercih edilen yapıları istemlerde ortaya konmaktadır.

Burada açıklanan, bu yönde bir ihtiyacı olan bir bireyde (*in vitro* veya *in vivo* ortamda) kanseri veya kanser hücrelerini tedavi etmeye veya tespit etmeye yönelik bir yöntemdir.

Bu buluşa göre, tedavi, KAAG1'e bağlanma kabiliyetine sahip olan ve bir bir terapötik moieteye konjuge olan bir antikorla veya onun bir antijen-bağlanma fragmanıyla gerçekleştirilir.

Yukarıda bu yönde bir ihtiyacı olan bir birey olarak atıf yapılan birey, örneğin kanser hastalığı bulunan veya kanser hastalığı bulunduğundan şüphelenilen bir birey olabilir. Bu gibi bir bireyde, bir meme karsinomundan kaynaklanan bir kanser veya kanser hücreleri bulunabilir.

Bahsi geçen kanser veya kanser hücrelerinin kaynağı, daha somut ifade etmek gerekirse, üçlü negatif veya bazal benzeri olarak karakterize edilen bir meme karsinomu olabilir.

Dolayısıyla, burada açıklanan tedavi veya belirleme yöntemlerinden fayda sağlayabilecek olan bireyler arasında, meme karsinomundan mustarip olan bireyler sayılabilir.

Meme karsinomunda, östrojen reseptörü ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş olduğu tümör hücreleri bulunabilir.

Meme karsinomunda, prosgesteron reseptörü ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş olduğu tümör hücreleri bulunabilir.

Meme karsinomunda, Her2 ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş olduğu tümör hücreleri bulunabilir.

Meme karsinomunda, Her2 aşırı ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş olduğu tümör hücreleri bulunabilir.

Daha somut ifade etmek gerekirse, meme karsinomunda, 1) östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş olduğu, 2) östrojen reseptörü ekspresyonunun azalmış ve yitirilmiş ve Her2 aşırı ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş olduğu, 3) progesteron reseptörü ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş ve Her2 aşırı ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş olduğu ya da 4) östrojen reseptörü ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş, progesteron reseptörü ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş ve Her2 aşırı ekspresyonunun azalmış veya yitirilmiş olduğu tümör hücreleri bulunabilir.

Daha da somutlaştırmak gerekirse, meme karsinomunda, 1) östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü ekspresyonunun yitirilmiş olduğu, 2) östrojen reseptörü ekspresyonunun yitirilmiş ve Her2 aşırı ekspresyonunun yitirilmiş olduğu, 3) progesteron reseptörü ekspresyonunun yitirilmiş ve Her2 ekspresyonunun yitirilmiş olduğu ya da 4) östrojen reseptörü ekspresyonunun yitirilmiş, progesteron reseptörü ekpresyonunun yitirilmiş ve Her2 ekspresyonunun yitirilmiş olduğu tümör hücreleri bulunabilir.

Bu buluşa göre, bireyde, üçlü negatif olarak karakterize edilen meme kanseri hücreleri ya da bir üçlü negatif meme kanseri olarak kategorize edilen bir tümör bulunuyor olabilir.

Bu buluşa göre, bireyde, bazal benzeri olarak karakterize edilen meme kanseri hücreleri ya da bir bazal benzeri meme kanseri olarak kategorize edilen bir tümör bulunuyor olabilir.

Bir anti-KAAG1 ile yürütülecek bir tedaviden fayda sağlayabilecek olan diğer bireyler arasında, bir epitel-mezenkimal geçiş (EMT) fenotipi sergileyen tümör hücrelerinin bulunduğu bir karsinoma sahip olan bireyler bulunur.

Yaygın kullanılan EMT moleküler markerlerine örnek olarak, E-kaderin, sitokeratin ve β-kateninin (membrandaki) ekspresyonlarının azalmış olması ve/veya Snail, Slug, Twist, ZEB1, ZEB2, N-kaderin, vimentin, α-düz kas aktini, matris metalloproteinazlar ve benzerlerinin ekspresyonlarının artmış olması gösterilebilir (örneğin bkz: Kalluri and Weinberg, The Journal of Clinical Investigation, 119(6), p1420-1428; 2009; Fassina et al., Modern Pathology, 25; p86-99; 2012; Lee et al., JCB; 172; p973-981; 2006). Bir EMT fenotipi, migrasyon ve invazyon kapasitesinde ve anoikis/apoptoza dirençte söz konusu olan bir artış ile de ayırt edilebilir. Dolayısıyla, epitel-mezenkimal geçişe uğrayan hücreler, epitel markerler yönünden söz konusu olan bir azalmanın ve mezenkimal markerlerin veya EMT fenotiplerinin saptanması yoluyla tespit edilebilirler.

Bu buluşa göre, terapötik amaçlı kullanım, örneğin, bu yönde bir ihtiyacı olan bir bireye KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanının uygulanmasını içerir. İhtiyaç sahibi olan birey, tercihen, ER ekspresyonu ve/veya PgR ekspresyonu yönünden bir eksikliğin söz konusu olduğu ve/veya

HER2 proteini aşırı ekspresyonunun bulunmadığı tümörlere sahip olan bireyler arasından seçilir. Bu markerlere yönelik klinik testler, genelde histopatolojik yöntemler (immünohistokimya, FISH ve benzeri) kullanılarak ve/veya gen ekspresyon çalışmaları ile gerçekleştirilirler (örneğin bkz: Dent et al, 2007, Bernstein and Lacey, 2011). Dolayısıyla, ihtiyaç sahibi olan birey, üçlü negatif meme kanseri veya bazal benzeri meme kanseri tanısı almış olan bir birey olabilir. İhtiyaç sahibi olan birey, hormonal tedaviye ve/veya transtuzumab tedavisine (veya başka anti-Her2 antikorlar ile yapılan tedavilere) cevap vermeyen bir birey olabilir. Alternatif olarak, ihtiyaç sahibi olan birey, epitel-mezenkimal geçişe uğrama kabiliyetine sahip olan ya da bir mezenkimal fenotip edinmiş olan tümör hücrelerinin bulunduğu bir birey olabilir.

Burada açıklanan, bu yönde bir ihtiyacı olan bir bireye KAAG1 aktivitesi veya ekspresyonunu inhibe eden bir inhibitör uygulamak suretiyle üçlü negatif meme kanseri veya bazal benzeri meme kanserini tedavi etmeye yönelik bir yöntemdir.

Bu buluşa göre, bahsi geçen KAAG1 inhibitörü, burada açıklanan bir antikoru veya onun bir antijen-bağlanma fragmanını içerebilir.

Yine bu buluşa göre, KAAG1 inhibitörü, SEKANS KOD NO.: 1'i veya onun bir fragmanını tamamlayıcı bir nükleotid sekansı içerebilir. Daha somut ifade etmek gerekirse, KAAG1 inhibitörü, SEKANS KOD NO.: 1'in (sınır pozisyonlar dâhil) 738 ilâ 992 sayılı nükleotidlerini veya onun bir fragmanını tamamlayıcı bir nükleotid sekansı içerebilir. Örnek vermek gerekirse, inhibitörde, SEKANS

KOD NO.: 1'i tamamlayıcı veya SEKANS KOD NO.: 1'in (sınır pozisyonlar dâhil) 738 ilâ 992 sayılı nükleotidlerini tamamlayıcı en az 10 adet ardışık dizili nükleotid (en az 15, en az 20) bulunabilir. KAAG1 inhibitörü için verilebilecek daha somut bir örnek, SEKANS KOD NO.: 1'in ekspresyonunu inhibe eden bir siRNA'dır.

Uygun antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları arasında, tümör hücrelerinin yüzeyleri üzerindeki KAAG1'e bağlanma kabiliyetine sahip olanlar bulunur. Bu gibi antikorlar veya onların bu gibi antijen-bağlanma fragmanlarının KAAG1'in sınır pozisyonlar dahil 30 ilâ 84 sayılı amino asitleri içinde yer alan bir epitopa bağlanan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları olmaları tercih edilebilir.

Alternatif olarak, bu antikorlar veya onların antijen-bağlanma fragmanları, KAAG1'in (sınır pozisyonlar dâhil) 36 ilâ 60 sayılı amino asitleri veya (sınır pozisyonlar dâhil) 61 ilâ 84 sayılı amino asitleri içinde bulunan bir epitopa bağlanan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları olabilirler.

Bahsi geçen epitopun içinde bulunabileceği veya yer alabileceği bölge için verilebilecek daha somut örnekler arasında, (sınır pozisyonlar dâhil veya hariç) 50 ilâ 70, 50 ilâ 65, 51 ilâ 65, 52 ilâ 65, 53 ilâ 65, 54 ilâ 65, 54 ilâ 64, 54 ilâ 63, 54 ilâ 62, 54 ilâ 61, 54 ilâ 60, 50 ilâ 62, 50 ilâ 61 ve 50 ilâ 60 sayılı amino asitler bulunur.

Bu buluşun bir yapısına göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, KAAG1'in 50 ilâ 70 sayılı amino asitleri içinde yer alan bir epitopa bağlanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

Buluşun bir diğer yapısına göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, KAAG1'in 50 ilâ 62 sayılı amino asitleri içinde yer alan bir epitopa bağlanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

Buluşun yine bir diğer yapısına göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, KAAG1'in 54 ilâ 65 sayılı amino asitleri içinde yer alan bir epitopa bağlanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

Terapötik tedavi için uygun antikorlar arasında, örneğin antikor-bağımlı hücre sitotoksisitesine aracılık eden antikorlar bulunur.

Terapötik tedavi için daha da uygun antikorlar arasında, bir terapötik moieteye konjuge olanlar bulunur.

Bu buluşa göre, antikor, örneğin bir monoklonal antikor, bir kimerik antikor, bir hümanize antikor, bir insan antikoru ya da böyle bir antikorun bir antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Terapötik kullanım

Burada belirtildiği gibi, bu buluş, "üçlü negatif meme kanseri" olarak karakterize edilen bir meme kanserinin bulunduğu bir bireye bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanının uygulanmasını kapsar. Burada bahsi geçen meme kanseri, "bazal benzeri meme kanseri" olabilir.

Bir meme kanserini "üçlü negatif meme kanseri" veya "bazal benzeri meme kanseri" alt-tipi altında sınıflandırırken nelerin esas alınması gerektiği sektörde bilinmekte olup (örneğin bkz: Foulkes et al., N. Engl. J. Med., 2010; 363:1938-1948), örnek olarak aşağıda açıklanan tanımlamalara bakılabilir:

"Bazal benzeri meme kanseri", örneğin, östrojen reseptörlerinin ekspresyonunun söz konusu olmaması veya düşük seviyelerde seyretmesi, Her2 aşırı ekspresyonunun çok düşük bir prevalansa sahip olması ve genelde insan meme dokusunun bazal veya miyoepitel hücrelerinde bulunan genlerin ekspresyonunun söz konusu olması ile karakterize edilen bir heterojen tümör grubunun dâhil olduğu bir meme kanseri alt-tipi şeklinde tariflenebilir. Burada bahsi geçen ekspresyon, mikro-dizi analizi ile belirlenebilir.

"Üçlü negatif meme kanseri", östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve Her2 ekspresyonunun söz konusu olmaması ile karakterize edilen bir tümörün yer aldığı bir kanser hastalığı şeklinde tariflenebilir. Bazı araştırmacılar, tümörleri ancak ve sadece hücrelerin %1'inden azının ER veya PR ekspresyonu yönünden pozitif sonuç vermesi halinde ER veya PR ekspresyonu yönünden negatif kabul ederler; diğer araştırmacılar ise, toplam hücre sayısının %10'una varan sayıda hücreden ekspresyon yönünden pozitif sonuç etmiş olsalar dahi tümörleri ER veya PR ekspresyonu yönünden negatif kabul ederler. HER2-negatiflik durumuna istinaden farklı tanımlar kullanılmıştır. En sık başvurulan iki tanıma göre, *in situ*

hibridizasyondan sonra HER2 geni amplifikasyonunun söz konusu olmadığı 0/1+ veya 2+ immünohistokimya skorunu veren tümörler negatif kabul edilirler. Burada bahsi geçen ekspresyon, özellikle immünohistokimyasal boyama yoluyla belirlenebilir.

Burada konu edilen ve açıklanan, bu yönde bir ihtiyacı olan bir bireye bir KAAG1 inhibitörü uygulamayı içeren bir tedavi yöntemidir. Bu gibi bir KAAG1 inhibitörü, örneğin KAAG1'e spesifik bağlanan bir antikor veya böyle bir antikorun bir antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

En kuvvetli antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarının KAAG1'e yönelik yüksek bir afiniteye sahip olanlar olmaları kuvvetle muhtemeldir. En kuvvetli antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarının bir hücre kompartmanının, örneğin bir lizozom veya bir endozomun içinde internalize edilen antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları olmaları da kuvvetle muhtemeldir.

Buna bağlı olarak, bu buluşun kapsamına giren antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarından özellikle önemli olanları, KAAG1'e yönelik yüksek bir afiniteye sahip olanlardır.

Uygun antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları arasında, tümör hücrelerinin yüzeyleri üzerindeki KAAG1'e yüksek bir afinite ile bağlanma kabiliyeti taşıyan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur. Bu tür yüksek afiniteli antikorlar veya onların antijen-bağlanma fragmanlarının KAAG1'in sınır pozisyonlar dâhil

ilâ 84 sayılı amino asitleri içinde yer alan bir epitopa bağlanmaları tercih edilir.

Alternatif olarak, bu antikorlar veya onların antijen-bağlanma fragmanları, KAAG1'in (sınır pozisyonlar dâhil) 36 ilâ 60 sayılı amino asitleri veya (sınır pozisyonlar dâhil) 61 ilâ 84 sayılı amino asitleri içinde bulunan bir epitopa bağlanan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları olabilirler.

Daha somut ifade etmek gerekirse, yüksek afiniteli antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, örneğin, (sınır pozisyonlar dâhil veya hariç) 50 ilâ 70, 50 ilâ 65, 51 ilâ 65, 52 ilâ 65, 53 ilâ 65, 54 ilâ 65, 54 ilâ 64, 54 ilâ 63, 54 ilâ 62, 54 ilâ 61, 54 ilâ 60, 50 ilâ 62, 50 ilâ 61 veya 50 ilâ 60 sayılı amino asitler içinde yer alan veya bulunan bir epitopa bağlanabilirler.

Bu buluşun bir yapısına göre, yüksek afiniteli antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, KAAG1'in 50 ilâ 70 sayılı amino asitleri içinde yer alan bir epitopa bağlanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

Bu buluşun bir yapısına göre, yüksek afiniteli antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, KAAG1'in 50 ilâ 62 sayılı amino asitleri içinde yer alan bir epitopa bağlanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

Bu buluşun bir yapısına göre, yüksek afiniteli antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, KAAG1'in 54 ilâ 65 sayılı amino asitleri içinde

yer alan bir epitopa bağlanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

Yüksek afiniteli antikorlar dâhil tercih edilen antikorlar arasında, bir hücre veya hücre kompartmanına (örneğin lizozomlar veya endozomlar) internalize olması mümkün olan antikorlar bulunur. Antikorların internalizasyona uygun olup olmadıkları, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bu buluş kapsamında gerçekleştirilen çalışmalara benzer immünofloresans çalışmalarının örnek gösterilebileceği sektörde bilinen uygun bir yöntem ile belirlenebilir.

Bu buluş, 3A4'ün CDR'lerine özdeş CDR'lere sahip olan antikorlar ile ilgilidir. Buna göre, SEKANS KOD NO.: 186 ilâ 188 ve 191 ilâ 193'ten herhangi birinde ortaya konan hafif zincir değişken bölge ve/veya ağır zincir değişken bölge konsensüs sekanslarına ve SEKANS KOD NO.: 46, 48, 189, 190 veya 194 ilâ 198'de ortaya konan spesifik sekanslara sahip olan antikorlar bu buluşun kapsamında yer alırlar. Bunlar arasından, SEKANS KOD NO.: 188 ile 196'dan herhangi birinde ortaya konan hafif zincir değişken bölge ve/veya ağır zincir değişken bölge konsensüs sekanslarına veya SEKANS KOD NO.: 46, 48, 189, 190 veya 194 ilâ 198'de ortaya konan spesifik sekanslara sahip olan antikorlar özellikle üzerinde durulan antikorlardır.

Bu buluşa göre, antikorlar veya onların antijen-bağlanma fragmanları bir terapötik moieteye konjuge edilirler.

Antikorlar veya onların antijen-bağlanma fragmanları bir insan sabit bölgesi içerebilirler. Antikorlar veya onların antijen-bağlanma fragmanlarında bir insan IgG1 sabit bölgesi bulunması tercih edilir. Alternatif olarak, antikorlar veya onların antijen-bağlanma fragmanlarında bir IgG2 sabit bölgesi bulunabilir.

Bu buluşta kullanıma uygun bir antikor, bir küçük moleküllü ilaç, KAAG1 dışındaki bir hedefe bağlanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, bir kemoterapötik veya bir sitotoksik ajanın örnek gösterilebileceği bir anti-kanser ajanı ile birlikte uygulanarak kullanılan ve bir terapötik moiete ile konjuge olan bir KAAG1 antikoru veya bir terapötik moiete ile konjuge olan bir antijen-bağlanma fragmanı da olabilir. KAAG1 antikoru ile birlikte uygulanabilecek anti-kanser ajanlarına verilebilecek örnekler arasında, doksorubisin, taksanlar, anti-anjiyogenik ajanlar, platin tuzları ve PARP inhibitörleri sayılabilir.

Burada açıklanan diğer tedavi yöntemleri arasında, antisens bazlı terapötiklerin (siRNA, antisensler, ribozimler ve benzerleri) örnek gösterilebileceği başka tür KAAG1 inhibitörlerinin uygulanmasına dayalı yöntemler bulunur.

<u>KAAG1'e bağlanan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanları</u>

"Antikor veya antijen-bağlanma fragmanı" terimi ya da "antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanları" gibi benzeri terimler, "hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanı" teriminin örnek

gösterilebileceği "varyant antikor veya antijen-bağlanma fragmanı" gibi terimleri de içine alan bir anlam taşırlar.

"Antikor" terimi, ister monoklonal ister poliklonal olsun intakt antikorlara atıf yapar. "Antikor" terimi, bispesifik antikorların örnek gösterilebileceği multispesifik antikorları da içine alan bir anlam taşır. İnsan antikorları genelde her birinde değişken bölgeler ve sabit bölgeler bulunan iki hafif zincir ile iki ağır zincirden oluşurlar. Hafif zincir değişken bölgesi, yanlarında çerçeve bölgeleri bulunan ve burada sırasıyla CDRL1, CDRL2 ve CDRL3 olarak adlandırılan üç CDR içerir. Ağır zincir değişken bölgesi, yanlarında çerçeve bölgeleri bulunan ve burada sırasıyla CDRH1, CDRH2 ve CDRH3 olarak adlandırılan üç CDR içerir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "antijen-bağlanma fragmanı" terimi, aslen bir antikorun bir kısmını oluşturmakta olup antikorun bağlandığı antijene (örneğin KAAG1, KAAG1'in salgılanan formu veya onların varyantları) bağlanma kabiliyetini o antikordan ayrı olarak da muhafaza edebilen bir veya daha fazla sayıda antikor fragmanına atıf yapar. Bir antikorun sahip olduğu antijene bağlanma fonksiyonunun intakt antikora ait fragmanlarla da hayata geçirilebileceği daha önceden gösterilmiştir. Bir antikorun "antijen-bağlanma fragmanı" teriminin kapsamına giren bağlanma kabiliyetine sahip fragmanlara verilebilecek örnekler arasında, (i) V_L, V_H, C_L ve C_{H1} domainlerinden oluşan bir monovalent fragman olan bir Fab fragmanı; (ii) menteşe bölgesinde yer alan bir disülfür köprüsü ile birbirlerine bağlı iki Fab fragmanı içeren bir bivalent fragman olan bir $F(ab')_2$ fragmanı; (iii) V_H ve C_{H1} domainlerinden oluşan bir Fd fragmanı; (iv) bir antikordaki

antikor kollarından yalnızca biri üzerindeki V_L ve V_H domainlerinden oluşan bir Fv fragmanı; (v) bir V_H domaininden oluşan bir dAb fragmanı (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546) ve (vi) bir izole tamamlayıcılık belirleme bölgesi (CDR), örneğin V_H CDR3 bulunur. Ayrıca, Fv fragmanının iki domaini, yani V_L ile V_H ayrı genler tarafından kodlanıyor olsalar da, bu domainler, rekombinan yöntemler çerçevesinde, V_L ile V_H bölgelerinin eşleştirilip bir araya getirilerek (tek zincirli Fv (scFv) adıyla bilinen) monovalent moleküller oluşturdukları aynı polipeptid zinciri üzerinde uzanmalarını mümkün kılan bir sentetik bağlayıcı yardımıyla birleştirilebilirler (örneğin bkz: Bird et al. (1988) Science 242:423-426; ve Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Bu tür tek zincirli antikorlar da bir antikorun "antijen-bağlanma fragmanı" teriminin kapsamı içinde sayılırlar. Öte yandan, antijen-bağlanma fragmanları arasında, (i) bir immünoglobulin menteşe bölgesi polipeptidine füzyonlu bir bağlanma domaini polipeptidi (örneğin bir ağır zincir değişken bölgesi, bir hafif zincir değişken bölgesi veya bir bağlayıcı peptid aracılığıyla bir hafif zincir değişken bölgesine füzyonlu bir ağır zincir değişken bölgesi), (ii) menteşe bölgesine füzyonlu bir immünoglobulin ağır zincir CH2 sabit bölgesi ve (iii) CH2 sabit bölgesine füzyonlu bir immünoglobulin ağır zincir CH3 sabit bölgesi içeren bağlanma domaini immünoglobulin füzyon proteinleri bulunur. Menteşe bölgesi, dimerizasyonu önlemek adına bir veya daha fazla sayıda sistein artığının serin artıkları ile değiştirilmesi yoluyla modifiye edilebilir. Bu gibi bağlanma domaini immünoglobulin füzyon proteinleri, US 2003/0118592 ve US 2003/0133939 sayılı patent yayınlarında daha ayrıntılı anlatılmakta ve açıklanmaktadırlar. Bu antikor fragmanları, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinen konvansiyonel

teknikler kullanılarak elde edilirler ve bu fragmanlar arasında fonksiyon yönünden tarama yapılması istendiğinde bu taramalar intakt antikorlarda olduğu gibi gerçekleştirilirler.

Tipik bir antijen-bağlanma yeri, bir hafif zincir immünoglobulini ile bir ağır zincir immünoglobulin eşleşmesinin oluşturduğu değişken bölgelerden meydana gelir. Antikor değişken bölgelerinin yapıları birbirleri ile çok tutarlı ve uyumlu olup çok benzer özellikler sergilerler. Bu değişken bölgeler, normalde, aralarında Tamamlayıcılık Belirleme Bölgeleri (CDR'ler) adı verilen üç hiperdeğişken bölgenin yer aldığı nispeten homolog çerçeve bölgelerinden (FR) meydana gelirler. Antijen-bağlanma fragmanının genel bağlanma aktivitesini genelde CDR'lerin sekansları belirler. FR'ler genelde CDR'lerin üç boyut üzerinde doğru konumlanıp hizalanmalarında bir rol oynarlar ve oynadıkları bu rolle antijene bağlanma fonksiyonunun optimum düzeyde ortaya konmasına yardımcı olurlar.

Burada kullanıldığı anlamıyla "yüksek afiniteli" terimi, 10 nM veya daha düşük bir düzeyde olan bir afiniteye atıf yapar. "Yüksek afiniteli" teriminin kapsamına özellikle dâhil olan antikorlar, 5 nM veya daha düşük bir afiniteye sahip olan antikorlardır. "Yüksek afiniteli" terimi ile nitelenebilecek olan antikorların daha somut örnekleri, 1 nM veya daha düşük ya da 0,1 nM veya daha düşük bir afiniteye sahip olan antikorlardır.

Bu buluşa konu olan antikorlar ve/veya antijen-bağlanma fragmanlarının kaynağı örneğin bir fare, bir sıçan veya başka herhangi

bir memeli ya da rekombinan DNA teknolojilerinin örnek gösterilebileceği başka bir kaynak olabilir.

KAAG1 antikorları ilk olarak ilgili antijene yönelik spesifisiteleri esasında Fab kütüphanelerinden izole edilmişlerdir. Fab'ları tam immünoglobulinlere dönüştürmek için başvurulabilecek yöntem örnekleri burada sunulmaktadır.

Burada açıklanan değişken bölgeler istenen türün sabit bölgeleri ile füzyonlanarak, antikorun istenen türe ait efektör hücreler tarafından algılanıp tanınmasına olanak sağlanabilir. Sabit bölgenin kaynağı, örneğin bir IgG1, IgG2, IgG3 veya IgG4 alt-tipi olabilir. Bir sabit bölgenin bir değişken bölge ile aynı çerçeve içinde klonlanması veya sentezlenmesi sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca iyi bilinen bir konudur ve örneğin rekombinan DNA teknolojisinden istifade edilerek gerçekleştirilebilir.

Bu buluşun belirli yapılarında, KAAG1'e bağlanan antikorlar, IgG1, IgG2, IgG3 veya IgG4 alt-tipine mensup antikorlar olabilirler. Buluşun daha spesifik yapıları, IgG1 alt-tipine veya özellikle de insan IgG1 alt-tipine mensup bir antikor ile ilgilidir. Buluşun diğer spesifik yapıları, IgG2 alt-tipine veya özellikle de insan IgG2 alt-tipine mensup bir antikor ile ilgilidir.

Söz konusu antikor, IgG1 alt-tipine veya özellikle de insan IgG1 alt-tipine mensup bir hümanize antikor olabilir. Alternatif olarak, antikor, IgG2 alt-tipine veya özellikle de insan IgG2 alt-tipine mensup bir hümanize antikor olabilir.

Antikor, örneğin antikor-bağımlı hücresel sitotoksisiteye (ADCC) veya kompleman-aracılı sitotoksisiteye (CMC) aracılık etme konusunda biyolojik etkinliğe sahip olabilir veya immün kompleksler ile ilişkili bir antikor olabilir. Standart ADCC aktivitesi, doğal katil (NK) hücrelerin aktive edilmesini içerir ve antikor-kaplı hücrelerin NK hücrelerin yüzeyleri üzerinde bulunan Fc reseptörleri tarafından algılanıp tanınmasına dayanır. Fc reseptörleri, bir hedef hücrenin, somutlaştırmak gerekirse KAAG1 gibi bir antijen eksprese eden bir kanseröz hücrenin yüzeyine bağlanan antikorların Fc domainini, örneğin IgG1 üzerinde bulunan Fc domainini algılayıp tanırlar. NK hücre, IgG'nin Fc reseptörüne bağlandığında, sitokinleri ve sitotoksik granülleri serbest bırakır ve bunlar hedef hücreye girer ve apoptoz tetiklemek suretiyle hücre ölümünü teşvik ederler.

Burada açıklanan, KAAG1'e ya da bir KAAG1 varyantına bağlanan antikorların bulunduğu bir antikor koleksiyonudur. Buluşun belirli yapılarında, söz konusu antikorlar, poliklonal antikorlar, monoklonal antikorlar, örneğin kimerik veya hümanize antikorlar, antikor fragmanları, örneğin antijen-bağlanma fragmanları, tek zincirli antikorlar, domain antikorları ve bir antijen-bağlanma bölgesi bulunan polipeptidlerden oluşan grup içerisinden seçilebilirler.

Buluşun bir özelliğine göre, bu buluşa uygun bir izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, KAAG1 eksprese eden tümör hücreleri veya KAAG1 varyantı eksprese eden tümör hücrelerinin (örneğin ADCC'ye bağlı bir şekilde) ölümünü (eliminasyonunu, yıkımını, lizisini) indükleme kabiliyetine sahip olabilir.

Buluşun bir diğer özelliğine göre, bu buluşa uygun izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanının karakterize edici özelliği, bilhassa KAAG1 veya bir KAAG1 varyantı eksprese eden tümör hücrelerinin yayılımını indirgeme kapasitesi olabilir.

Buluşun bir ek özelliğine göre, bu buluşa uygun izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanının karakterize edici özelliği, KAAG1 veya bir KAAG1 varyantı eksprese eden tümörlerin oluşumunu azaltma veya bozma kapasitesi olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, bir insan antikorundan elde edilmiş olabilecek bir sabit bölgeye ait amino asitler içerebilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir diğer yapısında, izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, bir insan antikorunun çerçeve amino asitlerini içerebilir.

Buluş Sahibi, burada açıklanan amaçlar ile kullanıldıklarında fayda sağlayabilecek olan spesifik antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanları oluşturmuştur.

Aşağıda, oluşturulan ve KAAG1'e spesifik bir şekilde bağlandığı görülmüş olan antikorların bir listesi verilmektedir: 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 ve 3H3. Antikor hafif zincir veya ağır zinciri, değişken bölgeleri veya tamamlayıcılık belirleme bölgelerinin (CDR'ler) sekansları, WO

2010/060186A8 patent numarasıyla 3 Haziran 2010 tarihinde yayımlanmış olan PCT/CA2009/001586 sayılı uluslararası başvuru, WO 2011/054112A1 patent numarasıyla 12 Mayıs 2011 tarihinde yayımlanmış olan PCT/CA2010/001795 sayılı uluslararası başvuru veya WO 2012/129668A1 patent numarasıyla 4 Ekim 2012 tarihinde yayımlanmış olan PCT/CA2012/00296 sayılı uluslararası başvuruda bulunmaktadır.

Burada konu edilen çoğu durumda, CDR'lerin sekansları ayrıca sunulmuş veya koyu yazı stili ile gösterilmiştir.

Bunlar arasından 3D3, 3A4, 3G10 ve 3C4 adı verilen antikorlar, *in vitro* ve/veya *in vivo* biyolojik testler için seçilmişlerdir. 3A4 antikorunun en iyi karakteristiklere sahip olan antikor olduğu görülmüştür. Yaptığımız deneyler temelinde, bir terapötik moieteye (örneğin bir sitotoksik ajan) konjuge halde kullanılan 3A4 antikorunun kanser hücrelerini öldürme konusunda konjuge edilmemiş versiyonundan daha etkin ve etkili olduğu bulunmuştur.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, hafif zincir değişken bölgesinin herhangi bir CDR'sini ya da CDR1, CDR2 ve/veya CDR3'ün bir kombinasyonunu içerebilir. Bunlar arasından seçilmesi özellikle tercih edilebilecek olan CDR3'tür. Bahsi geçen kombinasyonlara örnek olarak, CDRL1 ile CDRL3; CDRL1 ile CDRL2; CDRL2 ile CDRL3 ve CDRL1, CDRL2 ile CDRL3 gösterilebilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir diğer yapısında, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, ağır zincir değişken bölgesinin herhangi bir CDR'sini ya da CDR1, CDR2 ve/veya CDR3'ün bir kombinasyonunu içerebilir. Bunlar arasından seçilmesi özellikle tercih edilebilecek olan CDR3'tür. Bahsi geçen kombinasyonlara örnek olarak, CDRH1 ile CDRH3; CDRH1 ile CDRH2; CDRH2 ile CDRH3 ve CDRH1, CDRH2 ile CDRH3 gösterilebilir.

Bu buluşa göre, antikor veya antije-bağlanma fragmanı, bir CDRL1, bir CDRL2 ve bir CDRL3 arasından en az iki CDR'yi içerebilir.

Yine bu buluşa göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, bir CDRL1, bir CDRL2 ve bir CDRL3 içerebilir.

Yine bu buluşa göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, şunları içerebilir:

a. bir CDRL1, bir CDRL2 ve bir CDRL3 arasından en az iki CDR; ve
b. bir CDRH1, bir CDRH2 ve bir CDRH3 arasından en az iki CDR.

Antikor veya antijen-bağlanma fragmanı daha çok tercihen bir CDRL1, bir CDRL2 ve bir CDRL3 içerebilir.

Antikor veya antijen-bağlanma fragmanı daha çok tercihen bir CDRH1, bir CDRH2 ve bir CDRH3 de içerebilir.

Bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanında hafif zincir değişken bölgesi ile ağır zincir değişken bölgesinden yalnızca biri varsa, bu antikor veya fragman, sektörde bilinen ilgili yöntemler çerçevesinde bir tamamlayıcı değişken bölgeler kütüphanesinde tarama yapılarak yeniden yapılandırılabilir (Portolano et al. The Journal of Immunology (1993) 150:880-887, Clarkson et al., Nature (1991) 352:624-628).

Antikor veya antijen-bağlanma fragmanı örnekleri arasında, 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 ve 3H3 antikorlarının hafif zincirleri ve/veya ağır zincirlerinin CDR'lerini barındıran antikorlar veya fragmanlar bulunur. Daha somut örnekler arasında, 3D3, 3A4, 3C4 ve 3G10 antikorlarının hafif zincirleri ve/veya ağır zincirlerinin CDR'lerini barındıran antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanları bulunur. Bu buluşa göre, antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, 3A4 antikorunun hafif zincir ve ağır zincirinin CDR'lerini barındırırlar. Dolayısıyla bu buluş, 3A4 antikorunun CDR'lerini içeren her türlü monoklonal antikor, kimerik antikor, insan antikoru ve hümanize antikoru içine alan bir kapsama sahiptir.

Bu buluşa göre kullanılabilecek olan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, 3A4 antikorunun CDR'lerini içeren, örneğin SEKANS KOD NO.: 49'da gösterildiği gibi olan bir CDRH1, SEKANS KOD NO.: 50 veya SEKANS KOD NO.: 212'de gösterildiği gibi olan bir CDRH2, SEKANS KOD NO.: 51'de gösterildiği gibi olan bir CDRH3, SEKANS KOD NO.: 52'de gösterildiği gibi olan bir CDRL1, SEKANS KOD NO.: 53'te gösterildiği gibi olan bir CDRL2 ve

SEKANS KOD NO.: 54'te gösterildiği gibi olan bir CDRL3 içeren antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarıdır.

Dolayısıyla bu buluş, KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan ve aşağıda belirtilenlerden oluşan grup içerisinden seçilen sekansları içermeleri mümkün olan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarını içine alan bir kapsama sahiptir:

d. SEKANS KOD NO.: 48'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 46'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

aa. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

bb. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

cc. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

dd. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

ee. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

ff. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

gg. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

hh. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si.

Burada açıklanan, KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan ve aşağıda belirtilenlerden oluşan grup içerisinden seçilen sekansları içermeleri mümkün olan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarıdır:

a. SEKANS KOD NO.: 16'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 18'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

b. SEKANS KOD NO.: 20'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD

NO.: 22'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

c. SEKANS KOD NO.: 24'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 26'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

d. SEKANS KOD NO.: 48'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 46'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

e. SEKANS KOD NO.: 103'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 126'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

f. SEKANS KOD NO.: 104'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 127'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

g. SEKANS KOD NO.: 105'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 128'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

h. SEKANS KOD NO.: 106'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 145'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

i. SEKANS KOD NO.: 107'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD

NO.: 129'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

j. SEKANS KOD NO.: 108'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 130'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

k. SEKANS KOD NO.: 109'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 141'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

l. SEKANS KOD NO.: 110'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 131'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

m. SEKANS KOD NO.: 111'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 134'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

n. SEKANS KOD NO.: 112'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 135'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

o. SEKANS KOD NO.: 113'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 136'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

p. SEKANS KOD NO.: 114'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD

NO.: 133'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

q. SEKANS KOD NO.: 115'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 140'ta gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

r. SEKANS KOD NO.: 116'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 137'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

s. SEKANS KOD NO.: 117'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 144'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

t. SEKANS KOD NO.: 118'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 139'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

u. SEKANS KOD NO.: 119'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 132'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

v. SEKANS KOD NO.: 120'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 142'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

w. SEKANS KOD NO.: 121'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD

NO.: 138'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

x. SEKANS KOD NO.: 122'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 146'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

y. SEKANS KOD NO.: 123'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 153'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

z. SEKANS KOD NO.: 124'te gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 143'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

aa. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

bb. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

cc. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

dd. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD

NO.: 197'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

ee. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

ff. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si;

gg. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si; ve

hh. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si ve/veya SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesinin 3 CDR'si.

Örnek niteliğindeki diğer antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarında, 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 ve 3H3 antikorlarının hafif zincirleri ve/veya ağır zincirleri bulunur. Daha somut örnekler arasında, 3D3, 3A4, 3C4 ve 3G10 antikorlarının hafif zincirleri ve/veya ağır zincirlerini içeren antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları sayılabilir. Buluşa ilişkin daha da somut örnekler arasında, (hümanize olan veya olmayan) 3A4 antikorunun hafif zinciri ve/veya ağır

zincirini barındıran antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur.

Dolayısıyla bu buluş, KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan ve aşağıda belirtilenlerden oluşan grup içerisinden seçilen sekansları içermeleri mümkün olan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarını içine alan bir kapsama sahiptir:

d. SEKANS KOD NO.: 48'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 46'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

aa. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

bb. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

cc. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

dd. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

ee. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi; ve

ff. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi.

Burada açıklanan, KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan ve aşağıda belirtilenlerden oluşan grup içerisinden seçilen sekansları içermeleri mümkün olan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarıdır:

a. (SEKANS KOD NO.: 15'in kodladığı) SEKANS KOD NO.: 16'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya (SEKANS KOD NO.: 17'nin kodladığı) SEKANS KOD NO.: 18'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

b. (SEKANS KOD NO.: 19'un kodladığı) SEKANS KOD NO.: 20'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya (SEKANS KOD NO.: 21'in kodladığı) SEKANS KOD NO.: 22'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

c. (SEKANS KOD NO.: 23'ün kodladığı) SEKANS KOD NO.: 24'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya (SEKANS KOD NO.: 25'in kodladığı) SEKANS KOD NO.: 26'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

d. SEKANS KOD NO.: 48'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 46'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

e. SEKANS KOD NO.: 103'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 126'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

f. SEKANS KOD NO.: 104'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 127'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

g. SEKANS KOD NO.: 105'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 128'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

h. SEKANS KOD NO.: 106'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 145'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

i. SEKANS KOD NO.: 107'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 129'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

j. SEKANS KOD NO.: 108'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 130'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

k. SEKANS KOD NO.: 109'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 141'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

l. SEKANS KOD NO.: 110'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 131'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

m. SEKANS KOD NO.: 111'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 134'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

n. SEKANS KOD NO.: 112'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 135'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

o. SEKANS KOD NO.: 113'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 140'ta gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

p. SEKANS KOD NO.: 114'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 133'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

q. SEKANS KOD NO.: 115'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 140'ta gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

r. SEKANS KOD NO.: 116'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 137'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

s. SEKANS KOD NO.: 117'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 144'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

t. SEKANS KOD NO.: 118'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 139'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

u. SEKANS KOD NO.: 119'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 132'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

v. SEKANS KOD NO.: 120'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 142'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

w. SEKANS KOD NO.: 121'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 138'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

x. SEKANS KOD NO.: 122'de gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 146'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

y. SEKANS KOD NO.: 123'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 147'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

z. SEKANS KOD NO.: 124'te gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 144'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

aa. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

bb. SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

cc. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

dd. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi;

ee. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi; ve

ff. SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olan hafif zincir değişken bölgesi ve/veya SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olan ağır zincir değişken bölgesi.

Burada açıklanan ağır ve/veya hafif zincirlerin çerçeve bölgesinin kaynağı, burada açıklanan antikorlara istinaden örnekleri verilen çerçeve bölgelerinin biri veya birden fazlası olabilir. Dolayısıyla antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, burada açıklanan CDR'lerden (örneğin SEKANS KOD NO.: 72 ilâ 88'de gösterilen spesifik CDR'ler veya konsensüs CDR'leri veya SEKANS KOD NO.: 89-102'de gösterilen CDR varyantları arasından seçilen) birini veya birden fazlasını ve burada açıklanan çerçeve bölgelerinin kaynaklık ettikleri çerçeve bölgelerinden birini veya birden fazlasını içerebilirler. SEKANS KOD NO.: 103-154'te, beklenen CDR'ler koyu yazı stili ile gösterilmekte olup, çerçeve bölgeleri gösterilmemektedir.

Aşağıdaki Tablo 1'de, biyolojik testler için seçilen anti-KAAG1 antikorlarından bazılarının hafif ve ağır zincirlerinin tam ve eksiksiz sekanslarına atıf yapılmaktadır.

Tablo 1

Antikorun adı	**Zincir tipi**	**Nükleotid sekansı (SEKANS KOD NO.:)**	**Amino asit sekansı (SEKANS KOD NO.:)**
3D3	Hafif (L)	3	4
3D3	Ağır (H)	5	6
3G10	Hafif	7	8
3G10	Ağır	9	10
3C4	Hafif	11	12
3C4	Ağır	13	14
Hümanize 3D3	Hafif		166
Hümanize 3D3	Ağır		167
Hümanize 3C4	Hafif		170
Hümanize 3C4	Ağır		171

Hümanize 3A4	Hafif (Lh1)		199
Hümanize 3A4	Hafif (Lh2)		200
Hümanize 3A4	Ağır (Hh1)		202
Hümanize 3A4	Ağır (Hh2)		203
Hümanize 3A4	Ağır (Hh3)		204
Hümanize 3A4	Ağır (Hh4)		205

Yapılan epitop haritalama çalışmaları, 3D3 antikorunun sınır pozisyonlar dâhil 36 ilâ 60 sayılı amino asitlerin içinde yer alan bir KAAG1 epitopu ile etkileşime girdiğini açığa çıkarmışlardır. 3G10 ve 3A4 antikorları sınır pozisyonlar dâhil 61 ilâ 84 sayılı amino asitlerin içinde yer alan bir KAAG1 epitopu ile, 3C4 antikoru ise sınır pozisyonlar dâhil 1 ilâ 35 sayılı amino asitlerin içinde yer alan bir KAAG1 epitopu ile etkileşime girmektedir. 3G10 ile 3A4 benzer bir bölgeye bağlanıyor olmakla birlikte, 3G10 antikoru KAAG1'e 3A4 antikoru kadar etkin bir şekilde bağlanmamaktadır.

Burada sunulan bilgi ve bulgulardan anlaşılabileceği üzere, yukarıda sunulan spesifik kombinasyondaki hafif zincir değişken bölgesi başka herhangi bir hafif zincir değişken bölgesi ile değiştirilebilir. Yukarıda sunulan spesifik kombinasyondaki ağır zincir değişken bölgesi de benzer şekilde başka herhangi bir ağır zincir değişken bölgesi ile değiştirilebilir.

KAAG1'e bağlanan seçilmiş antikorların hafif ve ağır zincir değişken bölgelerinin sekansları aşağıdaki Tablo 2'de açıklanmaktadır.

Tablo 2

Antikorun adı	Değişken bölge tipi	Nükleotid (SEKANS KOD NO.:)	Amino asit (SEKANS KOD NO.:)
3D3	Hafif (VL)	15	16
3D3	Ağır (VH)	17	18
3G10	Hafif	19	20
3G10	Ağır	21	22
3C4	Hafif	23	24
3C4	Ağır	25	26
3A2	Hafif		103
3A2	Ağır		126
3E10	Hafif		106
3E10	Ağır		145
3G12	Hafif		121
3G12	Ağır		138
3A4	Hafif	47	48
3A4	Ağır	45	46
Hümanize 3D3	Hafif		168
Hümanize 3D3	Ağır		169
Hümanize 3C4	Hafif		172
Hümanize 3C4	Ağır		173
Hümanize 3A4	Hafif (Lvh1)		189
Hümanize 3A4	Hafif (Lvh2)		190
Hümanize 3A4	Ağır (Hvh1)		194
Hümanize 3A4	Ağır (Hvh2)		195
Hümanize 3A4	Ağır (Hvh3)		197
Hümanize 3A4	Ağır (Hvh4)		198

SEKANS KOD NO.: 103-154, KAAG1'e bağlandıkları gösterilmiş olan başka antikorların hafif zincir ve ağır zincir değişken bölgelerine tekabül etmektedirler.

KAAG1'e bağlanan seçilmiş antikorların hafif ve ağır zincir değişken bölgelerinin CDR sekansları aşağıdaki Tablo 3'te açıklanmaktadır.

Tablo 3

Antikorun adı	Zincir tipi	CDR	SEKANS KOD NO.:	Amino Asit Sekansı
3D3	Hafif (L)	CDR L1	27	KSSQSLLNSNFQKNFLA
3D3	Hafif	CDR L2	28	FASTRES
3D3	Hafif	CDR L3	29	QQHYSTPLT
3D3	Ağır (H)	CDR H1	30	GYIFTDYEIH
3D3	Ağır	CDR H2	31	VIDPETGNTA
3D3	Ağır	CDR H3	32	MGYSDY
3G10	Hafif	CDR L1	33	RSSQSLLHSNGNTYLE
3G10	Hafif	CDR L2	34	KVSNRFS
3G10	Hafif	CDR L3	35	FQGSHVPLT
3G10	Ağır	CDR H1	36	GYTFTDNYMN
3G10	Ağır	CDR H2	37	DINPYYGTTT
3G10	Ağır	CDR H3	38	ARDDWFDY
3C4	Hafif	CDR L1	39	KASQDIHNFLN
3C4	Hafif	CDR L2	40	RANRLVD
3C4	Hafif	CDR L3	41	LQYDEIPLT
3C4	Ağır	CDR H1	42	GFSITSGYGWH
3C4	Ağır	CDR H2	43	YINYDGHND

3C4	Ağır	CDR H3	44	ASSYDGLFAY
3A2	Hafif	CDR L1	148	KSSQSLLHSDGKTYLN
3A2	Hafif	CDR L2	149	LVSKLDS
3A2	Hafif	CDR L3	150	WQGTHFPRT
3A2	Ağır	CDR H1	151	GYTFTD YNMH
3A2	Ağır	CDR H2	152	YINPYNDVTE
3A2	Ağır	CDR H3	153	AWFGL RQ
3E10	Hafif	CDR L1	154	RSSKSLLHSNGN TYLY
3E10	Hafif	CDR L2	155	RMSNLAS
3E10	Hafif	CDR L3	156	MQHLEYPYT
3E10	Ağır	CDR H1	157	GDTFTD YYMN
3E10	Ağır	CDR H2	158	DINPNYGGIT
3E10	Ağır	CDR H3	159	QAYYRNS DY
3G12	Hafif	CDR L1	160	KASQDVGTAVA
3G12	Hafif	CDR L2	161	WTSTRHT
3G12	Hafif	CDR L3	162	QQHYSIPLT
3G12	Ağır	CDR H1	163	GYIFTDYEIH
3G12	Ağır	CDR H2	164	VIDPETGNTA
3G12	Ağır	CDR H3	165	MGYSDY
3A4	Hafif	CDR L1	52	RSSQSLLHSNGNTYLE
3A4	Hafif	CDR L2	53	TVSNRFS
3A4	Hafif	CDR L3	54	FQGSHVPLT
3A4	Ağır	CDR H1	49	GYTFTDDYMS
3A4	Ağır	CDR H2	50 veya 212	DINPYNGDTNYNQKFKG veya DINPYNGDTN
3A4	Ağır	CDR H3	51	DPGAMDY

Varyant antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanları

Bu buluş, burada açıklanan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarının varyantlarını da içine alan bir kapsama sahiptir. Buluşun kapsamına giren varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, amino asit sekansında bir varyasyon bulunan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarıdır. Örnek vermek gerekirse, buluşun kapsamına giren varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, en az bir adet varyant CDR (iki, üç, dört, beş, altı adet veya daha büyük sayılarda varyant CDR ya da hatta on iki adet varyant CDR) bulunan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarıdır. Varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları arasında, bir varyant hafif zincir değişken bölgesi, bir varyant ağır zincir değişken bölgesi, bir varyant hafif zincir ve/veya bir varyant ağır zincire sahip olan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur. Buluşun kapsamına giren varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, örneğin orijinal antikor veya antijen-bağlanma fragmanına kıyasla benzer düzeyde veya daha gelişmiş bir bağlanma afinitesine sahip olan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarıdır.

Burada kullanıldığı anlamıyla "varyant" terimi, burada açıklanan sekanslardan herhangi biri ile ilgili olabilecek olup, bu terimle atıf yapılabilecek olan unsurlara örnek olarak bir varyant CDR (CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 ve/veya CDRH3), bir varyant hafif zincir değişken bölgesi, bir varyant ağır zincir değişken bölgesi, bir varyant hafif zincir, bir varyant ağır zincir, bir varyant antikor, bir varyant antijen-bağlanma fragmanı ve bir KAAG1 varyantı gösterilebilir.

İkame bazlı mutagenez için en çok tercih edilen yerler hiperdeğişken bölgelerdir (CDR'ler), fakat çerçeve bölgesine ve hatta sabit bölgeye yönelik modifikasyonlar da buluşun kapsamı içinde sayılırlar. SEKANS KOD NO.: 72-102'de örnek CDR varyantları sunulmaktadır.

Konservatif ikameler, aşağıda listelenen gruplardan (1 ilâ 6 numaralı gruplar) biri içinde yer alan (bir CDR, değişken zincir, antikor veya benzeri bir unsura ait) bir amino asidin aynı grup içinde yer alan başka bir amino asit ile değiştirilmesi yoluyla yapılabilirler.

Konservatif ikamelere verilebilecek diğer örnekler, aşağıdaki Tablo 1A'da "tercih edilen ikameler" başlığı altında gösterilmektedirler. Eğer bu tür bir ikame sonucunda istenmeyen bir özellik meydana çıkarsa, o halde Tablo 1A'da "örnek niteliğindeki ikameler" adı altında belirtilen ya da amino asit sınıflarına istinaden aşağıda açıklandığı gibi olan daha büyük değişiklikler yapılabilir ve ürünler taranır.

Sektörde bilindiği üzere ikame bazlı mutagenez yoluyla buluşa konu olan polipeptidlerin biyolojik aktivitesini muhafaza eden varyantlar oluşturmak mümkündür. Bu varyantlarda, orijinal polipeptidin amino asit sekansında yer alan amino asit artıklarından en az birinin yerine farklı bir artık bulunur. Örneğin, ikame bazlı mutagenez için tercih edilen bir yerde, çeşitli farklı türlerden elde edilmiş olan belli artıkların özdeş oldukları bir yer bulunabilir. "Konservatif ikameler" olarak tanımlanan ikame örnekleri Tablo 1A'da gösterilmektedir. Eğer bu tür bir ikame sonucunda istenmeyen bir değişiklik meydana gelirse, o halde Tablo 1A'da "örnek niteliğindeki ikameler" adı altında

belirtilen ya da amino asit sınıflarına istinaden aşağıda açıklandığı gibi olan farklı tür ikameler yapılır ve ürünler taranır.

Fonksiyon veya immünolojik kimliği etkileyen büyük modifikasyonlar, (a) polipeptid omurgasının ikame bölgesindeki yapısını, örneğin yaprak konformasyonunu veya helisel konformasyonu, (b) molekülün hedef yerdeki yükünü ya da hidrofobisitesini ya da (c) yan zincirin büyüklüğünü idame ettirme yönündeki etkileri açısından istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklılık gösteren ikameler seçilerek gerçekleştirilirler. Doğada kendiliğinden oluşan artıklar, ortak yan zincir özellikleri esasında gruplara ayrılırlar:

(grup 1) hidrofobik: Norlösin, Metionin (Met), Alanin (Ala), Valin (Val), Lösin (Leu), İzolösin (Ile);
(grup 2) nötr hidrofilik: Sistein (Cys), Serin (Ser), Treonin (Thr);
(grup 3) asidik: Aspartik asit (Asp), Glutamik asit (Glu);
(grup 4) bazik: Asparajin (Asn), Glutamin (Gln), Histidin (His), Lizin (Lys), Arjinin (Arg);
(grup 5) zincir oryantasyonunu etkileyen artıklar: Glisin (Gly), Prolin (Pro); ve
(grup 6) aromatik: Triptofan (Trp), Tirozin (Tyr), Fenilalanin (Phe).

Konservatif olmayan ikamelerde, bu sınıflardan biri içinde yer alan bir artık başka bir sınıf içinde yer alan bir artıkla değiştirilir.

Tablo 1A. Amino asit ikamesi

Asıl artık	Örnek niteliğindeki ikameler	Konservatif ikameler
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norlösin	Leu
Leu (L)	Norlösin, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norlösin	Leu

Varyant antikor veya antijen-bağlanma fragmanının amino asit sekansındaki varyasyon kapsamında, bir amino asit takviyesi, eksiltmesi, sokması, ikamesi ve benzeri bir değişiklik, bir veya daha fazla sayıda amino aside istinaden omurga veya yan zincirde yapılmış bir veya daha fazla sayıda modifikasyon veya bir grup veya başka bir moleküle (yan zincirler veya omurgadaki) bir veya daha fazla sayıda amino asit eklenmesine dayalı bir değişiklik söz konusu olabilir.

Varyant antikor veya antijen-bağlanma fragmanının amino asit sekansı ile orijinal antikor veya antijen-bağlanma fragmanının amino asit sekansı arasında büyük bir sekans benzerliği ve/veya sekans özdeşliği bulunabilir. Bu iki sekans arasındaki benzerlik derecesi, özdeşliklerin (özdeş amino asitler) ve konservatif ikamelerin yüzdesine dayanır.

Değişken zincirler arasındaki benzerlik derecesi ve özdeşlik, genelde, varsayılan ayarlarda, yani blastp programı, BLOSUM62 matrisi (boşluk açma bedeli 11 ve boşluk uzatma bedeli 1; boşluk_x azaltma 50, beklenen 10,0, sözcük büyüklüğü 3) ve aktif filtreler eşliğinde Blast2 sekans programı (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) kullanılarak belirlenir.

Dolayısıyla yüzde cinsinden özdeşlik, orijinal peptide kıyasla özdeş olan ve aynı veya benzeri bir pozisyonu alabilecek olan amino asitlerin oranını verir. Yüzde cinsinden benzerlik ise, özdeş olan

amino asitler ile orijinal peptidde aynı veya benzer pozisyonda bulunan amino aside göre konservatif amino asit ikamesinin yapılmış olduğu pozisyonların oranını verir.

Dolayısıyla bu buluşa uygun varyantlar arasında, orijinal sekans veya orijinal sekansın bir kısmı ile en az %70, %75, %80, %81, %82, %83, %84, %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 oranında sekans özdeşliğine sahip olan varyantlar bulunur.

Varyantlara verilebilecek örnekler arasında, burada açıklanan bir sekans ile en az %81 oranında sekans özdeşliğine ve bir orijinal sekans veya bir orijinal sekansın bir kısmı ile en az %81, %82, %83, %84, %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 oranında sekans benzerliğine sahip olan varyantlar bulunur.

Diğer varyant örnekleri arasında, burada açıklanan bir sekans ile en az %82 oranında sekans özdeşliğine ve bir orijinal sekans veya bir orijinal sekansın bir kısmı ile en az %82, %83, %84, %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 oranında sekans benzerliğine sahip olan varyantlar bulunur.

Ek varyant örnekleri arasında, burada açıklanan bir sekans ile en az %85 oranında sekans özdeşliğine ve bir orijinal sekans veya bir orijinal sekansın bir kısmı ile en az %85, %86, %87, %88, %89, %90,

%91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 oranında sekans benzerliğine sahip olan varyantlar bulunur.
Varyantlara verilebilecek başka örnekler arasında, burada açıklanan bir sekans ile en az %90 oranında sekans özdeşliğine ve bir orijinal sekans veya bir orijinal sekansın bir kısmı ile en az %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 oranında sekans benzerliğine sahip olan varyantlar bulunur.

İlave varyant örnekleri arasında, burada açıklanan bir sekans ile en az %95 oranında sekans özdeşliğine ve bir orijinal sekans veya bir orijinal sekansın bir kısmı ile en az %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 oranında sekans benzerliğine sahip olan varyantlar bulunur.

Bunlara ek varyant örnekleri arasında, burada açıklanan bir sekans ile en az %97 oranında sekans özdeşliğine ve bir orijinal sekans veya bir orijinal sekansın bir kısmı ile en az %97, %98, %99 veya %100 oranında sekans benzerliğine sahip olan varyantlar bulunur.

Başvuru Sahibi, okuyucunun kolayca referans alabileceği bir özet sunmak adına, bu buluşun kapsamına giren varyant örneklerinin ayrı ayrı listelendiği ve bu varyantlara karşılık gelen yüzde cinsinden sekans özdeşliği ve yüzde cinsinden sekans benzerliği değerlerinin belirtildiği aşağıdaki Tablo 1B'yi oluşturmuştur. Tabloda geçen her "X"in ayrı bir varyantı tanımladığı düşünülmelidir.

Tablo 1B		Yüzde (%) cinsinden sekans özdeşliği																				
		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Yüzde (%)	80	X																				
	81	X	X																			
	82	X	X	X																		
	83	X	X	X	X																	
	84	X	X	X	X	X																
	85	X	X	X	X	X	X															
	86	X	X	X	X	X	X	X														
	87	X	X	X	X	X	X	X	X													
	88	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
	89	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
	90	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
	91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	92	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
	93	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
	94	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	95	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
	96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
	97	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
	98	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	99	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Bu buluş, burada açıklanan sekans ile en az %70 oranında özdeşliğine veya en az %80 oranında özdeşliğine sahip olan CDR'ler, hafif zincir değişken bölgeleri, ağır zincir değişken bölgeleri, hafif zincirler, ağır zincirler, antikorlar ve/veya antijen-bağlanma fragmanlarını içine alan bir kapsama sahiptir.

Dolayısıyla bu buluş, KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan ve aşağıda belirtilenleri içermeleri mümkün olan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarını kapsar:

d. SEKANS KOD NO.: 48 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 46 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi.

Burada konu edilen ve açıklanan, KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan ve aşağıda belirtilenden oluşan grup içerisinden seçilen sekansları içermeleri mümkün olan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarıdır:

a. SEKANS KOD NO.: 16 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 18 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

b. SEKANS KOD NO.: 20 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 22 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

c. SEKANS KOD NO.: 24 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 26 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

d. SEKANS KOD NO.: 48 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 46 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

e. SEKANS KOD NO.: 103 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 126 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

f. SEKANS KOD NO.: 104 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve

SEKANS KOD NO.: 127 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

g. SEKANS KOD NO.: 105 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 128 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

h. SEKANS KOD NO.: 106 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 145 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

i. SEKANS KOD NO.: 107 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 128 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

j. SEKANS KOD NO.: 108 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 130 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

k. SEKANS KOD NO.: 109 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 141 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

l. SEKANS KOD NO.: 110 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 131 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

m. SEKANS KOD NO.: 111 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve

SEKANS KOD NO.: 134 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

n. SEKANS KOD NO.: 112 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 135 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

o. SEKANS KOD NO.: 113 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 136 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

p. SEKANS KOD NO.: 114 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 133 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

q. SEKANS KOD NO.: 115 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 140 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

r. SEKANS KOD NO.: 116 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 137 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

s. SEKANS KOD NO.: 117 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 144 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

t. SEKANS KOD NO.: 118 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve

SEKANS KOD NO.: 139 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

u. SEKANS KOD NO.: 119 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 132 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

v. SEKANS KOD NO.: 120 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 142 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

w. SEKANS KOD NO.: 121 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 138 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

x. SEKANS KOD NO.: 122 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 146 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

y. SEKANS KOD NO.: 123 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 147 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi; ve

z. SEKANS KOD NO.: 124 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 143 ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

Bu buluşa göre, varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, mütekabil hafif zincir ve/veya ağır zincir değişken bölgesindeki CDR'ler ile özdeş olan CDR'ler içerirler. Başka örneklerde, varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları, varyant CDR(ler) içerebilirler.

Dolayısıyla, bir varyant antikor veya antijen-bağlanma fragmanı için verilebilecek örnekler, SEKANS KOD NO.: 16, 20, 24, 103, 106 veya 121 ile en az %70, %75 veya %80 oranında özdeş olan bir sekansın bulunduğu bir hafif zincir değişken bölgesi içeren antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarıdır. Bu gibi bir varyantın CDR'leri, mütekabil varyant olmayan (yabani tip sekanslı) antikor veya antijen-bağlanma fragmanının CDR'leri ile özdeş olabilir veya 1 ilâ 3 adet amino asit bakımından onlardan farklı olabilir.

Bir diğer varyant antikor hafif zincir değişken bölgesi örneği, SEKANS KOD NO.: 16'nın CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 16'nın çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 22 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir hafif zincir değişken bölgesidir. SEKANS KOD NO.: 168'de bir SEKANS KOD NO.: 16 varyantı sunulmaktadır.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor hafif zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 20'nin CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 20'nin çerçeve bölgesine kıyasla

çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 22 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir hafif zincir değişken bölgesidir.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor hafif zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 24'ün CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 24'ün çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 21 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir hafif zincir değişken bölgesidir. SEKANS KOD NO.: 172'de bir SEKANS KOD NO.: 24 varyantı sunulmaktadır.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor hafif zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 103'ün CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 103'ün çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 22 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir hafif zincir değişken bölgesidir.

Örnek gösterilebilecek bir varyant antikor hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 106'nın CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 106'nın çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 22 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir hafif zincir değişken bölgesidir.

Örnek gösterilebilecek bir varyant antikor hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 121'in CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 121'in çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 21 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir hafif zincir değişken bölgesidir.

Bazı durumlarda, varyant antikor hafif zincir değişken bölgesi, (amino asit ikameleri ile birlikte veya amino asit ikameleri olmaksızın) amino asit silmeleri veya eklemeleri içerebilirler. 1, 2, 3, 4 veya 5 adet amino asit silmesi veya eklemesi genelde tolere edilebilir.

Bu buluşa uygun bir varyant antikor veya antijen-bağlanma fragmanı için verilebilecek diğer örnekler, SEKANS KOD NO.: 18, 22, 26, 126, 138 veya 145 ile en az %70, %75 veya %80 oranında özdeş olan bir sekansın bulunduğu bir ağır zincir değişken bölgesi içeren antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarıdır. Bu gibi bir varyantın CDR'leri, mütekabil varyant olmayan (yabani tip sekanslı) antikor veya antijen-bağlanma fragmanının CDR'leri ile özdeş olabilir veya 1 ilâ 3 adet amino asit bakımından onlardan farklı olabilir.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor ağır zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 18'in CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 18'in çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 22 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan

bir ağır zincir değişken bölgesidir. SEKANS KOD NO.: 169'da bir SEKANS KOD NO.: 18 varyantı sunulmaktadır.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor ağır zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 22'nin CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 22'nin çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 23 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir ağır zincir değişken bölgesidir.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor ağır zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 26'nın CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 26'nın çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 23 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir ağır zincir değişken bölgesidir. SEKANS KOD NO.: 173'te bir SEKANS KOD NO.: 26 varyantı sunulmaktadır.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor ağır zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 126'nın CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 126'nın çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 23 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir ağır zincir değişken bölgesidir.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor ağır zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 145'in CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 145'in çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 23 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir ağır zincir değişken bölgesidir.

Örnek gösterilebilecek varyant antikor ağır zincir değişken bölgelerinden biri, SEKANS KOD NO.: 138'in CDR amino asit sekansları ile %100 oranında özdeş CDR amino asit sekanslarına sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 138'in çerçeve bölgesine kıyasla çerçeve bölgesinde örneğin 1 ilâ 22 adet amino asit modifikasyonu (örneğin konservatif olan veya olmayan amino asit ikameleri) bulunan bir ağır zincir değişken bölgesidir.

Bazı durumlarda, varyant antikor ağır zincir değişken bölgesi, (amino asit ikameleri ile birlikte veya amino asit ikameleri olmaksızın) amino asit silmeleri veya eklemeleri içerebilirler. 1, 2, 3, 4 veya 5 adet amino asit silmesi veya eklemesi genelde tolere edilebilir.

Varyant CDR'ler

Burada ayrıca, burada açıklanan CDR'lerden en az birinde (asıl CDR'ye kıyasla) en az bir adet konservatif amino asit ikamesi barındıran değişken zincirlerin bulunduğu polipeptidler, antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanları da açıklanmaktadır.

Bu buluş, CDR'lerinden en az ikisinde (mütekabil orijinal CDR'lere kıyasla) en az bir adet konservatif amino asit ikamesi barındıran değişken zincirlerin bulunduğu polipeptidler, antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarını da içine alan bir kapsama sahiptir.

Bu buluş, CDR'lerinin üçünde de (mütekabil orijinal CDR'lere kıyasla) en az bir adet konservatif amino asit ikamesi barındıran değişken zincirlerin bulunduğu polipeptidler, antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarını da içine alan bir kapsama sahiptir.

Bu buluş, CDR'lerinden en az birinde (mütekabil orijinal CDR'ye kıyasla) en az iki adet konservatif amino asit ikamesi barındıran değişken zincirlerin bulunduğu polipeptidler, antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarını da içine alan bir kapsama sahiptir.

Bu buluş, CDR'lerinden en az ikisinde (mütekabil orijinal CDR'lere kıyasla) en az iki adet konservatif amino asit ikamesi barındıran değişken zincirlerin bulunduğu polipeptidler, antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarını da içine alan bir kapsama sahiptir.

Bu buluş, CDR'lerinden üçünde de (mütekabil orijinal CDR'lere kıyasla) en az iki adet konservatif amino asit ikamesi barındıran değişken zincirlerin bulunduğu polipeptidler, antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarını da içine alan bir kapsama sahiptir.

En üstün karakteristikleri gösteren antikorların hafif zincir değişken bölgeleri veya ağır zincir değişken bölgelerinin amino asit sekansları arasında yaptığımız karşılaştırmalar, CDR'ler içinde ve değişken

bölgeler içinde yer alan konsensüs sekansları elde etmemizi sağlamıştır. CDR'lere ilişkin konsensüs sekansları, SEKANS KOD NO.: 72 ilâ 88'de sunulmaktadır.

Dolayısıyla bu buluş, bir örnekte, aşağıda belirtilenleri içeren bir hafif zincir değişken bölgesinin yer aldığı bir izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanı ortaya koyar:

a. SEKANS KOD NO.: ile SEKANS KOD NO.: 73'ten oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRL1 sekansı;
b. SEKANS KOD NO.: 74, SEKANS KOD NO.: 75 ile SEKANS KOD NO.: 76'dan oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRL2 sekansı; veya
c. SEKANS KOD NO.: 77, SEKANS KOD NO.: 78 ile SEKANS KOD NO.: 79'dan oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRL3 sekansı.

Dolayısıyla bu buluş, bir örnekte, aşağıda belirtilenleri içeren bir ağır zincir değişken bölgesinin yer aldığı bir izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanı ortaya koyar:

a. SEKANS KOD NO.: 80'i içeren bir CDRH1 sekansı;
b. SEKANS KOD NO.: 81, SEKANS KOD NO.: 82, SEKANS KOD NO.: 83, SEKANS KOD NO.: 84 ile SEKANS KOD NO.: 85'ten oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRH2 sekansı; veya

c. SEKANS KOD NO.: 86, SEKANS KOD NO.: 87 ile SEKANS KOD NO.: 88'den oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRH3 sekansı.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRL1 sekansı ihtiva edebilir:

$X_{1a}SSX_{2a}SLLX_{3a}X_{4a}X_{5a}X_{6a}X_{7a}X_{8a}X_{9a}X_{10a}LX_{11a}$ (SEKANS KOD NO.: 72);

burada X_{1a}, bir bazik amino asit olabilir;

burada X_{2a}, bir bazik amin asit olabilir;

burada X_{3a}, H, Y ya da N olabilir;

burada X_{4a}, S, T, N ya da R olabilir;

burada X_{5a}, S ya da N olabilir ya da mevcut olmayabilir;

burada X_{6a}, D, F ya da N olabilir;

burada X_{7a}, G ya da Q olabilir;

burada X_{8a}, K, L ya da N olabilir;

burada X_{9a}, T ya da N olabilir;

burada X_{10a}, bir aromatik amino asit olabilir; ve

burada X_{11a}, A, N, E ya da Y olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{1a}, K ya da R olabilir.

Buluşun bir diğer yapısında, X_{2a}, Q ya da K olabilir.

Buluşun yine bir diğer yapısında, X_{3a}, N ya da H olabilir.

Buluşun bir başka yapısında, X_{10a}, Y ya da F olabilir.

Daha somut örneklerde, X_{1a}'nın K olduğu, X_{2a}'nın Q olduğu, X_{3a}'nın N olduğu, X_{3a}'nın H olduğu, X_{4a}'nın S olduğu, X_{4a}'nın T olduğu, X_{5a}'nın S olduğu, X_{5a}'nın mevcut olmadığı, X_{6a}'anın N olduğu, X_{7a}'nın Q olduğu, X_{7a}'nın G olduğu, X_{8a}'nın K olduğu, X_{9a}'nın N olduğu, X_{9a}'nın T olduğu, X_{10a}'nın Y olduğu ya da X_{11a}'nın A olduğu SEKANS KOD NO.: 72 sekansına sahip olan bir CDRL1 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRL1 sekansı ihtiva edebilir:

$KASQDX_{1b}X_{2b}X_{3b}X_{4b}X_{5b}X_{6b}$ (SEKANS KOD NO.: 73);
burada X_{1b}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{2b}, G ya da H olabilir;
burada X_{3b}, T, N ya da R olabilir;
burada X_{4b}, F, Y ya da A olabilir;
burada X_{5b}, bir hidrofobik amino asit olabilir; ve
burada X_{6b}, N ya da A olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{1b}, V ya da I olabilir.

Buluşun bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{5b}, V ya da L olabilir.

Daha somut örneklerde, X_{1b}'nin I olduğu, X_{2b}'nin H olduğu, X_{3b}'nin T olduğu, X_{3b}'nin N olduğu, X_{4b}'nin Y olduğu, X_{4b}'nin F olduğu, X_{5b}'nin L olduğu ya da X_{6b}'nin N olduğu SEKANS KOD NO.: 73 sekansına sahip olan bir CDRL1 söz konusudur.

SEKANS KOD NO.: 89 ve 90'da, CDRL1'e ilişkin örnek niteliğindeki diğer buluş yapıları sunulmaktadır.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRL2 sekansı ihtiva edebilir:

$FX_{1c}STX_{2c}X_{3c}S$ (SEKANS KOD NO.: 74);
burada X_{1c}, A ya da G'dir;
burada X_{2c}, R ya da T'dir; ve
burada X_{3c}, E, K ya da A'dır.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{1c}, A olabilir ve X_{2c}, T olabilir.

Buluşun bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{1c}, A olabilir ve X_{2c}, R olabilir.

Daha somut örneklerde, X_{1c}'nin A olduğu, X_{2c}'nin R olduğu ya da X_{3c}'nin E olduğu SEKANS KOD NO.: 74 sekansına sahip olan bir CDRL2 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRL2 sekansı ihtiva edebilir:

$X_{1d}VSX_{2d}X_{3d}X_{4d}S$ (SEKANSK KOD NO.: 75);
burada X_{1d}, L ya da K olabilir;
burada X_{2d}, bir bazik amino asit olabilir;
burada X_{3d}, L ya da R olabilir; ve
burada X_{4d}, D ya da F olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{2d}, K ya da N olabilir.

Daha somut örneklerde, X_{1d}'nin L olduğu, X_{2d}'nin K olduğu, X_{3d}'nin L olduğu ya da X_{4d}'nin D olduğu SEKANS KOD NO.: 75 sekansına sahip olan bir CDRL2 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRL2 sekansı ihtiva edebilir:

X_{1e}ANRLVX_{2e} (SEKANS KOD NO.: 76);
burada X_{1e}, bir bazik amino asit olabilir; ve
burada X_{2e}, D ya da A olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{1e}, R ya da H olabilir.

Daha somut örneklerde, X_{1e}'nin R olduğu ya da X_{2e}'nin D olduğu SEKANS KOD NO.: 76 sekansına sahip olan bir CDRL2 söz konusudur.

SEKANS KOD NO.: 91 ilâ 93'te, CDRL2'ye ilişkin örnek niteliğindeki diğer buluş yapıları sunulmaktadır.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRL3 sekansı ihtiva edebilir:

X_{1f}Q$X_{2f}X_{3f}X_{4f}X_{5f}$PLT (SEKANS KOD NO.: 77);
burada X_{1f}, Q ya da L olabilir;
burada X_{2f}, bir aromatik amino asit olabilir;

burada X_{3f}, D, F ya da Y olabilir;
burada X_{4f}, E, A, N ya da S olabilir; ve
buradaX_{5f}, I, F ya da T olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{2f}, Y ya da H olabilir.

Buluşun bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{3f}, Y ya da D olabilir.

Buluşun yine bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{5f}, I ya da T olabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{1f}'nin Q olduğu, X_{2f}'nin H olduğu, X_{3f}'nin D olduğu, X_{3f}'nin Y olduğu, X_{4f}'nin S olduğu, X_{4f}'nin E olduğu, X_{4f}'nin A olduğu, X_{5f}'nin T olduğu ya da X_{5f}'nin I olduğu SEKANS KOD NO.: 77 sekansına sahip olan bir CDRL3 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRL3 sekansı ihtiva edebilir:

$QQHX_{1g}X_{2g}X_{3g}PLT$ (SEKANS KOD NO.: 78);
burada X_{1g}, bir aromatik amino asit olabilir;
burada X_{2g}, N ya da S olabilir; ve
burada X_{3g}, I ya da T olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{1g}, F ya da Y olabilir.
Diğer somut örneklerde, X_{2g}'nin S olduğu ya da X_{3g}'nin T olduğu SEKANS KOD NO.: 78 sekansına sahip olan bir CDRL3 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRL3 sekansı ihtiva edebilir:

$X_{1h}QGX_{2h}HX_{3h}PX_{4h}T$ (SEKANS KOD NO.: 79);
burada X_{1h}, bir aromatik amino asit olabilir;
burada X_{2h}, bir nötr hidrofilik amino asit olabilir;
burada X_{3h}, F ya da V olabilir;
burada X_{4h}, R ya da L olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{1h}, W ya da F olabilir.

Buluşun bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{2h}, S ya da T olabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{1h}'nin W olduğu, X_{2h}'nin T olduğu, X_{3h}'nin F olduğu ya da X_{4h}'nin R olduğu SEKANS KOD NO.: 79 sekansına sahip olan bir CDRL3 söz konusudur.

SEKANS KOD NO.: 94 ve 95'te, CDRL3'e ilişkin örnek niteliğindeki diğer buluş yapıları sunulmaktadır.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH1 sekansı ihtiva edebilir:

$GYX_{1i}FX_{2i}X_{3i}YX_{4i}X_{5i}H$ (SEKANS KOD NO.: 80);
burada X_{1i}, T, I ya da K olabilir;
burada X_{2i}, bir nötr hidrofilik amino asit olabilir;
burada X_{3i}, bir asidik amino asit olabilir;

burada X_{4i}, E, N ya da D olabilir; ve
burada X_{5i}, bir hidrofobik amino asit olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{2i}, T ya da S olabilir.

Buluşun bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{3i}, D ya da E olabilir.

Buluşun yine bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{4i}, N ya da E olabilir.

Buluşun başka bir örnek niteliğindeki yapısında, X_{5i}, M, I ya da v olabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{2i}'nin T olduğu, X_{3i}'nin D olduğu, X_{4i}'nin E olduğu, X_{5i}'nin I olduğu ya da X_{5i}'nin M olduğu SEKANS KOD NO.: 80 sekansına sahip olan bir CDRH1 söz konusudur.

SEKANS KOD NO.: 96 ve 97'de, CDRH1'e ilişkin örnek niteliğindeki diğer buluş yapıları sunulmaktadır.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH2 sekansı ihtiva edebilir:

$X_{1j}X_{2j}DPX_{3j}TGX_{4j}TX_{5j}$ (SEKANS KOD NO.: 81);
burada X_{1j}, V ya da G olabilir;
burada X_{2j}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{3j}, A, G ya da E olabilir;

burada X_{4j}, R, G, D, A, S, N ya da V olabilir; ve
burada X_{5j}, bir hidrofobik amino asit olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{2j}, I ya da L olabilir.

Buluşun bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{5j}, A ya da V olabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{1j}'nin V olduğu, X_{2j}'nin I olduğu, X_{3j}'nin E olduğu, X_{4j}'nin D olduğu ya da X_{5j}'nin A olduğu SEKANS KOD NO.: 81 sekansına sahip olan bir CDRH2 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH2 sekansı ihtiva edebilir:

$VX_{1k}DPX_{2k}TGX_{3k}TA$ (SEKANS KOD NO.: 82);
burada X_{1k}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{2k}, A, E ya da G olabilir; ve
burada X_{3k}, R, G, A, S, N, V ya da D olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{1k}, L ya da I olabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{1k}'nin I olduğu, X_{2k}'nin E olduğu ya da X_{3k}'nin D olduğu SEKANS KOD NO.: 82 sekansına sahip olan bir CDRH2 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH2 sekansı ihtiva edebilir:

$YIX_{1l}X_{2l}X_{3l}GX_{4l}X_{5l}X_{6l}$ (SEKANS KOD NO.: 83);
burada X_{1l}, S ya da N olabilir;
burada X_{2l}, bir aromatik amino asit olabilir;
burada X_{3l}, D, E ya da N olabilir;
burada X_{4l}, D ya da H olabilir;
burada X_{5l}, Y, S ya da N olabilir; ve
burada X_{6l}, D, E ya da N olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{3l}, D ya da N olabilir.

Buluşun bir diğer örnek niteliğindeki yapısında, X_{6l}, D ya da N olabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{2l}'nin F ya da Y olduğu, X_{3l}'nin N olduğu, X_{4l}'nin D olduğu ya da X_{6l}'nin N olduğu SEKANS KOD NO.: 83 sekansına sahip olan bir CDRH2 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH2 sekansı ihtiva edebilir:

$X_{1m}INPYNX_{2m}VTE$ (SEKANS KOD NO.: 84);
burada X_{1m}, N ya da Y olabilir; ve
burada X_{2m}, E, D ya da N olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{2m}, D ya da N olabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{1m}'nin N olduğu ya da X_{2m}'nin D olduğu SEKANS KOD NO.: 84 sekansına sahip olan bir CDRH2 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH2 sekansı ihtiva edebilir:

$DINPX_{1n}YGX_{2n}X_{3n}T$ (SEKANS KOD NO.: 85);
burada X_{1n}, N ya da Y olabilir;
burada X_{2n}, G ya da T olabilir; ve
burada X_{3n}, I ya da T olabilir.

SEKANS KOD NO.: 98 ve 99'da, CDRH2'ye ilişkin örnek niteliğindeki diğer buluş yapıları sunulmaktadır.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH3 sekansı ihtiva edebilir:

$MX_{1o}X_{2o}X_{3o}DY$ (SEKANS KOD NO.: 86);
burada X_{1o}, G ya da S olabilir;
burada X_{2o}, Y ya da H olabilir; ve
burada X_{3o}, A ya da S olabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{1o}'nun G olduğu, X_{2o}'nun Y olduğu ya da X_{3o}'nun S olduğu SEKANS KOD NO.: 86 sekansına sahip olan bir CDRH3 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH3 sekansı ihtiva edebilir:

$IX_{1p}YAX_{2p}DY$ (SEKANS KOD NO.: 87);
burada X_{1p}, G ya da S olabilir; ve
burada X_{2p}, M olabilir ya da mevcut olmayabilir.

Diğer somut örneklerde, X_{1p}'nin S olduğu ya da X_{2p}'nin M olduğu SEKANS KOD NO.: 87 sekansına sahip olan bir CDRH3 söz konusudur.

Bu buluşa göre, antikor, aşağıda belirtilen formülü içeren veya ondan oluşan bir CDRH3 sekansı ihtiva edebilir:

$AX_{1q}X_{2q}GLRX_{3q}$ (SEKANS KOD NO.: 88);
burada X_{1q}, R ya da W olabilir;
burada X_{2q}, bir aromatik amino asit olabilir; ve
burada X_{3q}, bir bazik amino asit olabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, X_{2q}, W ya da F olabilir.

Buluşun bir diğer yapısında, X_{3q}, Q ya da N olabilir.

Buluşun diğer somut örneklerinde, X_{1q}'nin R olduğu, X_{2q}'nin W olduğu ya da X_{3q}'nin N olduğu SEKANS KOD NO.: 88 sekansına sahip olan bir CDRH3 söz konusudur.

Bu buluşun kapsamına dâhil olan varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları arasında, (konservatif olan veya konservatif olmayan) bir sokma, bir silme veya bir amino asit ikamesi içeren antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur. Bu varyantlarda, orijinal polipeptidin amino asit sekansında yer alan amino asit artıklarından en az birinin yerine farklı bir artık bulunur.

Hümanize antikorlar

Bu buluşa konu olan varyant antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarına ilişkin örnek niteliğindeki bazı buluş yapıları, KAAG1'e bağlanma kabiliyetine sahip olan ve karakterize edici özellikleri burada hümanize olmak olarak tanımlanan bir grup antikor ve antijen-bağlanma fragmanları ile ilgilidirler.

Bu buluşa konu olan hümanize antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarının daha somut örnekleri arasında, hümanize 3D3, 3A4 ve 3C4 antikorları ile bunların antijen-bağlanma fragmanları bulunur. Bu buluşa göre hümanize 3A4 antikorları ve onların antijen-bağlanma fragmanları kullanılabilir. Hümanize 3D3, 3A4 veya 3C4 antikorlarında, monoklonal 3D3, 3A4 veya 3C4 antikoruna kıyasla çerçeve bölgesinde en az bir adet amino asit farkı vardır.

Monoklonal 3A4 antikorunun (VL: SEKANS KOD NO.: 48; VH: SEKANS KOD NO.: 46) CDR'lerine özdeş CDR'lere sahip olan hümanize 3A4 antikorları oluşturulmuş ve test edilmişlerdir. Bu hümanize antikorlar, monoklonal 3A4 antikoruna kıyasla değişken hafif zincir çerçeve bölgelerinde 11'e varan sayıda (birden on bire kadar) amino asit ikamesi ve değişken ağır zincir çerçeve bölgelerinde 23'e varan sayıda (birden yirmi üçe kadar) amino asit ikamesi içerirler. Buluş Sahibi, bu hümanize 3A4 antikorlarının KAAG1'e monoklonal 3A4 antikoru kadar etkin bir şekilde bağlandıklarını göstermiş ve ortaya koymuştur.

Varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarına verilebilecek örnekler arasında, SEKANS KOD NO.: 186'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur:

SEKANS KOD NO.: 186

DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHVPLTFGXGTXLEXK,

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 48'de gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir. Bu amino asit ikamesi, örneğin bir doğal insan antikoru veya bir insan antikor konsensüsünün mütekabil pozisyonunda bulunan amino asit olabilir. Bu amino asit ikamesi örneğin konservatif nitelikte olabilir.

Varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarına ilişkin örnek niteliğindeki bir diğer buluş yapısında, SEKANS KOD NO.: 87'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olan varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları söz konusudur:

SEKANS KOD NO.: 187

$DX_{e1}VMTQTPLSLX_{e2}VX_{e3}X_{e4}GX_{e5}X_{e6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{e7}L$
$LIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{e8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{e9}GT$
$X_{e10}LEX_{e11}K,$

burada X_{e1}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{e2}, A ya da P olabilir;

burada X_{e3}, bir nötr hidrofilik amino asit olabilir;

burada X_{e4}, L ya da P olabilir;

burada X_{e5}, bir asidik amino asit olabilir;

burada X_{e6}, Q ya da P olabilir;

burada X_{e7}, bir bazik amino asit olabilir;

burada X_{e8}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{e9}, A ya da Q olabilir;

burada X_{10}, bir bazik amino asit olabilir; veya

burada X_{e11}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 48'de gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir.

Varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarına ilişkin örnek niteliğindeki bir ilave buluş yapısında, SEKANS KOD NO.: 188'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olan varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları söz konusudur:

SEKANS KOD NO.: 188

$DX_{E1}VMTQTPLSLX_{E2}VX_{E3}X_{E4}GX_{E5}X_{E6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{E7}$
$LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{E8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{E9}G$
$TX_{E10}LEX_{E11}K$

burada X_{E1}, V ya da I olabilir;

burada X_{E2}, A ya da P olabilir;

burada X_{E3}, S ya da T olabilir;

burada X_{E4}, L ya da P olabilir;

burada X_{E5}, D ya da E olabilir;

burada X_{E6}, Q ya da P olabilir;
burada X_{E7}, K ya da Q olabilir;
burada X_{E8}, L ya da V olabilir;
burada X_{E9}, A ya da Q olabilir;
burada X_{E10}, R ya da K olabilir; veya
burada X_{E11}, L ya da I olabilir;
burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 48'de gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir.

Buluşun bir yapısına göre, hafif zincir değişken domain varyantı, SEKANS KOD NO.: 189 veya 190'da gösterildiği gibi olan bir sekansa sahip olabilir:

SEKANS KOD NO.: 189
DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.

SEKANS KOD NO.: 190
DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.

Varyant antikor veya antijen-bağlanma fragmanlarına verilebilecek örnekler arasında, SEKANS KOD NO.: 191'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur:

SEKANS KOD NO.: 191

SEQ ID NO.:191
QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNG
DTNYNQKFKGXXXXTXDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXVT
VSS,

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 46'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir. Bu amino asit ikamesi, örneğin bir doğal insan antikoru veya bir insan antikor konsensüsünün mütekabil pozisyonunda bulunan amino asit olabilir. Bu amino asit ikamesi örneğin konservatif nitelikte olabilir.

Varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarına ilişkin örnek niteliğindeki bir diğer buluş yapısında, SEKANS KOD NO.: 192'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olan varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları söz konusudur:

SEKANS KOD NO.: 192
$QX_{f1}QLVQSGX_{f2}EX_{f3}X_{bf4}KPGASVKX_{f5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{f6}QX_{f7}X_{f8}GX_{f9}X_{f10}LEW$
$X_{f11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{f12}X_{f13}X_{b14}X_{f15}TX_{f16}DX_{f17}SX_{f18}STAYMX_{f19}LX_{f20}SLX_{f21}SED$
$X_{f22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{f23}VTVSS,$

burada X_{f1}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{bf2}, P ya da A olabilir;
burada X_{f3}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{f4}, V ya da K olabilir;
burada X_{f5}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{f6}, bir bazik amino asit olabilir;
burada X_{f7}, S ya da A olabilir;

burada X_{f8}, H ya da P olabilir;
burada X_{f9}, bir bazik amino asit olabilir;
burada X_{f10}, S ya da G olabilir;
burada X_{f11}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{f12}, bir bazik amino asit olabilir;
burada X_{f13}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{f14}, I ya da T olabilir;
burada X_{f15}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{f16}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{f17}, K ya da T olabilir;
burada X_{f18}, bir nötr hidrofilik amino asit olabilir;
burada X_{f19}, Q ya da E olabilir;
burada X_{f20}, N ya da S olabilir;
burada X_{f21}, T ya da R olabilir;
burada X_{f22}, bir nötr hidrofilik amino asit olabilir; veya
burada X_{f23}, S ya da L olabilir;
burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 46'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir.

Varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarına ilişkin örnek niteliğindeki bir ilave buluş yapısında, SEKANS KOD NO.: 193'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olan varyant antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları söz konusudur:

SEKANS KOD NO.: 193

$QX_{F1}QLVQSGX_{F2}EX_{F3}X_{F4}KPGASVKX_{F5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{F6}QX_{F7}X_{F8}GX_{F9}X_{F10}L$
$EWX_{F11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{F12}X_{F13}X_{F14}X_{F15}TX_{F16}DX_{F17}SX_{F18}STAYMX_{F19}LX_{F20}SL$
$X_{F21}SEDX_{F22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{F23}VTVSS$

burada X_{F1}, I ya da V olabilir;
burada X_{F2}, P ya da A olabilir;
burada X_{F3}, M ya da V olabilir;
burada X_{F4}, V ya da K olabilir;
burada X_{F5}, M ya da V olabilir;
burada X_{F6}, K ya da R olabilir;
burada X_{F7}, S ya da A olabilir;
burada X_{F8}, H ya da P olabilir;
burada X_{F9}, K ya da Q olabilir;
burada X_{F10}, S ya da G olabilir;
burada X_{F11}, I ya da M olabilir;
burada X_{F12}, K ya da R olabilir;
burada X_{F13}, A ya da V olabilir;
burada X_{F14}, I ya da T olabilir;
burada X_{F15}, L ya da I olabilir;
burada X_{F16}, V ya da A olabilir;
burada X_{F17}, K ya da T olabilir;
burada X_{F18}, S ya da T olabilir;
burada X_{F19}, Q ya da E olabilir;
burada X_{F20}, N ya da S olabilir;
burada X_{F21}, T ya da R olabilir;
burada X_{F22}, S ya da T olabilir; ya da

burada X_{F23}, S ya da L olabilir;

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 46'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir.

Buluşun bir yapısına göre, ağır zincir değişken domain varyantı, SEKANS KOD NO.: 194 ilâ 197'den herhangi birinde gösterildiği gibi olan bir sekansa sahip olabilir:

SEKANS KOD NO.: 194

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNG
DTNYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTV
SS.

SEKANS KOD NO.: 195

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNG
DTNYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVT
VSS.

SEKANS KOD NO.: 196

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGD
TNYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTV
SS.

SEKANS KOD NO.: 197

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVS
S.

Bu buluşa göre, hümanize 3D3 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

DIVMTQSPXSLAVSXGXXXTXNC**KSSQSLLNSNFQKNFLA**WYQQKPGQXPKLLIY**FAS**
TRESSXPDRFXGSGSGTDFTLTISSXQAEDXAXYXC**QQHYSTPLT**FGXGTKLEXK
(SEKANS KOD NO.: 174);

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 16'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir. Bu amino asit ikamesi örneğin konservatif nitelikte olabilir.

Buluşun daha somut bir yapısına göre, hümanize 3D3 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

DIVMTQSPX$_{A1}$SLAVSX$_{A2}$GX$_{A3}$X$_{A4}$X$_{A5}$TX$_{A6}$NC**KSSQSLLNSNFQKNFLA**WYQQKP
GQX$_{A7}$PKLLIY**FASTRES**SX$_{A8}$PDRFX$_{A9}$GSGSGTDFTLTISSX$_{A10}$QAEDX$_{A11}$AX$_{A12}$YX$_{A13}$C**Q**
QHYSTPLTFGX$_{A14}$GTKLEX$_{A15}$K (SEKANS KOD NO.: 175);

burada X_{A1}, örneğin D ya da S olabilir;
burada X_{A2}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak L ya da I olabilir;
burada X_{A3}, örneğin E ya da Q olabilir;
burada X_{A4}, örneğin bir bazik amino asit ya da daha öncelikli olarak R ya da K olabilir;
burada X_{A5}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak A ya da V olabilir;
burada X_{A6}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak I ya da M olabilir;

burada X_{A7}, örneğin P ya da S olabilir;

burada X_{A8}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak V ya da I olabilir;

burada X_{A9}, örneğin S ya da I olabilir;

burada X_{A10}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak L ya da V olabilir;

burada X_{A11}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak V ya da L olabilir;

burada X_{A12}, örneğin V ya da D olabilir;

burada X_{A13}, örneğin bir aromatik amino asit ya da daha öncelikli olarak Y ya da F olabilir;

burada X_{A14}, örneğin Q ya da A olabilir; ve

burada X_{A15}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak I ya da L olabilir.

Buluşun daha da somut bir yapısına göre, hümanize 3D3 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

DIVMTQSPX$_{a1}$SLAVSX$_{a2}$GX$_{a3}$X$_{a4}$X$_{a5}$TX$_{a6}$NC**KSSQSLLNSNFQKNFLA**WYQQKP GQX$_{a7}$PKLLIY**FASTRES**SX$_{a8}$PDRFX$_{a9}$GSGSGTDFTLTISSX$_{a10}$QAEDX$_{a11}$AX$_{a12}$YX$_{a13}$C**QQ HYSTPL**TFGX$_{a14}$GTKLEX$_{a15}$K (SEKANS KOD NO.: 176);

burada X_{a1}, örneğin D ya da S olabilir;

burada X_{a2}, örneğin L ya da I olabilir;

burada X_{a3}, örneğin E ya da Q olabilir;

burada X_{a4}, örneğin R ya da K olabilir;

burada X_{a5}, örneğin A ya da V olabilir;

burada X_{a6}, örneğin I ya da M olabilir;

burada X_{a7}, örneğin P ya da S olabilir;
burada X_{a8}, örneğin V ya da I olabilir;
burada X_{a9}, örneğin S ya da I olabilir;
burada X_{a10}, örneğin L ya da V olabilir;
burada X_{a11}, örneğin V ya da L olabilir;
burada X_{a12}, örneğin V ya da D olabilir;
burada X_{a13}, örneğin Y ya da F olabilir;
burada X_{a14}, örneğin Q ya da A olabilir; ve
burada X_{a15}, örneğin I ya da L olabilir.

Bu buluşa göre, hümanize 3D3 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

EVQLXQSXAEXXXPGASVXXSCKAS**GYIFTDYEIH**WVX
QXPXXGLEWXG**VIDPETGNTA**FNQKFKGXXTXTADXS
XSTAYMELSSLTSEDXAVYYC**MGYSDY**WGQGTXXTVS
S (SEKANS KOD NO.: 177);

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 18'de gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir. Bu amino asit ikamesi örneğin konservatif nitelikte olabilir.

Buluşun daha somut bir yapısına göre, hümanize 3D3 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

EVQLX$_{B1}$QSX$_{B2}$AEX$_{B3}$X$_{B4}$X$_{B5}$PGASVX$_{B6}$X$_{B7}$SCKAS**GYIFTDYEIH**WVX$_{B8}$QX$_{B9}$PX$_{B10}$X$_{B11}$GLEWX$_{B12}$G**VIDPETGNTA**FNQKFKGX$_{B13}$X$_{B14}$TX$_{B15}$TADX$_{B16}$SX$_{B17}$STAYMELSSLTSEDX$_{B18}$AVYYC**MGYSDY**WGQGTX$_{B19}$X$_{B20}$TVSS (SEKANS KOD NO.: 178);

burada X_{B1}, örneğin V ya da Q olabilir;

burada X_{B2}, örneğin G ya da V olabilir;

burada X_{B3}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak V ya da L olabilir;

burada X_{B4}, örneğin K ya da V olabilir;

burada X_{B5}, örneğin bir bazik amino asit ya da daha öncelikli olarak K ya da R olabilir;

burada X_{B6}, örneğin K ya da T olabilir;

burada X_{B7}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak V ya da L olabilir;

burada X_{B8}, örneğin bir bazik amino asit ya da daha öncelikli olarak R ya da K olabilir;

burada X_{B9}, örneğin A ya da T olabilir;

burada X_{B10}, örneğin G ya da V olabilir;

burada X_{B11}, örneğin Q ya da H olabilir;

burada X_{B12}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak M ya da I olabilir;

burada X_{B13}, örneğin bir bazik amino asit ya da daha öncelikli olarak R ya da K olabilir;

burada X_{B14}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak V ya da A olabilir;

burada X_{B15}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak I ya da L olabilir;

burada X_{B16}, örneğin T ya da I olabilir;

burada X_{B17}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak T ya da S olabilir;

burada X_{B18}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak T ya da S olabilir;

burada X_{B19}, örneğin L ya da T olabilir; ve

burada X_{B20}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak V ya da L olabilir.

Buluşun daha somut bir yapısına göre, hümanize 3D3 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

EVQLX_{b1}QSX_{b2}AE$X_{b3}X_{b4}X_{b5}$PGASV$X_{b6}X_{b7}$SCKAS**GYIFTDYEIH**WVX_{b8}QX_{b9}PX_{b10} X_{b11}GLEWX_{b12}**GVIDPETGNTA**FNQKFKG$X_{b13}X_{b14}$TX_{b15}TADX_{b16}SX_{b17}STAYMELSSLTSE DX_{b18}AVYYC**MGYSDY**WGQGT$X_{b19}X_{b20}$TVSS (SEKANS KOD NO.: 179);

burada X_{b1}, örneğin V ya da Q olabilir;

burada X_{b2}, örneğin G ya da V olabilir;

burada X_{b3}, örneğin V ya da L olabilir;

burada X_{b4}, örneğin K ya da V olabilir;

burada X_{b5}, örneğin K ya da R olabilir;

burada X_{b6}, örneğin K ya da T olabilir;

burada X_{b7}, örneğin V ya da L olabilir;

burada X_{b8}, örneğin R ya da K olabilir;

burada X_{b9}, örneğin A ya da T olabilir;

burada X_{b10}, örneğin G ya da V olabilir;

burada X_{b11}, örneğin Q ya da H olabilir;

burada X_{b12}, örneğin M ya da I olabilir;

burada X_{b13}, örneğin R ya da K olabilir;
burada X_{b14}, örneğin V ya da A olabilir;
burada X_{b15}, örneğin I ya da L olabilir;
burada X_{b16}, örneğin T ya da I olabilir;
burada X_{b17}, örneğin T ya da S olabilir;
burada X_{b18}, örneğin T ya da S olabilir;
burada X_{b19}, örneğin L ya da T olabilir; ve
burada X_{b20}, örneğin V ya da L olabilir.

Bu buluşa göre, hümanize 3C4 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

DIVMXQSPSSXXASXGXRVTITC**KASQDIHNFLN**WFQQ KPGKXPKTLIF**RANRLVD**GVPSRFSGSGSGXDYXLTISSL XXEDXXXYSC**LQYDEIPL**TFGXGTKLEXX (SEKANS KOD NO.: 180);

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 24'te gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir. Bu amino asit ikamesi örneğin konservatif nitelikte olabilir.

Buluşun daha somut bir yapısına göre, hümanize 3C4 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

DIVMX$_{C1}$QSPSSX$_{C2}$X$_{C3}$ASX$_{C4}$GX$_{C5}$RVTITC**KASQDIHNFLN**WFQQKPGKX$_{C6}$PKT LIF**RANRLVD**GVPSRFSGSGSGX$_{C7}$DYX$_{C8}$LTISSLX$_{C9}$X$_{C10}$EDX$_{C11}$X$_{C12}$X$_{C13}$YSCL**QYDEIP LTF**GX$_{C14}$GTKLEX$_{C15}$X$_{C16}$ (SEKANS KOD NO.: 181);

burada X_{C1}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak T ya da S olabilir;

burada X_{C2}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak L ya da M olabilir;

burada X_{C3}, örneğin S ya da Y olabilir;

burada X_{C4}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak V ya da L olabilir;

burada X_{C5}, örneğin an asidik amino asit ya da daha öncelikli olarak D ya da E olabilir;

burada X_{C6}, örneğin A ya da S olabilir;

burada X_{C7}, örneğin T ya da Q olabilir;

burada X_{C8}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak T ya da S olabilir;

burada X_{C9}, örneğin Q ya da E olabilir;

burada X_{C10}, örneğin P ya da F olabilir;

burada X_{C11}, örneğin F ya da L olabilir;

burada X_{C12}, örneğin A ya da G olabilir;

burada X_{C13}, örneğin T ya da I olabilir;

burada X_{C14}, örneğin Q ya da A olabilir;

burada X_{C15}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak I ya da L olabilir; ve

burada X_{C16}, örneğin bir bazik amino asit ya da daha öncelikli olarak K ya da R olabilir.

Buluşun daha somut bir yapısına göre, hümanize 3C4 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

DIVMX$_{c1}$QSPSSX$_{c2}$X$_{c3}$ASX$_{c4}$GX$_{c5}$RVTITC**KASQDIHNFLN**WFQQKPGKX$_{c6}$PKTLI **FRANRLVD**GVPSRFSGSGSGX$_{c7}$DYX$_{c8}$LTISSLX$_{c9}$X$_{c10}$EDX$_{c11}$X$_{c12}$X$_{c13}$YSCL**QYDEIPLTF** GX$_{c14}$GTKLEX$_{c15}$X$_{c16}$ (SEKANS KOD NO.: 182);

burada X$_{c1}$, örneğin T ya da S olabilir;
burada X$_{c2}$, örneğin L ya da M olabilir;
burada X$_{c3}$, örneğin S ya da Y olabilir;
burada X$_{c4}$, örneğin V ya da L olabilir;
burada X$_{c5}$, örneğin D ya da E olabilir;
burada X$_{c6}$, örneğin A ya da S olabilir;
burada X$_{c7}$, örneğin T ya da Q olabilir;
burada X$_{c8}$, örneğin T ya da S olabilir;
burada X$_{c9}$, örneğin Q ya da E olabilir;
burada X$_{c10}$, örneğin P ya da F olabilir;
burada X$_{c11}$, örneğin F ya da L olabilir;
burada X$_{c12}$, örneğin A ya da G olabilir;
burada X$_{c13}$, örneğin T ya da I olabilir;
burada X$_{c14}$, örneğin Q ya da A olabilir;
burada X$_{c15}$, örneğin I ya da L olabilir; ve
burada X$_{c16}$, örneğin K ya da R olabilir.

Bu buluşa göre, hümanize 3C4 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

EVQLQESGPXLVKPSQXLSLTCTVX**GFSITSGYGWH**WI RQXPGXXLEWXG**YINYDGHND**YNPSLKSRXXIXQDTSK NQFXLXLXSVTXXDTAXYYC**ASSYDGLFAY**WGQGTLV TVSX (SEKANS KOD NO.: 183);

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 26'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir. Bu amino asit ikamesi örneğin konservatif nitelikte olabilir.

Buluşun daha somut bir yapısına göre, hümanize 3C4 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

EVQLQESGPX$_{D1}$LVKPSQX$_{D2}$LSLTCTVX$_{D3}$**GFSITSGYGWH**WIRQX$_{D4}$PGX$_{D5}$X$_{D6}$L EWX$_{D7}$**GYINYDGHND**YNPSLKSRX$_{D8}$X$_{D9}$IX$_{D10}$QDTSKNQFX$_{D11}$LX$_{D12}$LX$_{D13}$SVTX$_{D14}$X$_{D15}$D TAX$_{D16}$YYC**ASSYDGLFAY**WGQGTLVTVSX$_{D17}$ (SEKANS KOD NO.: 184);

burada X_{D1}, örneğin G ya da D olabilir;

burada X_{D2}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak T ya da S olabilir;

burada X_{D3}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak S ya da T olabilir;

burada X_{D4}, örneğin H ya da F olabilir;

burada X_{D5}, örneğin K ya da N olabilir;

burada X_{D6}, örneğin G ya da K olabilir;

burada X_{D7}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak I ya da M olabilir;

burada X_{D8}, örneğin bir hidrofobik amino asit ya da daha öncelikli olarak V ya da I olabilir;

burada X_{D9}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak T ya da S olabilir;

burada X_{D10}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak S ya da T olabilir;

burada X_{D11}, örneğin bir nötr hidrofilik amino asit ya da daha öncelikli olarak S ya da F olabilir;

burada X_{D12}, örneğin bir bazik amino asit ya da daha öncelikli olarak K ya da Q olabilir;

burada X_{D13}, örneğin S ya da N olabilir;

burada X_{D14}, örneğin A ya da T olabilir;

burada X_{D15}, örneğin A ya da E olabilir;

burada X_{D16}, örneğin V ya da T; ve

burada X_{D17}, herhangi bir amino asit ya da A olabilir ya da mevcut olmayabilir.

Buluşun daha somut bir yapısına göre, hümanize 3C4 antikoru, aşağıda gösterilen formülün söz konusu olduğu bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir:

EVQLQESGPX$_{d1}$LVKPSQX$_{d2}$LSLTCTVX$_{d3}$**GFSITSGYGW**HWIRQX$_{d4}$PGX$_{d5}$X$_{d6}$LEWX$_{d7}$**GYINYDGHND**YNPSLKSRX$_{d8}$X$_{d9}$**I**X$_{d10}$QDTSKNQFX$_{d11}$LX$_{d12}$LX$_{d13}$SVTX$_{d14}$X$_{d15}$DTAX$_{d16}$YYC**ASSYDGLFAY**WGQGTLVTVSX$_{d17}$ (SEKANS KOD NO.: 185);

burada X_{d1}, örneğin G ya da D olabilir;

burada X_{d2}, örneğin T ya da S olabilir;
burada X_{d3}, örneğin S ya da T olabilir;
burada X_{d4}, örneğin H ya da F olabilir;
burada X_{d5}, örneğin K ya da N olabilir;
burada X_{d6}, örneğin G ya da K olabilir;
burada X_{d7}, örneğin I ya da M olabilir;
burada X_{d8}, örneğin V ya da I olabilir;
burada X_{d9}, örneğin T ya da S olabilir;
burada X_{d10}, örneğin S ya da T olabilir;
burada X_{d11}, örneğin S ya da F olabilir;
burada X_{d12}, örneğin K ya da Q olabilir;
burada X_{d13}, örneğin S ya da N olabilir;
burada X_{d14}, örneğin A ya da T olabilir;
burada X_{d15}, örneğin A ya da E olabilir;
burada X_{d16}, örneğin V ya da T olabilir; ve
burada X_{d17}, A olabilir ya da mevcut olmayabilir.

Yukarıda belirtilenlere bağlı olarak, burada, böbrek ile ilişkili antijen 1'e (KAAG1) spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan ve SEKANS KOD NO.: 16 ile en az %70 oranında özdeş bir hafif zincir değişken bölgesine ve/veya SEKANS KOD NO.: 18 ile en az %70 oranında özdeş bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilecek olan bir antikor veya böyle bir antikorun bir antijen-bağlanma fragmanı açıklanmaktadır. Bahsi geçen antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı, SEKANS KOD NO.: 16 veya SEKANS KOD NO.: 18'e kıyasla en az bir adet amino asit ikamesi de içerebilir.

Burada ayrıca, SEKANS KOD NO.: 24 ile en az %70 oranında özdeş bir hafif zincir değişken bölgesine ve/veya SEKANS KOD NO.: 26 ile en az %70 oranında özdeş bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilecek olan bir antikor veya böyle bir antikorun bir antijen-bağlanma fragmanı da açıklanmaktadır. Bahsi geçen antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı, SEKANS KOD NO.: 24 veya SEKANS KOD NO.: 26'ya kıyasla en az bir adet amino asit ikamesi de içerebilir.

Bu buluş, başka bir yapısında, SEKANS KOD NO.: 48 ile en az %70 oranında özdeş bir hafif zincir değişken bölgesine ve/veya SEKANS KOD NO.: 46 ile en az %70 oranında özdeş bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilecek olan, bu buluşa göre kullanıma uygun bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı da ortaya koyar. Bahsi geçen antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı, SEKANS KOD NO.: 48 veya SEKANS KOD NO.: 46'ya kıyasla en az bir adet amino asit ikamesi de içerebilir.

Bu buluşun bir yapısına göre, söz konusu amino asit ikamesi, bir tamamlayıcılık belirleme bölgesinin (CDR) dışında yer alır. Bu gibi bir amino asit sekansına sahip olan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, örneğin bir hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "birden yirmi beşe kadar" terimi, ilgili sınır değerler içinde kalan her tekil değeri ve değer aralığını, örneğin 1, 2, 3'ü ve 25'e varana kadar her bir tekil değeri; 1 ilâ 25, 1 ilâ 24, 1 ilâ 23, 1 ilâ 22, 1 ilâ 21, 1 ilâ 20, 1 ilâ 19; 1 ilâ 18; 1 ilâ 17; 1 ilâ 16; 1

ilâ 15 ve benzeri değer aralıklarını; 2 ilâ 25, 2 ilâ 24, 2 ilâ 23, 2 ilâ 22, 2 ilâ 21, 2 ilâ 20; 2 ilâ 19; 2 ilâ 18; 2 ilâ 17 ve benzeri değer aralıklarını; 3 ilâ 25, 3 ilâ 24, 3 ilâ 23, 3 ilâ 22, 3 ilâ 21, 3 ilâ 20; 3 ilâ 19; 3 ilâ 18 ve benzeri değer aralıklarını; 4 ilâ 25, 4 ilâ 24, 4 ilâ 23, 4 ilâ 22, 4 ilâ 21, 4 ilâ 20; 4 ilâ 19; 4 ilâ 18; 4 ilâ 17; 4 ilâ 16 ve benzeri değer aralıklarını; 5 ilâ 25, 5 ilâ 24, 5 ilâ 23, 5 ilâ 22, 5 ilâ 21, 5 ilâ 20; 5 ilâ 19; 5 ilâ 18; 5 ilâ 17 ve benzeri değer aralıklarını ve benzeri diğer değer aralıklarını içine alan bir kapsama sahiptir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "birden yirmi üçe kadar" terimi, ilgili sınır değerler içinde kalan her tekil değeri ve değer aralığını, örneğin 1, 2, 3'ü ve 23'e varana kadar her bir tekil değeri; 1 ilâ 23, 1 ilâ 22, 1 ilâ 21, 1 ilâ 20, 1 ilâ 19; 1 ilâ 18; 1 ilâ 17; 1 ilâ 16; 1 ilâ 15 ve benzeri değer aralıklarını; 2 ilâ 23, 2 ilâ 22, 2 ilâ 21, 2 ilâ 20; 2 ilâ 19; 2 ilâ 18; 2 ilâ 17 ve benzeri değer aralıklarını; 3 ilâ 23, 3 ilâ 22, 3 ilâ 21, 3 ilâ 20; 3 ilâ 19; 3 ilâ 18 ve benzeri değer aralıklarını; 4 ilâ 23, 4 ilâ 22, 4 ilâ 21, 4 ilâ 20; 4 ilâ 19; 4 ilâ 18; 4 ilâ 17; 4 ilâ 16 ve benzeri değer aralıklarını; 5 ilâ 25, 5 ilâ 24, 5 ilâ 23, 5 ilâ 22, 5 ilâ 21, 5 ilâ 20; 5 ilâ 19; 5 ilâ 18; 5 ilâ 17 ve benzeri değer aralıklarını ve benzeri diğer değer aralıklarını içine alan bir kapsama sahiptir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "birden yirmiye kadar" terimi, ilgili sınır değerler içinde kalan her tekil değeri ve değer aralığını, örneğin 1, 2, 3'ü ve 20'ye varana kadar her bir tekil değeri; 1 ilâ 20; 1 ilâ 19; 1 ilâ 18; 1 ilâ 17; 1 ilâ 16; 1 ilâ 15 ve benzeri değer aralıklarını; 2 ilâ 20; 2 ilâ 19; 2 ilâ 18; 2 ilâ 17 ve benzeri değer aralıklarını; 3 ilâ 20; 3 ilâ 19; 3 ilâ 18 ve benzeri değer aralıklarını; 4 ilâ 20; 4 ilâ 19; 4 ilâ 18; 4 ilâ 17; 4 ilâ 16 ve benzeri değer aralıklarını; 5 ilâ 20; 5 ilâ 19; 5 ilâ 18;

5 ilâ 17 ve benzeri değer aralıklarını ve benzeri diğer değer aralıklarını içine alan bir kapsama sahiptir.

"Birden on beşe kadar" terimi de benzer şekilde, ilgili sınır değerler içinde kalan her tekil değeri ve değer aralığını, örneğin 1, 2, 3'ü ve 15'e varana kadar her bir tekil değeri; 1 ilâ 15; 1 ilâ 14; 1 ilâ 13; 1 ilâ 12; 1 ilâ 11; 1 ilâ 10 ve benzeri değer aralıklarını; 2 ilâ 15; 2 ilâ 14; 2 ilâ 13; 2 ilâ 12 ve benzeri değer aralıklarını; 3 ilâ 15; 3 ilâ 14; 3 ilâ 13 ve benzeri değer aralıklarını; 4 ilâ 15; 4 ilâ 14; 4 ilâ 13; 4 ilâ 12; 4 ilâ 11 ve benzeri değer aralıklarını; 5 ilâ 15; 5 ilâ 14; 5 ilâ 13; 5 ilâ 12 ve benzeri değer aralıklarını ve benzeri diğer değer aralıklarını içine alan bir kapsama sahiptir.

"Birden on bire kadar" terimi de benzer şekilde, ilgili sınır değerler içinde kalan her tekil değeri ve değer aralığını, örneğin 1, 2, 3'ü ve 11'e varana kadar her bir tekil değeri; 1 ilâ 11; 1 ilâ 10, 1 ilâ 9, 1 ilâ 8, 1 ilâ 7, ve benzeri değer aralıklarını; 2 ilâ 11; 2 ilâ 10; 2 ilâ 9; 2 ilâ 8 ve benzeri değer aralıklarını; 3 ilâ 11; 3 ilâ 10; 3 ilâ 9 ve benzeri değer aralıklarını; 4 ilâ 11; 4 ilâ 10; 4 ilâ 9; 4 ilâ 8; 4 ilâ 7 ve benzeri değer aralıklarını; 5 ilâ 11; 5 ilâ 10; 5 ilâ 9; 5 ilâ 8 ve benzeri değer aralıklarını ve benzeri diğer değer aralıklarını içine alan bir kapsama sahiptir.

Buluşun daha somut bir yapısında, SEKANS KOD NO.: 16'den elde edilen bir hümanize hafif zincir değişken bölgesinde yer alabilecek olan amino asit ikamelerinin sayısı, örneğin 1 ile 15 arası bir değerde olabilir.

Buluşun yine daha somut bir yapısında, SEKANS KOD NO.: 18'den elde edilen bir hümanize ağır zincir değişken bölgesinde yer alabilecek olan amino asit ikamelerinin sayısı, örneğin 1 ile 20 arası bir değerde olabilir. Bazı durumlarda, SEKANS KOD NO.: 18'in bir hümanize versiyonunun üzerinde duruluyorsa bu hümanize sekansta en az üç adet amino asit ikamesi bulunması faydalı olabilir.

Buluşun daha da somut bir yapısında, SEKANS KOD NO.: 24'ten elde edilen bir hümanize hafif zincir değişken bölgesinde yer alabilecek olan amino asit ikamelerinin sayısı, örneğin 1 ile 16 arası bir değerde olabilir.

Buluşun yine daha da somut bir yapısında, SEKANS KOD NO.: 26'dan elde edilen bir hümanize ağır zincir değişken bölgesinde yer alabilecek olan amino asit ikamelerinin sayısı, örneğin 1 ile 17 arası bir değerde olabilir.

Buluşun daha da somut bir yapısında, SEKANS KOD NO.: 48'den elde edilen bir hümanize hafif zincir değişken bölgesinde yer alabilecek olan amino asit ikamelerinin sayısı, örneğin 1 ile 11 arası bir değerde olabilir.

Buluşun yine daha da somut bir yapısında, SEKANS KOD NO.: 46'dan elde edilen bir hümanize ağır zincir değişken bölgesinde yer alabilecek olan amino asit ikamelerinin sayısı, örneğin 1 ile 23 arası bir değerde olabilir.

Bu buluşun bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesinde örneğin bir ile yirmi arası bir sayıda amino asit ikamesi yer alabilir.

Bu buluşun bir yapısına göre, ağır zincir değişken bölgesinde örneğin bir ile yirmi arası bir sayıda amino asit ikamesi yer alabilir.

Dolayısıyla, bir hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanında, SEKANS KOD NO.: 16 veya SEKANS KOD NO.: 24'e kıyasla yirmiye varan sayıda amino asit ikamesinin yer aldığı bir hafif zincir değişken bölgesi bulunabilir ve SEKANS KOD NO.: 18 veya SEKANS KOD NO.: 26'ya kıyasla yirmiye varan sayıda amino asit ikamesinin yer aldığı bir ağır zincir değişken bölgesi bulunabilir. Dolayısıyla, bir hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanında, SEKANS KOD NO.: 48'e kıyasla yirmi beşe varan sayıda amino asit ikamesinin yer aldığı bir hafif zincir değişken bölgesi bulunabilir ve SEKANS KOD NO.: 46'ya kıyasla yirmi beşe varan sayıda amino asit ikamesinin yer aldığı bir ağır zincir değişken bölgesi bulunabilir.

Hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanında iki hafif zincir değişken bölgesi ile iki ağır zincir değişken bölgesinin bulunduğu durumda, söz konusu hafif zincir değişken bölgelerinden en az birinde diğerinden bağımsız olarak yirmi beş, yirmi dört, yirmi üç, yirmi iki, yirmi bir, yirmi, on dokuz, on sekiz, on yedi, on altı, on beş, on dört, on üç, on iki, on bir, on, dokuz, sekiz, yedi, altı, beş, dört, üç, iki veya bir adet amino asit ikamesi yer alabileceği ve söz konusu ağır zincir değişken bölgelerinden en az birinde diğerinden bağımsız olarak yirmi beş, yirmi dört, yirmi üç, yirmi iki, yirmi bir, yirmi, on dokuz, on sekiz, on yedi, on altı, on beş, on dört, on üç, on iki, on bir, on, dokuz,

sekiz, yedi, altı, beş, dört, üç, iki veya bir adet amino asit ikamesi yer alabileceği anlaşılacaktır.

Burada tartışıldığı gibi, amino asit ikameleri konservatif olabilir veya olmayabilirler. Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, amino asit ikameleri konservatif nitelikte olabilir.

Burada açıklanan hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanında ayrıca SEKANS KOD NO.: 16, SEKANS KOD NO.: 18, SEKANS KOD NO.: 189, SEKANS KOD NO.: 190, SEKANS KOD NO.: 194, SEKANS KOD NO.: 195, SEKANS KOD NO.: 196, SEKANS KOD NO.: 197, SEKANS KOD NO.: 24 ve/veya SEKANS KOD NO.: 26'ya kıyasla bir silmenin söz konusu olduğu bir hafif zincir değişken bölgesi ve/veya ağır zincir değişken bölgesi bulunmasının da mümkün olduğu anlaşılacaktır. Bu buluşa göre kullanıma uygun hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanında ayrıca SEKANS KOD NO.: 189, SEKANS KOD NO.: 190, SEKANS KOD NO.: 194, SEKANS KOD NO.: 195, SEKANS KOD NO.: 196 ve/veya SEKANS KOD NO.: 197'ye kıyasla bir silmenin söz konusu olduğu bir hafif zincir değişken bölgesi ve/veya ağır zincir değişken bölgesi bulunmasının da mümkün olduğu anlaşılacaktır. Bu silme, örneğin hafif zincir değişken bölgesinin ve/veya ağır zincir değişken bölgesinin amino veya karboksi terminalinde bulunabilir.

Bu buluşa göre kullanıma uygun hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanına ilişkin örnek niteliğindeki bir diğer buluş yapısında, örneğin, SEKANS KOD NO.: 186, SEKANS KOD NO.:

187, SEKANS KOD NO.: 188, SEKANS KOD NO.: 189 ve SEKANS KOD NO.: 190'dan herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidinin yer almasının mümkün olduğu bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı söz konusudur.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 186'nın en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 veya en az 112 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 186'nın en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 186'da bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 186'nın 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 186'nın 6 ilâ 108, 5 ilâ 109, 13 ilâ 103, 14 ilâ 111 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 187'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 veya en az 112 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 187'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 187'de bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 187'nin 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 187'nin 7 ilâ 109, 12

ilâ 104, 22 ilâ 113, 18 ilâ 112 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

"SEKANS KOD NO.: 188'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi", "SEKANS KOD NO.: 189'un en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" veya "SEKANS KOD NO.: 190'ın en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi de benzer bir anlama sahiptir.

Bu buluşa göre, bu buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanında örneğin SEKANS KOD NO.: 189 veya 190'da gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi bulunabilir.

Bu buluşa göre kullanıma uygun hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, örneğin SEKANS KOD NO.: 191, 192, 193, 194, 195, 196 ve 197'den herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidinin yer almasının mümkün olduğu bir ağır zincir değişken bölgesi içerir (veya böyle bir ağır zincir değişken bölgesi de içerir).

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 191'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 veya en az 116 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 191'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 191'de bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 191'in 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 191'in 1 ilâ 106, 2 ilâ 112, 11 ilâ 113, 7 ilâ 102 numaralı veya

benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 192'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 veya en az 116 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 192'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 192'de bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 192'nin 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 192'nin 6 ilâ 109, 8 ilâ 113, 1 ilâ 102, 2 ilâ 105 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

"SEKANS KOD NO.: 193'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidi", "SEKANS KOD NO.: 194'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidi", "SEKANS KOD NO.: 195'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi", "SEKANS KOD NO.: 196'nın en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" veya "SEKANS KOD NO.: 197'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi de benzer bir anlama sahiptir.

Bu buluşa göre, bu buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanında örneğin SEKANS KOD NO.: 194, 195, 196 veya 197'de gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi bulunabilir.
Bu buluşa göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı örneğin aşağıda belirtilenleri içerebilir:

a) SEKANS KOD NO.: 186'nın en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 191, SEKANS KOD NO.: 192, SEKANS KOD NO.: 193, SEKANS KOD NO.: 194, SEKANS KOD NO.: 195, SEKANS KOD NO.: 196 ve SEKANS KOD NO.: 197'den herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

b) SEKANS KOD NO.: 187'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 191, SEKANS KOD NO.: 192, SEKANS KOD NO.: 193, SEKANS KOD NO.: 194, SEKANS KOD NO.: 195, SEKANS KOD NO.: 196 ve SEKANS KOD NO.: 197'den herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

c) SEKANS KOD NO.: 188'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 191, SEKANS KOD NO.: 192, SEKANS KOD NO.: 193, SEKANS KOD NO.: 194, SEKANS KOD NO.: 195, SEKANS KOD NO.: 196 ve SEKANS KOD NO.: 197'den herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

d) SEKANS KOD NO.: 189'un en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 191, SEKANS KOD NO.: 192, SEKANS KOD NO.: 193, SEKANS KOD NO.: 194, SEKANS KOD NO.: 195, SEKANS KOD NO.: 196 ve SEKANS KOD NO.: 197'den herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi; veya

e) SEKANS KOD NO.: 190'ın en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 191, SEKANS KOD NO.: 192, SEKANS KOD NO.: 193, SEKANS KOD NO.: 194, SEKANS KOD NO.: 195, SEKANS KOD NO.: 196 ve SEKANS KOD NO.: 197'den herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi.

Bu buluşun daha somut bir yapısında göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 189 veya 190'ın en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 194, 195, 196 veya 197'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 189'da gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 194'te gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 195'te gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 196'da gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 190'da gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 197'de gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşa konu olan hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanının bir diğer örneği olarak örneğin SEKANS KOD NO.: 174, SEKANS KOD NO.: 175, SEKANS KOD NO.: 176 veya SEKANS

KOD NO.: 168'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesinin yer aldığı bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı gösterilebilir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 174'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 veya en az 113 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 174'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 174'te bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 174'ün 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 174'ün 6 ilâ 108, 5 ilâ 109, 13 ilâ 103, 14 ilâ 111 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 175'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 veya en az 113 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 175'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 175'te bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 175'in 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 175'in 7 ilâ 109, 12 ilâ 104, 22 ilâ 113, 18 ilâ 112 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

"SEKANS KOD NO.: 176'nın en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" veya "SEKANS KOD NO.: 168'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi de benzer bir anlama sahiptir.

Bu buluşa göre, bu buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanında örneğin SEKANS KOD NO.: 168'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi bulunabilir.

Bu buluşa konu olan hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, örneğin SEKANS KOD NO.: 177, 178, 179 ve 169'dan herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidinin yer almasının mümkün olduğu bir ağır zincir değişken bölgesi içerir (veya böyle bir ağır zincir değişken bölgesi de içerir).

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 177'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 veya en az 113 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 177'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 177'de bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 177'nin 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 177'nin 1 ilâ 106, 2 ilâ 112, 11 ilâ 113, 7 ilâ 102 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 178'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96,

97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 veya en az 113 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 178'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 178'de bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 178'in 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 178'in 6 ilâ 109, 8 ilâ 113, 1 ilâ 102, 2 ilâ 105 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

"SEKANS KOD NO.: 179'un en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" veya "SEKANS KOD NO.: 169'un en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi de benzer bir anlama sahiptir.

Bu buluşa göre, bu buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanında örneğin SEKANS KOD NO.: 169'da gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi bulunabilir.

Bu buluşa göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı örneğin aşağıda belirtilenleri içerebilir:

f) SEKANS KOD NO.: 174'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 177, SEKANS KOD NO.: 178, SEKANS KOD NO.: 179 ve SEKANS KOD NO.: 169'dan herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

g) SEKANS KOD NO.: 175'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 177, SEKANS KOD NO.: 178, SEKANS KOD NO.: 179 ve SEKANS KOD NO.: 169'dan herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

h) SEKANS KOD NO.: 176'nın en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 177, SEKANS KOD NO.: 178, SEKANS KOD NO.: 179 ve SEKANS KOD NO.: 169'dan herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi; veya

i) SEKANS KOD NO.: 168'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 177, SEKANS KOD NO.: 178, SEKANS KOD NO.: 179 ve SEKANS KOD NO.: 169'dan herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi.

Bu buluşun daha somut bir yapısında göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 168'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 169'un en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 168'de gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 169'da gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşa uygun hümanize antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları için verilebilecek diğer örnekler arasında, SEKANS KOD NO.: 180, 181, 182 ve 172'den herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesinin yer alabileceği hümanize antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 180'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 veya en az 107 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 180'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 180'de bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 180'in 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 180'in 6 ilâ 102, 11 ilâ 106, 1 ilâ 106, 3 ilâ 95, 5 ilâ 95 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 181'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 veya en az 107 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 181'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 181'de bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 181'in 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 181'in 9 ilâ 106, 10 ilâ 101, 1 ilâ 98, 3 ilâ 99, 7

ilâ 107 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

"SEKANS KOD NO.: 182'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" veya "SEKANS KOD NO.: 172'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi de benzer bir anlama sahiptir.

Bu buluşa göre, bu buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanında örneğin SEKANS KOD NO.: 172'de gösterildiği gibi olan bir hafif zincir değişken bölgesi bulunabilir.

Bu buluşa konu olan hümanize antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, örneğin SEKANS KOD NO.: 183, 184, 185 ve 173'ten herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidinin yer almasının mümkün olduğu bir ağır zincir değişken bölgesi içerir (veya böyle bir ağır zincir değişken bölgesi de içerir).

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 183'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 veya en az 116 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 183'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 183'te bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 183'ün 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 183'ün 6 ilâ 111, 1 ilâ 106, 2 ilâ 104, 5 ilâ 106, 10 ilâ 107 numaralı

veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "SEKANS KOD NO.: 185'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, "en az 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 veya en az 116 adet ardışık dizili amino asit" terimlerini de içine alan bir kapsama sahiptir. "SEKANS KOD NO.: 185'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi, SEKANS KOD NO.: 185'te bulunan en az 90 adet ardışık dizili amino asitten meydana gelen olası her türlü sekansı ve özellikle de SEKANS KOD NO.: 185'in 3 CDR'sini içeren sekansları, örneğin SEKANS KOD NO.: 185'in 3 ilâ 107, 1 ilâ 115, 1 ilâ 110, 22 ilâ 116, 20 ilâ 115 numaralı veya benzeri başka amino asitlerini içeren bir sekansı içine alan bir kapsama sahiptir.

"SEKANS KOD NO.: 184'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" veya "SEKANS KOD NO.: 173'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidi" terimi de benzer bir anlama sahiptir.

Bu buluşa göre, bu buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanında örneğin SEKANS KOD NO.: 173'te gösterildiği gibi olan bir ağır zincir değişken bölgesi bulunabilir.

Bu buluşa göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı örneğin aşağıda belirtilenleri içerebilir:

a) SEKANS KOD NO.: 180'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 183, SEKANS KOD NO.: 184, SEKANS KOD NO.: 185 ve SEKANS KOD NO.: 173'ten herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

b) SEKANS KOD NO.: 181'in en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 183, SEKANS KOD NO.: 184, SEKANS KOD NO.: 185 ve SEKANS KOD NO.: 173'ten herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi;

c) SEKANS KOD NO.: 182'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 183, SEKANS KOD NO.: 184, SEKANS KOD NO.: 185 ve SEKANS KOD NO.: 173'ten herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi; veya

d) SEKANS KOD NO.: 172'nin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEKANS KOD NO.: 183, SEKANS KOD NO.: 184, SEKANS KOD NO.: 185 ve SEKANS KOD NO.: 173'ten herhangi birinin en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi.

Bu buluşun daha somut bir yapısında göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 172'nin en az 90 adet ardışık dizili

amino asidini içerebilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 173'ün en az 90 adet ardışık dizili amino asidini içerebilir.

Bu buluşun daha da somut bir yapısına göre, hafif zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 172'de gösterildiği gibi olabilir ve ağır zincir değişken bölgesi, SEKANS KOD NO.: 173'te gösterildiği gibi olabilir.

Bu buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanında, yukarıda tanımlandığı gibi olan bu buluşa uygun bir hafif zincir değişken bölgesi ve/veya ağır zincir değişken bölgesi bulunabilir ve bunun veya bunların yanı sıra, bir sabit bölgenin amino asitleri, örneğin bir insan antikorunun bir sabit bölgesinin amino asitleri de bulunabilir.

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, örneğin bir insan IgG1 sabit bölgesi içerebilir.

Buluşun bir diğer örnek niteliğindeki yapısına göre, söz konusu antijen-bağlanma fragmanı örneğin bir scFv, bir Fab, bir Fab' ya da bir $(Fab')_2$ olabilir.

<u>Antikorların hücrelerde üretimi</u>

Burada açıklanan anti-KAAG1 antikorları, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanların aşina oldukları çeşitli yöntemlerle, örneğin

hibridom metodolojisiyle ya da rekombinan DNA yöntemleriyle yapılabilirler.

Anti-KAAG1 antikorları, bir farenin bir antijen ile immünize edildiği, ardından farenin dalak hücrelerinin izole edilip HGPRT ekspresyonu bulunmayan miyelom hücreleri ile füzyonlandığı ve hipoksantin, aminopterin ve timin (HAT) içeren vasatlar kullanılarak hibrit hücrelerin seçildiği konvansiyonel hibridom teknolojisi ile üretilebilirler.

Anti-KAAG1 antikorları, rekombinan DNA yöntemleri ile üretilebilirler.

Anti-KAAG1 antikorlarının eksprese olmalarını sağlamak için, burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini veya başka herhangi bir zinciri kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekansları bir ekspresyon vektörüne, yani sokulan kodlama sekansının belli bir konakçıda transkripsiyonel ve translasyonel kontrolünü sağlayabilecek olan elemanların yer aldıkları bir vektöre sokulabilir. Bahsi geçen elemanlar arasında, artırıcılar, konstitütif ve indüklenebilir promotörler ve 5' ve 3' çevrilmemiş bölgelerinin örnek gösterilebileceği düzenleyici sekanslar sayılabilir. Bu tür ekspresyon vektörlerini yapmak için, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca iyi bilinen uygun yöntemlere başvurulabilir. Bu yöntemler arasında, *in vitro* rekombinan DNA teknikleri, sentetik teknikler ve *in vivo* genetik rekombinasyon bulunur.

Burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekanslarından elde edilen bir polipeptid veya RNA'yı eksprese etmek için, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinen çeşitli ekspresyon vektörü/konakçı hücre sistemlerinden istifade edilebilir. Bu sistemler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, rekombinan bakteriyofaj, plazmid veya kozmid DNA ekspresyon vektörleri ile transforme edilmiş bakterilerin örnek gösterilebileceği mikroorganizmalar; maya ekspresyon vektörleri ile transforme edilmiş mayalar; bakulovirüs vektörleri ile enfekte edilmiş böcek hücre sistemleri; viral veya bakteriyel ekspresyon vektörleri ile transforme edilmiş bitki hücresi sistemleri ve hayvan hücresi sistemleri bulunur. Memeli hücrelerinde uzun süreli rekombinan protein üretimi sağlamak için, hedefi hücre hatlarında stabil ekspresyona ulaşmak olan çalışmalar yapılabilir. Örnek vermek gerekirse, burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlamaya kabiliyetine sahip olan nükleotid sekansları, viral replikasyon kaynakları ve/veya endojen ekspresyon elemanları ve bir seçilebilir veya görünür marker gen içeren ve aynı vektörde veya ayrı bir vektörde bir seçilebilir veya görünür marker genin yer aldığı ekspresyon vektörleri kullanılarak hücre hatlarına transforme edilebilirler. Bu buluşun kullanılan vektör veya konakçı hücre ile sınırlı kalması hedeflenmemektedir. Belirli örneklerde, burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekanslarının her biri ayrı bir ekspresyon vektörüne ligate edilip her zincir ayrı ayrı eksprese edilebilir. Bir diğer örnekte ise, burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine

sahip olan hafif ve ağır zincirlerin her ikisi de aynı ekspresyon vektörüne ligate edilip aynı anda eksprese edilebilirler.

Alternatif olarak, sırasıyla bir *in vitro* transkripsiyon sistemi ya da bir birleşik *in vitro* transkripsiyon/translasyon sistemi kullanılarak, burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekanslarının bulunduğu bir vektörden RNA ve/veya polipeptid eksprese edilebilir.

Burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekansları içeren ve/veya burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekanslarının kodladıkları bir polipeptidi eksprese eden konakçı hücreler veya onların bir kısmı, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinen muhtelif prosedürler çerçevesinde ayırt edilip tanımlanabilirler. Bu prosedürler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, DNA/DNA veya DNA/RNA hibridizasyonları, PCR amplifikasyonu ve nükleik asit veya amino asit sekanslarını tespiti ve/veya miktar tayinine yönelik membran, çözelti veya çip bazlı teknolojiler içeren protein biyoeseyi veya immünoesey teknikleri sayılabilir. Polipeptidlerin ekspresyonunu spesifik poliklonal veya monoklonal antikorlar kullanarak tespit edip ölçmeye dayalı immünolojik yöntemler sektörde bilinirler. Bu tür tekniklere verilebilecek örnekler arasında, enzim-bağlı immünosorbent eseyleri (ELISA'lar), radyoimmünoeseyler (RIA'lar) ve floresans-aktive hücre ayıklama (FACS) bulunur. Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlar, bu metodolojileri bu buluşa kolayca adapte edebilirler.

Dolayısıyla, burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekansları içeren konakçı hücreler, mütekabil RNA'nın (mRNA, siRNA, shRNA ve benzeri) transkripte olması için ve/veya polipeptidin hücre kültüründen eksprese olması için uygun koşullar altında kültürlenebilirler. Bir hücrenin ürettiği polipeptid, kullanılan sekans ve/veya vektöre bağlı olarak salgılanabilir ya da hücre içinde korunabilir. Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekansları içeren ekspresyon vektörleri, polipeptidin bir prokaryotik veya ökaryotik hücre membranından geçerek direkt salgılanmasını sağlayacak sinyal sekansları içerecek şekilde tasarlanabilirler.

Genetik koddaki içkin dejenerasyondan dolayı, burada açıklanan hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerinden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleotid sekanslarının kodladıkları bir polipeptidi eksprese etmeleri için, örneğin aynı amino asit sekansını, hemen hemen aynı amino asit sekansını ya da fonksiyonel yönden muadil nitelikteki bir amino asit sekansını kodlayan başka DNA sekansları üretilip kullanılabilir. Burada açıklanan nükleotid sekansları, sektörde genel itibarıyla bilinen uygun yöntemler kullanılarak çeşitli amaçlar ile değişikliğe uğratılabilirler; sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın örneğin gen ürününün klonlanması, işlenmesi ve/veya ekspresyonunda modifikasyon yapılabilir. Gen fragmanları ve sentetik oligonükleotidlerde rastgele fragmantasyon ve PCR ile tekrar birleştirme işlemleri yürütülüp DNA shuffling yapılarak nükleotid sekansları değişikliğe uğratılabilirler. Örneğin,

oligonükleotid aracılı yer hedefli mutagenez gerçekleştirilerek, yeni restriksiyon yerleri yaratan, glikozilasyon paternlerini değiştiren, kodon tercihini değiştiren, uçbirleştirme varyantları üreten ve benzeri fonksiyonları yerine getiren mutasyonlar oluşması sağlanabilir.

Ek olarak, sokulan sekansların ekspresyonunu modüle etme veya eksprese edilen polipeptidi istenen şekilde işleme yönündeki kabiliyeti göz önünde tutularak bir konakçı hücre suşu seçilebilir. Polipeptidde yapılabilecek bu gibi modifikasyonlar arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, asetilasyon, karboksilasyon, glikozilasyon, fosforilasyon, lipidasyon ve asilasyon bulunur. Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, belli glikozilasyon yapıları veya paternleri içeren anti-KAAG1 antikorlarına ulaşılması istenebilir. Protein hedef alımını, katlanmasını ve/veya aktivitesini istenen sınırlar içinde ayarlamak için, polipeptid yarılarak polipeptidin bir "prepro" formunun elde edilmesini sağlayan bir translasyon sonrası işleme başvurulabilir. Ticari piyasada, translasyon sonrası aktiviteleri yönünden kendilerine özgü hücresel düzeneklere ve karakteristik mekanizmalara sahip olan farklı konakçı hücreler (örneğin CHO, HeLa, MDCK, HEK293 ve W138) bulunmakta olup bunlar Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) edinilebilirler ve eksprese edilen polipeptidin doğru şekilde modifiye edilmesi ve işlenmesini sağlamak üzere seçilebilirler.

Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlar, doğal, modifiye veya rekombinan nükleik asit sekanslarının bir heterolog sekansa ligate edilebileceklerini ve bu ligasyon sayesinde yukarıda bahsi geçen konakçı sistemlerinden herhangi birinde heterolog polipeptid

moietelerini içeren bir füzyon polipeptidinin translate edilebileceğini ilk bakışta fark edeceklerdir. Bu gibi heterolog polipeptid moieteleri, füzyon polipeptidlerinin ticari piyasada mevcut afinite matrisleri kullanılarak saflaştırılmasını kolaylaştırabilirler. Bu tür moieteler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, glutatyon S-transferaz (GST), maltoz bağlanma proteini, tioredoksin, kalmodülin bağlanma peptidi, 6-His (His), FLAG, c-myc, hemaglütinin (HA) ve antikor epitopları, örneğin monoklonal antikor epitopları bulunur.

Burada ayrıca, bir füzyon proteini kodlayan bir nükleotid sekansı içerebilecek olan bir polinükleotid açıklanmaktadır. Bahsi geçen füzyon proteini, burada açıklanan polipeptide (örneğin tam hafif zincir, tam ağır zincir, değişken bölgeler, CDR'ler ve benzeri) füzyonlu bir füzyon partneri (örneğin HA, Fc ve benzeri) içerebilir.

Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlar, nükleik asit ve polipeptid sekanslarının sektörde iyi bilinen kimyasal veya enzimatik yöntemler kullanılarak tam ve eksiksiz veya kısmen sentezlenebileceklerini de ilk bakışta anlayacak ve fark edeceklerdir. Örneğin, çeşitli katı faz teknikleri kullanılarak peptid sentezi gerçekleştirilebilir ve ABI 431A Peptid sentezleyici (PE Biosystems) gibi makineler kullanılarak sentez otomatikleştirilebilir. İstenirse, bir varyant protein üretmek üzere amino asit sekansı sentez sırasında değişikliğe uğratılabilir ve/veya başka proteinlere ait sekanslar ile kombine edilebilir.

Antikor konjugatları

Burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, bir tespit edilebilir moiete (yani tespit veya tanı amaçlı olarak) veya bir

terapötik moiete (terapötik amaçlı olarak) ile konjuge edilebilir. Bu buluşa göre, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, bir terapötik moiete (terapötik amaçlı olarak) ile konjuge edilir.

Bir "tespit edilebilir moiete", spektroskopik, fotokimyasal, biyokimyasal, immünokimyasal, kimyasal ve/veya başka fiziksel metotlarla tespit edilebilecek olan bir moietedir. Sektörde iyi bilinen uygun yöntemler kullanılarak bu buluşa konu olan antikorlar ve antijen-bağlanma fragmanlarına doğrudan ve/veya dolaylı olarak (örneğin sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın bir DOTA veya NHS bağlantısı gibi bir bağlantı aracılığıyla) bir tespit edilebilir moiete bağlanabilir. Birçok farklı tespit edilebilir moiete bulunmakta olup, kullanılacak olan tespit edilebilir moiete, gereken sensitivite, konjugasyon kolaylığı, stabilite gereksinimleri ve eldeki cihaz ve aygıtlar göz önünde tutularak seçilir. Uygun tespit edilebilir moietelere verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir floresan etiket, bir radyoaktif etiket (örneğin, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın ^{125}I, In^{111}, Tc^{99}, I^{131} ve PET tarayıcı için uygun pozitron yayıcı izotoplar ve benzerleri dâhil), bir nükleer manyetik rezonans aktif etiket, bir lüminesan etiket, bir kemilüminesan etiket, bir kromofor etiketi, bir enzim etiketi (örneğin ve sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bayır turpu peroksidaz, alkali fosfataz ve benzerleri), kuantum noktaları ve/veya bir nanopartikül sayılabilir. Tespit edilebilir moiete, bir tespit edilebilir sinyal oluşmasını sağlayabilir ve/veya üretebilir ve böylece tespit edilebilir moieteden tespit edilecek olan sinyal yayılır.

Buluşun örnek niteliğindeki bir diğer yapısında, antikor veya onun antijen-bağlanma fragmanı, bir terapötik moiete (örneğin ilaç, sitotoksik moiete) ile kenetlenebilir (modifiye edilebilir).

Buluşun örnek niteliğindeki bir yapısında, anti-KAAG1 antikorları ve antijen-bağlanma fragmanları, bir inhibitör, bir kemoterapötik veya sitotoksik ajan içerebilirler. Örnek vermek gerekirse, antikor ve antijen-bağlanma fragmanları, bir kemoterapötik veya sitotoksik ajana konjuge edilebilir. Uygun kemoterapötik veya sitotoksik ajanlar arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, İtriyum-90, Skandiyum-47, Renyum-186, İyot-131, İyot-125 ve sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca tanınan birçok başka ajan (örneğin lutesyum (örneğin Lu^{177}), bizmut (örneğin Bi^{213}), bakır (örneğin Cu^{67})) sayılabilir. Başka hallerde, kemoterapötik veya sitotoksik ajan, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, 5-florourasil, adriamisin, irinotekan, platin bazlı bileşikler, örneğin sisplatin ve anti-tübülin veya anti-mitotik bileşikler, örneğin taksanlar, doksorubisin ve siklofosfamid, pseudomonas endotoksin, risin ve başka toksinler içerebilir. Uygun antikor-ilaç konjugatları, IC_{50} değeri 0,001 nM ilâ 150 nM, 0,001 nM ilâ 100 nM, 0,001 nM ilâ 50 nM, 0,001 nM ilâ 20 nM ya da 0,001 nM ilâ 10 nM (sınır değerler dâhil) aralığı içinde yer alan konjugatlar arasından seçilirler. Dolayısıyla konjugasyon için kullanılan sitotoksik ilaç bu kriterler temelinde seçilir.

Alternatif olarak, bu buluşa konu olan terapötik amaçlı kullanım şekillerini hayata geçirmek adına ve sektörde bilindiği gibi, bu buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, buluşa konu olan antikor veya antijen-bağlanma fragmanına spesifik bağlanma

kabiliyetine sahip olan ve istenen bir tespit edilebilir, diagnostik veya terapötik moietenin taşınabileceği bir ikinci molekül (örneğin bir sekonder antikor ve benzeri) ile birlikte (ona konjuge halde) kullanılabilir.

Antikorların farmasötik bileşimleri ve onların kullanımı

Burada, anti-KAAG1 antikorları veya antijen-bağlanma fragmanlarının (konjuge veya değil) farmasötik bileşimleri de açıklanmaktadır. Farmasötik bileşim, bir anti-KAAG1 antikoru veya bir antijen-bağlanma fragmanı içerebilir ve ayrıca bir farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı içerebilir.

Buluşun başka yapıları, burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanını ve onun yanı sıra bir taşıyıcıyı içerebilecek olan bir bileşim ile ilgilidir.

Bu buluş, burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanını ve onun yanı sıra bir farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcıyı içerebilecek olan bir farmasötik bileşim ile de ilgilidir.

Bir farmasötik bileşim, etkin bileşenlerin yanı sıra, su, PBS, tuz çözeltileri, jelatinler, yağlar, alkoller ve etkin bileşiklerin farmasötik amaçla kullanılabilecek preparatlar formunda işlenmesini kolaylaştıran başka eksipiyanlar ve yardımcı maddeler dâhil farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcılar içerebilirler. Başka durumlarda, bu preparatlar sterilize edilebilirler.

Burada kullanıldığı anlamıyla "farmasötik bileşim" terimi, farmasötik açıdan kabul edilebilir seyrelticiler, koruyucular, çözünürleştiriciler, emülsifiye ediciler, adjuvanlar ve/veya taşıyıcılar ile birlikte terapötik açıdan etkili miktarda etkin madde bulunan bir içeriğe atıf yapar. Burada kullanıldığı anlamıyla "terapötik açıdan etkili miktar", belli bir hastalığa karşı belli bir uygulama rejimiyle bir terapötik etki elde edilmesini sağlayan miktara atıf yapar. Bu gibi bileşimler, sıvı ya da liyofilize edilmiş veya başka türlü bir şekilde kurutulmuş formülasyonları teşkil ederler; çeşitli farklı tampon içerikleri (örneğin Tris-HCl, asetat, fosfat), pH düzeyleri ve iyonik kuvvet seviyelerinde bulunabilecek olan seyrelticiler, yüzeylere absorpsiyon olmasını önlemek amacıyla kullanılan albümin veya jelatin gibi katkı maddeleri, deterjanlar (örneğin Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, safra asidi tuzları), çözünürleştirici ajanlar (örneğin gliserol, polietilen gliserol), antioksidanlar (örneğin askorbik asit, sodyum metabisülfit), koruyucular (örneğin tiomerosal, benzil alkol, parabenler), hacim artırıcılar veya tonisite ayarlayıcılar (örneğin laktoz, mannitol) içerebilirler ve bu bileşimlerde, polietilen glikol gibi polimerler proteine kovalent bağlanmış olabilir, metal iyonları ile kompleks kurulmuş olabilir ya da söz konusu materyal, polilaktik asit, poliglikolik asit, hidrojeller ve benzeri polimerik bileşiklerin partiküllü preparatlarının içine veya üzerine ya da lipozomlar, mikroemülsiyonlar, miseller, tek lamelli veya çok lamelli veziküller, hayalet eritrositler veya sferoplastların üzerine katılmış olabilir. Bu gibi bileşimler, fiziksel hali, çözünürlüğü, stabiliteyi, *in vivo* salım hızını ve *in vivo* klirens hızını etkileyeceklerdir. Kontrollü veya sürekli salımlı bileşimlerde formülasyon, lipofilik depolar (örneğin yağ asitleri, vakslar, yağlar) içinde yer alır. Burada ayrıca, polimerler

(örneğin poloksamerler veya poloksaminler) ile kaplı partiküllü bileşimler de konu edilmektedir. Konu edilen diğer bileşimler arasında, parenteral, pulmoner, nazal, oral, vajinal ve rektal uygulama yolları dâhil çeşitli farklı uygulama yollarına yönelik olarak, koruyucu kaplamalar, proteaz inhibitörleri veya permeasyon artırıcılar yer alan partiküllü formlar bulunur. Bir örnekte, farmasötik bileşim, parenteral, parakanseral, transmukozal, transdermal, intramüsküler, intravenöz, intradermal, subkütan, intraperitoneal, intraventriküler, intrakraniyal ve intratümöral yolla uygulanır.

Ayrıca, burada kullanılan "farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı" ya da "farmasötik taşıyıcı" sektörde bilinen bir terimdir ve sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, 0,01-0,1 M veya 0,05 M fosfat tamponu veya %0,8 saline atıf yapar. Ek olarak, bu gibi farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcılar, aköz olan veya olmayan çözeltiler, süspansiyonlar ve emülsiyonlar olabilirler. Aköz olmayan çözücülere verilebilecek örnekler arasında, propilen glikol, polietilen glikol, zeytinyağı gibi bitkisel yağlar ve etil oleat gibi enjektabl organik esterler bulunur. Aköz taşıyıcılar arasında, su, alkolik/aköz çözeltiler, emülsiyonlar veya süspansiyonlar, örneğin salin ve tamponlu vasatlar bulunur. Parenteral vehiküller arasında, sodyum klorür çözeltisi, Ringer dekstroz çözeltisi, dekstroz ve sodyum klorür, laktatlı Ringer çözeltisi veya sabit yağlar bulunur. İntravenöz vehiküller arasında, sıvı ve besin takviyeleri, elektrolit takviyeleri, örneğin Ringer dekstroz çözeltisine dayalı takviyeler ve benzerleri bulunur. Antimikrobiyaller, antioksidanlar, birleştirme ajanları, inert gazlar ve benzerlerinin örnek gösterilebileceği koruyucular ve başka katkı maddeleri de bulunabilir.

Herhangi bir bileşiğin terapötik açıdan etkili dozu, başlangıçta hücre kültürü eseylerinde ya da fare, sıçan, tavşan, köpek veya domuz gibi hayvan modellerinde hesaplanabilir. Konsantrasyon aralığını ve uygulama yolunu belirlemek için de bir hayvan modeli kullanılabilir. Daha sonra bu bilgiler ışığında, insanlarda kullanıma uygun dozlar ve uygulama yolları belirlenebilir. Bu teknikler sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca iyi bilinirler ve bir terapötik açıdan etkili doz, semptomları veya hastalığı iyileştirmek için etkin bileşenden uygulanması gereken miktarı teşkil eder. Terapötik etkinlik ve toksisite, hücre kültürlerinde veya deney hayvanlarıyla standart farmasötik prosedürler yürütülerek, örneğin ED_{50} (popülasyonun %50'sinde terapötik açıdan etkili olan doz) ve LD_{50} (popülasyonun %50'si için ölümcül olan doz) istatistikleri hesaplanıp karşılaştırılarak belirlenebilir. Yukarıda açıklanan terapötik bileşimlerden herhangi biri, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın ve fakat köpek, kedi, inek, at, tavşan, maymun ve insan gibi memeliler dâhil olmak üzere böyle bir tedaviye ihtiyacı olan herhangi bir deneğe uygulanabilir.

Bu buluş kapsamında kullanılan farmasötik bileşimler, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın ve fakat oral, intravenöz, intramüsküler, intraarteriyel, intramedüller, intratekal, intraventriküler, transdermal, subkütan, intraperitoneal, intranazal, enteral, topikal, dilaltı ve rektal uygulama yolları dâhil olmak üzere herhangi bir sayıda uygulama yolu ile uygulanabilirler.

Kullanım yöntemleri

Bu buluşun amaçları çerçevesinde "tedavi" terimi, hem terapötik tedaviye hem de amacın hedef patolojik durum veya hastalığı önlemek

veya yavaşlatmak (azaltmak) olduğu profilaktik veya önleyici tedbirlere atıf yapar. Tedaviye ihtiyacı olanlar arasında, hastalığa zaten yakalanmış olanların yanı sıra, hastalığa yatkınlığı bulunanlar veya hastalığa yakalanması önlenmesi gerekenler bulunur.

Bu buluş, meme kanseri bulunan veya meme kanseri bulunduğundan şüphelenilen bir bireyin KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı ile tedavi edilmesine dayanan bir tedavi yöntemi ortaya koyar.

Bu buluşa göre, söz konusu bireyde, östrojen reseptörü ekspresyonu, progesteron reseptörü ekspresyonu ve/veya Her2 ekspresyonu (veya aşırı ekspresyonu) yönünden negatif olan bir meme kanseri bulunuyor olabilir.

Yine bu buluşa göre, söz konusu bireyde, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve/veya Her2'den en az birinin düşük bir ekspresyon sergilediği bir meme kanseri bulunuyor olabilir.

Örnek vermek gerekirse, tümör, hem östrojen reseptörü ekspresyonu hem de progesteron reseptörü ekspresyonu yönünden negatif olabilir (ya da bu reseptörlerin her ikisi de düşük ekspresyon gösteriyor olabilir).

Bu buluşa göre, bireyde, üçlü negatif olarak karakterize edilen bir meme kanseri bulunuyor olabilir. Meme kanseri, bazal benzeri olabilir.

Burada ayrıca, burada açıklanan izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanının, karakterize edici özelliği östrojen reseptörü ekspresyonu, progesteron reseptörü ekspresyonu ve/veya Her2 aşırı ekspresyonunun bulunmaması ya da bu üç markerden en az birinin düşük ekspresyon gösteriyor olması olan bir meme kanserinin tedavisi veya tanısında kullanımı da konu edilmekte ve açıklanmaktadır.

Bu buluşa göre, terapötik kullanım, örneğin bu buluşa uygun KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanının böyle bir uygulamaya ihtiyacı olan bir bireye uygulanmasını içerebilir. İhtiyaç sahibi olan birey, tercihen, ER ekspresyonu ve/veya PgR ekspresyonu yönünden bir eksikliğin söz konusu olduğu ve/veya HER2 proteini aşırı ekspresyonunun bulunmadığı tümörlere sahip olan bireyler arasından seçilir. Bu markerlere yönelik klinik testler, genelde histopatolojik yöntemler (immünohistokimya, FISH ve benzeri) kullanılarak ve/veya gen ekspresyon çalışmaları ile gerçekleştirilirler (örneğin bkz: Dent et al, 2007, Bernstein and Lacey, 2011). Dolayısıyla, ihtiyaç sahibi olan birey, üçlü negatif meme kanseri tanısı almış olan bir birey olabilir. Söz konusu kanser, bazal benzeri meme kanseri olabilir.

Dolayısıyla bu buluş, üçlü negatif meme kanseri bulunan bir bireyin bir anti-KAAG1 antikoru ile terapötik tedavisi ile özellikle ilgilidir. Söz konusu kanser, bazal benzeri kanser olabilir.

Uygun antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları arasında, tümör hücrelerinin yüzeyleri üzerindeki KAAG1'e bağlanma kabiliyetine sahip olanlar bulunur. Bu gibi antikorların KAAG1'in sınır

pozisyonlar dâhil 30 ilâ 84 sayılı amino asitleri içinde (örneğin KAAG1'in (sınır pozisyonlar dâhil) 36 ilâ 60 sayılı amino asitleri içinde ya da (sınır pozisyonlar dâhil) 61 ilâ 84 sayılı amino asitleri içinde) yer alan bir epitopa bağlanan antikorlar olmaları tercih edilebilir.

Örneğin antikor-bağımlı hücre sitotoksisitesine aracılık eden antikorlar ve bir terapötik moiete ile konjuge edilen antikorlar uygun olabilirler.

Bu buluşa göre, antikor, örneğin bir monoklonal antikor, bir kimerik antikor, bir hümanize antikor ya da böyle bir antikorun bir antijen-bağlanma fragmanı olabilir.

Bu buluşa uygun terapötik kullanımda, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı bir inhibitör, bir kemoterapötik veya bir sitotoksik ajan ile birlikte uygulanabilir.

Burada konu edilen diğer tedavi yöntemleri arasında, antisens-bazlı terapötikler (siRNA, antisensler, ribozimler ve benzerleri) gibi başka tip KAAG1 inhibitörleri ile uygulama da bulunur.

Burada konu edilen ve açıklanan bir diğer unsur, böyle bir ihtiyacı olan bir bireyde o bireye KAAG1 aktivitesi veya ekspresyonunu inhibe eden bir inhibitör uygulamak suretiyle üçlü negatif meme kanseri veya bazal benzeri meme kanserinin tedavi edilmesine dayalı bir tedavi yöntemidir.

Söz konusu inhibitör, SEKANS KOD NO.: 1'i veya onun bir fragmanını tamamlayıcı bir nükleotid sekansı içerebilir. Daha somut ifade etmek gerekirse, inhibitör, SEKANS KOD NO.: 1'in (sınır pozisyonlar dâhil) 738 ilâ 992 sayılı nükleotidlerini veya onun bir fragmanını tamamlayıcı bir nükleotid sekansı içerebilir. Örnek vermek gerekirse, inhibitörde, SEKANS KOD NO.: 1'i tamamlayıcı veya SEKANS KOD NO.: 1'in (sınır pozisyonlar dâhil) 738 ilâ 992 sayılı nükleotidlerini tamamlayıcı en az 10 adet ardışık dizili nükleotid (en az 15, en az 20) bulunabilir.

Belirli hallerde, anti-KAAG1 antikorları ve onların fragmanları, KAAG1 eksprese eden kanser hücreleri ile etkileşime girebilir ve ADCC'ye aracılık etmek suretiyle bir immünolojik reaksiyon indükleyebilirler. Diğer hallerde ise, anti-KAAG1 antikorları ve onların fragmanları, KAAG1'in protein partnerleri ile olan etkileşimini bloke edebilirler.

Belirli hallerde, anti-KAAG1 antikorları ve onların antijen-bağlanma fragmanları, aynı hastalığa yönelik başka tedaviler (inhibitörler, kemoterapötikler veya sitotoksik ajanlar) ile aynı anda uygulanabilirler. Buna göre antikorlar, bir PARP1 inhibitörü, bir EGFR inhibitörü, anti-mitotikler (örneğin taksanlar), platin-bazlı ajanlar (örneğin sisplatin), DNA'ya hasar veren ajanlar (örneğin doksorubisin) ve sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinen başka anti-kanser tedavileri ile birlikte uygulanabilirler. Diğer hallerde ise, anti-KAAG1 antikorları ve antijen-bağlanma fragmanları, başka terapötik antikorlar ile birlikte uygulanabilirler. Bunlar arasında,

sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, EGFR, CD-20 ve Her2'yi hedef alan antikorlar bulunur.

Burada, östrojen reseptörü-negatif (ER-), progesteron-reseptörü-negatif (PgR-) olan ve/veya Her2 aşırı ekspresyonu bulunmayan (Her2-) bir KAAG-1 eksprese eden hücrenin büyümesini inhibe etmeye yönelik bir yöntem konu edilmekte ve açıklanmakta olup, bu yöntem, söz konusu hücrenin burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanından etkili bir miktar ile temas ettirilmesini içerebilir.

Burada ayrıca, bir memelide östrojen reseptörü-negatif (ER-), progesteron reseptörü-negatif (PgR-) olan ve/veya Her2 aşırı ekspresyonu bulunmayan (Her2-) bir KAAG-1 eksprese eden hücrenin büyümesini inhibe etmeye veya kanseri tedavi etmeye yönelik bir yöntem de konu edilmekte ve açıklanmakta olup, bu yöntem, burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanının böyle bir ihtiyacı olan bir memeliye uygulanmasını içerebilir.

Bu buluş, burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanının kullanıldığı tedavi yöntemi, tanı yöntemleri ve belirleme yöntemiyle ve bu antikor veya antijen-bağlanma fragmanının bu gibi amaçlara yönelik bir farmasötik bileşim veya ilacın üretiminde kullanımıyla ilgilidir.

Burada açıklanan tedavi yönteminde, burada açıklanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı böyle bir ihtiyacı olan bir memeliye ve özellikle de östrojen reseptörü-negatif (ER-), progesteron reseptörü

negatif (PgR-) olarak karakterize edilen ve/veya Her2 aşırı ekspresyonu bulunmayan (Her2-) bir kanserin söz konusu olduğu veya böyle bir kansere yatkınlığı bulunan bir hastaya uygulanır.

Burada ayrıca, tümör yayılmasını, tümör işgalini, tümör oluşumunu indirgemeye veya tümör lizisi indüklemeye yönelik olup, böyle bir ihtiyacı olan bir memeliye bir izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanı uygulanmasını içerebilecek olan yöntemler de konu edilmekte ve açıklanmaktadır.

Burada konu edilen ve açıklanan bir diğer unsur, burada açıklanan izole antikor veya antijen-bağlanma fragmanının östrojen reseptörü-negatif (ER-), progesteron reseptörü-negatif (PgR-) olan ve/veya Her2 aşırı ekspresyonu bulunmayan (Her2-) KAAG1 eksprese eden tümör hücrelerine istinaden kanser tedavisinde, tümör yayılması, tümör işgali, tümör oluşumunun indirgenmesinde ya da tümör lizisinin indüklenmesinde (ya da buna yönelik bir farmasötik bileşimin üretiminde) kullanımıdır.

Antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, örneğin metastaz yapma kabiliyetine sahip olan bir malign tümör ve/veya ankorajdan bağımsız büyüme ile karakterize edilen tümör hücrelerini içine alan bir anlamda malign tümörler için daha uygun olabilir. Burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, kanser hastalıklarının teşhisinde de kullanılabilir. Kanser teşhisi, burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanının bir kanser hastalığı bulunan veya bulunduğundan şüphelenilen bir memeliye uygulanması yoluyla *in vivo* ortamda gerçekleştirilebilir. Teşhis, antikor veya antijen-

bağlanma fragmanının memeliden alınan bir numune ile temas ettirilmesi ve numunede KAAG1 veya bir KAAG1 varyantı eksprese eden hücrelerin (tümör hücreleri) bulunup bulunmadığının belirlenmesi yoluyla *ex vivo* ortamda da gerçekleştirilebilir.

Burada ayrıca, bir memelide östrojen reseptörü-negatif (ER-), progesteron reseptörü-negatif (PgR-) olan ve/veya Her2 aşırı ekspresyonu bulunmayan (Her2-) bir kanser hastalığını veya KAAG1 eksprese eden hücreleri tespit etmeye yönelik bir yöntem de konu edilmekte ve açıklanmakta olup, bu yöntem, böyle bir ihtiyacı olan bir memeliye burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanının uygulanmasını içerebilir.

Burada ayrıca, KAAG1 veya bir KAAG1 varyantı eksprese eden bir hücreyi tespit etmeye yönelik bir yöntem de konu edilmekte ve açıklanmakta olup, bu yöntem, burada açıklanan bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanının söz konusu hücre ile temas ettirilmesini ve KAAG1 veya KAAG1 varyantı eksprese eden hücre ile antikorun bir kompleks oluşturup oluşturmadığının belirlenmesini içerir. Bu belirleme yöntemlerinde kullanılan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanlarına verilebilecek örnekler arasında, KAAG1'in ekstraselüler bölgesine bağlanma kabiliyetine sahip olan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur.

Belirleme yöntemlerinde kullanılan antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları için verilebilecek diğer örnekler arasında, östrojen reseptörü-negatif (ER-), progesteron reseptörü-negatif (PgR-) olan ve/veya Her2 aşırı ekspresyonu bulunmayan (Her2-) tümör

hücrelerinin yüzeyleri üzerinde eksprese olan KAAG1 veya KAAG1 varyantına bağlanabilen antikorlar veya antijen-bağlanma fragmanları bulunur.

Burada ayrıca, KAAG1'i (SEKANS KOD NO.: 2), SEKANS KOD NO.: 2 ile en az %80 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir KAAG1 varyantını ya da KAAG1 veya KAAG1 varyantının bir salgılanan veya dolaşımdaki formunu tespit etmeye yönelik olan bir yöntem de konu edilmekte ve açıklanmakta olup, bu yöntem, KAAG1 veya KAAG1 varyantı eksprese eden bir hücrenin veya KAAG1 veya KAAG1 varyantı içeren veya içerdiğinden şüphelenilen bir numunenin (biyopsi, serum, plazma, idrar ve benzeri) burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanı ile temas ettirilmesini ve bu iki unsur arasındaki bağlanmanın ölçülmesini içerebilir. Bahsi geçen numunenin kaynağı, kanser hastalığı (örneğin östrojen reseptörü-negatif (ER-), progesteron reseptörü-negatif (PgR-) olarak karakterize edilen ve/veya Her2 aşırı ekspresyonu bulunmayan (Her2-), bazal benzeri meme kanseri veya üçlü negatif meme kanseri gibi bir meme kanseri) bulunan ya da kanser bulunduğundan şüphelenilen bir memeli (örneğin bir insan) olabilir. Söz konusu numune, bahsi geçen memeliden elde edilen bir doku numunesi ya da bir hücre kültürü üst fazı olabilir.

Numune, memeliden elde edilen bir serum numunesi, bir plazma numunesi, bir kan numunesi veya assit sıvısı olabilir. Burada açıklanan antikor veya antijen-bağlanma fragmanı, KAAG1'in bir salgılanan veya dolaşımdaki (kan dolaşımındaki) formunu belirleme konusunda faydalı olabilir.

Söz konusu yöntem, KAAG1 veya KAAG1 varyantı ile ona bağlı antikor veya antijen-bağlanma fragmanının oluşturdukları kompleksin ölçülmesini içerebilir.

Bir antikorun bir antijene bağlanması, antijenin beklenen molekül ağırlığında bir artışa neden olacaktır. Dolayısıyla, antikor veya antijen-bağlanma fragmanı ile antijen birbirlerine spesifik bağlandıklarında bir fiziksel değişim meydana gelir.

Bu tür değişimler, örneğin elektroforez ve ardından Western blot gerçekleştirilip jel veya blotun renk değişimine bakılarak, kütle spektrometresi ile, bilgisayarlı HPLC ile ya da benzeri başka bir yöntemle tespit edilebilir. Molekül ağırlığındaki değişimleri hesaplamak için kullanılabilecek aygıtlar bulunmakta ve sektörde bilinmekte olup, bunlara örnek olarak Phosphorimager™ gösterilebilir.

Antikor örneğin bir tespit edilebilir etiket içeriyorsa, antijen-antikor kompleksi, etiketin yaydığı floresans, etiketin ışınım emisyonu, substratı ile birlikte sunulan etiketin enzimatik aktivitesi ya da başka bir gösterge üzerinden tespit edilebilir.

Bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı ile bir antijen arasındaki bağlanmanın tespiti ve/veya ölçümü, sektörde bilinen muhtelif yöntemler ile gerçekleştirilebilir. Bir antikor veya antijen-bağlanma fragmanı ile bir antijen arasındaki bağlanma, tespit edilebilir etiketin yaydığı sinyali (ışınım emisyonu, floresans, renk değişimi ve benzeri)

tespit etme kabiliyetine sahip olan bir aygıt ile izlenebilir. Bu tür bir aygıt, meydana geldiğinde bağlanmaya işaret eden veriler sunar ve ayrıca antijene bağlanan antikor miktarına dair veri de sağlayabilir. Söz konusu (genelde bir bilgisayarla birlikte kullanılan) aygıt, bir arka plan sinyali (örneğin antijen-antikor bağlanmasının bulunmadığı durumda elde edilen sinyal) veya arka plan gürültüsü ile spesifik antikor-antijen bağlanması meydana geldiğinde elde edilen sinyal arasındaki farkı hesaplama kabiliyetine de sahip olabilir. Dolayısıyla bu tür aygıtlar, kullanıcıya antijenin tespit edilmiş olup olmadığına dair göstergeler ve sonuçlar sunabilirler.

Burada ayrıca, burada açıklandığı gibi olan bir veya daha fazla sayıda antikor veya antijen-bağlanma fragmanının bulunduğu bir veya daha fazla sayıda kap yer alabilecek olan kitler de konu edilmekte ve açıklanmaktadır.

Nükleik asitler, vektörler ve hücreler

Antikorlar, genelde, hafif zincir ve/veya ağır zinciri kodlayan bir nükleik asit sekansının bulunduğu bir vektör(ler)den hafif zincir veya ağır zincirin eksprese olmasına olanak sağlayan hücrelerde yapılırlar.

Burada konu edilen ve açıklanan unsurlar arasında, burada açıklanan CDR'ler, hafif zincir değişken bölgeleri, ağır zincir değişken bölgeleri, hafif zincirler ve ağır zincirlerden herhangi birini kodlama kabiliyetine sahip olan nükleik asitler de bulunur.

Burada konu edilen ve açıklanan unsurlar arasında, KAAG1'e spesifik bağlanma kabiliyetine sahip olan bir antikorun bir hafif zincir değişken bölgesi ve/veya bir ağır zincir değişken bölgesini kodlayan bir nükleik asit de bulunur.

Örnek niteliğindeki nükleik asitler arasında, SEKANS KOD NO.: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 45 ve 47, onların fragmanları (örneğin en az 10, en az 15 veya en az 20 adet ardışık dizili nükleotid) ve onların tamamlayıcıları ile en az %70 oranında sekans özdeşliğine (yani en az %75, en az %80 oranında sekans özdeşliğine) sahip olan nükleik asitlerden oluşan grup içerisinden seçilen nükleik asitler bulunur.

Bu buluşa göre, nükleik asit, özellikle, KAAG1 veya KAAG1 varyantı eksprese eden tümör hücrelerin ölümünü (eliminasyonunu, yıkımını, lizisini) indükleme kabiliyetine sahip olabilecek olan bir antikorun bir hafif zincir değişken bölgesi ve/veya ağır zincir değişken bölgesini kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, özellikle, KAAG1 veya KAAG1 varyantı eksprese eden tümör hücrelerinin yayılmasını indirgeme kabiliyetine sahip olabilecek olan bir antikorun bir hafif zincir değişken bölgesi ve/veya ağır zincir değişken bölgesini kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, bilhassa, KAAG1 veya KAAG1 varyantı eksprese eden tümörlerin oluşumunu azaltma veya bozma kabiliyetine sahip olabilecek olan bir antikorun bir hafif zincir değişken bölgesi

ve/veya ağır zincir değişken bölgesini kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Örnek niteliğindeki nükleik asitler arasında, aşağıda belirtilenleri içeren bir hafif zincir değişken bölgesi kodlayan nükleik asitler bulunur:

a. SEKANS KOD NO.: 72 ile SEKANS KOD NO.: 73'ten oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRL1 sekansı;
b. SEKANS KOD NO.: 74, SEKANS KOD NO.: 75 ile SEKANS KOD NO.: 76'dan oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRL2 sekansı; veya
c. SEKANS KOD NO.: 77, SEKANS KOD NO.: 78 ile SEKANS KOD NO.: 79'dan oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRL3 sekansı.

Bu buluşa göre, nükleik asit, bir CDRL1, bir CDRL2 ve bir CDRL3 arasından en az iki CDR'yi içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Yine bu buluşa göre, nükleik asit, bir CDRL1, bir CDRL2 ve bir CDRL3 içerebilecek olan bir hafif zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluş, ayrıca aşağıda belirtilenleri içeren bir ağır zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit ile de ilgilidir:

a. SEKANS KOD NO.: 80'i içeren bir CDRH1 sekansı;

b. SEKANS KOD NO.: 81, SEKANS KOD NO.: 82, SEKANS KOD NO.: 83, SEKANS KOD NO.: 84 ile SEKANS KOD NO.: 85'ten oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRH2 sekansı; veya

c. SEKANS KOD NO.: 86, SEKANS KOD NO.: 87 ile SEKANS KOD NO.: 88'den oluşan grup içerisinden seçilen bir CDRH3 sekansı.

Bu buluşa göre, nükleik asit, bir CDRH1, bir CDRH2 ve bir CDRH3 arasından en az iki CDR'yi içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, bir CDRH1, bir CDRH2 ve bir CDRH3 içerebilecek olan bir ağır zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit olabilir.

En az bir adet konservatif amino asit ikamesi bulunan antikor varyantları kodlayan nükleik asitler de bu buluşun kapsamına girmektedir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, en az bir adet konservatif amino asit ikamesi içeren bir CDR kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, CDR'lerden en az ikisinde en az bir adet konservatif amino asit ikamesi içeren bir CDR kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, CDR'lerden üçünde de en az bir adet konservatif amino asit ikamesi içeren bir CDR kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, CDR'lerden en az birinde en az iki adet konservatif amino asit ikamesi içeren bir CDR kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, CDR'lerden en az ikisinde en az iki adet konservatif amino asit ikamesi içeren bir CDR kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Bu buluşa göre, nükleik asit, CDR'lerden üçünde de en az iki adet konservatif amino asit ikamesi içeren bir CDR kodlayan bir nükleik asit olabilir.

Burada, SEKANS KOD NO.: 16, SEKANS KOD NO.: 20, SEKANS KOD NO.: 24, SEKANS KOD NO.: 103, SEKANS KOD NO.: 104, SEKANS KOD NO.: 105, SEKANS KOD NO.: 106, SEKANS KOD NO.: 107, SEKANS KOD NO.: 108, SEKANS KOD NO.: 109, SEKANS KOD NO.: 110, SEKANS KOD NO.: 111, SEKANS KOD NO.: 112, SEKANS KOD NO.: 113, SEKANS KOD NO.: 114, SEKANS KOD NO.: 115, SEKANS KOD NO.: 116, SEKANS KOD NO.: 117, SEKANS KOD NO.: 118, SEKANS KOD NO.: 119, SEKANS KOD NO.: 120, SEKANS KOD NO.: 121, SEKANS KOD NO.: 122, SEKANS KOD NO.: 123, SEKANS KOD NO.: 124 ile SEKANS KOD NO.: 125'ten oluşan grup içerisinden seçilen bir sekans ile en az %70, %75 veya %80 oranında sekans özdeşliğine

sahip olan bir hafif zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit konu edilmekte ve açıklanmaktadır.

Burada ayrıca, SEKANS KOD NO.: 18, SEKANS KOD NO.: 22, SEKANS KOD NO.: 26, SEKANS KOD NO.: 126, SEKANS KOD NO.: 127, SEKANS KOD NO.: 128, SEKANS KOD NO.: 129, SEKANS KOD NO.: 130, SEKANS KOD NO.: 131, SEKANS KOD NO.: 132, SEKANS KOD NO.: 133, SEKANS KOD NO.: 134, SEKANS KOD NO.: 135, SEKANS KOD NO.: 136, SEKANS KOD NO.: 137, SEKANS KOD NO.: 138, SEKANS KOD NO.: 139, SEKANS KOD NO.: 140, SEKANS KOD NO.: 141, SEKANS KOD NO.: 142, SEKANS KOD NO.: 143, SEKANS KOD NO.: 144, SEKANS KOD NO.: 145, SEKANS KOD NO.: 146 ile SEKANS KOD NO.: 147'den oluşan grup içerisinden seçilen bir sekans ile en az %70, %75 veya %80 oranında sekans özdeşliğine sahip olan bir ağır zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit de konu edilmekte ve açıklanmaktadır.

Burada ayrıca, burada açıklanan nükleik asitleri içeren bir vektör de konu edilmekte ve açıklanmaktadır.

Bu buluşa göre, söz konusu vektör bir ekspresyon vektörü olabilir.

Sokulan kodlama sekansının belli bir konakçıda transkripsiyonel ve translasyonel kontrolünü sağlayabilecek kontrol elemanları içeren vektörler sektörde bilinirler. Bu elemanlar arasında, artırıcılar, konstitütif ve indüklenebilir promotörler ve 5' ve 3' çevrilmemiş bölgelerinin örnek gösterilebileceği düzenleyici sekanslar sayılabilir.

Bu tür ekspresyon vektörlerini yapmak için, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca iyi bilinen uygun yöntemlere başvurulabilir. Bu yöntemler arasında, *in vitro* rekombinan DNA teknikleri, sentetik teknikler ve *in vivo* genetik rekombinasyon bulunur.

Burada konu edilen açıklanan bir diğer unsur, burada açıklanan nükleik asidin yer alabileceği bir izole hücredir.

Bu izole hücre, ayrı vektörler üzerinde veya aynı vektör üzerinde bir hafif zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit ve bir ağır zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit içerebilir. Bu izole vektör, ayrıca, ayrı vektörler üzerinde veya aynı vektör üzerinde bir hafif zincir kodlayan bir nükleik asit ve bir ağır zincir kodlayan bir nükleik asit de içerebilir.

Bu buluşa göre, söz konusu hücre, bir antikoru veya onun bir antijen-bağlanma fragmanını eksprese etme, birleştirme ve/veya salgılama kabiliyetine sahip olabilir.

Burada ayrıca, burada açıklanan antikoru içerebilecek ve/veya eksprese edebilecek olan bir hücre de konu edilmekte ve açıklanmaktadır.

Bu buluşa göre, söz konusu hücre, bir hafif zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit ve bir ağır zincir değişken bölgesi kodlayan bir nükleik asit içerebilir.

Söz konusu hücre, bir antikoru veya onun bir antijen-bağlanma fragmanını eksprese etme, birleştirme getirme ve/veya salgılama kabiliyetine sahip olabilir.

Aşağıdaki örnekler, bu buluşun ayrıntılarını daha somut bir şekilde ortaya koymak amacı ile sunulmaktadırlar.

ÖRNEKLER

Örnek 1

Bu örnekte, Fab'ları tam boy IgG1 kimerik monoklonal antikorlarına dönüştürmek için kullanılan yöntemler açıklanmaktadır.

Fab'ların kullanımı, Fab monoklonal antikorları ile KAAG1 proteini arasında etkileşim çalışmaları gerçekleştirme olanağının dışında, antijenin biyolojik fonksiyonunu valide etme amaçlı anlamlı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar gerçekleştirmek ile sınırlı olabilir. Dolayısıyla, fare-insan kimerik IgG1'leri oluşturmak üzere Fab'larda bulunan hafif ve ağır zincir değişken bölgelerini tam boy antikor iskelelerine aktarmak gerekliydi. Hafif ve ağır immünoglobulin zincirlerine yönelik ekspresyon vektörleri, i) Fab ekspresyon vektörlerinden sonra gelen orijinal bakteriyel sinyal peptidi sekanslarının yerini memeli sinyal peptidlerinin almasını ve ii) fare antikorlarında bulunan hafif ve ağır zincir sabit bölgelerinin yerini insan sabit bölgelerinin almasını sağlayacak şekilde yapıldılar. Bu aktarımı gerçekleştirmek üzere başvurulan yöntemlerde, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanların aşina oldukları standart moleküler biyoloji teknikleri kullanıldı.

Hafif zincir ekspresyon vektörü - 293E geçici transfeksiyon sisteminde kullanılmak üzere tasarlanmış olan pTTVH8G (Durocher et al. 2002) adı verilen bir mevcut memeli ekspresyon plazmidi modifiye edilerek fare hafif zincir değişken bölgesi söz konusu plazmide yerleştirildi. Elde edilen fare-insan kimerik hafif zincirinde, bir fare değişken bölgesi ve onu takip eden insan kappa sabit domaini vardı. İnsan kappa sabit domainini kodlayan cDNA sekansı, OGS1773 ve OGS1774 primerleri (sırasıyla SEKANS KOD NO.: 55 ve 56) kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. İnsan kappa sabit bölgesine ilişkin nükleotid sekansı ile mütekabil amino asit sekansı, sırasıyla SEKANS KOD NO.: 57 ile 58'de gösterilmektedirler. Oluşan 321 baz çifti uzunluğundaki PCR ürünü, insan VEGF A'sının (NM_003376) sinyal peptidi sekansından hemen sonra gelen pTTVH8G'ye ligate edildi. Bu klonlama basamağı ayrıca fare hafif zincir değişken bölgelerini kodlayan cDNA'ların kesin bir şekilde konumlanmalarına izin veren benzersiz restriksiyon endonükleaz yerlerini konumlandırdı. pTTVK1 adı verilen nihai ekspresyon plazmidinin sekansı, SEKANS KOD NO.: 59'da gösterilmektedir. Tablo 2'de açıklanan sekanslar temelinde, 3D3, 3G10, 3C4 ve 3A4 antikorlarının hafif zincir değişken bölgelerine (sırasıyla SEKANS KOD NO.: 15, 19, 23 ve 47) özgü olan ve 5' uçlarında VEGF A sinyal peptidinin son 20 baz çiftine özdeş bir sekans içeren PCR primerleri tasarlandı. Bu primerlerin sekansları, SEKANS KOD NO.: 60, 61, 62 ve 213'te gösterilmektedirler. 3' uçlarının son kısımları özdeş olduğu için, 3D3, 3G10 ve 3C4'ün hafif zincir değişken bölgelerini amplifiye ederken aynı ters primer kullanıldı. Bu primerin (SEKANS KOD NO.: 63) 3' ucunda, insan kappa sabit domaininin ilk 20 baz çiftine özdeş olan bir sekans vardı. 3A4 hafif zincir değişken bölgesini amplifiye etmek için

SEKANS KOD NO.: 214'te gösterilen primer kullanıldı. Hem PCR fragmanları hem de parçalanan pTTVK1, T4 DNA polimerazın 3' - 5' eksonükleaz aktivitesi ile işlemden geçirildi ve bunun sonucunda, kaynaştırma yolu ile birleştirilen tamamlayıcı uçlar oluştu. Kaynaştırma reaksiyonları kompetan *E. coli*'ye transforme edildi ve ekspresyon plazmidleri sekanslama yoluyla doğrulanarak fare hafif zincir değişken bölgelerinin pTTVK1 ekspresyon vektörüne doğru şekilde sokulduklarından emin olundu. Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlar, hafif zincir ekspresyon plazmidlerinin yapımı için kullanılan yöntemin orijinal Fab kütüphanesinde bulunan bütün anti-KAAG1 antikorları için kullanılabileceğini anlayacaklardır.

Ağır zincir ekspresyon vektörü - ağır zincir immünoglobulinlerini üreten ekspresyon vektörü, hafif zincir immünoglobulinlerinin üretimini sağlamak üzere tasarlanmış olup yukarıda açıklanan pTTVK1'e benzer bir şekilde tasarlandı. İnsan IgGK sinyal peptidi sekansını ve yanı sıra insan IgG1 Fc domaininin CH2 ve CH3 bölgelerini içeren pYD11 plazmidi (Durocher et al., 2002), insan sabit CH1 bölgesini kodlayan cDNA sekansına ligate edilerek modifiye edildi. Benzersiz restriksiyon endonükleaz yerleri içerecek şekilde tasarlanmış olan PCR primerleri OGS1769 ve OGS1770 (SEKANS KOD NO.: 64 ve 65) kullanılarak, SEKANS KOD NO.: 66 ile 67'de gösterilen nükleotid sekansını ve mütekabil amino asit sekansını içeren insan IgG1 CH1 bölgesi amplifiye edildi. IgGK sinyal peptidi sekansından hemen sonra gelen 309 baz çifti uzunluğundaki insan CH1 fragmanının ligate edilmesi üzerine modifiye plazmide (SEKANS KOD NO.: 68) pYD15 adı verildi. Bu vektöre bir seçilmiş ağır zincir değişken bölgesi ligate edildiğinde, elde edilen plazmid,

insan sabit bölgeleri bulunan bir tam boy IgG1 ağır zincir immünoglobulini kodlar. Tablo 2'de açıklanan sekanslar temelinde, 3D3, 3G10, 3C4 ve 3A4 antikorlarının ağır zincir değişken bölgelerine (sırasıyla SEKANS KOD NO.: 17, 21, 25 ve 45) özgü olan ve 5' uçlarında IgGK sinyal peptidinin son 20 baz çiftine özdeş bir sekans içeren PCR primerleri tasarlandı. Bu primerlerin sekansları, SEKANS KOD NO.: 69 (3D3 ile 3G10 aynı 5' ucu sekansına sahiptirler), SEKANS KOD NO.: 70 ve 3A4'e istinaden SEKANS KOD NO.: 215'te gösterilmektedirler. 3' uçlarının son kısımları özdeş olduğu için, 3D3, 3C4 ve 3G10'un ağır zincir değişken bölgelerini amplifiye ederken aynı ters primer kullanıldı. Bu primerin (SEKANS KOD NO.: 71) 3' ucunda, insan CH1 sabit domaininin ilk 20 baz çiftine özdeş olan bir sekans vardı. 3A4 hafif zincir değişken bölgesi için SEKANS KOD NO.: 216 kullanıldı. Hem PCR fragmanları hem de parçalanan pYD15, T4 DNA polimerazın 3' - 5' eksonükleaz aktivitesi ile işlemden geçirildi ve bunun sonucunda, kaynaştırma yolu ile birleştirilen tamamlayıcı uçlar oluştu. Kaynaştırma reaksiyonları kompetan *E. coli*'ye transforme edildi ve ekspresyon plazmidleri sekanslama yoluyla doğrulanarak fare ağır zincir değişken bölgelerinin pYD15 ekspresyon vektörüne doğru şekilde sokulduklarından emin olundu. Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlar, ağır zincir ekspresyon plazmidlerinin yapımı için kullanılan yöntemin orijinal Fab kütüphanesinde bulunan bütün anti-KAAG1 antikorları için kullanılabileceğini anlayacaklardır.

293E hücrelerinde insan IgG1'lerinin ekspresyonu - Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan ve hafif ve ağır zincir immünoglobulinlerini kodlayan ekspresyon vektörleri, geçici transfeksiyon sistemi

kullanılarak 293E hücrelerinde eksprese edildiler (Durocher et al., 2002). Başka geçici veya stabil ekspresyon yöntemlerini kullanmak da mümkündür. Doku kültürü vasatında olası en büyük antikor çıktısına ulaşmak amacı ile hafif zincirin ağır zincire oranı optimize edildi ve en iyi sonucu veren oranın 9:1 (L:H) olduğu tespit edildi. ELISA ile anti-KAAG1 antikorlarının (monoklonal, kimerik veya hümanize) rekombinan Fc-KAAG1'e bağlanma kabiliyetleri ölçülüp orijinal fare Fab'ları ile kıyaslama yapıldı.

Diğer Fab'ları bir tam boy IgG'ye (3A4 dâhil) dönüştürmek ve antikorların ekspresyonu için başvurulan uygulama, bütün içeriği atıf yoluyla buraya dâhil edilmiş sayılan PCT/CA/2012/000296 numaralı uluslararası başvuruda daha ayrıntılı bir dille anlatılmakta ve açıklanmaktadır.

Örnek 2

3A4 fare monoklonal antikorunun hümanizasyonu

PCT/CA2009/001586, PCT/CA2010/001795 ve PCT/CA2012/000296 sayılı uluslararası patentlerde, hümanize hafif zincir ve ağır zincir değişken bölgelerini oluşturmak için kullanılan örnek niteliğindeki metodoloji açıklanmaktadır.

3A4 antikoru hafif zincir değişken bölgesinin hümanizasyonunda, antikorun %100 çerçeve hümanizasyonu için önerilen hümanize çerçeveye ulaşmak üzere 11 mutasyon yapıldı. 3A4 antikoru ağır zincir değişken bölgesinin hümanizasyonunda, antikorun %100

çerçeve hümanizasyonu için önerilen hümanize çerçeveye ulaşmak üzere 23 mutasyon yapıldı. Bu %100 hümanize değişken bölge sekansları, sırasıyla Lvh1 ve Hvh1 olarak etiketlendiler (SEKANS KOD NO.: 189 ve 194). Dikkatle yürütülen yapısal ve karşılaştırmalı sekans analizlerinde 3A4 fare sekanslarındaki bir dizi pozisyonda mutasyon söz konusu olması halinde antijen-bağlanma afinitesinin değişmesinin kuvvetle muhtemel olduğunun görülmesi sonucunda, söz konusu artıkların korundukları ek hümanize sekanslar da tasarlandı. Değişken bölgelere ait bu sekanslara, Lvh2, Hvh2, Hvh3 ve Hvh4 adı verildi (SEKANS KOD NO.: 190, 195, 196 ve 197).

İki hümanize hafif zincir varyantı (sabit bölge dâhil), burada Lh1 (SEKANS KOD NO.: 199) ve Lh2 (SEKANS KOD NO.: 200) tanımlıdır. Dört hümanize ağır zincir varyantı (sabit bölge dâhil), burada Hh1 (SEKANS KOD NO.: 202), Hh2 (SEKAN KOD NO.: 203), Hh3 (SEKANS KOD NO.: 204) ve Hh4 (SEKANS KOD NO.: 205) olarak tanımlıdır. İki hümanize hafif zincir ile dört hümanize ağır zinciri birleştirerek sekiz hümanize antikor (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3, Lh1Hh4, Lh2Hh1, Lh2Hh2, Lh2Hh3 ve Lh2Hh4) elde etmek mümkündür.

3A4 hafif zincir hümanize sekansı Lvh2'de (SEKANS KOD NO.: 190), fare sekansından gelen çerçeve artıkları Val-L2 ile Lys-L45, L2 artığının yarı gömülü olması, hem CDR-L1 hem de CDR-L3 ile temas etmesi ve antijen ile temas etmeye eğilimli olmasından, L45 artığının ise ağır zincire yaklaşmasından dolayı korundular. Bu murin artıklarının her ikisinin de insan çerçevelerinde görülebileceğini kaydettik. 3A4 ağır zincir hümanize sekansı Hvh2'de (SEKANS KOD

NO.: 195), fare sekansından gelen çerçeve artıkları Ile-H2 ile Lys-L73, H2 artığının yarı gömülü olması, hem CDR-H1 hem de CDR-H3 ile temas etmesi ve antijen ile temas etmeye eğilimli olmasından, H73 artığının ise Vernier zonunu destekleyen CDR-H2'ye ait olmasından ve bu iki murin artığının da insan çerçevelerinde görülebilecek olmasından dolayı korundular. 3A4 ağır zincir hümanize sekansı Hvh3'te (SEKANS KOD NO.: 196), fare sekansından gelen Ile-H2 ve Lys-L73 geri mutasyonları ve bunlara ek olarak, çerçeve artıkları Ile-H48, Ala-H67, Leu-H69 ve Val-H71, bütün bu murin artıklarının gömülü artıklar olması ve Veriner zonunu destekleyen CDR-H2'ye ait olmasından ve ayrıca murin artığı H71'in insan çerçevelerinde görülebilecek olmasından dolayı korundular. 3A4 ağır zincir hümanize artığı Hvh4'te (SEKANS KOD NO.: 197), Hvh3 hümanize varyantının altı geri mutasyonunun hepsi ve ayrıca iki ek fare çerçeve artığı Lys-H38 ile Lys-H66, bunların hepsinin CDR-H2'ye yakın yarı gömülü artıklar olmalarından dolayı korundular. Murin ve hümanize zincirlerin elde edilen amino asit sekansları Tablo 1'de listelenmektedir. Şekil 1a'da, murin ve hümanize hafif zincir değişken bölgeleri arasında yapılan hizalama ve Şekil 1b'de, murin ve hümanize ağır zincir değişken bölgeleri arasında yapılan hizalama gösterilmektedir.

Şekiller 2a ile 2b'de, sırasıyla murin hafif zincir değişken bölgesi ile %100 hümanize hafif zincir değişken bölgesi arasında yapılan bir hizalama ve murin ağır zincir değişken bölgesi ile %100 hümanize ağır zincir değişken bölgesi arasında yapılan bir hizalama gösterilmektedir. Bu şekillerde, korunan ve ikame için seçilmiş olan amino asitler özel olarak işaretlenmiştir.

Örnek 3

3A4 hümanize antikor varyantlarının birleştirilmesi ve ekspresyonu

Bu araştırmaların amacı, anti-klusterin antikorlarının kinetik parametrelerini belirlemektir. Somutlaştırmak gerekirse, 3A4 anti-KAAG1 monoklonal antikorunun hümanize edilmesinin antikorun insan KAAG1'ine bağlanımına ilişkin kinetik parametrelerini etkileyip etkilemediğini belirlemektir. Bu amaçla, BioRad firmasından edinilen ProteOn XPR36 cihazı kullanılarak bir kinetik analiz yöntemi geliştirildi. İnsan KAAG1'i, bir sensör çipinin üzerinde immobilize edildi. Tam boy antikorlar veya Fab fragmanları enjekte edildi ve immobilize KAAG1 ile etkileşime girmelerine izin verildi.

Kimerik (murin) 3A4 ağır ve hafif zincirlerini kodlayan plazmidin yapımı

Kimerik antikorun ağır ve hafif zincirleri, aşağıda belirtilen oligonükleotid primer çiftleri kullanılarak orijinal murin immünoglobulin zincirlerinden PCR ile amplifiye edildiler: ağır zincir, SEKANS KOD NO.: 206'nın kodladığı 5'-oligo ve SEKANS KOD NO.: 207'nin kodladığı 3'-oligo; hafif zincir, SEKANS KOD NO.: 208'in kodladığı 5'-oligo ve SEKANS KOD NO.: 209'un kodladığı 3'-oligo. Elde edilen PCR ürünleri, Hind III ile parçalandılar ve daha önceden Hind III ile parçalanmış olan pK-CR5'e (SEKANS KOD NO.: 210) klonlandılar.

Hümanize ağır zincir 3A4 varyantları 1, 2, 3 ve 4'ü kodlayan plazmidlerin yapımı

3A4 antikorunun hümanize ağır zincir bölgesini kodlayan fragmanlar (Hh1, Hh2, Hh3 ve Hh4) GenScript'ten (Piscataway, ABD) temin edildiler. Kozak ve bitiş kodonu sekansları dâhil DNA fragmanları, HindIII ile parçalandılar ve resirkülarizasyonu önlemek için daha önceden buzağı bağırsak fosfatazı (NEB) ile fosfattan arındırılmış olan pK-CR5 plazmidinin HindIII yerine klonlandılar. Şekil 3a'da, plazmid pK-CR5-3A4-HC-varyant1'in haritası gösterilmektedir. Hümanize 3A4'ün bütün ağır zincir varyantları benzer bir şekilde yapıldılar.

Hümanize hafif zincir 3A4 varyantları 1 ve 2'yi kodlayan plazmidlerin yapımı

3A4 antikorunun insan hafif zincir bölgelerini kodlayan fragmanlar (Lh1 ve Lh2) GenScript'ten temin edildiler. Kozak ve bitiş kodonu sekansları dâhil DNA fragmanları, BamHI ile parçalandılar ve resirkülarizasyonu önlemek için daha önceden buzağı bağırsak fosfatazı (NEB) ile fosfattan arındırılmış olan pMPG-CR5 plazmidinin (SEKANS KOD NO.: 211) BamHI yerine klonlandılar. Şekil 3b'de, plazmid pMPG-CR5-3A4-LC-varyant1'in haritası gösterilmektedir. Hümanize 3A4'ün bütün hafif zincir varyantları benzer bir şekilde yapıldılar.

Geçici transfeksiyon çalışması

Mini-Prep kiti (Qiagen Inc, Mississauga, ON) üreticisinin tavsiyelerine göre kullanılarak küçük *E. coli* kültürlerinden plazmid

DNA izole edildi. Kısaca tarif etmek gerekirse, 100 µg/ml ampisilin içeren 2 ml LB vasatına, ligasyon ve transformasyondan sonra alınan tek bir koloni inoküle edildi. Kültürler, dinamik bir hızla çalkalama (250 devir/dakika) eşliğinde gece boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edildiler. Daha sonra, kit ile birlikte sunulan protokoller, tamponlar ve kolonlar kullanılarak 1,5 ml kültürden plazmid izole edildi. DNA, 50 µl steril su kullanılarak elüe edildi. Plasmid Plus Maxi kiti (Qiagen Inc, Mississauga, ON) üreticisinin tavsiyelerine göre kullanılarak büyük *E. coli* kültüründen plazmid DNA izole edildi. 100 µg/mL ampisilin içeren 200 mL LB vasatına tek bir taze *E. coli* kolonisi inoküle edildi ve kültürler, dinamik bir hızla çalkalama (250 devir/dakika) eşliğinde gece boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edildiler. Bakteriler (ağır zincire ilişkin 130 mL kültür ve hafif zincire ilişkin 180 mL kültür), 6000 x g'de 4°C sıcaklıkta 15 dakika boyunca santrifüje tâbi tutularak peletlendiler ve plazmid, kit ile birlikte sunulan protokoller, tamponlar ve kolonlar kullanılarak izole edildi. Saf plazmidler, steril 50 mM Tris, pH 8'de yeniden süspanse edildiler ve 260 nm'de optik yoğunluk ölçümü yapılarak ölçüldüler. Saflaştırılmış plazmid, transfeksiyondan önce fenol/kloroform ile ekstrakte edilip ardından etanol ile presipite edilerek sterilize edildi. Plazmid, steril 50 mM Tris, pH 8'de yeniden süspanse edildi ve 260 nm'de optik yoğunluk ile ölçüldü.

Transfeksiyondan önce, hücreler (CHO-cTA), PBS ile yıkandılar ve süspansiyon kültüründe dekstrak sülfatın bulunmadığı çoğaltma vasatında (CD-CHO, Invitrogen) 3 saat boyunca 4,0 x 10^6 hücre/ml konsantrasyonunda yeniden süspanse edildiler. Her plazmid kombinasyonu için, her plazmidden 10 µg/ml ölçüsünde bulunmakta

olan 50 µg/ml polietilenimin takviyeli 5 ml CDCHO vasatının (PEI Max; Polysciences) yavaş yavaş ilave edilmesi yoluyla 45 ml hücre transfekte edildi. Nihai konsantrasyon, 1 µg/ml plazmid ve 5 µg/ml PEI idi. 2 saat sonra, hücreler 30°C sıcaklıktaki ortama aktarıldılar. Takip eden günlerde, hücrelerin üzerine 50 µg/mL dekstran sülfat ve her takviyeden (Efficient Feed A ve B, Invitrogen) 3,75 ml ilave edildi ve bunlar, 13 gün boyunca 30°C sıcaklıkta inkübe edildiler. 4, 6, 8 ve 11. günlerde 2,5 ml Feed A ve 2,5 ml Feed B ilave edildi. 13. günde, santrifüj yoluyla üst faz berraklaştırıldı ve bir 0,22 µm filtreden geçirilerek filtrelendi.

CHO hücreleri (CHOcTA), CR5 promotörünün regüle ettiği 3A4 antikorunun hümanize ağır ve hafif zincirlerinin farklı varyantlarını kodlayan plazmidler ile transfekte edildiler. Transfeksiyon, farklı hafif ve ağır zincir kombinasyonları ile gerçekleştirildi. Kontrol olarak, hücreler ayrıca kimerik/murin antikorunu kodlayan plazmidler ile de transfekte edildiler.

Antikorun saflaştırılması

CHO hücre transfeksiyonları Amicon Ultra (Ultracell-50k) kaseti ile 1500 devir/dakika hızla santrifüje tâbi tutularak bu transfeksiyonlardan 15 ml üst faz konsantre edildi. Konsantre antikor (550 µl), Nab spin kiti Protein A Plus'nin (Thermo Scientific) üreticisinin tavsiyelerine uygun kullanılması yoluyla saflaştırıldı. Daha sonra, saflaştırılmış antikorlar, nihai hacim 250 µl olana dek 2500 devir/dakika hızla konsantre edici Amicon Ultra (Ultracell-10K) kaseti ve PBS kullanılarak tuzdan arındırıldılar. Saflaştırılmış antikor,

Nanodrop spektrofometresi ile OD_{280}'de okuma yapılarak ölçüldü ve -20°C sıcaklıkta dondurulmuş halde tutuldu. Saflaştırılmış antikorun bir alikotu, eşit bir hacimdeki Laemmli 2X'de yeniden süspanse edildi, 95°C sıcaklıkta 5 dakika boyunca ısıtıldı ve buz üzerinde soğutuldu. İnsan Miyelom plazmasından (Athens Research) bilinen bir miktarda saflaştırılmış insan IgG1 kappası kullanılarak bir standart eğri yapıldı. Numuneler, bir poliakrilamid Novex %10 Tris-Glisin jeli (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON) üzerinde ayrıldılar ve 275 mA'da 1 saat boyunca bir Hybond-N nitroselüloz membranının (Amersham Bioscience Corp., Baie d'Urfée, QC) üzerine aktarıldılar. Membran, PBS'de bulunan %0,15 Tween 20, %5 yağsız sütte 1 saat boyunca bloke edildi ve Cy5'e konjuge olan bir Keçi anti-İnsan IgG'si (H+L) (Jackson, Katalog No. 109-176-099) ile birlikte 1 saat boyunca inkübe edildi. Sinyal, Typhoon Trio+ tarayıcı (GE Healthcare) ile tarama yapılarak açığa çıkarıldı ve ölçüldü. Şekil 4'te gösterildiği gibi, 3A4 hümanize antikor varyantlarının bütün kombinasyonları CHO hücrelerinde eksprese edildi.

Örnek 4

Murin ve hümanize 3A4 antikorunun kinetik analizi

Malzemeler

GLM sensör çipleri, Biorad ProteOn amin kenetleme kiti (EDC, sNHS ve etanolamin) ve 10 mM sodyum asetat tamponları, Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON) firmasından satın alındılar. HEPES tamponu, EDTA ve NaCl, Sigma-Aldrich (Oakville, ON) firmasından satın alındılar. %10 Tween-20 çözeltisi, Teknova (Hollister, CA) firmasından satın alındı. Keçi anti-insan IgG Fc fragmanı spesifik

antikor, Jackson ImmunoResearch firmasından satın alındı. Jel filtrasyon kolonu Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare firmasından satın alındı.

Jel filtrasyonu

3,114 mg/ml konsantrasyonunda ve 220 µl hacminde bulunan KAAG1 proteini, Superdex G75 kolonuna enjekte edildi. Ayrıştırma, Tween 20 bulunmayan HBST yürütme tamponunda (aşağıya bakınız) 0,4 ml/dakika hızla gerçekleştirildi. Toplanan fraksiyonların hacmi 500 µL'ydi. Fraksiyonlardaki KAAG1 konsantrasyonu, 5500 sönüm katsayısı ve 8969 molekül ağırlığında OD_{280}'de belirlendi. Şekil 5, KAAG1'in jel filtrasyon profilini temsil etmektedir. 11 ml civarında potansiyel agregata ilişkin ufak bir pik elüe olmaktadır. 13 ml'de elüe olan protein, SPR eseyi için analit olarak kullanıldı (fraksiyonlar 15 - 19).

SPR biyosensör eseyleri

Bütün yüzey plazmon rezonans eseyleri, bir BioRad ProteOn XPR36 cihazı (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON) kullanılarak 25°C sıcaklıkta HBST yürütme tamponuyla (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA ve %0,05 Tween 20, pH 7,4) gerçekleştirildiler. Anti-fare Fc yakalama yüzeyi, analit (yatay) yönünde 30 µL/dakika hızla 300 saniye boyunca enjekte edilen standart BioRad sNHS/EDC çözeltilerinin 1:5 oranındaki bir seyreltisi ile aktive edilen bir GLM sensör çipi kullanılarak oluşturuldu. Aktivasyondan hemen sonra, 10 mM NaOAc, pH 4,5'te yer alan 13 µg/ml ölçüsündeki bir anti-insan

IgG Fc fragmanı spesifik antikor çözeltisi, yaklaşık 8000 rezonans birimi (RU) immobilize olana dek 25 µL/dakika akış hızıyla analit yönünde enjekte edildi. Kalan aktif gruplar, analit yönünde 30 µL/dakika hızla 300 saniye boyunca 1 M etanolamin enjekte edilerek söndürüldüler ve böylece ayrıca, blank referans olarak kullanılmak üzere sahte-aktive interspotlar oluşması sağlandı. 3A4 varyantları arasında KAAG1'e bağlanım yönünden yapılan tarama iki basamakla gerçekleştirildi: hücre üst fazındaki 3A4 varyantlarının ligand yönünde (düşey) anti-insan IgG Fc fragmanı spesifik yüzey üzerinde dolaylı bir şekilde yakalanması ve ardından analit yönünde bir KAAG1 enjeksiyonu. Öncelikle ligand yönünde 100 µL/dakika hızla 30 saniye boyunca bir tampon enjeksiyonu yapılarak taban çizgisi stabilize edildi. Her 3A4 yakalaması için, hücre kültürü vasatlarındaki saflaştırılmamış 3A4 varyantları HBST'de %4'e varana dek seyreltildiler ya da HBST'de yer alan yaklaşık 1,25 µg/mL ölçüsünde saflaştırılmış 3A4 kullanıldı. Yabani tip 3A4 ile birlikte dört ilâ beş adet 3A4 varyantı, ayrı ligand kanallarına 25 µL/dakika hızla 240 saniye boyunca eşzamanlı olarak enjekte edildi. Bunun sonucunda, anti-insan IgG Fc fragmanı spesifik yüzey üzerinde yaklaşık 400-700 RU düzeyinde satüre edici ölçüde 3A4 yakalandı. Birinci ligand kanalı, gerekirse ve gerektiğinde bir blank kontrol olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı. Bu 3A4 yakalama basamağından hemen sonra analit yönünde iki tampon enjeksiyonu yapılarak taban çizgisi stabilize edildi ve daha sonra jel filtrasyonu ile saflaştırılmış KAAG1 enjekte edildi. Tipik bir tarama için, beş KAAG1 konsantrasyonu (8, 2,66, 0,89, 0,29 ve 0,098 nM) ve kontrol amaçlı tampon, ayrı analit kanallarına 50 µL/dakika hızla 120 saniye boyunca eşzamanlı olarak enjekte edildi ve 600 saniyelik bir ayrışma fazı uygulandı ve bunlar

sonucunda, yakalanan 3A4 varyantlarının her biri için bir tampon referansı bulunan bir dizi bağlanma sensorgramı elde edildi. Bir sonraki enjeksiyon döngüsü için anti-insan IgG Fc fragmanı spesifik yüzeyi hazırlamak için, anti-insan IgG Fc fragmanı spesifik - 3A4 kompleksleri 100 µL/dakika hızla 18 saniye boyunca 18 saniyelik bir %0,85 fosforik pulsu verilerek rejenere edildiler. Sensorgramlar hizalandılar ve biri tampon blank enjeksiyonu ve diğeri interspotlar olmak üzere iki referansla eşleştirildiler ve elde edilen sensorgramlar, ProteOn Manager yazılımı v3.0 kullanılarak analiz edildiler. Referans alınan sensorgramların lokal R_{max} kullanılarak 1:1 Langmuir bağlanma modeline uydurulması yoluyla kinetik ve afinite değerleri belirlendi ve elde edilen hız sabitlerinden (k_d s^{-1}/k_a $M^{-1}s^{-1}$) afinite sabitleri (K_D M) saptandı.

Hız ve afinite sabitlerinin belirlenmesi

Şekil 6'da, saflaştırılmış murin 3A4'ü, bir kimerik olarak geçici eksprese edilmiş murin 3A4'ü ve geçici eksprese edilmiş hümanize varyantlar ile KAAG1'in etkileşimine ilişkin birleşme (k_a, 1/Ms) ve ayrışma (k_d, 1/s) hız sabitleri ve afinite (K_d, M) sabitleri özetlenmektedir. Bu sabitler, Şekiller 7a-c'de grafiksel olarak sunulmaktadır. Saf parenteral, kimerik ve hümanize 3A4 varyantlarının birleşme hız sabitleri çok yakındır (Şekil 7a). Saf parenteral 3A4'e kıyasla geçici eksprese edilmiş kimeriğin ayrışma hız sabiti çok benzerdir ve bu bulgu, transfeksiyon prosedürünün KAAG1 ile antikor arasındaki etkileşime ilişkin parametreleri değişikliğe uğratmadığını göstermektedir (Şekil 7b). Bununla birlikte, bütün hümanize varyantların bir miktar farklı bir hız değerine, yani daha

yüksek bir ayrışma hızına sahip oldukları görülmektedir (Şekil 7b). Bu, afinite sabitlerine de yansımaktadır (Şekil 7c). Özetle, hümanize varyantın bağlanma afinitesi ($logK_D$) ile parent antikorda (LcHc) yapılan geri mutasyonların sayısı arasında doğrusal bir bağıntı söz konusudur; bağlanma afinitesi azaldıkça mutasyonların sayısı artmaktadır. Bununla birlikte, hiçbir fare artığının muhafaza edilmemiş olduğu en kötü varyant (H1L1, 0,47 nM) ile 10 adet fare artığının muhafaza edilmiş olduğu en iyi varyant (H4L2, 0,1 nM) arasında bağlanma afinitesi yönünden yalnızca 4 katlık bir fark söz konusudur. Son olarak, bütün varyantların KAAG1'e yönelik bağlanma afinitelerinin nanomolar altı düzeylerde olduğu ve en iyi varyantın (H4L2, 0,1 nM) murin antikoruna (LcHc, 0,057 M) kıyasla yaklaşık 6 kat daha zayıf bir afinite sergilediği tespit edildi. Genel olarak bakıldığında bu sonuçlar, varyantların hepsinin KAAG1'e yönelik yüksek afinite ortaya koyduğunu ve dolayısıyla hümanizasyonun başarılı olduğunu göstermektedir.

Örnek 5

Bir ELISA'da 3A4 hümanize varyantlarının KAAG1'e bağlanımı

Hümanize 3A4 varyantlarının bağlanma aktivitelerini murin 3A4 antikorunun bağlanma aktivitesi ile karşılaştırmak için ELISA yöntemleri de kullanıldı. Rekombinan insan KAAG1'i gece boyunca 96-kuyucuklu plakaların üzerine kaplandı, yıkandı ve artan miktarlarda murin veya hümanize 3A4 varyantları ile oda sıcaklığı altında 1 saat boyunca inkübe edildi. Yıkama basamaklarının gerçekleştirildiği bir diğer çevrimin ardından, kuyucuklara HRP'ye

konjuge bir anti-insan antikoru ilave edildi ve bağlı 3A4 antikoru, Abs_{450}'de kalorimetrik olarak ölçüldü. Şekil 8a'da gösterildiği gibi, hümanize varyantlar (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3 ve Lh1Hh4), KAAG1'e 0,016 nM kadar yüksek bir afiniteye sahip olan murin 3A4 (LcHc) ile çok benzer bir kuvvette bağlandılar. Bu bulgu, söz konusu dört hümanize ağır zincir varyantının dördünün de hümanize hafif zincirin L1 varyantı ile birleştirilmeleri halinde orijinal h3A4 ağır zinciri ile denk ve karşılaştırılabilir sonuçlar verdiklerini gösterdi. Şekil 8a'da, ağır zincir varyantları 3A4 hümanize hafif zincirinin Lh2 varyantı birleştirildiklerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir. Bu durumda, varyantların bağlanımları arasında bir farklılık söz konusuydu. Örnek vermek gerekirse, murin 3A4'e en yakın profili çizen varyant Lh2hh4'tü. Bu sonuç, ağır zincirin 4 numaralı varyantının KAAG1'e yönelik en yüksek afiniteye sahip olan varyant olduğunu gösteren SPR verileri ile tutarlı ve uyumluydu. Bu bağlanma sonuçları birlikte ele alındığında görülmektedir ki, bu eseyde hümanize varyantların hepsi insan KAAG1'i ile etkileşime girmektedir. Aralarında hemen göze çarpmayan bazı farklılıklar bulunsa da, ELISA'da elde edilen bağlanma sonuçları, SPR sonuçları ile uyumluydu.

Örnek 6

3A4 hümanize varyantlarının kanser hücrelerinin yüzeylerine bağlanımları

Hümanize 3A4 varyantlarının kanser hücrelerinin yüzeyleri üzerinde eksprese olan KAAG1 ile etkileşime girme kapasitelerini

değerlendirmek amacıyla akış sitometrisi kullanıldı. Bu amaçla, daha önceden akış sitometrisi ile 3A4'e etkin ölçüde bağlandıklarını göstermiş olduğumuz SKOV-3 yumurtalık kanseri hücreleri, sekiz hümanize varyant ve orijinal murin antikoru ile inkübe edildiler. Kısaca tarif etmek gerekirse, SKOV-3 hücreleri, EDTA bulunan plakadan alındılar ve 3,0 mg/ml, 0,3 mg/ml ya da 0,3 mg/ml antikor ile 1 saat boyunca buz üzerinde inkübe edildiler. Üç yıkama basamağının ardından, hücreler, FITC'ye konjuge sekonder antikor anti-insan IgG'si ile 1 saat boyunca buz üzerinde inkübe edildiler. Bir akış sitometresinde hücre yüzeyi floresansı ölçülmüş olup, bu ölçümden elde edilen değerler Şekil 9'daki histogramda gösterilmektedir. Görülebileceği gibi, bütün varyantlar permeabilize edilmemiş hücrelerde yüzey üzerindeki KAAG1'i tespit etmeyi başardılar ve en kuvvetli sinyaller 3A4 antikorlarının en yüksek konsantrasyonunda (3 mg/ml) elde edilirken, antikor konsantrasyonu düştükçe sinyaller de zayıfladı. Farklı varyantlar arasından en fazla sayıda murin geri mutasyonu bulunan varyantlar (Şekil 9, bkz: Lh1Hh4 ve Lh2Hh4), hücrelerin yüzeyleri üzerindeki KAAG1 ile en yüksek aktiviteyi ortaya koyarak etkileşime giren varyantlar oldular. Lh1Hh4 ile Lh2hh4, gerçekten de murin 3A4 antikoruna (LcHc) kıyasla KAAG1'e yönelik biraz daha gelişmiş bir hücre yüzeyi bağlanımı gösterdiler.

Örnek 7

Bu örnekte, anti-KAAG1 antikorlarının TNBC'de KAAG1 ekspresyonunu tespit etmek amacı ile kullanımı anlatılmakta ve açıklanmaktadır.

TNBC numunelerinde KAAG1 antijeninin bulunup bulunmadığını belirlemenin bir yolu olarak immünohistokimya gerçekleştirildi. Hasta biyopsilerinden edinilen 139 meme tümörü numunesinin bulunduğu doku mikro-dizileri elde edildi. Parafine gömülü epitel meme tümörü numuneleri, lamların üzerine yerleştirildiler ve 50°C sıcaklıkta 15 dakikalığına fikse edildiler. Ardından numuneler ksilen ile iki defa işlemden geçirilip akabinde %100, %80 ve %70 etanolde peş peşe 5 dakikalık yıkamalarla dehidre edilerek parafinden arındırıldılar. Lamlar, PBS'de 5 dakika boyunca üç defa yıkandılar ve antijeni ortaya çıkarmak maksadıyla antijen geri kazanım çözeltisi (1 mM EDTA, pH 8,0) ile işlemden geçirildiler. Lamlar metanolde yer alan H_2O_2 ile inkübe edilerek endojen peroksidaz reaktif türler çıkarıldı ve lamların serum içermeyen bloke edici çözelti (Santa Cruz Biotech) ile oda sıcaklığı altında 5 dakika boyunca inkübe edilmeleri yoluyla blokaj gerçekleştirildi. Ardından oda sıcaklığında 1 saat boyunca primer antikor (anti-KAAG1 3A4) ilave edildi. KAAG-1 reaktif antijen, biyotin-konjuge fare anti-kappa ile ve ardından streptavidin-HRP tersiyer antikoru ile inkübasyon gerçekleştirilerek tespit edildi. Lamların DAB-hidrojen peroksidaz substratı ile 5 dakikadan kısa bir süre boyunca işlemden geçirilmeleri yoluyla pozitif boyanma açığa çıkarıldı ve daha sonra hematoksilin ile karşıt boyamaya tâbi tutuldu. KAAG1 proteininin meme tümörü numunelerinin büyük çoğunluğunda çok yüksek seviyelerde eksprese olduğu tespit edildi. Şekil 10'da, 139 adet tümör içeren temsili bir dizi gösterilmektedir. Somutlaştırmak gerekirse, TNBC oldukları teyit edilen 15/20 biyopsi numunesi (Şekil 10, yıldız işareti ile gösterilen numuneler), 3A4 antikoruna karşı KAAG1 ekspresyonu yönünden kuvvetli ölçüde boyandı. Bu immünohistokimyasal çalışmalar birlikte ele

alındıklarında, monoklonal antikorların meme kanserinde, özellikle de TNBC'de KAAG1 belirleme konusunda faydalı olduklarını ortaya koymaktadırlar.

Örnek 8

Bu örnekte, anti-KAAG1 antikorlarının TNBC hücre hatlarında KAAG1 ekspresyonunu belirleme amaçlı kullanımı anlatılmakta ve açıklanmaktadır.

KAAG1'i kodlayan cDNA'nın primer yapısına dair yapılan biyoenformatik analizinden, biyokimyasal çalışmalardan ve proteini epitel hücrelerde immünohistokimyasal tekniklerle tespit edip belirleme çalışmalarından elde edilen sonuçlar, KAAG1 antijeninin hücre yüzeyi üzerinde yer aldığını gösterdi. Fakat KAAG1'in gerçekten de TNBC hücrelerinin yüzeyleri üzerinde eksprese olduğunu kanıtlamak için daha kesin ve dolaysız kanıtlara ihtiyaç vardı. Bu analizi gerçekleştirmek için, bir ticari satıcıdan (ATCC, Manassas, VA) meme kanseri hücre hatları edinildi ve bunlar akış sitometrisi deneylerinde kullanıldılar. KAAG1 mRNA'sına özgü primerlerin kullanıldıkları daha önceden gerçekleştirilmiş olan RT-PCR ekspresyon analizlerinde, belirli meme kanseri hücre hatlarının KAAG1 mRNA'sını eksprese ettikleri görülmüştü (bkz: PCT/CA2007/001134). Bundan dolayı, KAAG1 antijeninin hücre yüzeyleri üzerindeki varlığını belirlemek amacıyla bu hücre hatlarından bazıları seçildi. Bunu doğrulamak için, üçlü negatif MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, BT-20 ve BT-549 hücre hatları, 3A4 anti-KAAG1 antikoru kullanılarak KAAG1'in yüzey

ekspresyonu yönünden test edildiler. Ek olarak, analize adları T47D ve MCF7 olan ve üçlü negatif olmayan meme kanseri hücre hatları da dâhil edildi. Son olarak, akış sitometrisi deneyi (FCM) için bir negatif kontrol görevi görmesi adına, tespit edilemez düzeyde KAAG1 antijeni ekspresyonu sergileyen 293-6E adlı bir kontrol hücre hattı katıldı. FCM analizinin amaçları doğrultusunda, hücreler, 5 mM EDTA kullanılarak hasat edildiler, bir hemositometre ile sayıldılar ve 2 x 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda FCM tamponunda (1x PBS'de %0,5 BSA, %0,01 keçi serumu) yeniden süspanse edildiler. 100 µl hücrenin üzerine 0,5 µg/ml nihai konsantrasyonunda kimerik 3A4 anti-KAAG1 antikoru veya bir kontrol amaçlı IgG ilave edildi ve oluşan içerik takip eden 1 saat boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra bağlanmamış olan antikorları uzaklaştırmak amacı ile hücreler soğuk FCM tamponunda yıkandılar, ardından FITC sekonder antikoruna konjuge anti-insan IgG'si (1:200 oranında seyreltilmiş) içeren 100 µl FCM tamponunda yeniden süspanse edildiler ve müteakip 45 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildiler. Soğuk FCM tamponunda gerçekleştirilen bir diğer yıkama basamağından sonra, hücreler 300 µl FCM tamponunda yeniden süspanse edildiler ve bir akış sitometresi ile analiz edildiler. Her numuneye 10 µg/ml propidyum iyodür ilave edilerek ölü hücrelerin çerçeve içine alınmasına olanak sağlandı. Yapılan üç bağımsız deneyden elde edilen sonuçlar Şekil 11'de gösterilmekte olup, bu şekilde yer alan ortalama floresans yoğunluğundaki (MFI) misli cinsinden artış, hücreler negatif kontrol amaçlı insan IgG'si ile inkübe edildiklerinde elde edilen ve keyfi olarak 1'e ayarlanmış olan sinyale kıyasla hücreler 3A4 antikoru ile inkübe edildiklerinde elde edilen sinyale ilişkin geometrik ortalama değerini temsil etmektedir. Antikorların kontrol 293-6EHEK-293

hücreleri ile inkübasyonu, hücreler primer antikor olmadan inkübe edildiklerinde elde edilen sinyale yakın floresans sinyallerinin oluşması ile sonuçlandı. Ayrıca, 3A4 ile elde edilen sinyal ile kontrol IgG'si ile elde edilen sinyal arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu. Dahası, kontrol IgG'si meme kanseri hücre hatları ile inkübe edildiğinde elde edilen sinyaller, kontrol 293-6E hücreleri ile elde edilen sinyallere çok yakındı. Diğer yandan, 3A4 antikoru meme kanseri hücre hatları ile inkübe edildiğinde tespit edilebilir floresans sinyalleri gözlemlendi. Her ne kadar değişken miktarlarda floresans gözlemlenmiş olsa da, en yüksek KAAG1 miktarı iki TNBC hücre hattı olan MDA-MB-231 ile BT-20 hücre hatlarındaki hücrelerin yüzeyleri üzerinde tespit edildi (bkz: Şekil 11; TNBC hücre hatları bir yıldız işareti ile gösterilmektedirler). Gerçekten de beş TNBC hücre hattının beşi de bu koşullar altında KAAG1 ekspresyonu yönünden pozitif sonuç verdi. T47 D ve MCF-7 hücreleri de KAAG1 eksprese etti. Bu bulgular birlikte ele alındığında anlaşılabileceği üzere, bu akış sitometrisi analizi, KAAG1'in hücre yüzeyleri üzerinde en yüksek düzeyde eksprese olduğu hücre hattının TNBC hücre hattı olduğunu göstermektedir.

Örnek 9

3A4 anti-KAAG1 antikorunun bir antikor konjugatı olarak kullanımı için yöntemler

Yukarıda gösterildiği gibi, KAAG1 antijeni, akış sitometrisi kullanılarak kanser hücrelerinin yüzeyleri üzerinde 3A4 ile tespit edilmiştir. Bir antikor hücrelerin yüzeyleri üzerinde bulunan hedefine

bağlandığında meydana gelebilecek bir dizi farklı moleküler olay vardır. Bunlar arasında aşağıda belirtilenler bulunur: i) başka bir hücre yüzeyi antijeni/reseptörüne veya bir liganda erişimin bloke olması; ii) hücrelerin ADCC veya CDC aracılığıyla hedef alınmasına olanak sağlayacak nispeten stabil bir antikor-antijen kompleksinin oluşması; iii) agonistik antikorların kullanıldığı durumlarda olduğu gibi, sinyalleşme olayları meydana gelebilir; iv) kompleks, internalize olabilir; veya v) kompleks, hücre yüzeyinden kopup ayrılabilir. Bu soruya cevap verebilmek için, 3A4 antikoru-KAAG1 kompleksinin hücrelerin yüzeyleri üzerindeki davranışını inceledik. Bu deneyde pozitif kontrol olarak, daha önceki internalizasyon deneylerinde başarıyla kullanılmış olan (bkz: PCT/CA2009/001586) yumurtalık kanseri hücre hattı SKOV3 kullanıldı. MDA-MB-231 TNBC hücreleri, Örnek 3'te tarif edildiği gibi plakaya yatırıldılar, yıkandılar ve 0,5 μg/ml kimerik 3A4 antikoru ile inkübe edildiler. Yıkama işleminden sonra, tam ve eksiksiz vasat ilave edildi ve hücreler 60 dakikaya varan bir süre boyunca tutulacakları 37°C sıcaklığındaki bir ortama yerleştirildiler. Hücreler belirtilen zaman noktalarında (bkz: Şekil 12) çıkarıldılar, hızla soğutuldular ve FITC-konjuge anti-insan IgG'si ile gerçekleştirilecek akış sitometrisine hazır hale getirildiler ve bahsi geçen analizden elde edilen sonuçlar, 0 zaman noktasında kaydedilen sinyale kıyasla hücre yüzeyi üzerinde kalan ortalama floresans yoğunluğu yüzdesi olarak ifade edildiler (bkz: Şekil 12; Yüzey sinyali (0 zaman noktasına kıyasla kalan %)). Şekil 12'de gösterildiği gibi, 3A4 antikoru MDA-MB-231 hücreleri ile inkübe edildiğinde (Şekil 12; şekilde MDA-231 olarak gösterilen siyah çubuklar) floresans sinyali hızla düştü ve 30-45. dakika itibarıyla maksimum sinyal kaybına ulaşıldı. Meydana gelen sinyal kaybı, 3A4

antikoru SKOV3 hücreleri ile inkübe edildiğinde (Şekil 12; gri çubuklar) gözlemlenen sinyal kaybı ile denk ve karşılaştırılabilir düzeydeydi. Bu bulgu, 3A4/KAAG1 kompleksinin hücrelerden kaybolduğunu göstermekte olup, bu da kompleksin internalize olmuş olmasının kuvvetle muhtemel olduğuna işaret etmektedir. Hücre yüzeyi floresansındaki bu azalmadan sorumlu olan mekanizmayı açıklığa kavuşturmak amacı ile yürütülen preliminer çalışmalar, kompleksin internalize olmuş gibi gözüktüğünü ortaya koydu. Hümanize 3A4 antikorları ile de benzer sonuçlar elde edilmesi beklenmektedir.

İki ek TNBC hücre hattıyla, yani MDA-MB-436 (Şekil 13) ve BT-20 (Şekil 14) ile de benzer sonuçlar elde edildi ve böylece 3A4/KAAG1 kompleksinin birden çok sayıda TNBC hücre hattındaki hücrelerin yüzeyleri üzerinde internalize olduğu teyit edilmiş oldu. Diğer yandan, MDA-MB-436 ve T47D'nin yüzeyleri üzerinde de 3A4 bağlanımına dair benzer MFI seviyeleri kaydedilmiş olmasına rağmen (Şekil 11), 3A4 antikoru T47D hücre hattı ile inkübe edildiğinde hücre yüzeyi üzerinde sinyal kaybı gözlemlenmedi. Bu bulgu, 3A4/KAAG1 kompleksi internalizasyonunun üçlü negatif olmayan hücrelere kıyasla TNBC hücrelerinde daha yüksek bir düzeyde meydana gelmiş olması ihtimalinin söz konusu olduğuna (Şekil 15) işaret etmektedir.

Bu bulgular, internalizasyonun mikroskopik ölçekte gözlemlenip gözlemlenemeyeceğini görmek amacı ile canlı hücrelerde immünofloresans gerçekleştirilerek biraz daha ileri bir düzeyde teyit edildiler. MDA-MB-231 hücreleri, lamellerin üzerine ekildiler ve hücreler yeterli ölçüde yapıştıktan sonra, 10 µg/mL ölçüsünde 3A4

anti-KAAG1 kimerik antikoru içeren taze vasat ilave edildi ve oluşturulan içerik müteakip 4 saat boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Ardından hücreler PBS'de yıkanıp akabinde 20 dakikalığına (PBS'de yer alan) %4 paraformaldehitte fikse edildiler. Yıkama yapıldıktan sonra, hücreler, 5 dakika boyunca PBS'de yer alan %0,1 Triton X-100 ile permeabilize edildiler. Daha sonra PBS'de yer alan %1,5 kuru süt ile 1 saat boyunca blokaj gerçekleştirildi. PBS'de yer alan %1,5 sütte 2 saat boyunca anti-LAMP1 (Santa Cruz, sc-18821; 1:100 oranında seyreltilmiş) ile inkübasyon gerçekleştirilerek lizozom ile ilişkili membran proteini 1'e (LAMP1, Chang et al., 2002) dair tespit yapıldı. PBS'de yıkama yapıldıktan sonra, %1,5 süt ile birlikte sekonder antikorlar ilave edildi ve içerik 1 saat boyunca inkübe edildi. Anti-KAAG1 kimerik antikoru için kullanılan sekonder antikor, 1:300 oranında seyreltilmiş bir Rhodamin Kırmızı-X-konjuge eşek anti-insan IgG'si (H+L) idi. Anti-LAMP1 antikoru için kullanılan sekonder antikor, 1:300 oranında seyreltilmiş bir DyLight488-konjuge keçi anti-insan IgG'si (H+L) idi. Her iki sekonder antikor da Jackson ImmunoResearch firmasından edinildi. Lameller PBS'de yıkandılar ve DAPI bulunan Prolong Gold solma önleyici reaktife gömüldüler. Şekil 7'de gösterildiği gibi, MDA-MB-231 kanser hücrelerinin bulunduğu ortamda 37°C sıcaklıkta 4 saatlik inkübasyondan sonra, endozomal-lizozomal-bazlı internalizasyon yolakları için tipik bir bulgu olarak 3A4 antikorunun yer aldığı komplekslerin ağırlıklı olarak peri-nükleer alan yakınlarında (oklarla gösterilmektedir; Şekil 16'daki sol panelde yer alan kırmızı boyalı bölgelere bakınız) bulundukları tespit edildi. Bir lizozomal marker olan LAMP1 görüntülendiğinde ve bu markerin de aynı alanlarda eksprese olduğu tespit edildiğinde (oklarla gösterilmektedir; Şekil 16'daki orta panelde yer alan yeşil boyalı

bölgelere bakınız) bu gözlem ilaveten teyit edilmiş oldu. Daha da önemlisi, yukarıda bahsi geçen iki görüntü birleştirildiğinde, 3A4 antikoru ile anti-LAMP1 antikorunun aynı yapılarda bulunduklarına işaret eden sarı-turuncu yapılarla bezeli bir görüntü oluştu (oklarla gösterilmektedir; Şekil 16'daki sağ panelde yer alan sarı boyalı bölgelere bakınız). Kanser hücrelerinin yüzeyleri üzerinde bulunan KAAG1'e bağlanan 3A4 ile bir geç endozom/lizozom markeri olan LAMP1'in aynı bölgelerde yer aldıklarına işaret eden bu bulgu, antikor/antijen kompleksinin internalize edilmiş olduğunu ve 3A4 antikoru ile konjugasyon ilişkisi kurularak kullanılan bir yükün serbest kalması için uygun bir yolağı izlediğini göstermektedir. Bir diğer TNBC hücre hattı olan BT-20 ile de aynı sonuçlar gözlemlendi (bkz: Şekil 17).

Bu bulgular birlikte ele alındığında anlaşılabileceği üzere, bu çalışmalar, 3A4 gibi KAAG1'e özgü antikorların bir antikor konjugat formunda, somutlaştırmak gerekirse bir antikor-ilaç konjugatı (ADC) formunda kullanım olanaklarının bulunduğunu kanıtlamıştır. Dolayısıyla, TNBC'lerin KAAG1'e yönelik yüksek düzey bir spesifisiteye sahip olmaları ve bu hedefin hücrelerde internalize olma kapasitesine sahip olması, uygulamaların bir ADC formunda geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır.

Örnek 10

Anti-KAAG1 antikorlarının ER proteini ekpresyonu ve/veya PgR proteini ekspresyonu eksikliği söz konusu olan ve/veya HER2 proteini aşırı ekspresyonu bulunmayan hücreleri etkin bir şekilde hedef alıp

öldürebileceğini kanıtlamak için, 3A4-ADC1 ve 3A4-ADC2 adını verdiğimiz iki antikor-ilaç konjugatı (ADC) ürettik.

Bu amaçla kimerik 3A4 antikorunu kullandık ve bu antikoru, internalizasyon akabinde lizozomal enzimlerin özel olarak seçip yaracağı yüksek düzeyde stabil bir peptid bağlayıcısı aracılığıyla bir sitotoksik ilaç ile konjuge ettik (3A4-ADC1) ya da yarılabilir olmayan bir bağlayıcı aracılığıyla başka bir anti-mitotik ilaç ile konjuge ettik (3A4-ADC2). Kullanılan sitotoksik ilaç, konjugatın hücrelere internalize olmasından sonra aktif hale geçebilir.

3A4 ADC'lerinin TNBC hücrelerinin yüzeyleri üzerindeki KAAG1'i tespit etme kabiliyetleri, burada açıklanan yöntemler çerçevesinde akış sitometrisi kullanılarak belirlendi. Kısaca değinmek gerekirse, konjuge edilmemiş 3A4, 3A4-ADC1, 3A4-ADC2 ve bir kontrol amaçlı IgG, KAAG1-pozitif olan MDA-231 TNBC hücrelerinin eşliğinde inkübe edildiler. Elde edilen sonuçlar, hangi ilaç ile olursa olsun 3A4 konjugasyonunun 3A4 ile MDA-231 gibi üçlü negatif meme kanseri hücreleri arasındaki bağlanma ilişkisini etkilemediğini gösterdi (ilgili veriler sunulmamaktadır).

3A4 ADC'lerinin TNBC hücrelerinin yüzeyleri üzerinde eksprese olan KAAG1'e bağlanabildikleri teyit edildikten sonra, söz konusu ADC'lerin bu hücrelere karşı ortaya koydukları sitotoksisite hücre proliferasyon eseyleri ile değerlendirildi. MDA-231 veya TOV-112D hücreleri, önceki örneklere istinaden yukarıda anlatıldığı gibi kültürlendiler. Hücreler, %5 CO_2 ve 37°C koşulları altında gece boyunca kuyucuk başına 200 µl vasat bulunan 96 kuyucuklu plakalara

3000 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildiler. Ertesi gün vasatlar, 0,122 nM ile 500 nM arasında değişen konsantrasyonlarda antikor içeren taze vasatlar ile değiştirildiler ve tazelenen içerik takip eden 72 saat boyunca 37°C sıcaklık altında inkübe edildi. Bu koşullar üçer kuyucukta tekrarlandı. Üreticisinin sunduğu protokol çerçevesinde CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI) ürününün kullanıldığı bir hücresel proliferasyon eseyiyle sağ kalan hücrelerin sayısı belirlendi. Ham veriler toplandıktan sonra, sonuçlar, PBS ile işlemden geçirilmiş kuyucuklardaki hücrelerin sayısı %100 kabul edilip buna göre hesaplanan sağ kalım yüzdesi cinsinden ifade edildiler. Bu sonuçlar, konjuge edilmemiş 3A4'ün test edilen konsantrasyon seviyelerinden hiçbirinde MDA-231 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediğini gösterdi. Diğer yandan, test edilen 3A4 ADC'leri istatistiksel açıdan anlamlı düzeylerde sitotoksisite gösterdiler.

Bu bulgular, 3A4 antikoru konjugatlarının üçlü negatif meme kanseri veya bazal benzeri meme kanseri bulunan hastalar için bir alternatif tedavi olarak kullanılabileceklerini göstermektedir. Hümanize 3A4 antikorlarına dayalı konjugatlar için de benzer sonuçlar elde edilmesi beklenmektedir.

Bu tarifnamede atıf yapılan sekanslar şunlardır:

SEKANS KOD NO.: 1

SEKANS KOD NO.: 2

MDDDAAPRVEGVPVAVHKHALHDGLRQVAGPGAAAAHLPRWPPPQLAASRREAPPLSQRPHRTQG
AGSPPETNEKLTNPQVKEK

SEKANS KOD NO.: 3

SEKANS KOD NO.: 4

DIVMTQSPSSLAVSIGQKVTMNCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESSIP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELKAVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEKANS KOD NO.: 5

SEKANS KOD NO.: 6

EVQLQQSVAELVRPGASVTLSCKASGYIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNTAFNQKFK
GKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEKANS KOD NO.: 7

SEKANS KOD NO.: 8

DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIYKVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELKAVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEKANS KOD NO.: 9

GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA

SEKANS KOD NO.: 10

EIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDNYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPYYGTTTYNQKFK
GKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDDWFDYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEKANS KOD NO.: 11

[illegible]

SEKANS KOD NO.: 12

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKSPKTLIFRANRLVDGVPSRFSGS
GSGQDYSLTISSLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

SEKANS KOD NO.: 13

[illegible]

AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA

SEKANS KOD NO.: 14

EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYINYDGHNDYNPSLK
SRISITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEKANS KOD NO.: 15

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAATAGGACAGAAGGTCACTATGAA
CTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAACTTTCAAAAGAACTTTTTGGCCTGGTACCAGC
AGAAACCAGGCCAGTCTCCTAAACTTCTGATATACTTTGCATCCACTCGGGAATCTAGTATCCCT
GATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGA
AGACCTGGCAGATTACTTCTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCA
AGCTGGAGCTGAAA

SEKANS KOD NO.: 16

DIVMTQSPSSLAVSIGQKVTMNCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESSIP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 17

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGTAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGTCCTG
CAAGGCTTCGGGCTACATATTTACTGACTATGAGATACACTGGGTGAAGCAGACTCCTGTGCATG
GCCTGGAATGGATTGGGGTTATTGATCCTGAAACTGGTAATACTGCCTTCAATCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAACTCAGCAGTTTGAC
ATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTTATTCTGATTATTGGGGCCAAGGCACCACTC
TCACAGTCTCCTCA

SEKANS KOD NO.: 18

EVQLQQSVAELVRPGASVTLSCKASGYIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNTAFNQKFK
GKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 19

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACGCTCCCTGTCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTC
TTGTAGATCGAGTCAGAGCCTTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTATTTGCAGA
AACCAGGCCAGCCTCCAAAGGTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCGGAGTGGAGGCTGAGGA
TCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCTCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGC
TGGAGCTGAAA

SEKANS KOD NO.: 20

DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIYKVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 21

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTG
TAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGACAACTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGA
GCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACTATGGTACTACTACCTACAACCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCCGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCGGCCTGAC
ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGGA
CTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEKANS KOD NO.: 22

EIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDNYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPYYGTTTYNQKFK
GKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDDWFDYWGQGTLVTVSA

SEKANS KOD NO.: 23

GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCAC
TTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCATAACTTTTTAAACTGGTTCCAGCAGAAACCAGGAAAATCTC
CAAAGACCCTGATCTTTCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGT
GGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTTTGAAGATTTGGGAATTTATTC
TTGTCTACAGTATGATGAGATTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAGA

;SEKANS KOD NO.: 24

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKSPKTLIFRANRLVDGVPSRFSGS
GSGQDYSLTISSLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELR

SEKANS KOD NO.: 25

GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTG
CACTGTCACTGGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAA
ACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAACTACGATGGTCACAATGACTACAACCCATCTCTCAAA
AGTCGAATCTCTATCACTCAAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGAC
TACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGCTTATTTGCTTACTGGGGCC
AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEKANS KOD NO.: 26

EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYINYDGHNDYNPSLK
SRISITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGTLVTVSA

SEKANS KOD NO.: 27

KSSQSLLNSNFQKNFLA

SEKANS KOD NO.: 28

FASTRES

SEKANS KOD NO.: 29

QQHYSTPLT

SEKANS KOD NO.: 30
GYIFTDYEIH

SEKANS KOD NO.: 31
VIDPETGNTA

SEKANS KOD NO.: 32
MGYSDY

SEKANS KOD NO.: 33
RSSQSLLHSNGNTYLE

SEKANS KOD NO.: 34
KVSNRFS

SEKANS KOD NO.: 35
FQGSHVPLT

SEKANS KOD NO.: 36
GYTFTDNYMN

SEKANS KOD NO.: 37
DINPYYGTTT

SEKANS KOD NO.: 38
ARDDWFDY

SEKANS KOD NO.: 39
KASQDIHNFLN

SEKANS KOD NO.: 40

RANRLVD

SEKANS KOD NO.: 41

LQYDEIPLT

SEKANS KOD NO.: 42

GFSITSGYGWH

SEKANS KOD NO.: 43

YINYDGHND

SEKANS KOD NO.: 44

ASSYDGLFAY

SEKANS KOD NO.: 45 - 3A4 ağır zincir değişken bölge nükleotid sekansı

```
CAGATCCAGTTGGTGCAATCTGGACCTGAGATGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTG
TAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACGACTACATGAGCTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGA
GCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACAACGGTGATACTAACTACAACCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGAC
ATCGGAAGACTCAGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACCCGGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAG
GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
```

SEKANS KOD NO.: 46 - 3A4 ağır zincir değişken bölge polipeptid sekansı

```
QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNYNQKFK
GKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSVTVSS
```

SEKANS KOD NO.: 47 - 3A4 hafif zincir değişken bölge nükleotid sekansı

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGGCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTC
TTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTCTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTTCAGA
AACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCCACACAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC
AGATTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA
TCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAGGC
TGGAGCTGAAA

SEKANS KOD NO.: 48 - 3A4 hafif zincir değişken bölge polipeptid sekansı

DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK

SEKANS KOD NO.: 49 - 3A4 ağır zincir CDR1 polipeptid sekansı

GYTFTDDYMS

SEKANS KOD NO.: 50 - 3A4 ağır zincir CDR2 polipeptid sekansı

DINPYNGDTNYNQKFKG

SEKANS KOD NO.: 51 - 3A4 ağır zincir CDR3 polipeptid sekansı

DPGAMDY

SEKANS KOD NO.: 52 - 3A4 hafif zincir CDR1 polipeptid sekansı

RSSQSLLHSNGNTYLE

SEKANS KOD NO.: 53- 3A4 hafif zincir CDR2 polipeptid sekansı

TVSNRFS

SEKANS KOD NO.: 54 - 3A4 hafif zincir CDR3 polipeptid sekansı

FQGSHVPLT

SEKANS KOD NO.: 55

GTAAGCAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC

SEKANS KOD NO.: 56

GTAAGCGCTAGCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC

SEKANS KOD NO.: 57

GCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA
AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEKANS KOD NO.: 58

AVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

;SEKANS KOD NO.: 59

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGGTGAGTAC
TCCCTCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATTT
GATATTCACCTGGCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCT
CCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCATGAACTTTCTGCT
GTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTT
GAGACGGAGCTTACAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT

SEKANS KOD NO.: 60

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATTGTGATGACCCA
GTCTCC

SEKANS KOD NO.: 61

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTTTGATGACCCA
AACTCC

SEKANS KOD NO.: 62

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATCGTTATGTCTCA
GTCTCC

SEKANS KOD NO.: 63

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGC

SEKANS KOD NO.: 64

GTAAGCGCTAGCGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCT
TTCCCCTGGCCCC

SEKANS KOD NO.: 65

GTAAGCGAATTCACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTG

SEKANS KOD NO.: 66

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCAGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT

SEKANS KOD NO.: 67

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEKANS KOD NO.: 68

SEKANS KOD NO.: 69

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCGAGGTTCAGCTGCAGCA

GTCTGT

SEKANS KOD NO.: 70

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCGAGGTGCAGCTTCAGGA

GTCAGG

SEKANS KOD NO.: 71

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAG GC

SEKANS KOD NO.: 89: CDRL1 örneği

K-S-S-Q-S-L-L-N/H-S/T-S/N/D-N/G-Q/N/K-K/L-N-Y-L-A

SEKANS KOD NO.: 90: CDRL1 örneği

K-A-S-Q-D-I-H-N/T-Y/F-L-N

SEKANS KOD NO.: 91: CDRL2 örneği

F-A-S-T-R-E-S

SEKANS KOD NO.: 92: CDRL2 örneği

L-V-S-K-L-D-S

SEKANS KOD NO.: 93: CDRL2 örneği

R-A-N-R-L-V-D

SEKANS KOD NO.: 94: CDRL3 örneği

Q-Q-H-Y-S-T-P-L-T

SEKANS KOD NO.: 95: CDRL3 örneği

W/L-Q-Y/G-D/T-A/E/H-F-P-R-T

SEKANS KOD NO.: 96: CDRH1 örneği

G-Y-T/I-F-T-D/E-Y-E/N-M/I/V-H

SEKANS KOD NO.: 97: CDRH1 örneği

G-F-T/S-I-T-S-G-Y-G-W-H

SEKANS KOD NO.: 98: CDRH2 örneği

V/N/G-I/L-D-P-E/A/G-T/Y-G-X-T-A

SEKANS KOD NO.: 99: CDRH2 örneği

Y-I-N/S-F/Y-N/D-G

SEKANS KOD NO.: 100: CDRH3 örneği

M-G-Y-S/A-D-Y

SEKANS KOD NO.: 101: CDRH3 örneği

A-S-S-Y-D-G-F-L-A-Y

SEKANS KOD NO.: 102: CDRH3 örneği

A-R/W-W/F-G-L-R-Q/N

SEKANS KOD NO.: 103 - 3A2 hafif zincir değişken bölgesi

DAVMTQIPLTLSVTIGQPASLSC**KSSQSLLHSDGKTYLN**WLLQRPGQSPKRLIS**LVSKLDS**GVPD
RFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYC**WQGTHFPRT**FAGGTNLEIK

SEKANS KOD NO.: 104 - 3F6 hafif zincir değişken bölgesi

SIVMTQTPLTLSVTIGQPASITC**KSSQSLLYSDGKTYLN**WLLQRPGQSPKRLIS**LVSKLDS**GVPD
GFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**WQGTHFPRT**FGGGTKLEIK

SEKANS KOD NO.: 105 - 3E8 hafif zincir değişken bölgesi

DAVMTQIPLTLSVTIGQPASISC**KSSQSLLHSDGKTYLN**WLLQRPGQSPKRLIY**LVSKLDS**GVPD
RFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**WQGTHFPRT**FGGGTKLEIK

SEKANS KOD NO.: 106 - 3E10 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISC**RSSKSLLHSNGNTYLY**WFLQRPGQSPQLLIY**RMSNLAS**GVPD
RFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPYT**FGGGTKLEIK

SEKANS KOD NO.: 107 - 3A9 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSLGQKVTMSC**KSSQSLLNSNNQLNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTRKS**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFC**QQHFNTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 108 - 3B1 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAISVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVF**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSIPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 109 - 3G5 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVF**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFC**QQHYSIPLT**FGSGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 110 - 3B2 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSIPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 111 - 3B8 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 112 - 3G8 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 113 - 3F7 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLIY**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 114 - 3E9 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTEFTLTITSVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 115 - 3C3 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FGSTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISGVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 116 - 3E12 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNC**KSSQSLLNRSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSIPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 117 - 4A2 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNC**KSSQSLLNNSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLLY**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTYFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLDLK

SEKANS KOD NO.: 118 - 3F10 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLTMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNTSNQLNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTTES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 119 - 3F4 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC**KSSQSLLNTSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTRAS**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 120 - 3B11 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC**KSSQSLLNSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVY**FASTRES**GVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSTPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 121 - 3G12 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITC**KASQDVGTAVA**WYQQKPGQSPELLIY**WTSTRHT**GVPDRFSGS
GSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC**QQHYSIPLT**FGAGTKLELR

SEKANS KOD NO.: 122 - 3D1 hafif zincir değişken bölgesi

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITC**KASQDIHTYLN**WFQQKPGKSPETLIY**RANRLVD**GVPSRFSGS
GSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYC**LQYDEFPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 123 - 3C2 hafif zincir değişken bölgesi

DIQMTQSPSSMYASLGERVTLTC**KASQDIHNYLN**WFQQKPGKSPKTLIH**RANRLVA**GVPSRFSGS
GSGQDYSLTISSLEYEDLGIYYC**LQYDAFPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 124 - 3E6 hafif zincir değişken bölgesi

DIQMTQSPSSMYASLGERVTLTC**KASQDIHNYLN**WFQQKPGKSPKTLIH**RANRLVA**GVPSRFSGS
GSGQDYSLTISSLEYEDLGIYYC**LQYDAFPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 125 - 3H3 hafif zincir değişken bölgesi

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITC**KASQDIHRFLN**WFQQKPGKSPKTLIF**HANRLVD**GVPSRFSGS
GSGLDYSLTISSLEYEDMGIYFC**LQYDAFPLT**FGAGTKLELK

SEKANS KOD NO.: 126 - 3A2 ağır zincir değişken bölgesi

HEIQLQQSGPELVKPGASVKMSCKTS**GYTFTDYNMH**WVKQKPGQGLEWIG**YINPYNDVTE**YNEKF
KGRATLTSDKSSSTAYMDLSSLTSDDSAVYFC**AWFGLRQ**WGQGTLVTVST

SEKANS KOD NO.: 127 - 3F6 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GYIFTEYNIH**WVKQKPGQGPEWIG**NINPYNDVTE**YNEKF
KGKATLTSDKASSTAYMDLSSLTSEDSAVYYC**ARWGLRN**WGQGTLVTVSA

SEKANS KOD NO.: 128 - 3E8 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSVPELVKPGASVKMSCKTS**GYTFTEYNMH**WVKQKPGQGPEWIG**NINPYNNVTE**YNEKF
KGKATLTSDKSSSTAYLDLSSLTSEDSAVYYC**ARWGLRN**WGQGTLVTVSA

SEKANS KOD NO.: 129 - 3A9 ağır zincir değişken bölgesi

HQVQVQQPGAELVRPGASVTLSCKAS**GYIFTDYEVH**WVRQRPVHGLEWIG**VIDPETGDTA**YNQKF
KGKATLTADKSSSTAYMELSSLTAEDSAVYYC**IGYADY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 130 - 3B1 ağır zincir değişken bölgesi

HQVQLQQPGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEIH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGGTA**YNQKF
KGKATLTTDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC**MGYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 131 - 3B2 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEIH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGATA**YNQKF
KGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**MGYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 132 - 3F4 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEIH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGSTA**YNQKF
KGKATLTADKASSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**MGYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 133 - 3E9 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSGAELVRPGASATLSCKAS**GYTFTDYEMH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGSTA**YNQKF
KGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**MGYADY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 134 - 3B8 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEIH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGDTA**YNQNF
TGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**MGYADY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 135 - 3G8 ağır zincir değişken bölgesi

HQVQLKQSGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEVH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPATGDTA**YNQKF
KGKATLTADKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYC**MGYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 136 - 3F7 ağır zincir değişken bölgesi

HQAYLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEIH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGDTA**YNQKF
KDKATLTADKASSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**MGYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 137 - 3E12 ağır zincir değişken bölgesi

HQVQLQQSEAELVKPGASVKLSCKAS**GYTFTDYEIH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGDTA**YNQKF
KGKATLTADKSSSTAYMELSRLTSEDSAVYYC**MGHSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 138 - 3G12 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSVAELVRPGASVTVSCKAS**GYIFTDYEIH**WVKQTPAHGLEWIG**VIDPETGNTA**FNQKF
KGKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**MGYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 139 - 3F10 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSVAELVRPGAPVTLSCKAS**GYTFTDYEVH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGATA**YNQKF
KGKATLTADKSSSAAYMELSRLTSEDSAVYYC**MSYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 140 - 3C3 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSVAEVVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEIH**WVKQTPVHGLEWIG**VIDPETGVTA**YNQRF
RDKATLTTDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFC**MGYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 141 - 3G5 ağır zincir değişken bölgesi

HQVQLQQPGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEIH**WVKQTPVHGLEWIG**VLDPGTGRTA**YNQKF
KDKATLSADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**MSYSDY**WGPGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 142 - 3B11 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSVAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFTDYEMH**WVKQTPVRGLEWIG**VIDPATGDTA**YNQKF
KGKATLTADKSSSAAFMELSSLTSEDSAVYYC**MGYSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 143 - 3E6 ağır zincir değişken bölgesi

HQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS**GYTFSDYEMH**WVKQTPVHGLEWIG**GIDPETGDTV**YNQKF
KGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**ISYAMDY**WGQGTSVTVSS

SEKANS KOD NO.: 144 - 4A2 ağır zincir değişken bölgesi

HQVKLQQSGTELVRPGASVTLSCKAS**GYKFTDYEMH**WVKQTPVHGLEWIG**GIDPETGGTA**YNQKF
KGKAILTADKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYC**ISYAMDY**WGQGTSVTVSS

SEKANS KOD NO.: 145 - 3E10 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS**GDTFTDYYMN**WVKQSHGKSLEWIG**DINPNYGGIT**YNQKF
KGKATLTVDTSSSTAYMELRGLTSEDSAVYYC**QAYYRNSDY**WGQGTTLTVSS

SEKANS KOD NO.: 146 - 3D1 ağır zincir değişken bölgesi

HEVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVT**GFSITSGYGWH**WIRQFPGDKLEWMG**YISFNGDYN**YNPSL
KSRISITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYYC**ASSYDGLFAY**WGQGTLVTVSA

SEKANS KOD NO.: 147 - 3C2 ağır zincir değişken bölgesi

HDVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVT**GFSITSGYGWH**WIRQFPGNKLEWMG**YISFNGDSN**YNPSL
KSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYC**ASSYDGLFAY**WGQGPLVTVSA

A

SEKANS KOD NO.: 148

KSSQSLLHSDGKTYLN

SEKANS KOD NO.: 149

LVSKLDS

SEKANS KOD NO.: 150

WQGTHFPRT

SEKANS KOD NO.: 151

GYTFTD YNMH

SEKANS KOD NO.: 152

YINPYNDVTE

SEKANS KOD NO.: 153

AWFGL RQ

SEKANS KOD NO.: 154

RSSKSLLHSNGN TYLY

SEKANS KOD NO.: 155
RMSNLAS

SEKANS KOD NO.: 156
MQHLEYPYT

SEKANS KOD NO.: 157
GDTFTD YYMN

SEKANS KOD NO.: 158
DINPNYGGIT

SEKANS KOD NO.: 159
QAYYRNS DY

SEKANS KOD NO.: 160
KASQDVGTAVA

SEKANS KOD NO.: 161
WTSTRHT

SEKANS KOD NO.: 162
QQHYSIPLT

SEKANS KOD NO.: 163
GYIFTDYEIH
SEKANS KOD NO.: 164
VIDPETGNTA
SEKANS KOD NO.: 165
MGYSDY

SEKANS KOD NO.: 166

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQK
PGQPPKLLIYFASTRESSVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPLTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEKANS KOD NO.: 167

MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYEIHWVRQAPGQGLE
WMGVIDPETGNTAFNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCMGYSDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

SEKANS KOD NO.: 168

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESSVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPLTFGQGTKLEIK

SEKANS KOD NO.: 169

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVIDPETGNTAFNQKFK
GRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCMGYSDYWGQGTLVTVSS

SEKANS KOD NO.: 170

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKAPK
TLIFRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEKANS KOD NO.: 171

MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSITSGYGWHWIRQHPGKGL
EWIGYINYDGHNDYNPSLKSRVTISQDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASSYDGLFAYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

SEKANS KOD NO.: 172

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKAPKTLIFRANRLVDGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSLQPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQGTKLEIK

SEKANS KOD NO.: 173
EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSITSGYGWHWIRQHPGKGLEWIGYINYDGHNDYNPSLK
SRVTISQDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASSYDGLFAYWGQGTLVTVS

SEKANS KOD NO.: 186 (3A4 varyant hafif zincir değişken bölge konsensüsü 1)

DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHVPLTFGXGTXLEXK

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 48'de gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir. Bu amino asit ikamesi örneğin konservatif nitelikte olabilir.

SEKANS KOD NO.: 187 (3A4 varyant hafif zincir değişken bölge konsensüsü 2)

$DX_{a1}VMTQTPLSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{a7}LLIHTVS$
$NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{a8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}K$

burada X_{a1}, bir hidrofobik amino asit olabilir;
burada X_{a2}, A ya da P olabilir;
burada X_{a3}, nötr hidrofilik amino asit olabilir;
burada X_{a4}, L ya da P olabilir;
burada X_{a5}, bir asidik amino asit olabilir;
burada X_{a6}, Q ya da P olabilir;
burada X_{a7}, bir bazik amino asit olabilir;

burada X_{a8}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{a9}, A ya da Q olabilir;

burada X_{a10}, bir bazik amino asit olabilir; veya

burada X_{a11}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 48'de gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir.

SEKANS KOD NO.: 188 (3A4 varyant hafif zincir değişken bölge konsensüsü 3)

$DX_{A1}VMTQTPLSLX_{A2}VX_{A3}X_{A4}GX_{A5}X_{A6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{A7}LLIHTV$
$SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{A8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{A9}GTX_{A10}LEX_{A11}K$

burada X_{A1}, V ya da I olabilir;

burada X_{A2}, A ya da P olabilir;

burada X_{A3}, S ya da T olabilir;

burada X_{A4}, L ya da P olabilir;

burada X_{A5}, D ya da E olabilir;

burada X_{A6}, Q ya da P olabilir;

burada X_{A7}, K ya da Q olabilir;

burada X_{A8}, L ya da V olabilir;

burada X_{A9}, A ya da Q olabilir;

burada X_{A10}, R ya da K; veya

burada X_{A11}, L ya da I olabilir;

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 48'de gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino

asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir.

SEKANS KOD NO.: 189 (3A4 varyant 1 hafif zincir değişken bölgesi: Lvh1)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEKANS KOD NO.: 190 (3A4 varyant 2 hafif zincir değişken bölgesi: Lvh2)

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEKANS KOD NO.: 191 (3A4 varyant ağır zincir değişken bölge konsensüsü 1)

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNGDTNYNQ
KFKGXXXXTXDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXVTVSS

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 46'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir. Bu amino asit ikamesi örneğin konservatif nitelikte olabilir.

SEKANS KOD NO.: 192 (3A4 varyant ağır zincir değişken bölge konsensüsü 2)

$QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}LEWX_{b11}G$
$DINPYNGDTNYNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}SLX_{b21}SEDX_{b22}AVYY$
$CARDPGAMDYWGQGTX_{b23}VTVSS$

burada X_{b1}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{b2}, P ya da A olabilir;

burada X_{b3}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{b4}, V ya da K olabilir;

burada X_{b5}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{b6}, bir bazik amino asit olabilir;

burada X_{b7}, S ya da A olabilir;

burada X_{b8}, H ya da P olabilir;

burada X_{b9}, bir bazik amino asit olabilir;

burada X_{b10}, S ya da G olabilir;

burada X_{b11}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{b12}, bir bazik amino asit olabilir;

burada X_{b13}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{b14}, I ya da T olabilir;

burada X_{b15}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{b16}, bir hidrofobik amino asit olabilir;

burada X_{b17}, K ya da T olabilir;

burada X_{b18}, bir nötr hidrofilik amino asit olabilir;

burada X_{b19}, Q ya da E olabilir;

burada X_{b20}, N ya da S olabilir;

burada X_{b21}, T ya da R olabilir;

burada X_{b22}, bir nötr hidrofilik amino asit olabilir; veya

burada X_{b23}, S ya da L olabilir;

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 46'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir.

SEKANS KOD NO.: 193 (3A4 varyant ağır zincir değişken bölge konsensüsü 3)

$QX_{B1}QLVQSGX_{B2}EX_{B3}X_{B4}KPGASVKX_{B5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{B6}QX_{B7}X_{B8}GX_{B9}X_{B10}LEWX_{B11}$
$GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{B12}X_{B13}X_{B14}X_{B15}TX_{B16}DX_{B17}SX_{B18}STAYMX_{B19}LX_{B20}SLX_{B21}SEDX_{B22}AV$
$YYCARDPGAMDYWGQGTX_{B23}VTVSS$

burada X_{B1}, I ya da V olabilir;
burada X_{B2}, P ya da A olabilir;
burada X_{B3}, M ya da V olabilir;
burada X_{B4}, V ya da K olabilir;
burada X_{B5}, M ya da V olabilir;
burada X_{B6}, K ya da R olabilir;
burada X_{B7}, S ya da A olabilir;
burada X_{B8}, H ya da P olabilir;
burada X_{B9}, K ya da Q olabilir;
burada X_{B10}, S ya da G olabilir;
burada X_{B11}, I ya da M olabilir;
burada X_{B12}, K ya da R olabilir;
burada X_{B13}, A ya da V olabilir;
burada X_{B14}, I ya da T olabilir;
burada X_{B15}, L ya da I olabilir;
burada X_{B16}, V ya da A olabilir;

burada X_{B17}, K ya da T olabilir;

burada X_{B18}, S ya da T olabilir;

burada X_{B19}, Q ya da E olabilir;

burada X_{B20}, N ya da S olabilir;

burada X_{B21}, T ya da R olabilir;

burada X_{B22}, S ya da T olabilir; veya

burada X_{B23}, S ya da L olabilir;

burada X ile gösterilen amino asitlerden en az biri, SEKANS KOD NO.: 46'da gösterilen polipeptiddeki mütekabil amino asitten farklı bir amino asit olup bir (konservatif olan veya konservatif olmayan) amino asit ikamesini teşkil etmektedir.

SEKANS KOD NO.: 194 (3A4 varyant 1 ağır zincir değişken bölgesi: Hvh1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYN
QKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS

SEKANS KOD NO.: 195 (3A4 varyant 2 ağır zincir değişken bölgesi: Hvh2)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYNQ
KFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS

SEKANS KOD NO.: 196 (3A4 varyant 3 ağır zincir değişken bölgesi: Hvh3)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQK
FKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS

SEKANS KOD NO.: 197 (3A4 varyant 4 ağır zincir değişken bölgesi: Hvh4)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQK
FKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS

SEKANS KOD NO.: 198 - 3A4 murin hafif (kappa) zinciri

DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEKANS KOD NO.: 199 - 3A4 hümanize hafif (kappa) zincir varyantı 1; Lh1

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEKANS KOD NO.: 200 - 3A4 hümanize hafif (kappa) zincir varyantı 2; Lh2

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEKANS KOD NO.: 201 - 3A4 murin ağır (Igg1) zinciri

[illegible]

SEKANS KOD NO.: 202 - 3A4 hümanize ağır (Igg1) zincir varyantı 1; Hh1

[illegible]

SEKANS KOD NO.: 203 - 3A4 hümanize ağır (Igg1) zincir varyantı 2; Hh2

[illegible]

SEKANS KOD NO.: 204 - 3A4 hümanize ağır (Igg1) zincir varyantı 3; Hh3

[illegible]

SEKANS KOD NO.: 205 - 3A4 hümanize ağır (Igg1) zincir varyantı 4: Hh4

[illegible]

SEKANS KOD NO.: 206

ATACCCAAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACAC

SEKANS KOD NO.: 207

ATACCCAAGCTTCATTTCCCGGGAGACAGGGAG

SEKANS KOD NO.: 208

ATACCCAAGCTTGGGCCACCATGAACTTTCTGCTGTCT TGG

SEKANS KOD NO.: 209

ATACCCAAGCTTCTAACACTCTCCCCTGTTGAAG

SEKANS KOD NO.: 210 pK-CR5

SEKANS KOD NO.: 211 pMPG-CR5

[illegible]

SEKANS KOD NO.: 212 - 3A4 hümanize ağır zincir CDR2 polipeptid sekansı

DINPYNGDTN

SEKANS KOD NO.: 213 - OGS18500

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTGTGATGACCCA AACTCC

SEKANS KOD NO.: .214 - OGS2084

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTCCG

SEKANS KOD NO.: 215 - OGS1879

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCCAGATCCAGTTGGTGCA ATCTGG

SEKANS KOD NO.: 216 - OGS1810

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAG GC

REFERANSLAR

Santana-Davila R. and Perez E.A. (2010) "Treatment options for patients with triple-negative breast cancer" J Hematol Oncol. 27:42.

de Ruijter T.C., Veeck J., et al. (2011) "Characteristics of triple-negative breast cancer." J Cancer Res Clin Oncol. 137:183.

Ismail-Khan R. and Bui M.M. (2010) "A review of Triple-negative breast cancer" Cancer Control 17:173.

Carey L.A., Perou C.M. et al. (2006) "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." JAMA 295:2492.

Krieg M., Seynaeve C. et al. (2009) "Sensitivity to first-line chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers." J Clin Oncol 27:3764.

Rouzier R., Perou C.M. et al. (2005) "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy" Clin Cancer Res 11:5678.

Fong P.C., Boss D.S. et al. (2009) "Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers." N Engl J Med 361:123.

Dent R., Trudeau M et al. (2007) "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Feature and Patterns of Recurrence" Clin. Cancer Res. 13: 4429.

Bernstein L and J.V. Lacey Jr. (2011) "Receptors, Associations, and Risk Factor Differences by Breast Cancer Subtypes: Positive or Negative?" J Natl Cancer Inst 103(6): 451-453 (Advanced publication February 23, 2011).

Nofech-Mozes S. et al., (2009) "Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers" Cancer Res. Treat. 118: 131-137.

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- CA 2007001134 W **[0007] [0432]**
- WO 2007147265 A **[0007]**
- CA 2009001586 W **[0008] [0076] [0410] [0433]**
- WO 2010060186 A **[0008]**
- CA 2010001785 W **[0008]**
- WO 2011054112 A **[0008]**
- US 20110223107 A **[0008]**
- US 20030118592 A **[0060]**
- US 20030133939 A **[0060]**
- WO 2010060186A8 A **[0076]**
- CA 2010001795 W **[0076] [0410]**
- WO 2011054112 A1 **[0076]**
- CA 2012000296 W **[0076] [0409] [0410]**
- WO 2012129668 A1 **[0076]**

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **LARKIN M.A. et al.** ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics,* 2007, vol. 23 (21), 2947-2948 **[0010]**
- **KALLURI ; WEINBERG.** *The Journal of Clinical Investigation,* 2009, vol. 119 (6), 1420-1428 **[0027]**
- **FASSINA et al.** *Modern Pathology,* 2012, vol. 25, 86-99 **[0027]**
- **LEE et al.** *JCB,* 2006, vol. 172, 973-981 **[0027]**
- **FOULKES et al.** *N. Engl. J. Med.,* 2010, vol. 363, 1938-1948 **[0042]**
- **WARD et al.** *Nature,* 1989, vol. 341, 544-546 **[0060]**
- **BIRD et al.** *Science,* 1988, vol. 242, 423-426 **[0060]**
- **HUSTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1988, vol. 85, 5879-5883 **[0060]**
- **ISMAIL-KHAN R ; BUI M.M.** A review of Triple-negative breast cancer. *Cancer Control,* 2010, vol. 17, 173 **[0443]**
- **CAREY L.A. ; PEROU C.M. et al.** Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA,* 2006, vol. 295, 2492 **[0443]**
- **KRIEG M. ; SEYNAEVE C. et al.** Sensitivity to first-line chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol,* 2009, vol. 27, 3764 **[0443]**
- **ROUZIER R.; PEROU C.M. et al.** Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res,* 2005, vol. 11, 5678 **[0443]**
- **FONG P.C.; BOSS D.S. et al.**

• **PORTOLANO et al.** *The Journal of Immunology,* 1993, vol. 150, 880-887 **[0086]**
• **CLARKSON et al.** *Nature,* 1991, vol. 352, 624-628 **[0086]**
• **TATIANA A ; TATUSOVA ; THOMAS L ; MADDEN.** Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett,* 1999, vol. 174, 247-250 **[0111]**
• **SANTANA-DAVILA R. ; PEREZ E.A.** Treatment options for patients with triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol.,* 2010, vol. 27, 42 **[0443]**
• **DE RUIJTER T.C. ; VEECK J. et al.** Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.,* 2011, vol. 137, 183 **[0443]**
Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med,* 2009, vol. 361, 123 **[0443]**
• **DENT R.; TRUDEAU M et al.** Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Feature and Patterns of Recurrence. *Clin. Cancer Res.,* 2007, vol. 13, 4429 **[0443]**
• **BERNSTEIN L ; J.V. LACEY JR.** Receptors, Associations, and Risk Factor Differences by Breast Cancer Subtypes: Positive or Negative?. *J Natl Cancer Inst,* 23 February 2011, vol. 103 (6), 451-453 **[0443]**
• **NOFECH-MOZES S. et al.** Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Cancer Res. Treat.,* 2009, vol. 118, 131-137 **[0443]**

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1a

A = murin

B = Hümanize

ŞEKİL 1b

C = fare

ŞEKİL 2a

D = Değişken hafif zincir hizalaması

E = Fare VL'si

F = SEKANS KOD NO.:

ŞEKİL 2b

G = Değişken ağır zincir hizalaması

H = Fare VH'si

ŞEKİL 3a

I = β-Laktamaz

J = kaynak

K = poli

L = Varyant

M = Akseptör sekans

N = artırıcı

O = TATA kutusu

P = Donör sekans

R = üç parçalı lider

ŞEKİL 3b

S = Higromisin

T = Promotör

U = kappa

ŞEKİL 5

V = Fraksiyonlar

Y = Tüp Rafındaki Pozisyon

Z = Tüp #

A1 = Tampon

B1 = Mililitre

ŞEKİL 6

C1 = Antikor

D1 = Misli cinsinden fark

ŞEKİL 7a

E1 = Saf

ŞEKİL 8a

F1 = Bağıl bağlanım

G1 = L1 serisi

ŞEKİL 8b

H1 = L2 serisi

ŞEKİL 9

I1 = Hücre bağlanımı

ŞEKİL 10

J1 = TNBC numuneleri

ŞEKİL 11

K1 = MFI (IgG'ye kıyasla misli cinsinden 3A4 ile elde edilen sinyal)

L1 = Meme Kanseri hücre hatları

M1 = TNBC hücre hatları

ŞEKİL 12

N1 = Yüzey sinyali (0 zaman noktasına kıyasla kalan %)

O1 = Zaman (dakika)

ŞEKİL 13

P1 = BT-20 TNBC hücre hattı

ŞEKİL 14

R1 = MBA-MB-436 TNBC hücre hattı

ŞEKİL 15

S1 = T47D hücre hattı (TNBC değildir)

ŞEKİL 16

T1 = eşodaklı

U1 = Birleştirme

ŞEKİL 1a

3A4-VL

```
A     DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK   11/80 (86.3%)
B   1 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK    0/80 (100%)
B   2 DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK    2/80 (97.5%)
                            CDR-L1                 CDR-L2                                CDR-L3
```

ŞEKİL 1b

3A4-VH

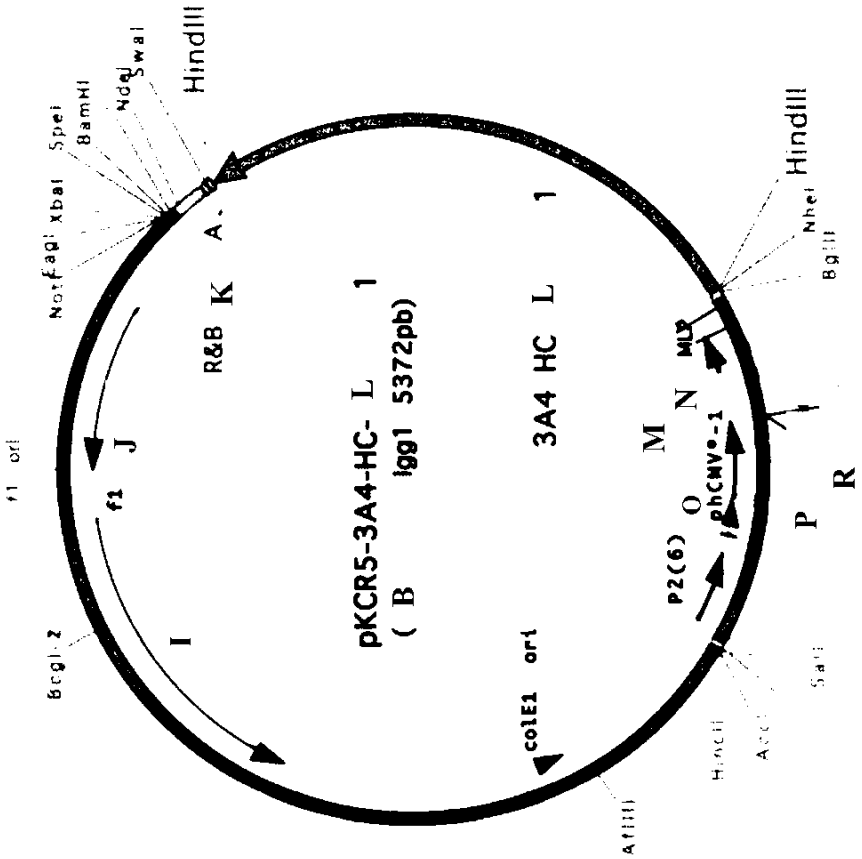
```
C     QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNYNQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSVTVSS   21/82 (74.4%)
B   1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS    0/82 (100%)
B   2 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS    2/82 (97.5%)
B   3 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS    6/82 (92.7%)
B   4 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS    8/82 (90.2%)
                            CDR-H1                 CDR-H2                                CDR-H3
```

ŞEKİL 2a

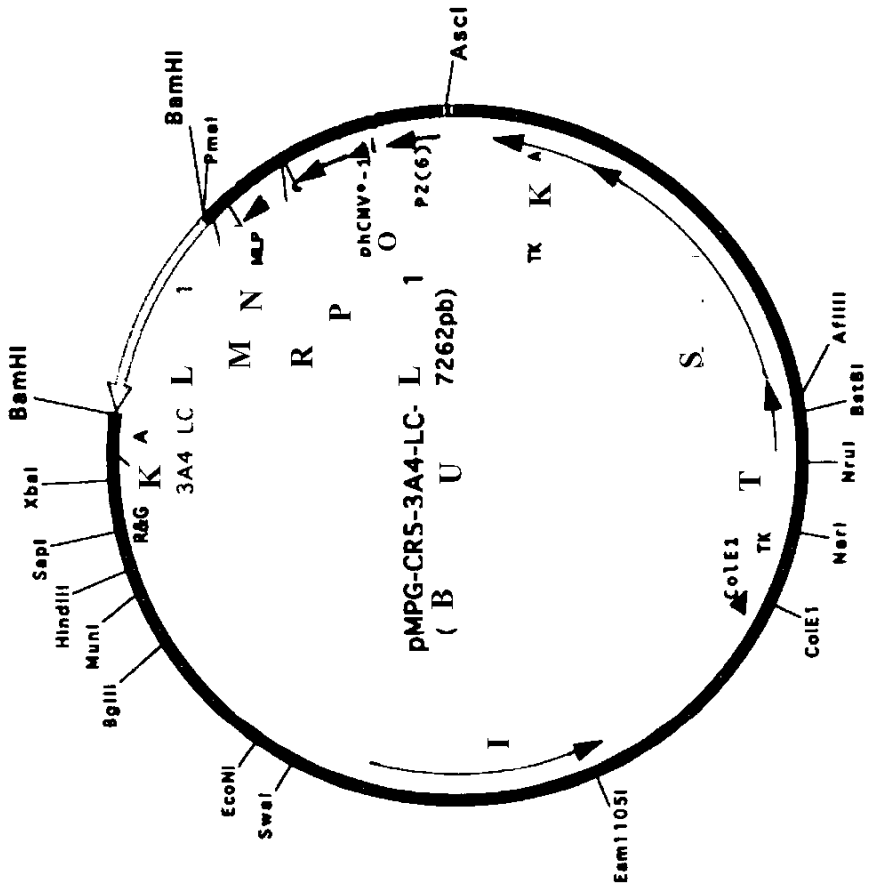
```
D

E                   DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRF 60
F        189        DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRF 60
                    *:*********.*: *: ********************************:***:******

E                   SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK 112
F        189        SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK 112
                    ****************************:*************** **:**:*
```

ŞEKİL 2b

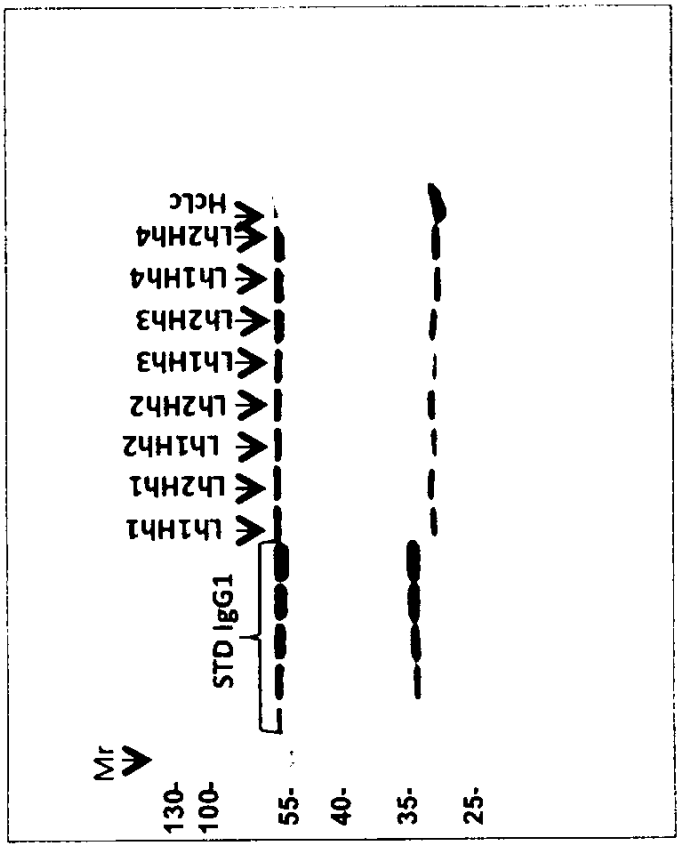
```
G

H                   QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNY 60
F        194        QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY 60
                    *:******.*: *******:******************:*: *:.***:************

H                   NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSVTVSS 116
F        194        NQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTVSS 116
                    ******:. :*.*.*:*****:*.** ***:******************* *****
```


pKCR5-3A4-HC-
(B
igg1 5372pb)
L
1
3A4 HC
L
1
R&B
K
A
I
J
f1
f1 ori
BglI-2
NotI
AgeI
XbaI
SpeI
BamHI
NdeI
SwaI
HindIII
colE1 ori
P2(6)
O
M
N
MLS
phCMV*-1
P
R
HindIII
NheI
BglII
SalI
AflIII

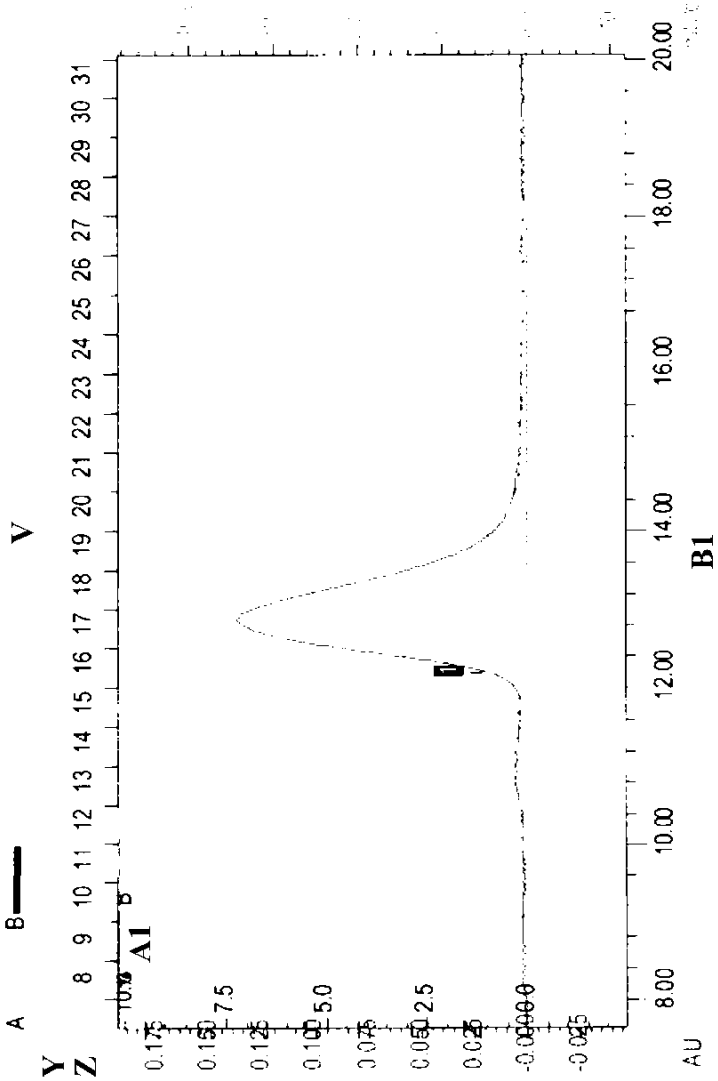
ŞEKİL 3a


pMPG-CRS-3A4-LC-
(B U L 7262pb)
BamHI
BamHI
AscI
XbaI
SapI
HindIII
MunI
BglII
EcoNI
SwaI
Eam1105I
ColE1
ColE1
NarI
NruI
BstBI
AflIII
3A4 LC
R&G
TK
TK
pCMV*-1
P2(6)
PmaI
M N
R
P
S
T
I
K
K
L
L
U
O
A
A
1
1

ŞEKİL 3b


Mr
130-
100-
55-
40-
35-
25-
STD IgG1
Lh1Hh1
Lh2Hh1
Lh1Hh2
Lh2Hh2
Lh1Hh3
Lh2Hh3
Lh1Hh4
Lh2Hh4
HcLc

ŞEKİL 4

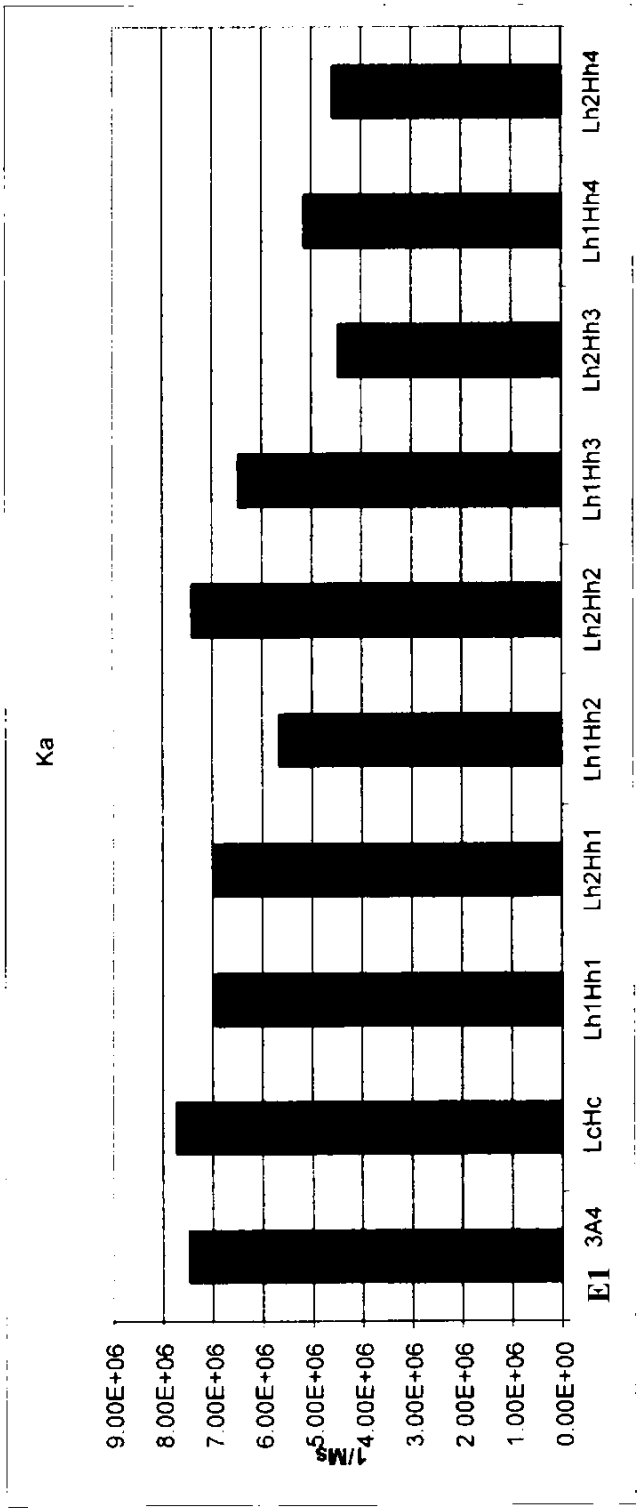


ŞEKİL 5

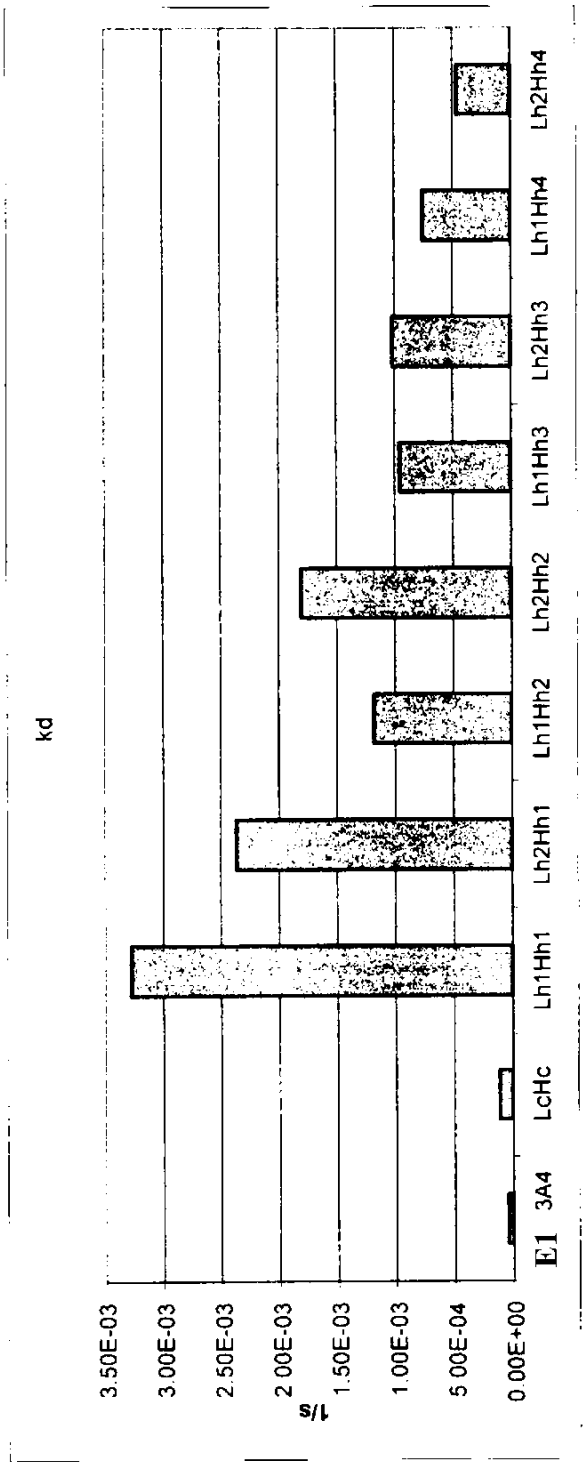
ŞEKİL 6

C1	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (nM)	D1
LcHc	7.72×10^{6}	1.21×10^{-4}	0.016	-
Lh1Hh1	6.93×10^{6}	3.28×10^{-3}	0.474	29.6
Lh2Hh1	6.97×10^{6}	2.37×10^{-3}	0.341	21.3
Lh1Hh2	5.65×10^{6}	1.19×10^{-3}	0.211	13.2
Lh2Hh2	7.40×10^{6}	1.81×10^{-3}	0.245	15.3
Lh1Hh3	6.46×10^{6}	9.60×10^{-4}	0.149	9.3
Lh2Hh3	4.46×10^{6}	1.02×10^{-3}	0.228	14.3
Lh1Hh4	5.14×10^{6}	7.64×10^{-4}	0.149	9.3
Lh2Hh4	4.57×10^{6}	4.70×10^{-4}	0.103	6.4

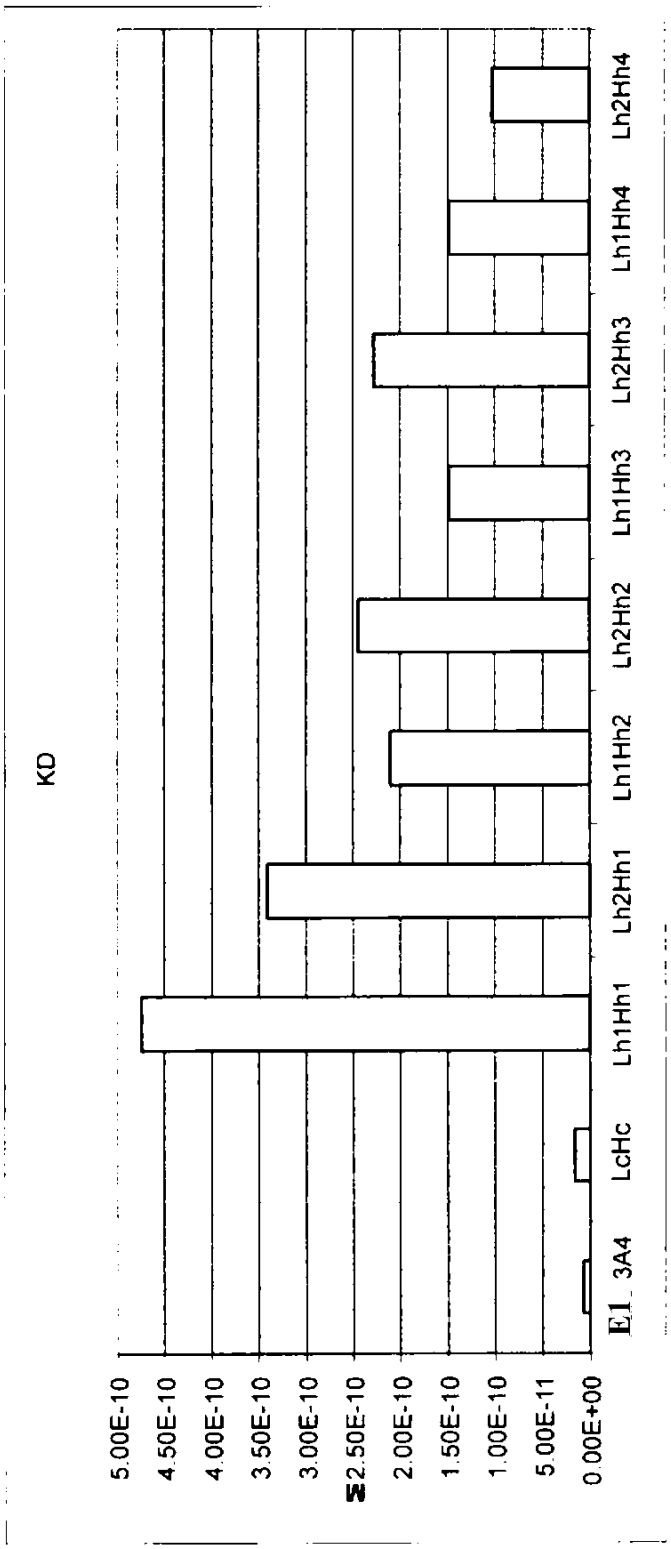
ŞEKİL 7a

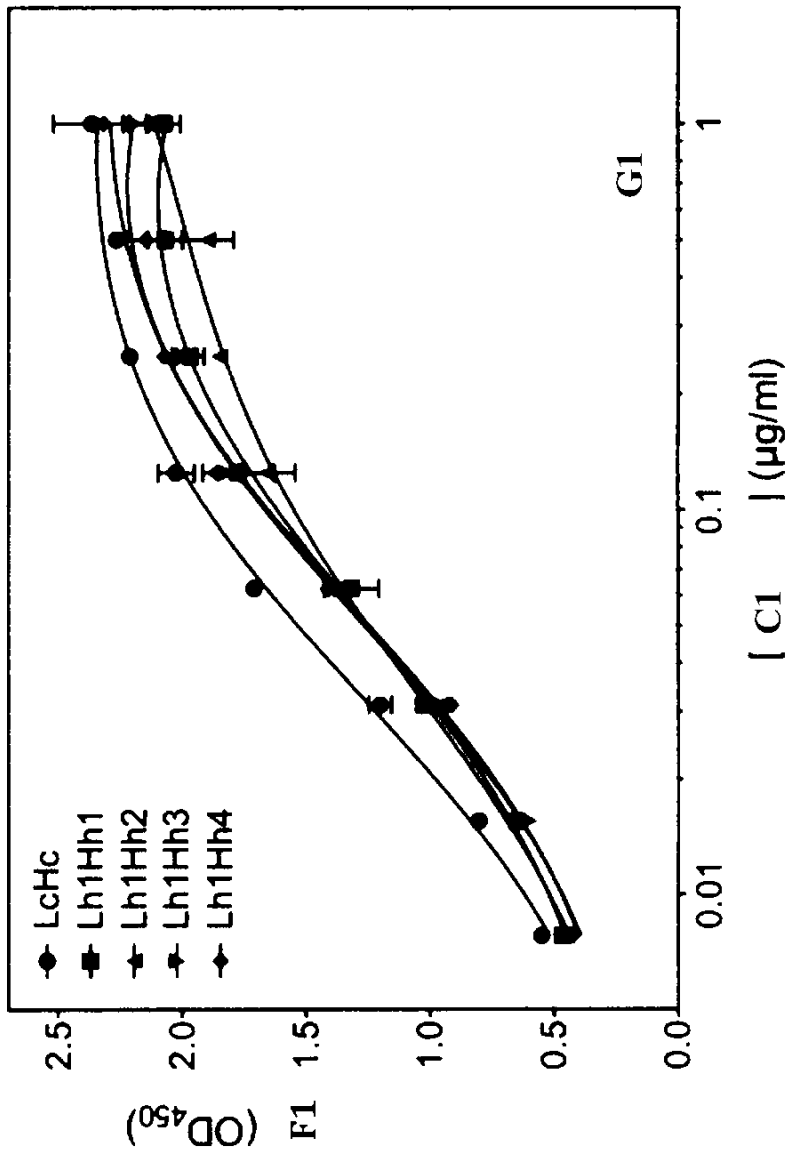

Ka
9.00E+06
8.00E+06
7.00E+06
6.00E+06
5.00E+06
4.00E+06
3.00E+06
2.00E+06
1.00E+06
0.00E+00
1/Ms
E1
3A4
LcHc
Lh1Hh1
Lh2Hh1
Lh1Hh2
Lh2Hh2
Lh1Hh3
Lh2Hh3
Lh1Hh4
Lh2Hh4

ŞEKİL 7b


kd
1/s
3.50E-03
3.00E-03
2.50E-03
2.00E-03
1.50E-03
1.00E-03
5.00E-04
0.00E+00
E1
3A4
LcHc
Lh1Hh1
Lh2Hh1
Lh1Hh2
Lh2Hh2
Lh1Hh3
Lh2Hh3
Lh1Hh4
Lh2Hh4

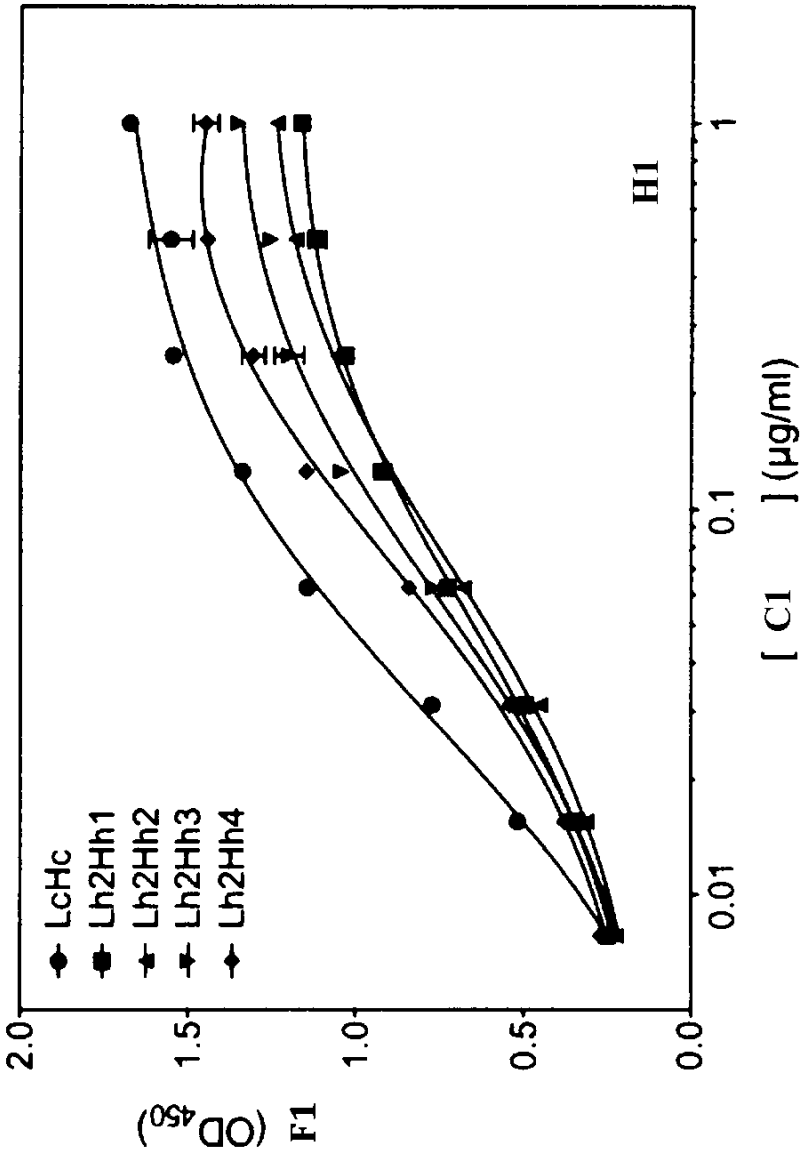
ŞEKİL 7c

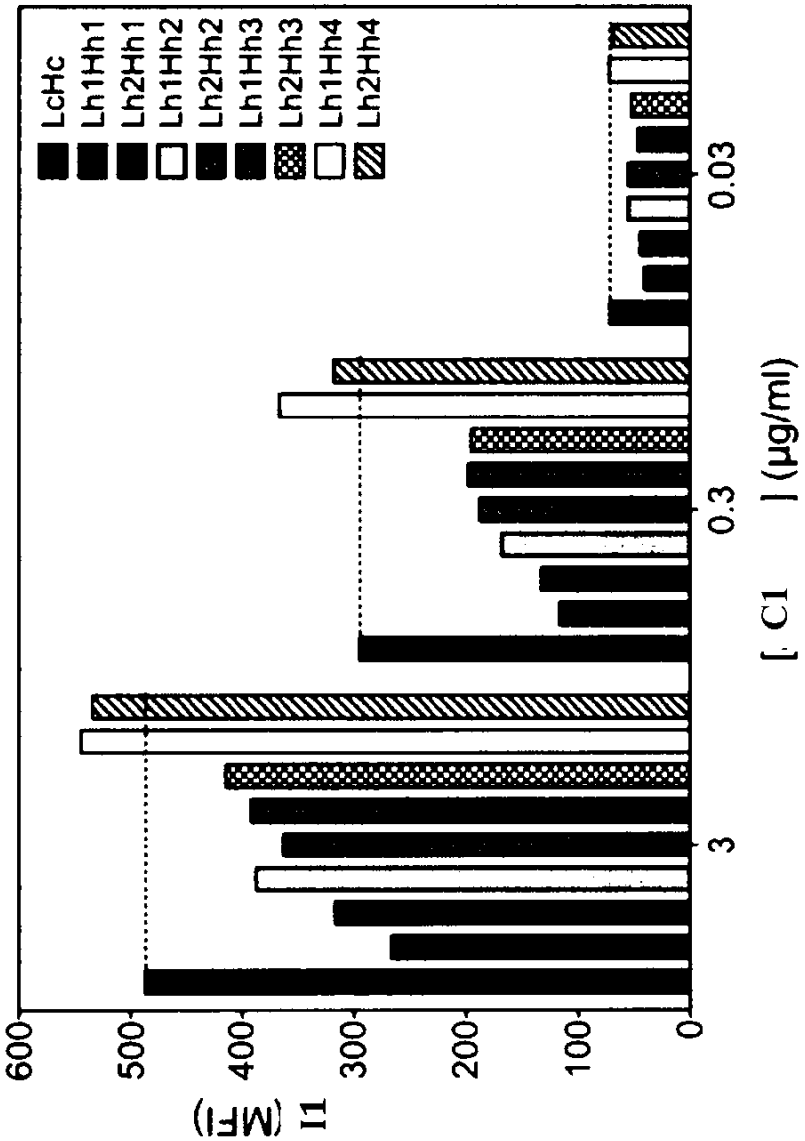

KD
5.00E-10
4.50E-10
4.00E-10
3.50E-10
3.00E-10
2.50E-10
2.00E-10
1.50E-10
1.00E-10
5.00E-11
0.00E+00
E1_3A4
LcHc
Lh1Hh1
Lh2Hh1
Lh1Hh2
Lh2Hh2
Lh1Hh3
Lh2Hh3
Lh1Hh4
Lh2Hh4


LcHc
Lh1Hh1
Lh1Hh2
Lh1Hh3
Lh1Hh4
F1 (OD450)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
[C1] (µg/ml)
G1

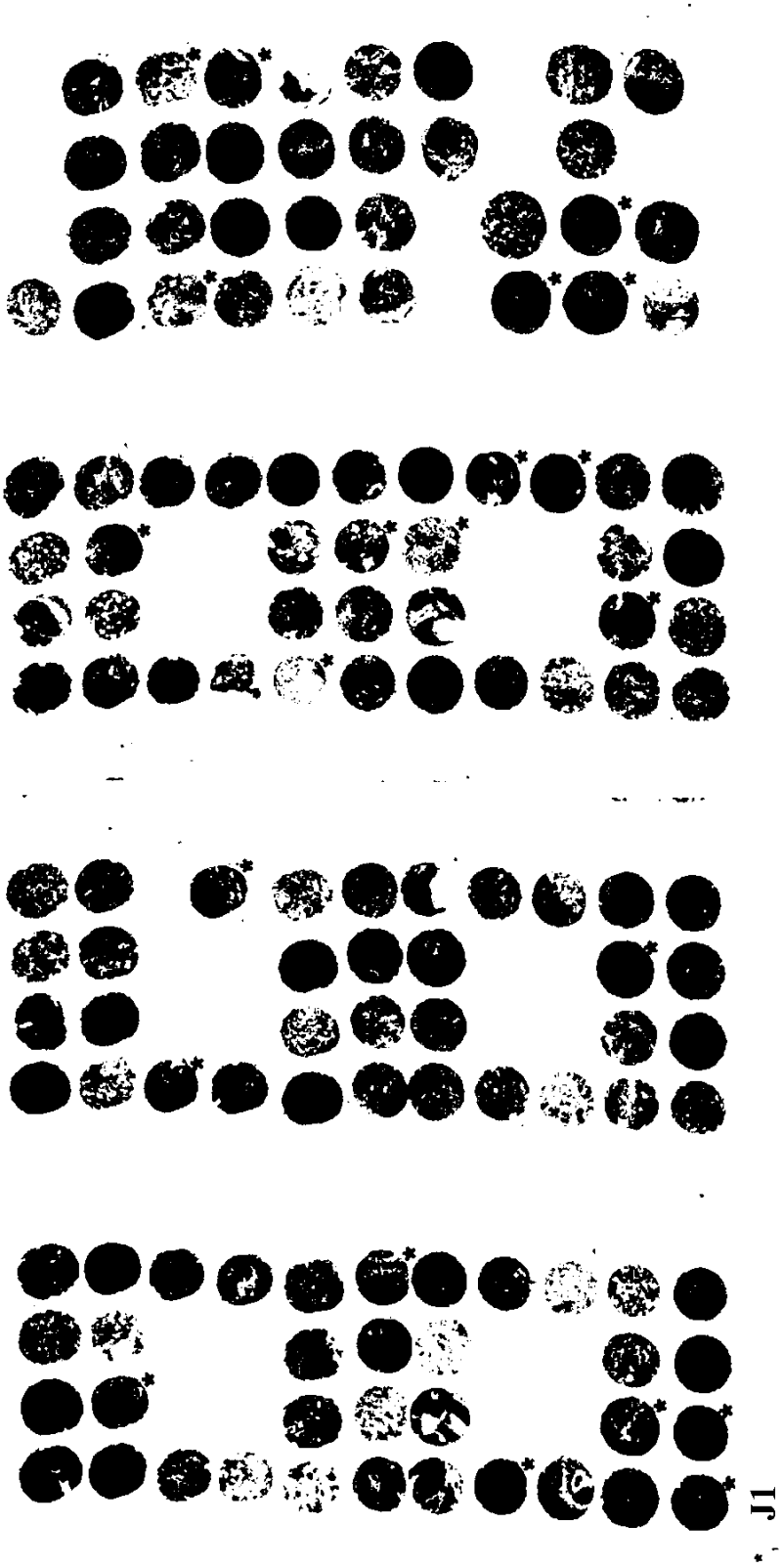
ŞEKİL 8a

ŞEKİL 8b


LcHc
Lh2Hh1
Lh2Hh2
Lh2Hh3
Lh2Hh4
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
F1 (OD450)
0.01
0.1
1
[C1] (µg/ml)
H1

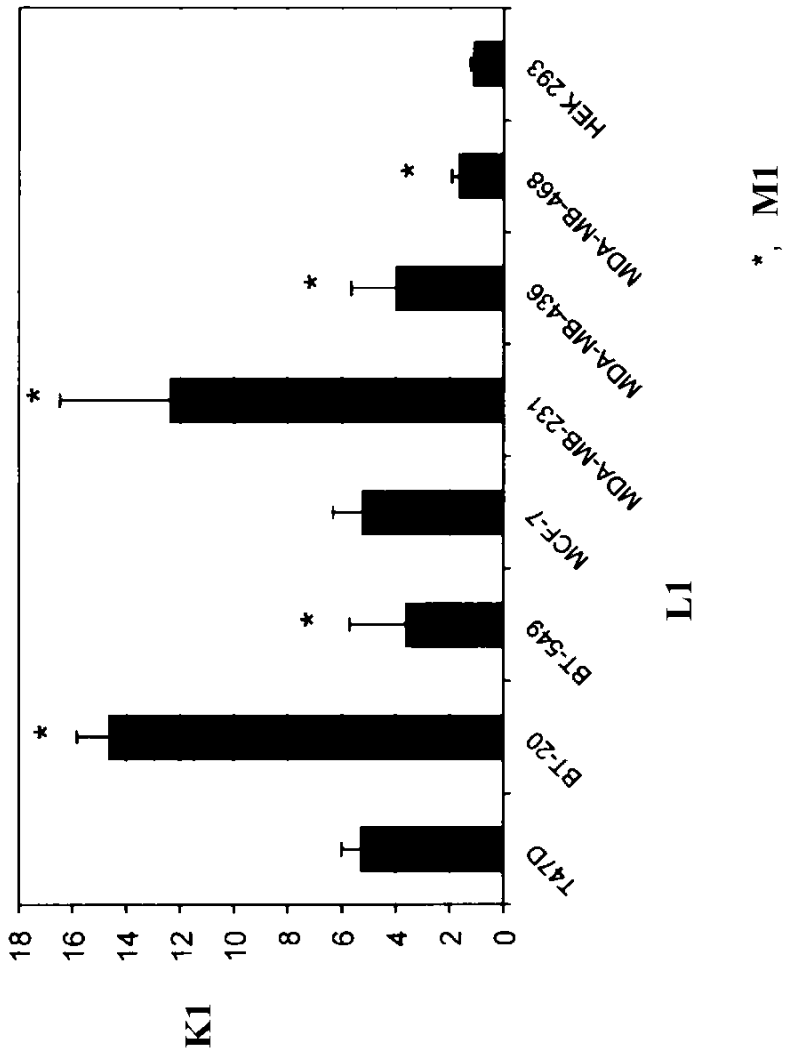

LcHc
Lh1Hh1
Lh2Hh1
Lh1Hh2
Lh2Hh2
Lh1Hh3
Lh2Hh3
Lh1Hh4
Lh2Hh4
I1 (MFI)
600
500
400
300
200
100
0
3
0.3
0.03
[C1] (µg/ml)

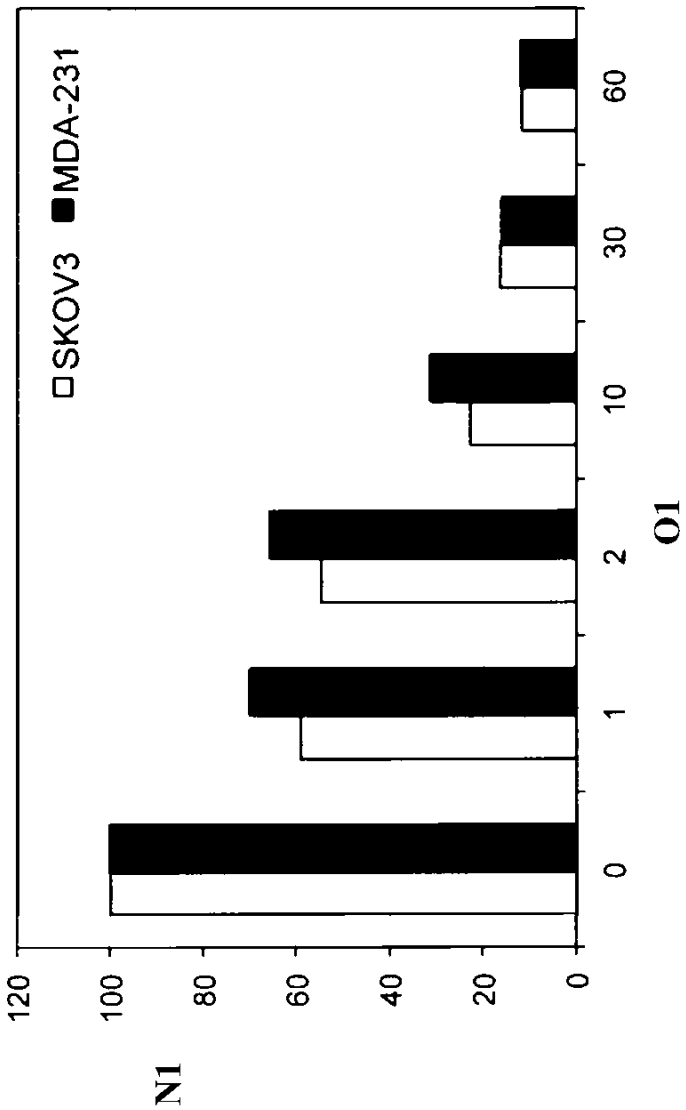
ŞEKİL 9



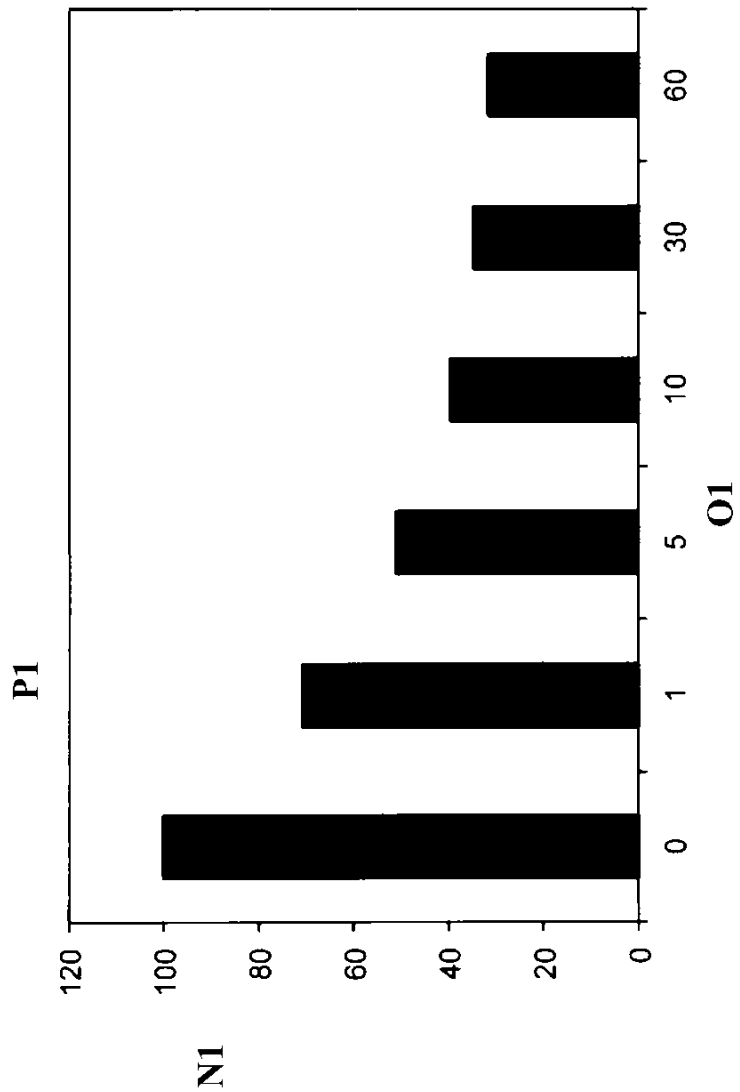
ŞEKİL 10

ŞEKİL 11

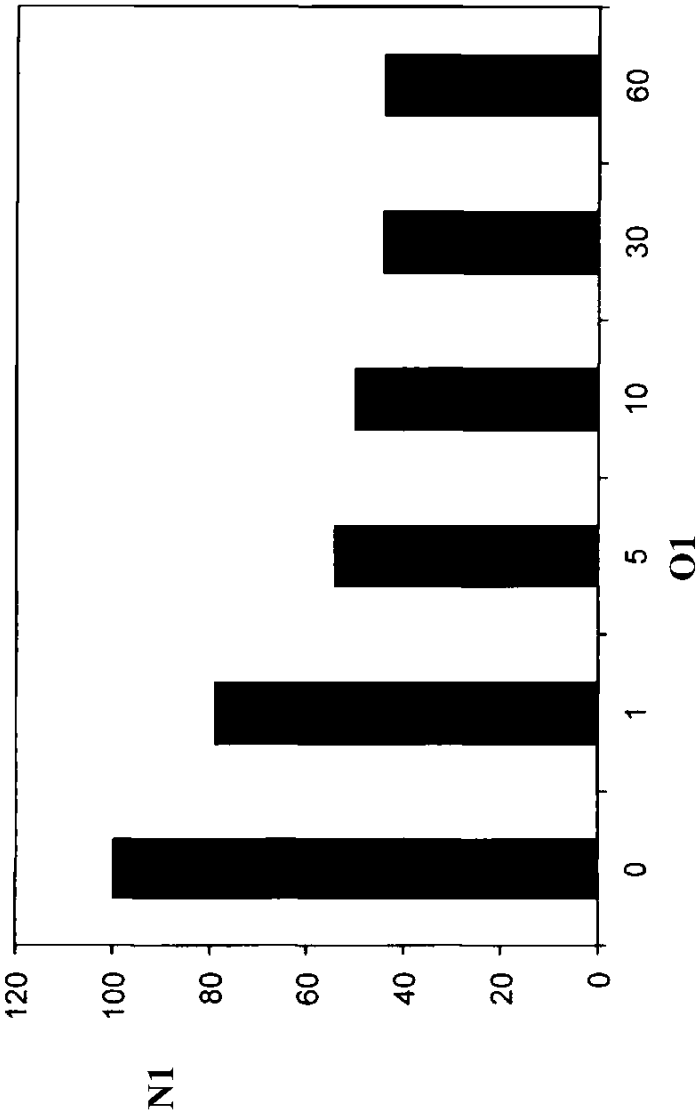

K1
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
T47D
BT-20
BT-549
MCF-7
MDA-MB-231
MDA-MB-436
MDA-MB-468
HEK 293
L1
*
*
*
*
*
*, M1



ŞEKİL 12

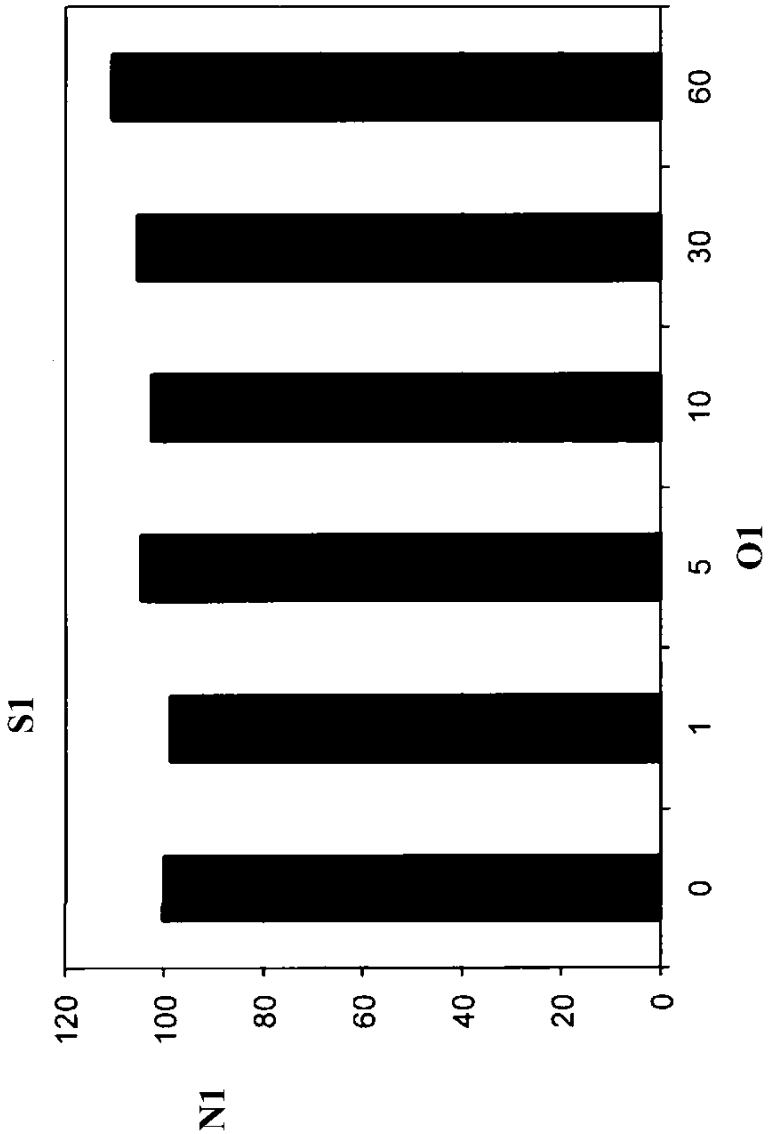


ŞEKİL 13

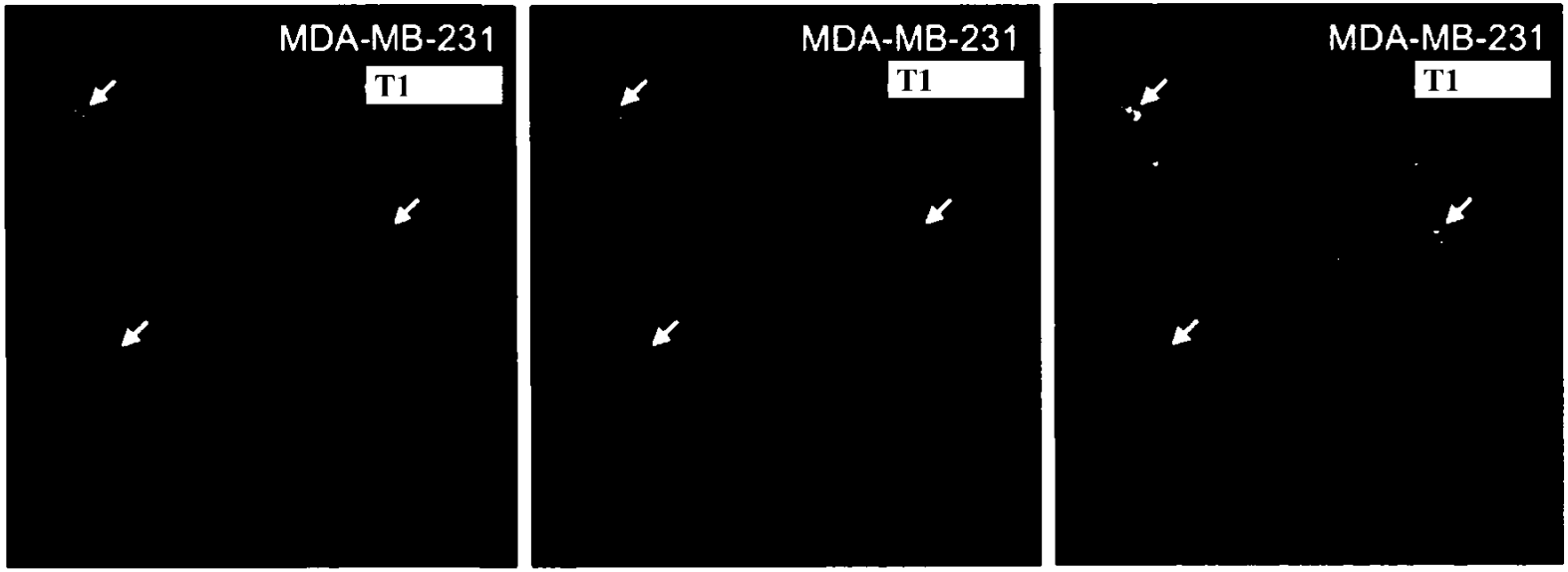


ŞEKİL 14

ŞEKİL 15



ŞEKİL 16



KAAG1 LAMP1 U1

ŞEKİL 17