

ÖZET
İMMÜNOSTİMÜLATÖR OLİGODEOKSİNÜKLEOTİTLER

Mevcut buluş, immünoştimülatör oligodeoksinükleotitler, bu tür oligodeoksinükleotitleri
5 içeren vektörler ve aşılar, bunların ilaç olarak kullanımı, bunların, bulaşıcı hastalıkların
önlenmesi veya bunlarla savaşılmadaki kullanımları ve bu tür
oligodeoksinükleotitlerin tespit edilmesine yönelik yöntemler ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Kumes hayvanlarında bulaşıcı bir hastalığı engellemeye veya bununla savaşmaya yönelik aşı olup, özelliği; söz konusu aşının (a) aşağıdaki genel formüle sahip olan bir immünoestimülatör metillenmemiş oligodeoksinükleotitin bir immünoestimülatör miktarını



burada

- 10 x = 3-20;
z = 0-10;
n = 2-100;

veya bunların farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve/veya oligodeoksinükleotiti içeren bir vektörü, (b) bir antijen bileşeninin immünojenik bir miktarını veya bir antijen bileşenini kodlayan genetik bilgiyi, burada söz konusu antijen bileşeni kendi doğal suşu formunda kumes hayvanlarına karşı patojenik olan bir virüs veya mikro-organizmadır veya bunlardan türetilir, ve (c) farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı içermesi **ile karakterize edilmesidir.**

20

2. İstem 1'e göre bir aşı olup, özelliği;
x = 3-10;
z < 5;
n = 3-18 olması **ile karakterize edilmesidir.**

25

3. İstem 1 veya 2'ye göre bir aşı olup, özelliği; $5' [G]_x$ ve $3' [G]_z$ nükleotitlerin bir fosforotiyoat bağlanmasına sahip olması ve diğer nükleotitlerin bir fosfodiester bağlanmasına sahip olmasıdır.

30

4. İstemler 1-3'ten herhangi birine göre bir aşı olup, özelliği; söz konusu oligodeoksinükleotitin bir taşıyıcıya veya haptene bağlanmasıdır.

35

5. Önceki istemlerden herhangi birine göre aşı olup, özelliği; söz konusu virüsün veya mikro-organizmanın Bulaşıcı Bronşit virüsünden, Newcastle Hastalığı virüsünden, Bulaşıcı Bursal Hastalığından (Gumboro), Tavuk Anemi ajanından,

5 Kuşlara ait Reovirüsten, *Mycoplasma gallisepticum*, Hindi Rhinotracheitis virüsten, *Haemophilus paragallinarum* (Coryza), Tavuk Poksvirüsten, Kuşlara ait Encephalomyelitis virüsten, Egg Drop sendromu virüsü, Bulaşıcı Laryngotracheitis virüsünden, Hindi Herpes Virüsünden, Eimeria türlerinden, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma synoviae*, *Salmonella* türleri ve *Escherichia coli*'den oluşan gruptan seçilmesi **ile karakterize edilmesidir.**

TARİFNAME

İMMÜNOSTİMÜLATÖR OLİGODEOKSİNÜKLEOTİTLER

Mevcut buluş immünostimülatör oligodeoksinükleotitleri içeren aşılarda ve/veya bu
5 oligodeoksinükleotitleri içeren vektörlerle ilgilidir.

Son yirmi yılda omurgalı immün sisteminin mikrobiyal enfeksiyonu tespit etmek ve
patojenlerin kendine özgü özelliklerinin soydaş konak patojen tanıma reseptörleriyle
(PRR'ler) ile etkileşen patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP'lar) olarak
10 adlandırılan paternlerle reseptör aracılıklı tanınması vasıtasıyla hızlı immün
aktivasyonunu tetiklemek için mekanizmalara sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Iwasaki A,
Medzhitov R. 2001. Science 327, 291-295. Medzhitov R., 2009. Immunity 30, 766-775).

Şu anda patojen deoksiribonükleik asitlerin (DNA) belirli formlarının bu PAMP'lar
15 arasında olduğu açıktır. 1995'te bakteriyel DNA'daki metillenmemiş CpG motiflerinin
murin B-hücre aktivasyonunu tetiklediği raporlanmıştır (Krieg et al., 1995). Bu çalışma
ilk kez bakteriyel immünostimülatör metillenmemiş CpG-içeren DNA'nın spesifik
tanınması ve önceden tanınmış CpG baskılanmasının yanı sıra memeli DNA'sında
yaygın CpG metilasyonu arasında bir bağlantı oluşturmuştur. En etkili B hücre
20 stimülatör metillenmemiş CpG oligodeoksinükleotitin (CpG ODN) GACGTT dizi
elemanına sahip olduğu gösterilmiştir.

Alanda bir sonraki çığır açan makale Shizuo Akira'nın Osaka/Japonya'daki laboratuvarı
tarafından yayınlanmıştır (Hemmi et al., 2000). Farelerde bir gen klonlama ve bir
25 hedeflenmiş gen knockout yaklaşımı vasıtasıyla farelerde CpG-ODN'lere karşı hücrel
tepkiye toll-benzeri reseptör 9'un (TLR9) aracılık ettiği kesin olarak gösterilebilmiştir.
Sonrasında CpG-ODN'lerin NF κ -B yolu aracılığıyla baskın olarak TLR9
sinyallemesine yönelik agonistler olduğu gösterilmiştir (Medzhitov 2001). Sonraki on
yolda temel araştırma konuları ve genel potansiyel immünoterapötik uygulamalar
30 üzerine oldukça fazla çalışma yayınlanmıştır (örneğin, Krieg 2002, 2003, 2006;
Klinman 2004, Voleler 2005, Wilson et al., 2006, Kindrachuk et al., 2008, Dorn and
Kippenberger 2008, Vollmer and Krieg 2009, Wilson et al. 2009 gözden geçirilmiştir).
Birkaç derleme makale CpG-ODN'lerin anti-enfektif uygulamalara (Krieg 2007), kanser
tedavisinde TLR9 agonistlerinin kullanımına (Krieg 2007, Weiner 2009), astım ve alerji
35 tedavisi için (Kline 2007, Kline and Krieg 2008, Fonseca and Kline 2009) ve aşı

adjuvanları olarak TLR9 aktivasyonuna (Klinman et al., 2004, Klinman 2006, Daubenberger 2007, Wagner 2009, Mutwiri et al., 2009, Klinman et al., 2009) odaklanmaktadır.

5 WO2004/005476, memelilerde terapötik kullanıma yönelik çeşitli CpG motiflerini açıklamaktadır.

WO2012/089800, CpG motiflerini ve bunların TLR etkileşimindeki uygulamalarını açıklamaktadır.

10

CpG ODN'ler ayrıca veteriner uygulamalarında, özellikle büyükbaşlarda, domuzlarda, koyunlarda, köpeklerde, tavuklarda ve balıkta immüno-stimülasyon ajanları ve aşı adjuvanları olarak açıklanmış ve tartışılmıştır (Babiuk et al., 2003, Carrington and Secombes 2006, Griebel et al., 2005, Mutwiri et al., 2003, Singh ve O'Hagan 2003, 15 Werling ve Jungi 2003).

Tavuklarda veteriner kullanımı alanında CpG oligodeoksinükleotitlerin örneğin Newcastle Hastalığına karşı tavukları korumak için aşılarında kullanımı anlatılmıştır (Linghua 2007).

20

Yakın zamanda TLR21'in CpG oligodeoksinükleotitlerin tanınmasında memeli TLR9'una karşı bir fonksiyonel homolog olarak hareket ettiği tavuklarda gösterilmiştir (Brownlie et al., 2009).

25

Spesifik CpG ODN'lerin immüno-modulatorler olarak tasarımı şimdiye kadar son derece yaygın olmuştur. Bu özellikle memeli olmayan CpG ODN'ler için doğrudur. Bunun nedeni çok faktörlüdür; bunların birinci insan TLR'lerine yönelik ve insan olmayan TLR'lere yönelik immüno-modulator CpG motifleri arasındaki korelasyon hakkında hiç bilgi yoktur. İkinci olarak CpG ODN'lerin çok düşük konsantrasyonlarının etkilerini 30 seçime bağlı olarak test etmek için gürültü seviyesine karşı yeteri kadar düşük arka planı olan mevcut hücre sistemleri yoktur. Bunun ötesinde mevcut yüksek çıktılı tarama yöntemi yoktur ve olsa dahi CpG ODN'lerin memeli olmayan türlerde immüno-modulatorler olarak *in vivo* ile *in vitro* etkinliği arasında açık bir korelasyon yoktur.

35

Dolayısıyla açıkça yüksek bir immüno-modulator etkiye sahip olan ve dolayısıyla düşük dozlarda etkili olan yeni CpG ODN'lere yönelik bir ihtiyaç vardır. Ve CpG-aktivitesinin *in*

vitro ve *in vivo* aktivitesi arasında bir korelasyon gösteren, veteriner kullanımlarına yönelik seçici ve hassas CpG ODN seçim sistemlerine yönelik bir ihtiyaç vardır.

Mevcut buluşun amaçlarından biri bu yeni CpG ODN'leri içeren aşular sağlamaktır.

5

Bu açıdan mevcut buluş kümes hayvanlarında bulaşıcı bir hastalığı engellemeye veya bununla savaşmaya yönelik bir aşı ile ilgili olup, aşağıdaki genel formüle sahip olan bir immünoestimülator metillenmemiş oligodeoksinükleotitleri

10



burada $x = 3-10$; $z = 0-10$; $n = 2-100$ 'dir; veya bunların farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve/veya oligodeoksinükleotiti içeren bir vektörü, bir antijen bileşeninin immünojenik bir miktarını veya bir antijen bileşenini kodlayan genetik bilgiyi, burada söz konusu antijen bileşeni kendi doğal suşu formunda kümes hayvanlarına karşı patojenik olan bir virüs veya mikro-organizmadır veya bunlardan türetilir, ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı içermektedir.

15

Bir "immünoestimülator metillenmemiş oligodeoksinükleotit" NF- κ B veya İnterferon Regulator Faktör 3 (IRF3) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olan sinyalleme kaskatlarının başlatılmasını stimüle eden bir metillenmemiş sitidinfosfat-guanozin di-nükleotit dizisini ihtiva eden bir oligodeoksinükleotit anlamına gelmektedir. Bu aktivasyon karşılığında inflamatuvar sitokinlerin ve diğer hücrel aktivasyon olaylarının ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. NF- κ B bağlanma alanları ve NF- κ B alanından etkilenen gen ekspresyonu, diğerlerinin yanında Schindler ve Baichwal (1994) tarafından açıklanmıştır.

20

25

Oligodeoksinükleotit terimi deoksinükleotitlerin kısa bir nükleik asit polimeri, başka bir deyişle bir fosfat grubuna ve bir değişebilir organik baza bağlanan birden çok deoksiriboz içeren bir molekül anlamına gelmektedir. Bu tür bir organik baz süstitüe edilmiş bir pirimidin veya süstitüe edilmiş bir pürindir. Örnekler sitozin ve timin sırasıyla adenin ve guanindir.

30

Buluşu göre oligonükleotitler modifikasyonlar içerebilmektedir. Bu modifikasyonlara ilişkin örnekler örneğin, bir nükleositin 3' ve/veya 5' ucuna yerleşen fosfodiester

35

internükleosit köprüdeki modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar diğerleri arasından örneğin bir fosforotiyoat veya bir fosforoditiyoat ile bir fosfodiesterin yer değiştirmesiyle ilgilidir.

- 5 Diğer modifikasyonlar örneğin bir defosfo köprüsü ile bir fosfodiester köprüsünün yer değiştirmesidir. Defosfo köprülerine ilişkin örnekler metilhidroksilamin, formasetal ve dimetilensülfon gruplarıdır.

- 10 Yine başka modifikasyonlar dopal bir nükleosit bazın inosin, 5-florositozin, 7-deaza-7-süstitüe edilmiş guanin, 7-deaza-8-süstitüe edilmiş guanin, 2-tiyourasil, dihidrourasil, 5-bromo-sitozin, 6-süstitüe edilmiş sitozinler, N4-süstitüe edilmiş sitozinler, gibi doğal olmayan bir nükleosit bazı ile yer değiştirmesiyle ilgili olan modifikasyonlardır.

- 15 Yine başka modifikasyonlar bir şeker biriminin; bir β -riboz şeker veya bir β -D-2'-riboz şeker biriminin örneğin, L-2'-deoksiriboz veya 2'-L-arabinoz gibi modifiye edilmiş bir şeker ile yer değiştirmesiyle ilgili modifikasyonlardır.

- 20 Oligonükleotitler hakkında ayrıca anlayış kazandıran bir ders kitabı örneğin, Carl W. Dieffenbach tarafından gözden geçirilen, "PCR Primer: A Laboratory Manual", İkinci Baskı, 2003, Ulusal Alerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Enstitüsü; Gabriela S. Dreksler, Uniformed Services University of the Health Sciences, Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN 978-087969654-2'dir.

- 25 CpG motifini taşıyan $5' \{T C G T C G\}_n 3'$ yapısı buluşa göre bir ODN'nin aktif immünostimüle edici kısmını temsil etmektedir. Dolayısıyla mevcut buluş "omurga" olarak adlandırılan bu kısmı içeren immünostimülatör oligodeoksinükleotitler sağlamaktadır.

- 30 Buluşa göre bir oligodeoksinükleotitin omurgasında $5' \{T C G T C G\}_n 3'$ yapısının en az iki, tercihen üç kere mevcut olması gerektiği bulunmuştur. Dolayısıyla n en az iki olmalıdır. Ayrıca oligodeoksinükleotitlerin aktivitesinin n arttığı zaman arttığı bulunmuştur. Bu etki n arttığı zaman dengelenmektedir. Temel olarak omurga yapısının n sayısı bu doğrultuda en az 2 olmalıdır. Sentetik dizi ne kadar uzunsa yapılmasının da o kadar zor olmasından dolayı tercihen n'nin aralığı sadece $3 \geq n \geq 100$ 'dür.
- 35 Uygulamada tercihen n'in aralığı $3 \geq n \geq 18$ 'dir. Daha da tercihen n'nin aralığı $4 \geq n \geq$

18'dir, daha da tercihen n'nin aralığı $5 \geq n \geq 18$ 'dir, yine daha da tercihen n'nin aralığı $6 \geq n \geq 18$ 'dir.

5 Buluşta kullanıma yönelik CpG ODN'nin tanımlanması diğerlerinin yanında halihazırda kullanımda olan NF-κB aktivasyonunun tanımlanmasına yönelik sistemlerden daha seçici bir tespit sistemi kullanılması vasıtasıyla mümkün kılınmıştır. Brownlie et al. (2009) bir NF-κB lüsiferaz tabanlı raporör sistemi açıklamaktadır. Diğer sistemler örneğin IL-8 transkript ölçümüne veya sitokin sekresyonuna veya NO sekresyonunun tespitine dayanmaktadır.

10

Bunun aksine mevcut buluşta sekrete edilmiş alkalın fosfat tabanlı bir tespit sistemi (SEAP) kullanılmıştır. SEAP memeli sistemlerindeki bir raporör enzimdir (Yang et al., 1997). Bu sistemin şaşırtıcı şekilde duyarlı olduğu ve şaşırtıcı şekilde test edilen CpG ODN'nin *in vitro* ve *in vivo* aktiviteleri arasında yakın bir korelasyon sağladığı ortaya 15 çıkmıştır. SEAP sistemi bir substrat olarak *para*-nitrofenilfosfat (pNPP) ile kullanılmıştır.

Mevcut sistemler üzerinde başka bir gelişme SEAP genini taşıyan plazmidin hücrelerine dahil olma ve stabil korunmadır. Bu zamana kadar bütün tespit sistemleri hücrelerin raporör gen ile geçici transfeksiyonunu kullanmıştır. Raporör genin 20 hücrelerine dahil olma ve stabil korumadan dolayı şimdi ilk kez bir doz/tepki eğrisi oluşturulabilmektedir. Eğer çeşitli CpG ODN aktiviteleri arasında güvenilir bir karşılaştırma yapılacaksa bu tür bir eğri önemlidir.

Dolayısıyla mevcut buluşun Örnekler bölümünde detaylı şekilde açıklanan yöntemler 25 ve hücre hatları ilk kez çeşitli CpG ODN'ler arasında güvenilir bir yan yana karşılaştırma yapmaya olanak sağlamaktadır.

Kullanılan sisteme ilişkin diğer detaylar Örnekler bölümünde verilmektedir.

30 $5' [G]_x \{ T C G T C G \}_n T C G [G]_z 3'$ yapısının 5'-ucundaki G'lerin sayısındaki bir artışın CpG ODN aktivitesine ilişkin bir artışa neden olduğu bulunmuştur. x değeri tercihen en az 3 olmalıdır ancak G'nin sayısının 20 G'ye kadar çıkması CpG ODN'nin aktivitesini geliştirmektedir. Dolayısıyla artan tercih sırasına göre daha da tercihen x 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 veya 20'dir.

Ayrıca $5' [G]_x \{ T C G T C G \}_n T C G [G]_z 3'$ yapısının 3'-ucundaki G'lerin sayısındaki bir artışın CpG ODN aktivitesine ilişkin (az) bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Z değeri tercihen 10 veya 10'dan az olmalıdır ancak G'nin sayısını 0 G'ye kadar düşürmek CpG ODN aktivitesini arttırmaktadır. Dolayısıyla artan tercih sırasına göre z

5 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 veya 0'dır.

Yukarıda belirtildiği gibi bir nükleositin 3' ve/veya 5' ucuna yerleşen fosfodiester internükleosit köprüde farklı modifikasyon türleri uygulanabilmektedir. Ancak temel olarak sentez yoluna dayanarak iki nükleotit arasındaki yaygın bağ tipleri: fosfodiester

10 (PDE) bağlar ve fosforotiyoat (PTO) bağlardır. CpG ODN'nin stabilitesini ve immünostimülatör etkisini arttırmak için sentetik oligodeoksinükleotitlerin yapı blokları genellikle fosforotiyoatlarla donatılmaktadır, böylece bunlar PTO bağları oluşturmaktadır.

15 Ancak şaşırtıcı şekilde sadece $5' [G]_x$ ve $3' [G]_z$ nükleotitler PTO bağları aracılığıyla bağlandığında ve diğer nükleotitler PDE bağları aracılığıyla bağlandığında buluşa göre oligodeoksinükleotitlerin etkinliğinin ayrıca arttığı bulunmuştur. (Bu tür durumlarda $5' [G]_x$ ile $\{ T C G T C G \}_n T C G [G]_z 3'$ bağı bir PTO iken $5' [G]_z \{ T C G T C G \}_n T C G$ ile $[G]_z 3'$ bağı bir PDE'dir.)

20 Dolayısıyla tarifname, oligodeoksinükleotitleri açıklamakta olup, burada $5' [G]_x$ ve $3' [G]_z$ nükleotitler bir fosforotiyoat bağlanmasına sahiptir ve diğer nükleotitler bir fosfodiester bağlanmasına sahiptir.

25 Normalde CpG oligodeoksinükleotitler hem in vitro test sistemlerinde hem de in vivo nanomolar miktarlarda aktiftir.

Ancak şaşırtıcı şekilde buluşa göre CpG oligodeoksinükleotitler pikomolar (alt-nanomolar) miktarlarda bile aktiftir; bunların EC50'si 1 nM'nin altındadır.

30 Bir oligodeoksinükleotitin yarı-maksimal etkili konsantrasyonu (EC50) raportör hücrelerde (HEK293-pNifty2-tavukTLR21 veya HD11-pNifTy2Hyg) bir raportör enzim SEAP miktarını (405 nM'de absorbe edilen renkli ürünü üretmektedir) indüklemek için gerekli olan bir yarı-maksimal enzimatik reaksiyon oranını veren oligodeoksinükleotit

miktardır. Eğer bir oligodeoksinükleotidin EC50'si bu hücrelerde 1 nM'nin altında ise pikomolar (alt-nanomolar) miktarlarda aktif olarak değerlendirilmektedir.

5 Buluşa göre bir oligodeoksinükleotiti bir taşıyıcıya veya bir haptene bir reaktif kimyasal grup aracılığıyla bağlamak gayet mümkündür. Bu bağlantı kombine moleküllerin immünoestimülatör etkisini arttırmaktadır.

Bu tür bileşenlere ilişkin safi örnekler örneğin digoksinin, aminohegzil-, Teksas kırmızısı ve biotindir.

10

Tercih edilen taşıyıcılar veya haptener 3'- ve 5'-etiketli Teksas kırmızısı ve 5'-etiketli digoksinidir. Oligodeoksinükleotitlerin haptener/taşıyıcılara bağlantısı teknikte iyi bilinmektedir.

15

Buluşun başka bir düzenlemesi açıklandığı gibi bir immünoestimülatör metillenmemiş oligodeoksinükleotit içeren bir vektör içeren bir aşı ile ilgilidir. Bu tür bir vektör bir plazmid, bir virüs, bir bakteriyofaj gibi bir nükleik asit molekülü veya moleküler biyolojide kullanılan herhangi başka bir vektör olabilmektedir. Sadece bir örnek olarak bir immünoestimülatör metillenmemiş oligodeoksinükleotit içeren bir vektör örneğin, 20 buluşa göre bir immünoestimülatör metillenmemiş oligodeoksinükleotitin klonlanmış olduğu, bakteride çoğaltılabilen bir plazmid gibi bir DNA molekülü olabilmektedir. Bu tür bir plazmid tercihen konakta yüksek sayıda plazmidin bulunmasına neden olan bir aktif replikasyon orijinine sahiptir. Plazmidlerin izolasyonunu takiben bu tür bir bakteriyi yüksek oranda büyütme buluşa göre immünoestimülatör metillenmemiş 25 oligodeoksinükleotitin sentetik üretimi için bir alternatif sağlamaktadır.

30

Mevcut buluşun amaçlardan biri bir antijen bileşeni veya bir antijen bileşenini kodlayan genetik bilgi ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı ile birlikte bulaşıcı hastalığı engelleyen veya bununla savaşan başarılı immünoestimüle edici bileşenler olarak 30 kullanılabilen yeni CpG ODN'ler sağlamaktır.

Genelde antijen bileşeni terimi bir insan veya bir hayvana uygulandığı zaman bir immün tepkiyi indükleyebilen, stimüle edebilen veya arttırabilen en az bir epitop içeren ilgili bir bileşim anlamına gelmektedir.

Antijen bileşeni herhangi bir tür antijen bileşeni olabilmektedir ancak tercihen kendi doğal suş formunda insanlara veya hayvanlara karşı patojenik olan bir virüsten veya mikro-organizmadan türetilmektedir.

- 5 Antijen bileşeni tercihen inaktive edilmiş veya atenüe formda tam patojen veya bir patojen ekstraktı veya patojenin bir immünojenik proteindir.

Eğer antijen bileşeni patojenin bir immünojenik proteindir, bu immünojenik protein tercihen in vitro kültürlenmiş hücrelerde eksprese edilmekte veya bunlardan geri kazanılmaktadır.

Dolayısıyla buluş bulaşıcı hastalığı engellemeye veya bununla savaşmaya yönelik bir aşı olup, özelliği; söz konusu aşının buluşa göre bir immünoestimüle edici miktarda bir oligodeoksinükleotit ve/veya buluşa göre bir vektör, bir antijen bileşeninin immünojenik bir miktarını veya bir antijen bileşenini kodlayan genetik bilgiyi ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı içermesi ile karakterize edilmesidir.

Elbette oligodeoksinükleotiti immünoestimüle edici miktarı ve antijen bileşeninin immünojenik miktarı aralarında güçlü bir şekilde ilişkilidir. Mevcut buluşun yararlarından birisi mevcut buluşa göre oligodeoksinükleotitin bulaşıcı hastalığı engellemek veya bununla savaşmak için gerekli olan antijen bileşeni miktarını düşürebilmesidir.

Bulaşıcı hastalığı engellemek veya bununla savaşmak için gerekli olan antijen bileşeni miktarı antijen bileşeninin immünojenik miktarı olarak anılmaktadır.

25

Oligodeoksinükleotitin immünoestimüle edici bir miktarı antijen bileşeninin immünojenik miktarını, başka bir deyişle bulaşıcı bir hastalığı engellemek veya bununla savaşmak için gerekli olan antijen bileşeni miktarını azaltabilen miktardır.

30 Yani temel olarak "oligodeoksinükleotitin immünoestimüle edici miktarı" ve "immünojenik miktar" ifadeleri birbiriyle ilişkili görülmelidir.

Eğer aşı bir antijen bileşenini kodlayan genetik bilgiyi içeriyorsa bu genetik bilgi tarafından eksprese edilen antijen bileşeni miktarının bulaşıcı hastalığı engellemeye

veya bununla savaşmaya yeterli olması gerektiğini; başka bir deyişle bir immünojenik miktar olması gerektiğini belirtmeye gerek yoktur.

5 Buluşa göre metillenmemiş oligodeoksinükleotitlerin immünostimülatör olduğu gerçeği bunların aşılardaki antijen bileşenlerinin immünolojik etkinliğini arttırabildiği anlamına gelmektedir. Bu nedenden dolayı buluşa göre aşılarda birçok durumda buluşa göre oligodeoksinükleotitlerin bulunmadığı durumdakinden daha az antijen bileşeni veya antijen bileşenini kodlayan genetik bilgiyi içerecektir.

10 Bazı durumlarda bu şekildeki bir antijen bileşeni immünostimülatör oligodeoksinükleotitleri eklemeyen istenen immünojenik seviyeye ulaşamamasına rağmen her koşulda yüksek miktarların verilmesini gerektiren bu tür düşük immünojenik özelliklere sahip olabilmektedir. Ancak şimdi istenen immünojenite seviyesini elde etmek için bu tür durumlarda antijen bileşeni buluşa göre bir oligodeoksinükleotit ile
15 birlikte olağan yüksek konsantrasyonda verilebilmektedir.

Dolayısıyla buluşa göre bir oligonükleotit ile uygulanacak antijen bileşeninin veya antijen bileşenini kodlayan genetik bilginin miktarı pratik olarak oligonükleotitin yokluğunda verilen miktara eşit veya bu miktarın altında olmalıdır. Spesifik bir aşının
20 üretimine dahil olan uzman kişi bu spesifik aşının miktarını bilmelidir. Ayrıca Örnekler örneğin kullanılacak antijen bileşeninin miktarı için birçok kılavuz, örneğin üç farklı inaktive edilmiş viral aşığı vermektedir: Newcastle hastalığı virüsü aşısı, Bulaşıcı Bronşit virüsü aşısı ve Hindi Rhinotracheitis aşısı.

25 Antijen bileşeni veya antijen bileşenini kodlayan genetik bilgiyle birlikte uygulanması gereken, buluşa göre oligodeoksinükleotit miktarı hem seçilen oligodeoksinükleotide hem de antijen bileşenine dayanmaktadır.

30 Buluşa göre çok uygun bir oligodeoksinükleotit miktarı genel olarak 1 ve 100 nanomol arasında değişiklik göstermektedir. Çok iyi *in vivo* sonuçlar örneğin, buluşa göre 1-10 µg oligodeoksinükleotit ile elde edilmiş olup, burada nanomolar aralıkta *in vitro* testlerde 30 deoksinükleotitlik bir ortalama uzunluğun aktif olduğu gösterilmiştir.

Eğer bir oligodeoksinükleotit pikomolar aralıkta aktif olan oligodeoksinükleotitlerden
35 oluşan gruptan seçilirse uzman kişi 1 nanomolün altındaki, muhtemelen çok altındaki

miktarların, başka bir deyişle pikomolar miktarların nanomolar miktarları test etmeden önce test edilmeye değer olduğunu anlayacaktır.

5 Buluşa göre aşılar farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı içermektedir. Bu taşıyıcının doğası diğerlerinin yanında uygulama yoluna dayanmaktadır. Eğer uygulama yolu oral veya intranazal yol aracılığıyla ise taşıyıcı steril su, bir fizyolojik tuz solüsyonu veya bir tampon kadar basit olabilmektedir. Tercih edilen yol enjeksiyon ise taşıyıcı tercihen izotonik olmalıdır ve bunu enjeksiyon için uygun kılan pH kısıtlamalarına sahip olmalıdır. Ayrıca bu taşıyıcılar teknikte kapsamlı olarak
10 bilinmektedir.

Buluşa göre aşılar antijen bileşenine veya antijen bileşenini kodlayan genetik bilgiye ve buluşa göre bir oligodeoksinükleotide ek olarak bir adjuvan içermektedir. Adjuvanlar genel olarak konaktaki immün tepkiyi spesifik olmayan bir şekilde arttıran maddelerdir.

15 Freund tamamlanmış ve tamamlanmamış adjuvan, E vitamini, iyonik olmayan blok polimerler ve dekstran sülfat, karbopol ve piran gibi poli-anyonlar, alum hidroksit gibi birçok adjuvanın uygun olduğu bilinmektedir. Ayrıca alum fosfat, saponinler, tokoferol ve mineral yağlar gibi bitkisel yağlar sıklıkla kullanılmaktadır. Çok etkili adjuvanlar su
20 içinde yağ emülsiyonları ve özellikle ayrıca su içinde yağ adjuvanlar ve yağ içinde su adjuvanlar olarak bilinen su içinde yağ emülsiyonlarıdır. Bu emülsiyonlar teknikte iyi bilinmektedir. Dolayısıyla tercihen aşı bir yağ içinde su adjuvan içerir.

Tercihen antijen bileşeni kendi doğal suşu formunda kümes hayvanları için patojenik
25 olan bir virüs veya mikro-organizmadır veya bunlardan türetilmektedir.

Daha da tercihen söz konusu virüs veya mikro-organizma Bulaşıcı Bronşit virüsünden, Newcastle Hastalığı virüsünden, Bulaşıcı Bursal Hastalığından (Gumboro), Tavuk Anemi ajanından, Kuşlara ait Reovirüsten, *Mycoplasma gallisepticum*, Hindi
30 Rhinotracheitis virüsünden, *Haemophilus paragallinarum* (Coryza), Tavuk Poksvirüsten, Kuşlara ait Encephalomyelitis virüsünden, Egg Drop sendromu virüsü, Bulaşıcı Laryngotracheitis virüsünden, Hindi Herpes Virüsünden, Eimeria türlerinden, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma synoviae*, *Salmonella* türleri ve *Escherichia coli* den oluşan gruptan seçilir.

Tarifname ayrıca bir ilaç olarak kullanıma yönelik bir immünoestimülatör metillenmemiş oligodeoksinükleotit açıklamaktadır.

5 Mevcut buluş kümes hayvanlarında bulaşıcı hastalığı engellemekte veya bununla savaşmakta kullanıma yönelik bir immünoestimülatör metillenmemiş oligodeoksinükleotit içeren aşılarda ilgilidir.

10 Bu zamana kadar bütün tespit sistemleri hücrelerin raportör gen ile geçici transfeksiyonunu kullanmıştır. Bu geçici sistemler CpG ODN'lerin etkinliğinin güvenilir yan yana bir karşılaştırmasına olanak sağlamamaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi mevcut sistemler üzerindeki önemli bir gelişme raportör genini taşıyan plazmidin hücrelere dahil olması ve stabil korunmadır. Stabil plazmidin çeşitli hücre bölünme döngülerinden sonra hücrede mevcut kaldığı anlamına gelmektedir.

15 Sıklıkla bir plazmidde ilişkin stabil koruma hücrelerin bir direnç geninin plazmid üzerinde bulunduğu antibiyotikler gibi bir veya daha fazla seçici ajanın basıncı altında büyütülmesi vasıtasıyla elde edilmektedir. Plazmid kaybı daha sonra plazmid kaybeden hücrenin ölmesine neden olmaktadır. Geriye kalan yaşayabilir hücreler halen plazmid barındırmaktadır.

20 Stabil korumanın başka bir yolu lineer hale getirilmiş plazmidlerle transfeksiyondur. Bu plazmidler genel olarak hücrenin genomuyla entegre hale gelmekte ve dolayısıyla stabil olarak korunmaktadır. Dolayısıyla mevcut buluşun yine başka bir düzenlemesi bir TLR21-reseptörü ve bir NF-κB raportör genini kodlayan bir plazmid içeren bir hücre ile ilgili olup, burada plazmid hücre içinde stabil olarak korunmaktadır. Bu hücreler CpG moleküllerinin taranmasında, daha spesifik olarak buluşa göre CpG moleküllerinin taranmasında kullanım için çok uygundur.

30 Örnekler hücrede stabil olarak korunabilen bir raportör genini kodlayan bir plazmid içeren bu tür bir hücrenin nasıl elde edileceğine dair yeterli birçok kılavuz vermektedir.

Ayrıca yukarıda bahsedildiği gibi sekrete edilmiş alkalin fosfata (SEAO) dayalı tespit sistemlerinin kullanılan tespit sistemi için çok uygun olduğu gösterilmiştir.

35 Dolayısıyla tercihen raportör gen sekrete edilmiş alkalin fosfatı kodlayan bir gendir.

Temel olarak yukarıda açıklandığı gibi bir NF-κB raportör genini, tercihen SEAP genini taşıyan bir plazmidin dahil edilmesine ve tercihen stabil korunmasına olanak sağlayan bir TLR21'i taşıyan ve eksprese eden herhangi bir hücre veya hücre hattı TLR-21'e özgü CpG ODN'leri test etmek için uygundur.

5

TLR-21'e özgü CpG ODN'nin test edilmesi için uygun bu tür bir hücre hattına ilişkin tercih edilen bir örnek tavuk hücre hattı HD11'dir.

10 Dolayısıyla tercihen tespit sisteminde kullanıma yönelik bir hücre hattı bir raportör geni kodlayan bir stabil plazmid içeren bir HD11 hücre hattıdır.

HD11 hücre hattı gibi tavuk hücre hatları tavuk-TLR'sine ilişkin bir tam panel göstermektedir. Bu belirli koşullarda belirli bir arka plan aktivitesi oluşturabilmektedir.

15 Dolayısıyla kümes hayvanı olmayan memeli hücre hatları gibi hücre hatları daha çok tercih edilmektedir. Bu tür bir memeli hücre hattına ilişkin bir örnek TLR21'in klonlanmış olduğu bir HEK293 hücresidir. Bu tür bir hücre hattı TLR21 aktive edici sinyaller için daha spesifik olarak seçicidir.

20 Dolayısıyla daha çok tercihen tespit sisteminde kullanıma yönelik bir hücre hattı stabil olarak korunmuş bir raportör geni ve TLR21'in klonlanmış olduğu HEK293'ü içeren memeli hücre hattı HEK293'tür.

25 Tarifname ayrıca immünoestimülatör oligodeoksinükleotitleri tespit etmeye yönelik bir yöntem açıklamakta olup, burada bu yöntem a) bir oligodeoksinükleotitin buluşa göre bir hücreyle temas ettirilmesini, b) raportör genin ürün seviyesinin tespit edilmesini içermektedir.

30 Bu yöntemin tercih edilen bir formunda raportör genin ürünü SEAP'tır.

30

Bu yöntemin daha da tercih edilen bir formu immünoestimülatör oligodeoksinükleotitlerin tespitine yönelik bir yöntemle ilgili olup, burada hücre tavuk hücre hattı HD11'in bir hücresi veya tavuk TLR21'inin klonlanmış olduğu bir HEK293 hücre hattının bir hücresidir.

35

Örnekler

Örnek 1:

5 Tavuk TLR21'in gen klonlaması ve heterolog ekspresyonu

Tavuk TLR araştırmalarında son dönem ilerlemeleri TLR21'in kuş türlerinde memeli TLR9'un fonksiyonel homoloğu olduğunu önermektedir (Keestra 2008, Brownlie et al., 2009).

10

TLR21 gen klonlamasının taslağı

Gen bankası veri tabanı dizisi NM_001030558'e bağlı olarak bir primer çifti tavuk TLR21 geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonuna yönelik sentezlenmiştir:

15

Ga-TLR21-for1

GAAGCTTACCATGATGGAGACAGCGGAGAAGGC

Ga-TLR21-rev1

20 GGCGGCCGCTACATCTGTTTGTCTCCTTCCCTG

Primerler kodonları (koyu renk) başlatmak ve bitirmek için bitişik kısıtlama klonlama alanları (altı çizili) ve bir Kozak dizisi (italik) sağlamak üzere tasarlanmıştır. RT-PCR bir şablon olarak tavuk dalak toplam RNA'sı ve bu primerler kullanılarak gerçekeştirilmiştir. Beklenen büyüklükte (~ 3000 bp) bir PCR ürünü pCR2.1-Topo'ya klonlandı ve 5 plazmid klon (PI, P2, P12, P13, P14) dizilimi yapılmıştır.

25

Kullanıldığı şekilde, tavuk TLR21'ine ilişkin DNA dizisi.

İnsan embriyonik böbrek (HEK) hücreleri 293 viral transformasyon aracılığıyla 1970'lerde oluşturulmuştur (Graham et al., 1977) ve şimdi ATCC gibi hücre hattı havuzları aracılığıyla araştırma topluluğu için bulunmaktadır.

- 5 pNifty2 birçok immünohistimülasyon etkiye ilişkin bir ayırıcı özellik olan, NFκB transkripsiyon faktör aktivasyonunun, diğerlerinin arasından toll-benzeri reseptör aktivasyonlarının tespitine olanak sağlayan bir plazmidir. pNifty2'de NFκB üzerindeki kendi transkripsiyonuna/çevrimine bağlı raportör gen sekrete edilmiş alkalik fosfatazdır (SEAP). Detaylar bu plazmide satan şirketin veri föyünde açıklanmaktadır: InvivoGen.
- 10 pNifty2 aracılığıyla transformasyon/transfeksiyon olayları büyüme ortamına zeokinin eklenmesi vasıtasıyla hem bakteri hem de memeli hücrelerinde seçilmektedir.

- HEK293 hücreleri standart yöntemler (lipofeksiyon) aracılığıyla pNifty2 ile transfekte edilmiştir, stabil bir hücre hattı seçilmiştir, NF-κB/SEAP ekseninin işlevselliği insan
- 15 tümör nekroz faktörü α'nın (Sigma) stimülasyonu vasıtasıyla oluşturulmuştur. Stimüle edilmiş hücrelerin kültür süpernatantındaki sekrete edilmiş SEAP bir alkalik tampon (50 mM NaHCO₃, pH9.6, 2 mM MgCl₂) içinde kromojenik substrat p-nitrofenilfosfat kullanan bir mikrotitre plaka kolorimetrik analiz vasıtasıyla belirlenmiştir. Renk gelişimi (λ = 405 nm) bir mikrotitre plaka okuyucu vasıtasıyla gözlemlenmiştir. Bu okuma ayrıca klonal
- 20 hatların gürültü oranlarına karşı yüksek sinyal ile seçilmesi (kısıtlı dilüsyon yöntemi vasıtasıyla) için kullanılmıştır. Bu seçilen klonların biri (dublaj klon 11) daha sonra tavuk TLR21 ile başka çalışmalara yönelik kullanılmıştır.

- pcDNA3.1(+)-neo Invitrogen'den satın alınan standart bir memeli ekspresyon
- 25 vektörüdür. TavukTLR21 geninin bu vektöre alt klonlanması PCR vasıtasıyla dahi edilen bitişik Hind III (başlangıç kodonu) ve Not I (bitiş kodonu) alanları aracılığıyla yapılmıştır. (Bakınız, şekil 1).

- Bu plazmid daha sonra klonal HEK293-pNifty2-zeo hattına transfekte edilmiştir ve
- 30 rekombinant hücreler hem zeokininin hem de G418'in büyüme ortamı içine eklenmesi vasıtasıyla seçilmiştir. Meydana gelen poliklonal rekombinant hücre hattının işlevselliği kültürün ODN-X4 ve ODN-HEK1-PTO ile stimülasyonu ve SEAP tespiti vasıtasıyla değerlendirilmiştir. Daha üstün klonal hücre hatları daha sonra kısıtlı dilüsyon yönteminin ardından stimülasyon ve SEAP tespiti vasıtasıyla tanımlanmıştır.

SEAP memeli sistemlerindeki bir raportör enzimdir (Yang et al., 1997). SEAP insan embriyonik alkalın fosfatazın sekrete edilmiş bir formudur. Esas avantajları tespitinin hassasiyetini ve sağlamlığını sağlayan yüksek stabilite ve son derece yüksek spesifik aktivitedir. SEAP tespiti için çeşitli substratlar açıklanmıştır ancak reaksiyon ürünü p-nitrofenolatın yüksek hassasiyette ($\epsilon_{405} = 18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tespit edilmesinden dolayı ekonomik ve sağlam pNPP seçilmiştir. Test düzeneklerimizde kinetik analizler gerçekleştirilmekteyiz çünkü bunlar daha geniş bir dinamik niceliklendirme aralığı sağlamaktadır.

- 10 HEK293-pNifTy2-Zeo hücreleri pcDNA3 ile transfekte edilmiştir. 1(+)-Neo-chiTLR21 (Pvu I ile lineer hale getirilmiştir) ve bir poliklonal hücre hattı ortamın 350 $\mu\text{g/ml}$ zeokin ve 600 $\mu\text{g/ml}$ G418 ile desteklenmesi vasıtasıyla seçilmiştir. Hücrelerin ODN-X4 (PDE) ile ve ODN-HEK1 (PTO) ile stimüle edilmesi vasıtasıyla bir işlevsellik testi gerçekleştirilmiştir. Sekrete edilmiş alkalın fosfataz (SEAP) parental HEK293-pNifTy2-Zeo hücre hattı vasıtasıyla değil de seçilen hücreler vasıtasıyla üretilmiştir. Tekli hücre klonlama gerçekleştirilmiştir ve münferit klonlar ODN-X4'e (PDE) (GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG) ve ODN-HEK1'e (PTO) (TCGTCGTTTTGTCGTTTGTTCGTT) karşı yanıt vermelerine yönelik analiz edilmiştir.
- 15
- 20 46 zeo/G418-çift-dirençli klonal hücre hattından sadece 3'ü ODN stimülisine karşı yanıt verirken 3 - 4 başka hücre hattı daha zayıf sinyaller göstermiştir. Dolayısıyla seçilen klonların %85'i bu işlevsel değildir.

Bütün diğer çalışmalar için ODN-X4 (PDE) ve ODN-HEK1'e (PTO) stimülasyonuna karşı yanıt üzerine uzak ara en yüksek SEAP okuma sinyali ile üretilen klonal hücre hattı 38 kullanılmıştır.

25

Şekiller 2-5 çeşitli zeo/G418-çift-dirençli klonal hücre hattının SEAP aktivitesine ilişkin bir özet vermektedir.

30

Örnek 2:

$5' [\text{G}]_x \{ \text{T C G T C G} \}_n \text{T C G} [\text{G}]_z 3'$ motifine bağlı bu homopolimer serisinde 3'-dG turu test edilen bütün ODN'ler için bir G'ye kısaltılmıştır.

35

Şaşırtıcı şekilde Şekil 6'dan eğer $n = 3$ ise immüno-stimülatör etkinin beklenmedik şekilde yüksek olduğu çikartılabilmektedir. Bu etki Şekil 9'da beklenmedik şekilde düşük bir EC_{50} değeri şeklinde açıkça niceliklendirilmektedir.

- 5 Bunun ötesinde Şekiller 6-8'den $n=3$ 'ten $n=13$ 'e bir artışın aktivitede ayrıca bir artış da (= EC_{50} 'de bir azalma) verdiği çikartılabilmektedir. Bu artış $n = 5$ değerine eriştiğinde daha da hızlı bir düşüş göstermektedir.

Şekil 9, X23 - 4 ila X23N - 27'nin pikomol cinsinden EC_{50} değerini göstermektedir.

10

Şekil 9'dan görülebildiği üzere $n=10$ ve üstünde bir değerde EC_{50} değeri 100 pM'in biraz altında bir düzlüğe erişirken halihazırda $n=4$ 'lük bir değerde EC_{50} 'nin 200 pM'nin sadece biraz üstünde olduğu görülebilmektedir.

15 **Örnek 3:**

$5' [G]_x \{ T C G T C G \}_n T C G [G]_z 3'$ motifine bağlı bu homopolimer dizilerinde $n = 4$ iken 3'-G'lerin sayısı modifiye edilmiştir.

Aşağıdaki yapılar test edilmiştir:

20 X23-six 5'-GGGGGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGGGGG-3'

(=X23, standart 1)

X4-pent 5'-GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG-3'

(= standart 2)

X23-nine-3455 5'-GGGGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGGGGG-3'

25 ($\rightarrow n=4, x=5, z=4$)

X23-nine-3451 5'-GGGGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG-3'

($\rightarrow n=4, x=5, z=0$)

30 Şekil 10, raportör hücreler HEK293-pNifty2-tavukTLR21'indeki raportör enzim SEAP'ın 405 nm'de abzorbe edilen bir renkli ürün miktarını indüklemeye 3'-G'lerin sayısının değiştirilmesinin etkisini göstermektedir.

Bu CpG motiflerine yönelik aşağıdaki EC_{50} gibidir:

X4-pent (standart kontrol)

340 pM

X23-nine-3455 (n=4, x=5, z=4)	100 pM
X23-nine-3451 (n=4, x=5, z=0)	<< 100 pM

Buradan EC₅₀ ile ilişkili olarak z=4 veya 4'ten az olması koşuluyla 3'-G'lerin sayısının özellikle ilgili olmadığı çikartılabilmektedir.

5 Şekillerin açıklaması:

Şekil 1: pcDNA3.1(+)-chiTLR21'in plazmid haritası

10 Şekiller 2-5: çeşitli zeo/G418-çift-dirençli klonal hücre hattının SEAP aktivitesine ilişkin özet.

Şekiller 6-8: bu şekiller X23 - 4 ila 3N - 27'nin raportör hücrelerin HEK293-pNifty2-tavukTLR21'indeki raportör enzim SEAP'ın 405 nm'de absorbe edilen bir renkli ürün miktarını indüklemedeki etkisini göstermektedir.

15

Şekil 9: bu şekil X23 - 4 ila X23N - 27'nin pikomol cinsinden EC₅₀ değerini göstermektedir.

20 Şekil 10: bu şekil X4-pent (standart kontrol), X23-six, X23- nine-3455 ve X23-nine-3451'in EC₅₀ değerlerini göstermektedir.

Literatür Referansları

25 Babiuk L.A., Gomis S., Hecker R., 2003. Molecular approaches to disease control. Poultry Sci. 82, 870-875.

Brownlie, R., Zhu J., Allan B., Mutwiri G.K., Babiuk L.A., Potter A., Griebel P., 2009. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. Mol. Immunol. 46, 3163-3170

30 Carrington A.C., Secombes C.J., 2006. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. Vet. Immunol. Immunopathol. 112, 87-101.

Daubenberger C.A., 2007. TLR9 agonists as adjuvants for prophylactic and therapeutic vaccines. Curr. Opin. Mol. Ther. 9, 45-52.

- Dorn A., Kippenberger S., 2008. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 10-20.
- Fonseca D.E., Kline J.N., 2009. Use of CpG oligodeoxynucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 256-262.
- 5 Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Griebel P.J., Brownlie R., Manuja A., Nichani A., Mookherjee N., Popowych Y., Mutwiri G., Hecker R., Babiuk L.A., 2005. Bovine toll-like receptor 9: a comparative analysis of molecular structure, function and expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 11-16.
- 10 Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. 2010. *Science* 327, 291-295.
- 15 Keestra A.M., 2008. Molecular dissection of the chicken Toll-like receptor repertoire. PhD thesis (Proefschrift), University of Utrecht, The Netherlands
- Kline J.N., 2007. Immunotherapy of asthma using CpG oligodeoxynucleotides. *Immunol. Res.* 39, 279-286.
- Kline J.N., Krieg A.M., 2008. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect.* 21, 434-439.
- 20 Klinman D.M., 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 249-258.
- Klinman D.M, Currie D., Gursel I., Verthelyi D., 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* 199, 201-216.
- 25 Klinman D.M., 2006. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* 25, 135-154.
- Klinman D.M., Klaschik S., Sato T., Tross D., 2009. CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 248-255.
- 30 Kindrachuk J., Potter J., Wilson H.L., Griebel P., Babiuk L.A., Napper S., 2008. Activation and regulation of toll-like receptor 9: CpGs and beyond. *Mini Rev. Med. Chem.* 8, 590-600.
- Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- 35

- Krieg A.M., 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20,709-760.
- Krieg A.M., 2003. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat. Med.* 9, 831-835.
- 5 Krieg A.M., 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 471-484.
- Krieg A.M., 2007a. Anti-infective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 289-294.
- Krieg A.M., 2007b. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.*
 10 117, 1184-1194.
- Linghua Zhang et al., 2007. Vaccination with Newcastle disease vaccine and CpG oligodeoxynucleotides induces specific immunity and protection against Newcastle disease virus in SPF chicken. *Vet. Immun. And Immunopath.* 115, 216-222.
- Medzhitov R., 2001. CpG DNA: security code for host defense. *Nat. Immunol.* 2, 15-16.
- 15 Medzhitov R., Approaching the asymptote: 20 years later. 2009. *Immunity* 30, 766-775)
- Mutwiri G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A., 2009. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 226-232.
- Mutwiri G., Pontarollo R., Babiuk S., Griebel P., van Drunen Littel-van den Hurk S.,
 20 Mena A., Tsang C., Alcon V., Nichani A., Ioannou X., Gomis S., Townsend H., Hecker R., Potter A., Babiuk L.A., 2003. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 89-103.
- Schindler, U., and Baichwal, V.R., 1994. *Moll. Cell. Biol.* 14: 5820-5831.
- Singh M., O'Hagan D.T., 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J.*
 25 *Parasitol.* 33, 469-478.
- Vollmer J., 2005. Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 673-682.
- Vollmer J., Krieg A.M., 2009. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 195-204.
- 30 Wagner H., 2009. The immunogenicity of CpG-antigen conjugates. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 61, 243-247.
- Weiner G.J., 2009. CpG oligodeoxynucleotide-based therapy of lymphoid malignancies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 263-267.
- Werling D., Jungi T.W., 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune
 35 response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 1-12.

Wilson H.L., Dar A., Napper S.K., Marianela Lopez A., Babiuk L.A., Mutwiri G.K., 2006. Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* 25, 183-213.

Wilson K.D., de Jong S.D., Tam Y.K., 2009. Lipid-based delivery of CpG oligodeoxynucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 233-242.

Yang, T.T., Sinai, P., Kitts, P.A., Kain, S.R., 1997. Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechniques* 23, 1110-1114.

10 **DİZİ LİSTESİ**

<110> Intervet International BV

<120> İmmünostimülatör oligodeoksinükleotitler

<130> 2011.014

15 <160> 19

<170> PatentIn versiyonu 3.5

<210> 1

< 211> 33

< 212> DNA

20 < 213> sentetik DNA

<400> 1

gaagcttacc atgatggaga cagcggagaa ggc 33

<210> 2

< 211> 33

25 < 212> DNA

< 213> sentetik DNA

<400> 2

ggcggcgcgt acatctgttt gtctcctcc ctg 33

<210> 3

30 < 211> 2935

< 212> DNA

< 213> sentetik DNA

<400> 3

aagcttacca	tgatggagac	agcggagaag	gcatggccca	gcaccaggat	gtgccctcc	60
cactgctgtc	cactctggct	gctgctgctg	gtgacagtga	cactgatgcc	gatggtgcac	120
ccgtatggct	ttcgcaactg	cattgaggat	gtcaaggcac	ctttgtactt	ccgctgcac	180
cagcgcttcc	tgcagtcgcc	ggccctggca	gtgtctgacc	tgccaccaca	tgccatcgcg	240
ctcaatctgt	catacaaaa	aatgcgctgc	ctgcagccct	ctgcctttgc	ccacctgaca	300
cagctgcata	ccctggacct	gacctacaac	ctctggaga	ccctctcccc	tggtgccttc	360
aatgggctgg	gtgtgctggt	ggtgctggac	ctgtctcaca	acaagctgac	cacacttgct	420
gaaggggtgt	tcaacagctt	gggcaacctg	tctctgctgc	aggtacaaca	taacccccctc	480
agcacggtgt	caccaagtgc	tctgctacct	ctggtcaacc	tgccgccct	gtctctacgg	540
ggcggggcgc	tgaatgggtt	gggggcagtg	gcagtggcag	tgccagggctt	ggcacagctg	600
gagctggtgg	acctatgtga	aaacaacctg	acaacgctgg	ggccaggccc	accgctacct	660
gcctcgctgc	tcacctgca	gctgtgcaac	aactcgctga	gggagttagc	ggggggcagc	720
ccggagatgc	tatggcacgt	gaagatactc	gacctctcct	acaacagtat	ctcacaggcg	780
gaggtcttca	cccagctcca	cctgcgcaac	atcagcctgc	tccacctgat	cggcaacccc	840

ttggatgtct	tccacctgtt	ggacatctct	gacatccaac	ctcgcagcct	ggatttctct	900
gggttgggtgc	tgggggctca	ggggctggat	aaggtgtgcc	tgaggctgca	gggtccccag	960
gccttgccggc	ggctgcagct	acaacgcaac	gggctgaagg	tgctgcattg	taatgcactg	1020
cagttgtgtc	ctgtgctgag	agagctggac	ctgtcctgga	accggctaca	gcacgtgggc	1080
tgtgccggcc	ggctgctggg	caagaagcag	cgggagaagc	tggaagtgct	gacagtggaa	1140
cacaacctgc	tgaagaaact	gccgtcttgc	ctgggggccc	aggtgctgcc	tcggctgtac	1200
aacatttctc	tccgctttaa	ccgcatcctg	actggtgggc	ccaagcctt	tgctacgcc	1260
ccggccctgc	aggtgttgtg	gctcaatatt	aacagcctgg	tgtggctgga	caggcaggca	1320
ctgtggaggc	tgcaaacct	gacagagctg	cgcttgaca	acaacctgct	gaccgacctc	1380
tatcacaact	ccttcattga	cctccacaga	ctgcgcaccc	tcaacctgcg	caacaaccgt	1440
gtctccgtcc	tcttctctgg	tgtcttccag	gggctggctg	agctgcagac	gctggattta	1500
gggggcaaca	acttgcccca	cctgactgca	cagtcactgc	aggggctgcc	caaactgcgc	1560
aggctgtacc	tggaccgcaa	cagattgctg	gaggtgagca	gcactgtgtt	cgccccagtg	1620
caggctaccc	tgggggtgct	ggacctgccc	gccacaacc	tgcaatcat	ctcacagtgg	1680
ctgcgcaagc	cgccaccctt	ccgcaacctg	agcagcctgt	acgacctgaa	gctgcaggcg	1740
cagcagccct	atggactgaa	gatgctgcct	cactacttct	tccagggctt	ggtgaggctg	1800
cagcagctgt	cgctgtcaca	gaacatgctg	cggtccatcc	caccggatgt	cttogaggac	1860
ttgggcccagc	tgcgtccct	ggcattggct	gacagcagca	atgggctgca	tgacctgcct	1920
gacggcatct	tcagaaacct	gggcaacctg	cggttccctg	acctggagaa	tgcaaggctg	1980
cactcgctca	ctctggaagt	cttcggcaat	ctcagccggc	tgcaagtgt	gcacttggcc	2040
agaaacgagc	tgaagacctt	caatgacagc	gttgccagcc	ggctgtcctc	cttgcgctac	2100
ctggacctgc	gcaagtgtcc	gctcagctgc	acctgtgaca	acatgtggct	gcagggctgg	2160
ctgaacaaca	gccgtgtgca	ggttgtctac	ccctacaact	acacctgtgg	ctcacagcac	2220
aatgcctaca	tccacagctt	tgacacacac	gtctgcttcc	tggacctggg	gctctatctc	2280
tttgctggga	ctgcaccggc	agtgtgtgtg	ctgtgtgtgg	tgccggtgg	gtaccaccgc	2340
gcctactgga	ggctgaagta	ccactggtac	cttctgcgg	gctgggtcaa	ccagcgggtg	2400
cggcgggagg	aaaagtgtca	cctctatgac	agctttgtgt	cctacaattc	agctgatgaa	2460
agttgggtgt	tgcaagaagt	ggtgctgag	ctggagcacg	gtgccttccg	cctctgcttg	2520
caccaccgcg	acttccagcc	gggccgcagc	atcattgaca	acattgtgga	tgctgtctac	2580
aacagccgga	agacggtgtg	cgtggtgagc	cgcagctacc	tgccgagcga	gtggtgctct	2640
ctagagggtgc	agttggccag	ctaccggctg	ttggatgagc	ggcgtgacat	cctggctactg	2700

gtgctgctgg aggacgtggg tgatgctgag ctgtctgcct accaccgcat ggggagggtg 2760
 ctgctgcggc gcacctacct gcgctggcct cttgaccccg cagctcagcc gctcttttgg 2820
 gcacggctga agagggcact gaggtgggga gaggaggag aggaggagga agaagaaggt 2880
 ttgggtggag ggacgggaag gcccaggga ggagacaaac agatgtagcg gccgc 2935

<210> 4
 < 211> 22
 < 212> DNA
 5 < 213> sentetik DNA
 <400> 4
 gggggggtcg tcgtcgtcgt cg 22
 <210> 5
 < 211> 28
 10 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 <400> 5
 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcgtcg 28
 <210> 6
 15 < 211> 34
 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 <400> 6
 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcg 34
 20 <210> 7
 < 211> 40
 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 <400> 7
 25 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcgtcgtcg 40
 <210> 8
 < 211> 46
 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 30 <400> 8
 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcgtcgtcg tcgtcg 46

<210> 9
 < 211> 52
 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 5 <400> 9
 gggggggtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc gtcgtcgtcg tcgctgctgt cg 52
 <210> 10
 < 211> 58
 < 212> DNA
 10 < 213> sentetik DNA
 <400> 10
 gggggggtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc gtcgtcgtcg tcgctgctgt cgtcgtcg 58
 <210> 11
 < 211> 64
 15 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 <400> 11
 gggggggtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc gtcgtcgtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc 60
 gtcg 64
 <210> 12
 20 < 211> 70
 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 <400> 12
 gggggggtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc gtcgtcgtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc 60
 gtcgtcgtcg 70
 25 <210> 13
 < 211> 76
 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 30 <400> 13
 gggggggtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc gtcgtcgtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc 60
 gtcgtcgtcg tcgctg 76

<210> 14
 < 211> 82
 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 5 <400> 14

 gggggggtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc gtcgctgctg tcgctgctgt cgtcgtcgtc 60
 gtcgctgctg tcgctgctgt cg 82

 <210> 15
 < 211> 88
 10 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 <400> 15

 gggggggtcg tcgctgctgt cgtcgtcgtc gtcgctgctg tcgctgctgt cgtcgtcgtc 60
 gtcgctgctg tcgctgctgt cgtcgtcgtc 88

 15
 <210> 16
 < 211> 28
 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 20 <400> 16
 ggggggtcgt cgtcgtcgtc gtcggggg 28
 <210> 17
 < 211> 41
 < 212> DNA
 25 < 213> sentetik DNA
 <400> 17
 ggggggttcg ttttctttt cgttttctt ttcgtgggg g 41
 <210> 18
 < 211> 36
 30 < 212> DNA
 < 213> sentetik DNA
 <400> 18
 gggggctcgtc gtcgctgctg tcgctgctgt cggggg 36

<210> 19

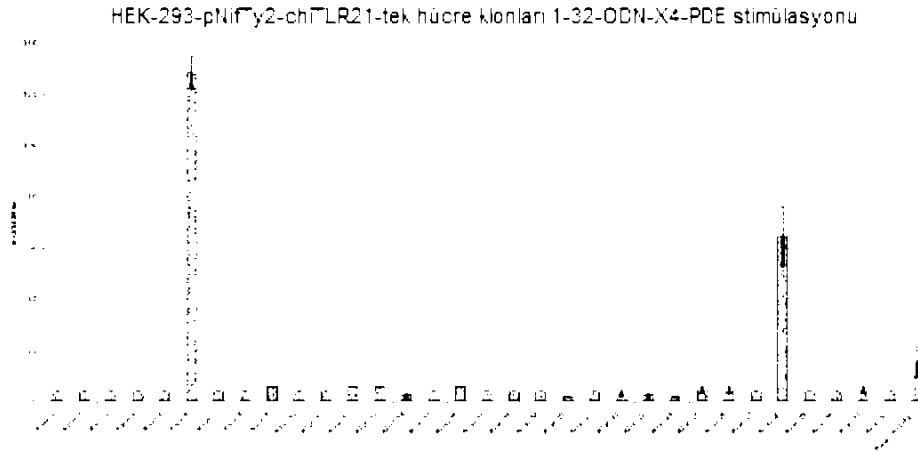
< 211> 32

< 212> DNA

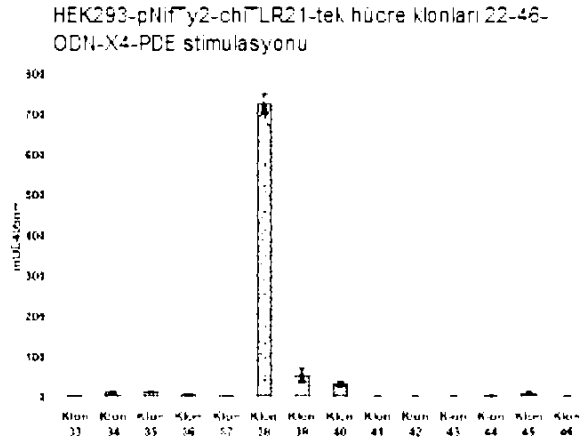
< 213> sentetik DNA

5 <400> 19

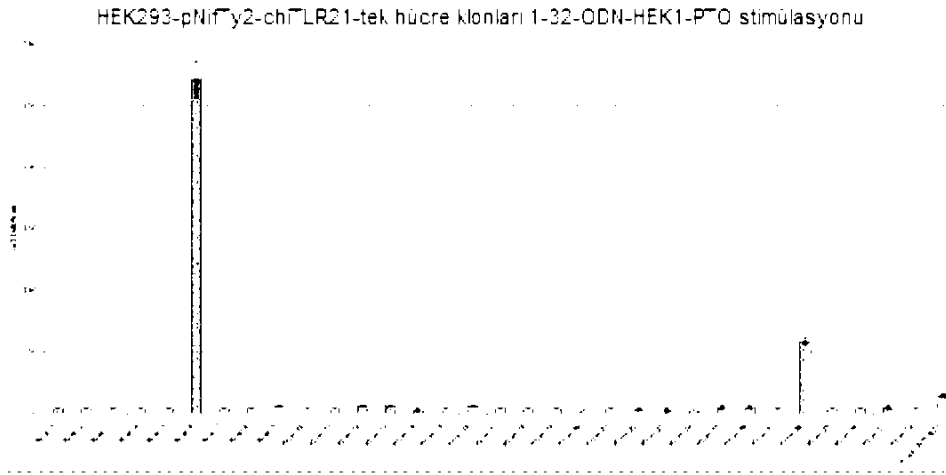
gggggtcgtc gtcgtcgtcg tcgtcgtcgt cg 32



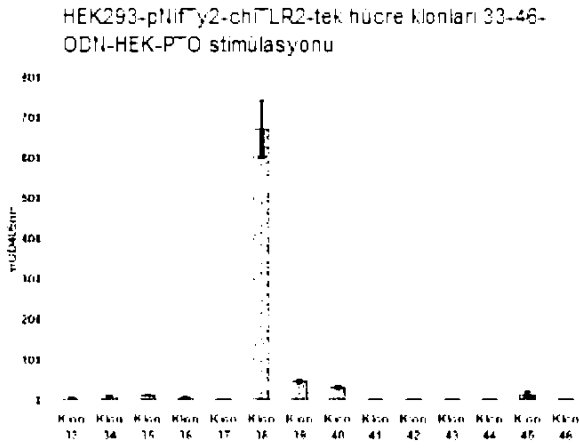
Şekil 2



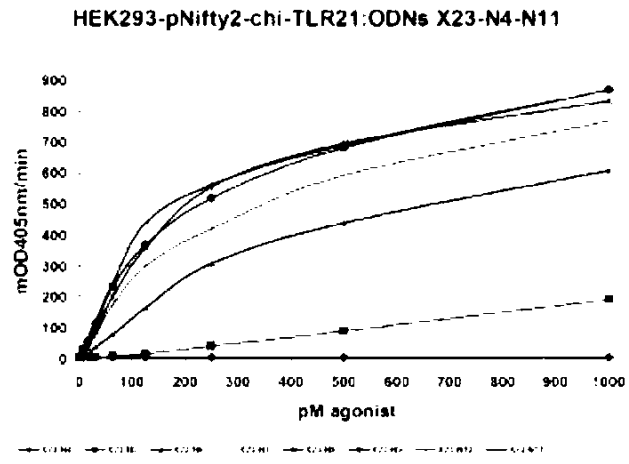
Şekil 3



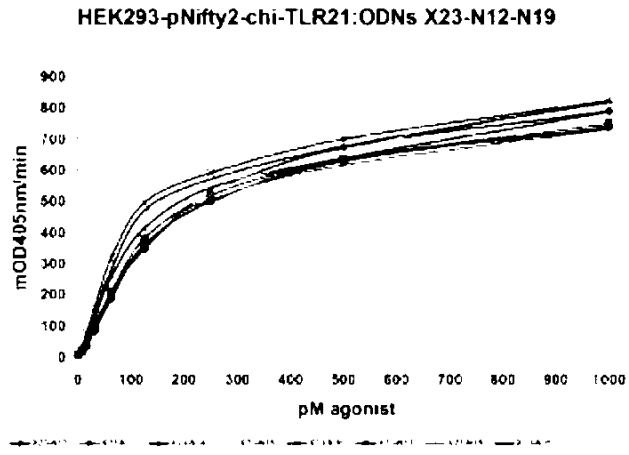
Şekil 4



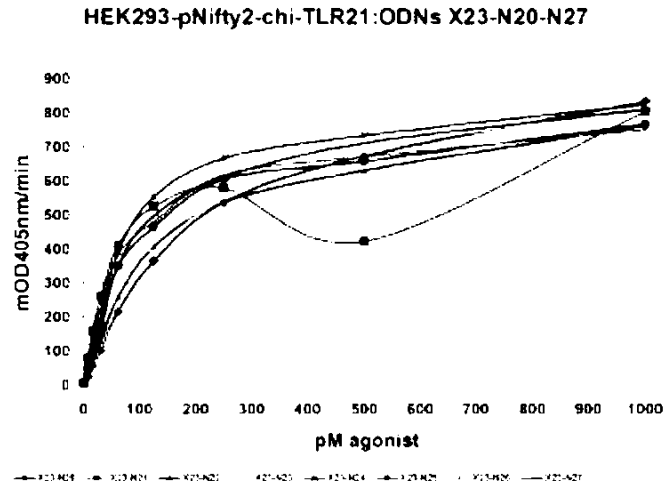
Şekil 5



Şekil 6

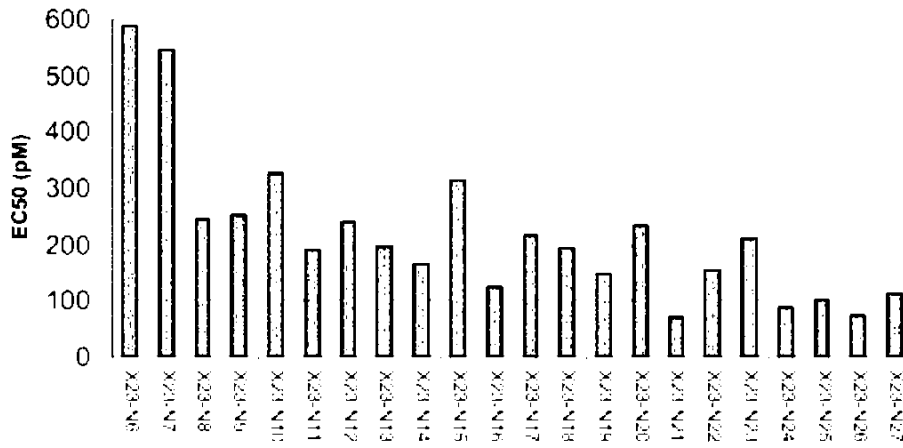


Şekil 7

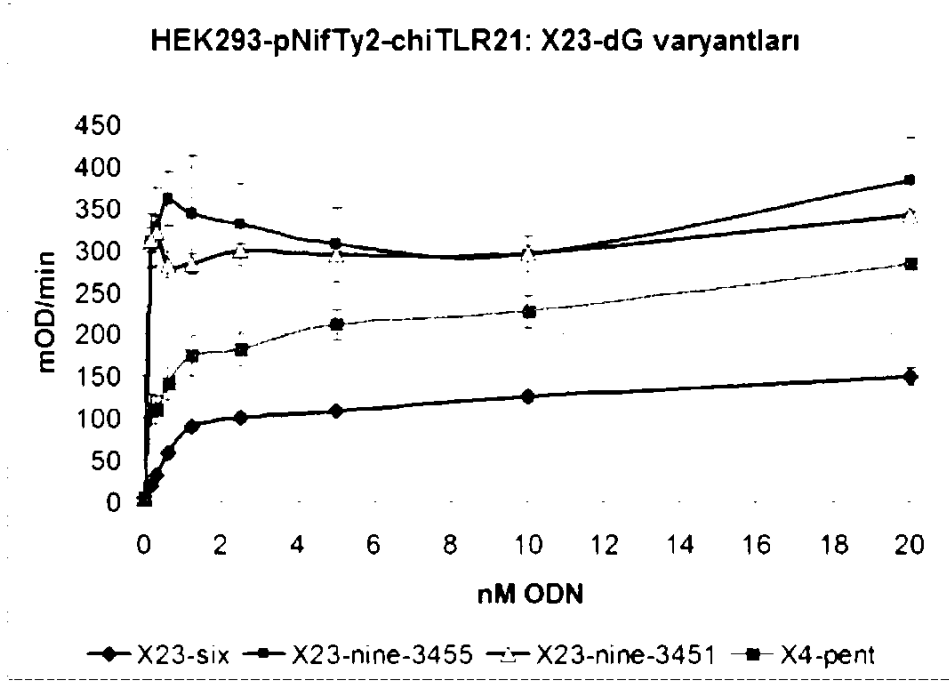


Şekil 8

X23-N6-N27, EC50 değerleri



Şekil 9



Şekil 10