

ÖZET**GELİŞTİRİLMİŞ ANTI-IL-23P19 ANTİKORLARI**

İnsan IL-23p19'a karşı geliştirilen antikorlar ve bunların, örneğin inflamatuvar, otoimmün
5 ve proliferatif hastalıkların tedavisindeki kullanımları sağlanır.

İSTEMLER

1. SEQ ID NO: 47'nin K20, T23, W26, S27, P30, E82, S95, L96, L97, P98, D99, P101, G103, Q104, H106, A107 ve L110 kalıntılarını içeren bir epitopta insan IL-232üne bağlanan bir antikor veya antijen bağlayıcı parçası olup, özelliği söz konusu antikor veya antijen bağlayıcı parçanın aşağıdakileri içermesidir:
 - (a) CDRL1, CDRL2 ve CDRL3'ü içeren hafif zincir değişken alanı veya antijen bağlayıcı parçası, burada

CDRL1, SEQ ID NO: 36 dizisini veya bir varyantını içerir;

CDRL2, SEQ ID NO: 41 dizisini veya bir varyantını içerir; ve

CDRL3, SEQ ID NO: 46 dizisini veya bir varyantını içerir;

Burada her varyant, bire kadar çıkabilen sayıda konservatif olarak modifiye edilmiş amino asit ornatımını içerir;

ve
 - (b) CDRH1, CDRH2 ve CDRH3'ü içeren ağır zincir değişken alanı veya antijen bağlayıcı parçası, burada:

CDRH1, SEQ ID NO: 19 dizisini veya bir varyantını içerir;

CDRH2, SEQ ID NO: 25 dizisini içerir; ve

CDRH3, SEQ ID NO: 31 dizisini veya bir varyantını içerir;

Burada her varyant, bire kadar çıkabilen sayıda konservatif olarak modifiye edilmiş amino asit ornatımını içerir.
2. Ayrıca γ 1 veya γ 4 insan ağır zincir sabit alanını veya bir varyantını içeren ağır zincir sabit alanını içeren İstem 1'e göre bir antikor veya antijen bağlayıcı parçası olup, özelliği sabit alan varyantının, 20'ye kadar çıkabilen sayıda konservatif olarak modifiye edilmiş amino asit ornatımlarını içermesidir.
3. İstem 1 veya İstem 2'ye göre bir antikor veya antijen bağlayıcı parçası olup, özelliği antikor veya antijen bağlayıcı parçasının, Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ ve bir çift antikordan oluşan gruptan seçilen bir antikor parçası olmasıdır.

4. İstem 1'deki antikorun veya antijen bağlayıcı parçasının hafif zincir değişken alanını ve ağır zincir değişken alanını kodlayan izole bir nükleik asittir.
5. Konakçı hücre vektör ile transfeke edildiğinde konakçı hücre tarafından tanınan kontrol dizilerine işlevsel olarak bağlı olan İstem 4'teki nükleik asidi içeren bir ifade vektörüdür.
6. Aşağıdaki adımları içeren bir polipeptidi üretme yöntemidir:
 - 10 İstem 5'teki ifade vektörünü içeren konakçı hücrenin, kültür ortamında nükleik asit dizisinin ifade edildiği koşullar altında kültürlenmesi, böylelikle hafif ve ağır zincir değişken alanlarını içeren polipeptitlerin üretilmesi; ve polipeptitlerin, konakçı hücre veya kültür ortamından geri kazanılması.
 - 15 7. Farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı veya seyreltici ile kombinasyon halinde İstemler 1 ila 3'ten herhangi birindeki antikor veya antijen bağlayıcı parçasını içeren farmasötik bir bileşimdir.
 - 20 8. İlaç olarak kullanılmaya yönelik İstemler 1 ila 3'ten herhangi birindeki antikor veya antijen bağlayıcı parçasıdır.
 - 25 9. İnsan denekte bağışıklık tepkisinin baskılanmasında kullanılmaya yönelik İstemler 1 ila 3'ten herhangi birindeki antikor veya antijen bağlayıcı parçası olup, özelliği bağışıklık tepkisinin, inflamatuvar bir tepki veya otoimmün bir tepki olmasıdır.
 - 30 10. İstem 9'a göre kullanıma yönelik antikor veya antikor veya antikor bağlayıcı parçası olup, özelliği artrit, sedef, inflamatuvar bağırsak hastalığı, multipl skleroz, sistemik lupus eritematozus, diyabet ve kanserden oluşan gruptan seçilen bir bozukluğun tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.

TARİFNAME

GELİŞTİRİLMİŞ ANTI-IL-23P19 ANTİKORLARI

Mevcut tarifname genel olarak istemlerde tanımlandığı üzere interlökin-23 p 19 (IL-23p19)-özellikli antikorlar ve bunların kullanımı ile ilgilidir. Daha belirgin bir biçimde, bu buluş, istemlerde tanımlandığı üzere insan IL-23p19'u tanıyan ve özellikle de inflamatuvar, otoimmün ve proliferatif bozukluklarda olmak üzere onun etkinliğini modüle edebilen hümanize antikorlarla ilgilidir.

Bağışıklık sistemi, bireyleri bakteri, çok hücreli organizmalar ve virüsler gibi zararlı etmenlerden, aynı zamanda kanserden koruma işlevini görmektedir. Bu sistem, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler (DCler), eozinofil, T hücreleri, B hücreleri ve nötrofiller gibi çeşitli tiplerdeki lenfoid ve miyeloid hücrelerden oluşmaktadır. Bu lenfoid ve miyeloid hücreleri genellikle sitokinler olarak bilinen sinyal üreten proteinler üretirler. Bağışıklığın tepkisi ise inflamasyon içermektedir, örneğin bağışıklık hücrelerinin birikimi sistematik olarak gövdenin belirli bir bölgesinde olabilir. Bulaşıcı etmene veya yabancı maddeye tepki olarak bağışıklık hücreleri sitokinler salgılamaktadır, dolayısıyla bağışıklı hücre çoğalmasını, gelişimini veya yer değişimini ayarlamaktadır. Bağışıklığın tepkisi patolojik sonuçlar oluşturmaktadır, örneğin otoimmün bozukluklarında görüldüğü gibi aşırı inflamasyona karıştığına, (bakınız, örn, Abbas ve arkadaşları (ed.) (2000) Cellular ve Molecular Immunology, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA; Oppenheim ve Feldmann (ed.) (2001) Cytokine Reference, Academic Press, San Diego, CA; von Andrian ve Mackay (2000) New Engl. J. Med. 343:1020-1034; Davidson ve Diamond (2001) New Engl. J. Med. 345:340-350).

İnterlökin-12 (IL-12), p35 ve p40 alt ünitelerinden oluşan bir heterodimerik bir moleküldür. Çalışmalar IL-12'nin saf T hücrelerini IFNY salgılayan T-yardımcı tip 1 CD4+ haline gelmesinde kritik bir rolü olduğu göstermektedir. Ayrıca IL-12'nin T hücre bağımlı bağışıklık ve canlı için inflamatuvar tepkiler için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Bakınız, *örn.*, Cua ve arkadaşları (2003) Nature 421:744-748. IL-12 alıcısı, IL-12β1 ve IL-12β2 alt ünitelerinden oluşmaktadır.

İnterlökin-23 (IL-23), IL-23'e özgü olan p19 ve IL-12 ile paylaşılan p40 iki alt ünitesinden oluşan bir heterodimerik sitokindir. p19 alt ünitesi yapısal olarak, granüosit koloni uyarıcı etmeni (G-CSF), IL-6 ile bağlantılıdır ve p35 ise IL-12'nin alt ünitesidir. IL-

23,IL-23R ve IL-12 β 1'den oluşan, IL-12 alıcısı tarafından paylaşılan heterodimerik alıcıya bağlanmasıyla sinyal göndermeye aracılık eder. Daha önceki bir kaç çalışma, p40'daki genetik eksiklik sonuçlarının (p40 sersemlemiş fare, p40KO fare) p35KO farede bulunanlardan daha şiddetli olduğunu göstermiştir. Bu sonuçların bazıları neticede IL-23'ün bulunması ile açıklanmış ve p40KO'nun sadece IL-12'in değil IL-23'ün de izah edilmesini engellemektedir. (bakınız, örn., Oppmann ve arkadaşları (2000) *Immunity* 13:715-725; Wiekowski ve arkadaşları (2001) *J. Immunol.* 166:7563-7570; Parham ve arkadaşları (2002) *J. Immunol.* 168:5699-708; Frucht (2002) *Sci STKE* 2002, E1-E3; Elkins ve arkadaşları (2002) *Infection Immunity* 70:1936-1948).

p40 KO farenin kullanılmasıyla yapılan güncel çalışmalar, IL-23 ve IL-12'in bloke edilmesinin çeşitli inflamatuvar ve otoimmün bozuklukların etkili şekilde tedavi ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, p40 vasıtasıyla IL-12'nin bloke edilmesi, oportünist mikrobik enfeksiyonlara olan artan duyarlılık gibi çeşitli sistemik durumları ortaya çıkarmaktadır. Bowman ve arkadaşları (2006) *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:245.

Tedavi edici antikorlar sitokin faaliyetini bloke etmek için kullanılabilir. Canlı içi tedavi edici etmen olarak antikorlar kullanarak en belirgin sınırlandırma, antikorların bağışıklık sağlayıcılığıdır. Monoklonal antikorların çoğun kemirgenlerden kaynaklanmaktadır, insanlarda tekrarlanarak kullanılması tedavi edici antikora karşı olan bağışıklık tepkisinin oluşması ile sonuçlanırlar. Bu tür bir bağışıklı tepkisi asgaride tedavi edici etkinin azalmasına ve azamide ise potansiyel ölümcül anafilaktik tepki ile sonuçlanır. Kemirgen antikorların bağışıklığının azaltılması, fare değişken bölgelerinin insan sabit bölgeleri ile kaynamış olduğu kimerik antikorların üretilmesi ile alakalıdır. Liu ve arkadaşları (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43. Aslında, insan değişken bölgelerin hibridleri enjekte edilmiş olan fareler ve fare sabit bölgeleri insan değişken bölgelerine karşı olarak yönlendirilen güçlü anti-antikor tepkiler geliştirmekte, bu tür kimerik antikordaki tüm kemirici Fv bölgesinin engellenmesinin hastalarda istenmeyen bağışıklık sağlayıcılık ile sonuçlanabileceğini önermektedir.

Genellikle çeşitli etki alanlarının tamamlayıcı determinant bölge (CDR) döngüleri antikor moleküllerinin bağlanma bölgesini içerdiğinde inanılmaktadır. Dahası, kemirici CDR döngülerinin insan yapısı üstüne aşılması (örn. insanlaştırma) ile kemirici dizilerin daha da azaltılması denenmiştir. Jones ve arkadaşları (1986) *Nature* 321:522; Verhoeyen ve arkadaşları (1988) *Science* 239:1534. Dahası, CDR döngüsü antikor

içinde orijinin antikoru olarak aynı bağlayıcı özellikler ile birlikte eşit oranda sonuç
 alınamamaktadır. Yapı kalıntıları (FR) içindeki değişiklikler CDR döngü desteği ile ilgili
 kalıntılar bırakmakta, hümanize antikorlarda ise antijen bağıntı benzeşimini korumak
 için gereklidir. Kabat ve arkadaşları (1991) J. Immunol. 147:1709. CDR aşılmasının
 5 kullanımı ve bir kaç sayıda hümanize antikoru içinde yapı kalıntı korunması oluşumları
 rapor edilse de, belirli bir dizilişin antikor basende biyolojik özellikler ile istenilen
 bağıntıyla sonuçlanmasının zor olduğu öngörüsünde bulunulabilir. Bakınız, örn. Queen
 ve arkadaşları (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029, Gorman ve arkadaşları
 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181, ve Hodgson (1991) Biotechnology (NY)
 10 9:421-5. Dahası, önceki bir çok çalışma hayvan düşük ve ağır değişken dizileri için, bu
 tür çalışmalar için soru işaretleri oluşturabilecek öngörülen yapıyı oluşturan, değişik
 insan dizilimleri kullanmışlardır. Bilinen antikor dizilimlerinin kullanılması veya, daha
 umumiyetle, bu antikorların bilinen X-ray yapılarına, antikorlar NEW ve KOL'a, sahip
 olmasıdır. Bakınız, örn., Jones ve arkadaşları, *yukarıda verilmektedir*, Verhoeyen ve
 15 arkadaşları, *yukarıda verilmektedir*, ve Gorman ve arkadaşları, *yukarıda verilmektedir*.
 Kesin dizilim bilgisi bir kaç hümanize yapılar için rapor edilmiştir. Örnek niteliğinde olan
 IL-23p19 mühendislik antikorları, ortaklaşa-tahsis edilen A.B.D. Geçici Patent
 Başvuruları 60/891,409 ve 60/891,413'de (ikisi de 23 Şubat 2007'de verilen), A.B.D.
 Patent Başvuruları 2007/0009526 ve 2007/0048315 ve Uluslararası Patent Başvuruları
 20 WO 2007/076524, WO 2007/024846 ve WO 2007/147019 içinde açıklanmıştır.

Örnek olarak inflamatuvar, otoimmün ve proliferatif gibi bozukluklarda anti-huIL-23p19
 kullanımı için gereklilik ortaya çıkmıştır. Tercihen, bu tür antikorlar insan denekler
 üzerindeki bağışıklık sağlayıcılığı azaltmak için insan germline dizilimlerini sunmak için
 25 üretilmişlerdir. Öncelikli olarak, bu tür antikorlar huIL-23p19 için yüksek benzeşime
 sahip olacak ve huIL-23p19'e yüksek spesiflik ile bağlanacaktır. Little, M. et al.,
 Immunology Today, Vol. 21(8), 1 August 2000, pages 364-370, hibridom ve
 rekombinant antikorları açıklar. WO 2007/027714 (8 Mart 2007'de yayınlanmıştır),
 geliştirilmiş anti-IL-23 antikorlarını açıklar. Glenn E. Morris, The Protein Protocols
 30 Handbook, 1 January 1996, pages 595-600, yarışmalı ELISA ile protein antijenlerinin
 epitop eşleşmesini açıklar. Rudikoff S. et al., PNAS, Vol. 79(6), 1 March 1982, pages
 1979-1983, antijen bağlama spesifikliğini değiştiren tekli amino asit ornatımını açıklar.

Mevcut buluş istemlerde açıklanmıştır. Tarifname hümanize veya kimerik rekombinant
 35 antikorlar dahil olarak insan IL-23p19'u bağlayan, antikor hafif değişken etki alanı

içeren veya bununla ilgili antikör birleştirici parçayı, en azından bir tane olmak üzere, iki veya üç CDR'ın SEQ ID NO: 32-46 içeren grup içerisinde seçilmiş antikörler veya bunlarla ilgili parçalar gibi muteber bileşenleri içermektedir. Bir uygulamada, mevcut uygulamanın birleştirici bileşeni SEQ ID NO: 32-36 içeren grup içerisinde seçilmiş en az bir CDRL1 içermekte olan; SEQ ID NO: 37-41 içeren grup içerisinde seçilmiş en az bir CDRL2 içermekte olan; ve SEQ ID NO: 42-46 içeren grup içerisinde seçilmiş en az bir CDRL3 içermekte olan hafif zincir değişken etki alanı ihtiva etmektedir.

Tarifnamenin bir uygulamasında, bağlayıcı bileşen ağır zincir değişken etki alanı veya bununla ilgili antikör bağlayıcı parçaya sahiptir, en azından bir tane olmak üzere, SEQ ID NO: 15-31 içeren gruptan seçilen iki veya üç adet CDR içermektedir. Diğer uygulamada, mevcut buluşun bağlayıcı bileşeni SEQ ID NO: 15-19 içeren grup içinden seçilmiş en az bir adet CDRH1 içermekte; SEQ ID NO: 20-26 grup içinden seçilmiş en az bir adet CDRH2 içermekte; SEQ ID NO: 27-31 içeren gruptan seçilmiş en az bir adet CDRH3 içermektedir.

Diğer uygulamalarda, aşağıdaki iki paragrafta anlatıldığı şekilde, mevcut buluşun bağlayıcı bileşeni bir adet hafif zincir değişken etki alanı ve bir adet ağır zincir değişken etki alanı veya bunlarla ilgili antikör bağlayıcı parçaları içermektedir.

Bazı uygulamalarda, bağlayıcı bileşen çerçeve bölgesinin amino asit diziliminin tamamen veya önemli ölçüde hepsinin insan immünoglobulin amino asit dizilimi olan bir çerçeve bölgesi içermektedir.

Bazı uygulamalarda, istemlerde tanımlandığı üzere hafif ve/veya ağır zincir değişken etki alanları bir veya daha fazla CDR değişkeni içerebilir. Çeşitli uygulamalarda değişken etki alanı 1'e kadar olan SEQ ID No dizilimi ile ilgili korunarak modifiye edilmiş amino asit kalıntıları içerebilir. Korunumlu amino asit değişimleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tarifnamenin bazı uygulamalarında hafif zincir değişken etki alanı SEQ ID NO: 14'ün kalıntıları 1-108 veya bunlarla ilgili değişken içermektedir. Tarifnamenin bazı uygulamalarında ağır zincir değişken etki alanı, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 veya SEQ ID NO: 8 gibi, SEQ ID NO: 6-8 olanlardan kalıntılar 1-116 içeren grup içinden seçilen bir dizilim içerebilir. Tarifnamenin çeşitli uygulamalarında, varyant değişken etki

alanı , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 veya 50'ye kadar veya daha fazla sıralı SEQ ID No dizilimi ile ilgili korunarak modifiye edilmiş amino asit kalıntıları içerebilir. Tarifnamenin bir başka uygulamasında ise, bağlayıcı bileşen bir adet hafif zincir değişken etki alanı ve bir adet ağır zincir değişken etki alanı veya bunlarla ilgili antikor bağlayıcı parçaları içermektedir.

Tarifnamenin bir uygulamasında, bağlayıcı bileşen SEQ ID NO: 14'ün bir adet hafif zincir dizilimi ve/veya SEQ ID NO: 6-8 içeren gruptan seçilmiş bir adet hafif zincir dizilimi içermektedir.

10

Diğer uygulamalarda, mevcut buluşun bağlayıcı bileşenleri bir adet hafif zincir değişken etki alanı veya bununla ilgili, özünde SEQ ID NO: 14'ün kalıntıları 1-108 ve/veya bir ağır zincir değişken etki alanı veya bunlarla ilgili antikor bağlayıcı parçası ihtiva eden, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 veya SEQ ID NO: 8 gibi, SEQ ID NO: 6-8 olanlardan kalıntılar 1-116 içeren grup içinden seçilen bir dizilim ihtiva eden bir antikor bağlayıcı parçası içermektedir.

Diğer uygulamalarda, mevcut buluşun bağlayıcı bileşeni bir adet hafif zincir değişken etki alanı veya bununla ilgili, SEQ ID NO: 14'ün kalıntıları 1-108 ile en azından %50, %75, %80, %85, %90, %95, %98 veya %99 dizilim homolojisine sahip antikor bağlayıcı parça, ve/veya bir adet ağır zincir etki alanına veya SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 veya SEQ ID NO: 8 gibi, SEQ ID NO: 6-8 kalıntıları 1-116 içeren grup içinden seçilen bir dizilim ile en azından %50, %75, %80, %85, %90, %95, %98 veya %99 dizilim homolojisine sahip antikor bağlayıcı parça içermektedir.

25

Burada açıklanan bir uygulamada, bağlayıcı bileşen kalıntılar 20-30 içeren epitopa insan IL-23p19 (SEQ ID NO: 47) veya kalıntılar 82-110 veya her ikisiyle de bağlanmaktadır. Tarifnamenin diğer bir uygulamasında, IL-23p19 bağlayıcı bileşeni bazı veya bütün kalıntılar K20, T23, W26, S27, P30, E82, S95, L96, L97, P98, D99, P101, G103, Q104, H106, A107 ve L110 içeren ve isteğe bağlı olarak kalıntılar L24, L85, T91, S100 ve V102 içeren epitopa bağlanmaktadır. İstemlerde tanımlandığı üzere buluşun antikoru veya antijen bağlayıcı parçası, SEQ ID NO: 47'nin K20, T23, W26, S27, P30, E82, S95, L96, L97, P98, D99, P101, G103, Q104, H106, A107 ve L110 kalıntılarını içeren bir epitopta insan IL-23'e bağlanır. Çeşitli uygulamalarda, ilgili antikorun epitopu antikorun X-ray kristal yapısının temini ile belirlenmektedir: antikor

kompleksi ve belirleyicinin, ilgili antikor üzerindeki antikorun belirlenmiş mesafesi, örnek olarak 4Å veya 5Å olduğu, içerisinde IL-23p19 üzerinde kalıntı bırakmaktadır. Tarifnamenin bazı uygulamalarında epitop, kalıntıların en azından %30, %40, %45, %50 veya %54'ün antikorun belirlenmiş mesafesi içinde olduğu IL-23p19 boyunca 11'li veya daha fazla bitişik amino asit kalıntıları olarak tanımlanmaktadır.

Bir uygulamadaki buluş, çapraz-sınırlama analizi içinde insan IL-23'ne mevcut buluşun bağlayıcı bileşeninin bağlanmasını engelleme kabiliyeti olan antikorlar ile ilgilidir. Diğer bir uygulama, IL-23 dolayısıyla, sınırlandırma olmaksızın bu gibi faaliyetler kendi alıcısına bağlanması ve T_H17 hücrelerini çoğalması veya hayatta kalmasını teşvik etme amaçlı gerçekleştirilen faaliyeti engelleme kabiliyeti olan bağlayıcı bileşenler ile ilgilidir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun bağlayıcı bileşiği ayrıca, ağır zincir sabit bölgesini içerir, burada ağır zincir sabit bölgesi, γ 1, γ 2, γ 3, veya γ 4 insan ağır zincir sabit bölgesi veya bunların varyantını içermektedir. Çeşitli uygulamalarda hafif zincir sabit bölgesi bir lambda veya bir kappa insan hafif zincir sabit bölgesi içermektedir.

Çeşitli uygulamalarda, mevcut buluşun bağlayıcı bileşikler, poliklonal, monoklonal, kimerik, hümanize veya tamamen insan antikorları veya bunların parçalarıdır. Mevcut buluş ayrıca antijen bağlayıcı parçacığın, Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, ve bir çift antikor içeren gruptan seçilmiş bir antikor olduğunu düşünmektedir.

Mevcut tarifname, IL-23'ün biyolojik etkinliğini önlemek için yeterli miktarda IL-23'e özgü olan antikora (veya bununla ilgili antijen bağlayıcı parçasının) gereksinimi olan bir deneğe verildiği şekilde bir insan denekteki bağışıklık tepkisini bastırma yöntemini kapsamaktadır. Bazı uygulamalarda, IL-23 için belirli olan antikor hümanize veya kimerik antikor olabilir. Diğer uygulamalarda, bağışıklık tepkisi artrit, sedef hastalığı ve inflamatuvar bağırsak hastalığı dahil olarak bir inflamatuvar tepkidir. Diğer uygulamalarda bağışıklık tepkisi multipl skleroz, üveit, sistemik lupus eritematoz ve diyabet dahil olarak otoimmün tekidir. Diğer uygulamada, denek kanser hastasıdır ve bağışıklık tepkisi Th17 tepkisidir. Bir uygulamada buluş, bir insan denekte bağışıklık tepkisinin baskılanmasında kullanılmaya yönelik istemlerde tanımlanan antikor veya antijen bağlayıcı parçasını sağlar, burada bağışıklık tepkisi, inflamatuvar bir tepki veya otoimmün tepkidir; örneğin artrit, sedef, inflamatuvar bağırsak hastalığı, multipl skleroz,

sistemik lupus eritematozus, diyabet ve kanserden oluşan gruptan seçilen bir bozukluğun tedavisinde kullanıma yöneliktir.

5 Mevcut buluş ile ilave immüno baskılayıcı veya anti-inflamatuar etmen verilmesi tasarlanmaktadır. Mevcut buluşun bağlayıcı bileşikleri, bağlayıcı bileşen veya bununla ilgili antijen bağlayıcı parça içeren, farmakolojik olarak tanınabilecek bir taşıyıcı veya sulandırıcı ile birlikte kullanılacak farmakolojik bir bileşim içinde olabilir. Tarifnamenin bir başka uygulamasında, farmakolojik bileşim immüno baskılayıcı veya anti-inflamatuar etmen içerebilir.

10

Mevcut tarifname, bağlayıcı bileşenin antikor somutlaştırılmasının polipeptit dizilimini kodlayan izole edilmiş nükleik asidi kapsamaktadır. Nükleik asit, vektör ile asit verilmiş bir konak hücre ile tanınmış kontrol dizilimlerine uygulanabilir şekilde bağlanmış bir açıcı kas vektörü olabilir. Ayrıca, vektörü içeren konak hücre ve nükleik asidin açığa 15 çıktığı koşullar altında konak hücrenin kültürlenmesini içeren polipeptit üretimi metodu, dolayısıyla polipeptit üretimini ve polipeptidin konak hücre veya ortamdan kurtarılmasını kapsamaktadır.

20 Çeşitli uygulamalarda, antikor veya antijen kullanımı ile, bununla ilgili mevcut kullanımda, bunlarla sınırlı olmaksızın, inflammatuar hastalık, otoimmün hastalık, kanser, bulaşıcı hastalık (örn. bakteriyel, mikrobakteriyel, viral veya mantarla ilgili enfeksiyon ve kronik enfeksiyonlar dahil olarak), artrit, sedef hastalığı, inflammatuar bağırsak hastalığı, multipl skleroz, üveit, sistemik lupus eritematoz ve diyabet gibi bozuklukların tedavisindeki ilaçların üretilmesi ile ilgilidir.

25

Diğer uygulamalarda tarifname, bunlarla sınırlı olmaksızın, inflammatuar hastalık, otoimmün hastalık, kanser, bulaşıcı hastalık (örn. bakteriyel, mikrobakteriyel, viral veya mantarla ilgili enfeksiyon ve kronik enfeksiyonlar dahil), artrit, sedef hastalığı, inflammatuar bağırsak hastalığı, multipl skleroz, üveit, sistemik lupus eritematoz ve 30 diyabet gibi bozuklukların tedavisine yönelik burada açıklanan bağlayıcı bir bileşiği içeren farmasötik kompozisyonları ile ilgilidir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun bağlayıcı bileşiği veya farmasötik kompozisyonu, denekteki hastalık semptomlarının gerileme sürecin uzamasına neden olmaktadır, öyle 35 ki dozlama aralığı deneğin içindeki bağlayıcı bileşenin yarı ömründen daha fazla bir

zamana genişletilebilir, örneğin tekrarlayan-düzelen hastalık tedavisindeki gibi. Çeşitli uygulamalarda, bir ilaç verme ile diğeri arasındaki aralık 6-, 8-, 10-, 12-, 16-, 20-, 24-, 30-hafta veya daha fazladır. Diğeri uygulamalarda, tek bir ilaç verimi tekrarlamaların kalıcı şekilde önlemek için yeterlidir.

5

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1. fare anti-insan IL-23p19 antikor klonu ağır zincir değişken etki alanının dizilimlerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Dizilimler klonlar m1A11, m11C1, m5F5, m21D1, m13B8, h13B8a, h13B8b ve h13B8c için belirtilmiştir. CDRler gösterilmiştir. Her iki şekilde, “m” öneki bir fare antikorunu ifade etmekte ve “h” ise hümanize antikorunu ifade etmektedir. Önekler “a”, “b” ve “c” , aşağıda detaylıca belirtilecek olan, hümanize 13B8 ağır zincir değişken etki alanının varyantlarını işaret etmektedir.

15

Şekil 2, fare anti-insan IL-23p19 antikor klonu hafif zincir değişken etki alanının dizilimlerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Dizilimler klonlar m1A11, m11C1, m5F5, m21D1, m13B8, h13B8 ve CDRler için belirtilmiştir.

20 BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Ekteki istemler dahil olarak burada kullanıldığı şekilde, belirtme edatları metinde açıkça tam aksini belirtmesine rağmen ilgili çoğul referanslarını da kapsamaktadır. Tablo 7. bu uygulamada kullanılan dizilim belirteçlerinin bir listesini göstermektedir. Buradaki referansların örnek olarak gösterilmesi yukarıda anılanlardan herhangi birinin geçerli buluş öncesi teknik durum olarak kabul edilmesi amacını taşımamakta ne de bu yayınların veya dokümanların içeriğinin veya tarihine karşı olan herhangi bir kabul edilmesine dayanak teşkil etmemektedir.

30 I. Tanımlar

“Proliferatif etkinlik”, örneğin. normal hücre bölünmesi, aynı zamanda kanser, tümörler, displazi, hücre transformasyonu, metastaz ve anjiyogenez gibi gerekli olan veya özellikle ilişkilendirilmiş faaliyetleri teşvik etmeyi kapsamaktadır.

35

“ilaç verme” ve “tedavi”, hayvan, insan, denek, hücre, doku ve biyolojik sıvıya uygulanırsa, ekzojen farmasötik, terapötik, diyagnostik etmen teması veya hayvan, insan, denek, hücre, doku ve biyolojik sıvı kompozisyonunu ifade etmektedir. “ilaç verme” ve “tedavi”, örnek olarak terapötik, farmakokinetik, diyagnostik, araştırma ve deneysel yöntemleri ifade etmektedir. Bir hücrenin tedavisi bir reaktifin hücreye teması, aynı zamanda reaktifin hücre ile temas halinde olan bir sıvıya temasını da kapsamaktadır. “ilaç verme” ve “tedavi”, ayrıca *in vitro* ve *ex vivo* tedaviler anlamına gelmektedir, örneğin, bir hücrenin, bir reaktif aracılığıyla, veya diğer bir hücre ile tanılayıcı, bağlayıcı birleşimde olmasıdır. “Tedavi”, bir insan, veteriner veya araştırma deneğine uygulanan tedavi edici, önleyici veya koruyucu önlemlere, araştırma ve teşhis edici uygulamaları ifade etmektedir. “Tedavi”, bir insan, veteriner veya araştırma deneğine, veya hücre, doku veya organa uygulandığında, bir etmenin hayvan deneğe, bir hücreye, dokuya, fizyolojik bölgeye veya fizyolojik sıvı ile temas etmesini kapsamaktadır. “Bir hücrenin tedavisi”, etmenin IL-23 alıcısı (IL-23R/IL-12Rbeta1 heterodimer) ile temas ettiği durumları, örnek olarak. sıvı aşamasında veya koloidal aşamasında olan ayrıca agonist veya antagonistin hücre veya alıcı ile temas etmediği durumlarda.

Burada kullanıldığı şekilde, “antikor” istenilen biyolojik faaliyeti gösteren antikorun herhangi bir formunu ifade etmektedir. Dahası, en geniş anlamıyla kullanılmış ve özellikle monoklonal antikorları (tam uzunlukta monoklonal antikorlar dahil), poliklonal antikorları, çoklu-özellikli antikorları (örn. bispesifik antikorları), kimerik antikorları, hümanize antikorları, tamamen insan antikorlarını, istenilen biyolojik faaliyeti gösterdikleri sürece kapsamaktadır.

Burada kullanıldığı şekilde, terimler “IL-23p19 bağlayıcı parçası”, ilgili bağlayıcı parça” veya “ilgili antijen bağlayıcı parça” IL-23p19 faaliyeti engellediği biyolojik faaliyet içinde kalmayı önlemleri ölçüde sürdürmekte olan bir antikorun parçasının veya türevini kapsamaktadır. Dahası, “antikor parçası” terimi ve IL-23p19 bağlayıcı parçası tüm uzunlukta bir antikoru, genel olarak antijen bağlayıcı veya ilgili değişken bölgeyi ifade etmektedir. Antikor parçaları örnekleri Fab, Fab', F(ab')₂, ve Fv parçalarını; çift antikorlar; doğrusal antikorlar; tekli zincir antikor moleküllerini, örneğin. sc-F; ve antikor parçalarından oluşmuş çoklu-spesifik antikorlarını içermektedir. Genellikle, bir bağlayıcı parça ve türev kendi IL-23p19 önleyici faaliyetinin en az %10'u kadarını muhafaza etmektedir. Öncelikli olarak, bağlayıcı parça veya türev kendi IL-23p19 önleyici

faaliyetinin en az %25, %50, %60, %70, %80, %90, %95, %99 veya %100'ü (veya fazla) kadarını muhafaza etmekle beraber, yeterli bağını ile herhangi bir bağlayıcı parça istenilen biyolojik etkinin ortaya çıkartılması için etkili olmaktadır. Ayrıca, IL-23p19 bağlayıcı parçası kendi biyolojik faaliyetini önemli ölçüde değiştirmeyen

5 korunumlu amino asit değişimlerine sahip varyantlar içermektedir.

Burada kullanıldığı şekilde, "Monoklonal antikor" terimi önemli ölçüde homojen antikor popülasyonundan elde edilen bir antikor ifade etmektedir, örneğin. çok küçük miktarlarda bulunan doğal olarak meydana gelen mutasyonlar için olanlar haricindeki

10 popülasyonu içeren bağımsız antikorlar. Monoklonal antikorlar oldukça belirgin, tek bir antijenik epitopa doğru yönlendirilmiştir. Tam tersine, geleneksel (poliklonal) antikor hazırlamaları genel anlamda değişik (veya belirli) epitoplara doğru yönlendirilmiş antikor yoğunluğunu içerir. "Monoklonal" düzenleyici önemli ölçüde homojen olan antikor popülasyonundan elde edilmiş olan antikorun karakterini ve herhangi bir özellikli

15 yöntem ile antikor üretimi gereksiniminin oluşturulamayacağını ifade etmektedir. Örnek olarak, mevcut icada uygun olarak kullanılacak monoklonal antikorlar ilk kez Kohler ve arkadaşları (1975) Nature 256: 495, tarafından tanımlanmış hibridom yöntemi veya rekombinant DNA yöntemleri ile yapılabilir (bakınız, örn., ABD Patent No. 4.816.567). "Monoklonal antikorlar" örnek olarak Clarkson'ın vd. (1991) Nature 352: 624-628 ve

20 Marks ve arkadaşları (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597, tanımladığı teknikler kullanılarak aşama antikor yığınlarından izole edilebilir.

Monoklonal antikorlar özellikli bir türden türetilen veya belirli antikor sınıfı veya alt sınıfına ait antikorda ağır ve/veya hafif zincirin ilgili dizilimlere benzer veya homolog

25 olduğu, bu arada zincir(ler)in geri kalan kısmının diğer türlerde türetildiği veya diğer antikor sınıfı veya alt sınıfına ait olan antikorlar içindeki ilgili dizilimlerin, aynı zamanda bu tür antikorların parçalarının da benzer veya homolog olduğu, böylelikle istenilen biyolojik faaliyeti sergileyebilecekleri, bölüm içerisindeki "kimerik" antikorları içermektedir. ABD Patent No. 4,816,567; Morrison ve arkadaşları (1984) Proc. Natl.

30 Acad. Sci. USA 81: 6851-6855.

"Antikor etki alanı", sadece değişken bölgesi ağır zincir veya değişken bölgesi hafif zincir içeren immünolojik olarak fonksiyonlu immünoglobulin parçasıdır. Bazı durumlarda iki veya daha fazla V_H bölgesi iki değerli antikor etki alanı oluşturmak için peptit bağ

düzenleyicisi ile eşdeğerli bir şekilde birleştirilir. İki değerli antikor etki alanının iki V_H bölgesi aynı veya farklı antijenleri hedef alabilir.

“İki değerli antikor” iki adet antijen bağlanma alanı içerir. Bazı durumlarda, iki bağlanma alanı aynı antijen spesifikliklerine sahiptir. Bununla birlikte, iki değerli antikorlar çift spesifik olabilir (aşağıya bakınız).

Burada kullanıldığı şekilde, “tekli-zincir Fv” veya “scFv” antikor terimi, antikorum V_H ve V_L etki alanlarını, bu alanların tek bir polipeptit zincir içinde sunulduğu, içeren antikor parçalarını ifade etmektedir. Genel olarak, polipeptit antijen bağlantısı için istenilen yapıda oluşturulması için sFv’yi etkin hale getiren V_H ve V_L etki alanları arasındaki polipeptit bağ düzenleyicisi içermektedir. sFv incelemesi için Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, Cilt 113, Rosenberg ve Moore ed. Springer-Verlag, New York, sayfa 269-315 bakınız.

Monoklonal antikorlar, irileştirilmiş tekli etki alanı antikorlarının içermektedir. Bakınız, örn., Muyldermans ve arkadaşları (2001) Trends Biochem. Sci. 26:230; Reichmann ve arkadaşları (1999) J. Immunol. Methods 231:25; WO 94/04678; WO 94/25591; ABD Patent No. 6,005,079). Bir uygulamada, mevcut tarifname tekli etki alanı antikorlarının oluşturulduğu şekilde modifikasyonları ile iki adet V_H etki alanı içeren tekli etki alanı antikorları sağlamaktadır.

Burada kullanıldığı şekilde, “çift antikorlar” terimi parçalarının aynı polipeptit zincir V_H - V_L veya V_L - V_H içinde bir hafif zincir değişken etki alanına (V_L) bağlanmış ağır zincir değişken etki alanı (V_H) içerdiği iki antijen-bağlayıcı alan ile küçük antikor parçacıkları ifade etmektedir. Kısa bir bağ düzenleyicisinin kullanılması aynı zincir üzerindeki iki etki alanı arasındaki eşleşmeye olanak sağlamakta, etki alanları diğer zincirin tamamlayıcı etki alanları ile eşleşmeye zorlanmakta ve iki adet antijen-bağlayıcı alan oluşturmaktadır. Çift antikorlar daha kapsamlı şekilde, örn, EP 404,097; WO 93/11161; ve Holliger ve arkadaşları (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 anlatılmıştır. Mühendislik olarak geliştirilmiş antikor değişkenleri incelemesi için Holliger ve Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136 bakınız.

Burada kullanıldığı şekilde, “hümanize antikor” insan olmayan (örn. fare) ve aynı zamanda insan antikorlarından gelen dizilimler içeren antikor şekillerini ifade

etmektedir. Bu tür antikorlar insan olmayan immünoglobulinden gelen asgari dizilimi ihtiva ederler. Genel olarak, insan olmayan immünoglobulin veya bütün veya önemli ölçüde bütün FR bölgeleri insan immünoglobulin dizilimi ile uyumlu olan bütün veya önemli ölçüde bütün çok değişkenli döngülerinin içinde büyük ölçüde hepsinin en azından bir, ve genellikle iki değişken etki alanı içermekte olduğu hümanize antikorlardır. Hümanize antikorlar, genellikle insan immünoglobulini olan, en azından bir kısım immünoglobulin sabit bölgesi (Fc) içermektedir. Önekler "hum", "hu" veya "h", ebeveyne ait kemirgen antikorlardan (örn. fare 13B8 veya m13B8). gelen hümanize antikorları (örn. hum13B8) ayırt etmek gerekli olduğunda antikor klon belirlemelerine eklenir. Kemirgen antikorların hümanize şekilleri, genel olarak ebeveyne ait kemirgen antikorların aynı CDR dizilimlerini içermesine rağmen, belirli amino asit değişimleri, benzeşimi arttırmak, hümanize antikorun stabilitesini arttırmak veya diğer nedenlerle dahil edilebilir.

15 Mevcut buluştaki antikorlar ayrıca değiştirilmiş dengeleyici özellikleri sağlamak için modifiye edilmiş (veya bloke edilmiş) Fc bölgeleri olan antikorlar içermektedir. Bakınız, örn. Pat. No. 5,624,821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702; Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656. Bu tür bir değiştirme, teşhis ve tedavide olası en faydalı etkileri ile bağışıklık sistemini çeşitli reaksiyonlarını geliştirmek veya bastırmak için kullanılabilir. Fc bölgesindeki değişimler amino asit değişikliklerini (yer değiştirme, çıkarma ve yerleştirme), glikosilasyon ve deglikosilasyon ve çoklu Fc ekleme içermektedir. Fc'ye yapılan değişiklikler tedaviye ait antikorların içindeki antikorların yarılanma ömrünü değiştirebilir ve daha uzun yarılanma ömrü, beraberinde gelen uygunluğun artırılması ve materyal kullanımının azaltılması ile birlikte, daha düşük frekanslı dozlama ile sonuçlanabilir. Bakınız Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol.116:731 at 734-35.

“Tam insan antikor” terimi, sadece insan immünoglobulin protein dizilimleri içeren antikor ifade etmektedir. Tam insan antikor, eğer bir farede veya bir fare hücresinden türetilmiş bir hibridom içinde üretilmişse fare karbonhidrat zincirleri içerebilir. Benzer şekilde, “fare antikor” sadece fare immünoglobulin dizilimleri içeren antikor ifade etmektedir. Tam insan antikor bir insan içinde, insan immünoglobulin germline dizilimlerine sahip bir transgenik hayvan içinde, aşama görüntüleme veya diğer moleküler biyolojik yöntemler ile üretilebilir.

Burada kullanıldığı şekilde “çok değişken bölge”, antijen-bağlayıcıdan sorumlu olan antikorun amino asit kalıntılarını ifade etmektedir. Çok değişkenli bölge, bir “tamamlayıcı determinant bölge” ve “CDR” ‘dan gelen amino asit kalıntılarını içermektedir (örn. hafif zincir değişken etki alanındaki kalıntılar 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) ve 89-97 (CDRL3) ve ağır zincir değişken etki alanındaki kalıntılar 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) ve 95-102 (CDRH3) (Kabat ve arkadaşları (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. baskı. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) ve/veya “çok değişkenli döngü” ‘den gelen kalıntılar (örn. hafif zincir değişken etki alanındaki kalıntılar 26-32 (L1), 50-52 (L2) ve 91-96 (L3) ve ağır zincir değişken etki alanındaki kalıntılar 26-32 (H1), 53-55 (H2) ve 96-101 (H3) (Chothia ve Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Burada kullanıldığı şekilde “çerçeve” ve “FR” terimi, burada CDR kalıntıları olarak belirtilen çok değişken bölge kalıntılarından ziyade değişken etki alanı kalıntılarını ifade etmektedir. Yukarıdaki numaralandırma Kabat numaralandırma sistemi ile ilgilidir ve ilişikteki Dizilim Listesinde dizilim numaralandırmasına detaylı şekilde uyması gerekmemektedir.

“Bağlayıcı bileşik”, bir molekülü, küçük molekülü, makro molekülü, polipeptit, antikor veya parçayı ve ilgili benzeşimi, veya hedefe bağlanabilme yeteneğine sahip çözünür alıcıyı ifade etmektedir. “Bağlayıcı bileşik” ayrıca tümleşik molekülleri ifade etmektedir, örn. iyonize edilmiş moleküle, ve eşdeğer olan ve eşdeğer olmayan modifiye edilmiş olan eşdeğer olmayan bir tümleşik, örn. fosforilasyon, asilasyon, çapraz bağlantı, siklizasyon veya sınırlı bölünme ile modifiye edilmiş hedefe bağlanmaya kabiliyetli olan. Antikora referans olarak kullanıldığında, “bağlayıcı bileşik” terimi hem antikorları hem de ilgili antijen bağlayıcı parçaları ifade etmektedir. “Bağlayıcı” bağlanma kompozisyonun normal Brownian hareketindeki azalmadaki birleşme sonuçlarının olduğu hedef ile bağlayıcı bileşimin ilişkilendirmeyi, bu bağlayıcı birleşimin solüsyon içinde sonuçlandığı veya askıya alındığı durumlarda, ifade etmektedir. “Bağlayıcı birleşim” bir molekülü, örneğin bir bağlayıcı bileşiğin hedefe bağlanmaya yetkin olan bir dengeleyici, ekşiyan, tuz, tampon, solvent veya katkı ile kombinasyon halinde olması gibi.

“Korunumlu değiştirilmiş varyantlar” veya “korunumlu değiştirim”, bu bilim dalındaki yeteneği bilen amino asitlerin değiştirimini ifade etmek ve genel olarak sonuç olarak alınan molekülün biyolojik aktivitesini değiştirmeden, polipeptidin gerekli bölgelerinde

olsa bile, yapılmaktadır. Bu gibi örnek gösterilen değiştirimler aşağıda gösterilen Tablo 1’de belirtilenlere göre yapılmaktadır:

Tablo 1

rnek Korunumlu Amino Asit Değiştirimleri

Orijinal kalıntı	Korunum değiştirimi
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Orijinal kalıntı	Korunum değiştirimi
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Buna ilave olarak, bu bilim dalında yeteneği bilinenler, genelde polipeptidin gerekli olamayan bölgelerindeki tekli amino asit değiştirimlerin önemli ölçüde biyolojik aktiviteyi değiştirmediği bilinmektedir. Bakınız, örn., Watson ve arkadaşları (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., s. 224 (4th Edition).

5

“Özünde içermekte olan” ifadesi veya varyasyonları, özellikler ve istemler boyunca ezbere söylenen öğeleri veya öğe gruplarının dahil edildiğini belirtmek ve diğer öğelerin, benzer veya söylenenlerden farklı tabiata sahip, belirli dozaj idaresinin, yönteminin veya bileşiminin temel ve özgün özelliklerini maddesel olarak değiştirmeyen, öğelerin isteğe bağlı olarak dahil edilmesi için kullanılmıştır. Sınırlandırılmamış bir örnek olarak, esasen söylenen amino asit dizilimi içeren bir bağlayıcı bileşik bileşiğin bağlayıcı özelliklerini maddesel olarak değiştirmeyen bir veya daha fazla amino asit kalıntısını değiştirimi dahil olarak bir veya daha fazla amino asidi içermektedir.

15

“Efektif miktar” tıbbi durumun semptomu veya işaretini düzeltmek veya önlemek için gerekli miktarı belirtmektedir. Efektif miktar ayrıca teşhise olanak sağlayan veya kolaylaştıran yeterli miktar anlamına da gelmektedir. Belirli bir hasta veya veteriner deneği için olan efektif miktar tedavi edildiği koşullara, hastanın genel sağlığına, izlenen yöntemlere, ilaç verme dozajına ve yan etkilerin önemi gibi faktörlere göre değişiklik gösterebilir. Bakınız, örn., ABD Patent No. 5,888,530. Efektif miktar, azami doz veya önemli yan etkileri veya zehirli etkileri önleyici doz protokolü olabilir. Etki, diyagnostik önlem veya parametrenin geliştirilmesinde en azından %5, genellikle en azından %10, çoğunlukla en azından %20, çoğunlukla en azından %30, tercihen en azından %40, tercihen en azından %50, tercihen en azından %60, ideal olarak en azından %70, daha ideal olarak en azından %80 ve en ideal olarak en azından %90 olarak %100ün normal denek tarafından gösterilen diyagnostik parametre olarak tanımlandığı. Bakınız, *örneğin* Maynard ve arkadaşları (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory ve Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londra, Birleşik Krallık.

30

“Bağışıklık durumu” ve “bağışıklık bozukluğuna”, patolojik inflamasyon, inflamatuvar bozukluk ve otoimmün bozukluğu veya hastalığı örnek olarak verilebilir. “Bağışıklık durumu” ayrıca kanser, tümörler ve anjiyogenez gibi enfeksiyonlar, bağışıklık sistemi tarafından yok edilmeye karşı koyan enfeksiyonlar, tümörler ve kanserler dahil olarak,

35

kalıcı enfeksiyonlar ve proliferatif durumları ifade etmektedir. “Kanserli olma durumu”, kanser, kanser hücreleri, tümörler, anjiyogenez ve displazi gibi kanser öncesi koşulları kapsamaktadır.

- 5 “İnflamatuvar bozukluk”, tüm veya kısmen patoloji sonuçlarının, örneğin. Bağışıklık sisteminin hücrelerindeki sayısında değişiklik, yer değiştirim hızındaki değişiklik, aktivasyondaki değişiklik gibi, olduğu bir bozukluk veya patolojik koşul anlamına gelmektedir. Bağışıklık sisteminin hücreleri, T hücreleri, B hücreleri, monositler veya makrofajlar, antijen sunan hücreler (APCler), dendritik hücreler, mikrogliya, NK
- 10 hücreleri, NKT hücreleri, nötrofiller, eozinofil, mast hücreleri veya sitokin-üreten endotelial veya epitelyal hücreler gibi özellikle immünoloji ile ilişkilendirilmiş herhangi diğer hücreleri kapsamaktadır.

- 15 “IL-17 üreten hücre”, klasik TH1-tipi T hücresi veya TH2-tipi T hücresi olmayan, T_H17 hücreleri olarak anılan bir T hücresi anlamına gelmektedir. T_H17 hücreleri detaylı şekilde Cua ve Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559; Tato ve O’Shea (2006) Nature 441:166-168; Iwakura ve Ishigame (2006) J. Clin. Invest. 116:1218-1222 ele alınmıştır. (örn., mitojen tepki P-proteini; kemokin ligandı 2; interlökin-17 (IL-17); kopyalama faktörü ile ilgili RAR; ve/veya sitokin sinyal gönderme 3’ün baskılayıcısı), IL-
- 20 23 agonist ile tedavinin ibaresinin IL-12 agonist ile tedaviden daha büyük olduğu, “daha büyük” terimi aşağıda açıklanmaktadır. IL-23 agonist ile ibaresi, IL-12 tedavisinden genellikle en azından 5-misli daha büyük, tipik olarak en azından 10-misli daha büyük, daha tipik olarak en azından 15-misli daha büyük, en tipik olarak en azından 20-misli daha büyük, tercihen en azından 25-misli daha büyük ve en çok tercih edilen olarak en
- 25 azından 30-misli daha büyüktür. Önemli ölçüde saf IL-17 üreten hücreler popülasyonu ile tedavi edildiğinde, ekstensör ölçülebilir. Bir $Th17$ tepkisi, genellikle $Th1$ tepkisi ile bastırılmış olarak birleştirilmiş aktivite ve/veya $Th17$ hücrelerin çoğalması içindeki immün tepkisidir.

- 30 Dahası, “IL-17-üreten hücre”, hücre gelişmesi veya hücre farklılaşması izyolu içinde işlenmiş olan öncül veya haberci hücreyi içermekte, bir IL-17 üretici hücrenin farklılaşması aşağıda açıklanmıştır. IL-17 üretici hücreye olan öncül veya haberci hücre, lenf bezi boşaltılması (DLN) içinde bulunabilir. Buna ilave olarak, “IL-17 üretici hücre”, aşağıda açıklanan şekilde, örn. forbolester, iyonofor ve/veya karsinojen
- 35 tarafından etkinleştirilmiş, dahası farklılaştırılmış, depolanmış, dondurulmuş,

kurutulmuş, etkisizleştirilmiş, kısmen düşürülmüş şekilde, örneğin rekombinant teknolojisi ile apoptoz, proteoliz veya lipid oksidasyon ile değiştirilmiş şekilde bir IL-17 üretici hücreyi içine almaktadır.

5 Burada kullanıldığı şekilde “izole edilmiş nükleik asit molekülü”, antikör nükleik asidinin doğal kaynağı ile normal olan ilişkilendirilmiş olan en azından bir adet kontaminant nükleik asit molekülünden tanımlanmış ve ayrılmış olan bir nükleik asit molekülünü ifade etmektedir. İzole edilmiş nükleik asit molekülü doğada bulunduğu farklı şekilde veya bağlamdadır. Bu sebeple, izole edilmiş nükleik asit molekülleri doğal hücrelerde mevcut olan nükleik asit moleküllerinde ayrılmaktadır. Bununla birlikte, izole edilmiş nükleik asit, normal şekilde antikoru dışa vuran, örnek olarak nükleik asit molekülünün doğal hücrelerden farklı kromozoma ait yerde bulunması gibi, hücreler içinde bulunan bir nükleik asit molekülü içermektedir.

15 “Kontrol dizilimleri”, belirli bir konak organizma içinde uygulanabilir şekilde link edilmiş kodlama sıralamasının ifadesi için gerekli DNA dizilimlerini ifade etmektedir. Kontrol dizilimleri prokaryotlar için uygundur, örneğin bir kolaylaştırıcı, uygulanabilir şekilde bir uygulama dizilimi ve ribozom bağlayıcı alan içermektedir. Ökaryotik hücrelerin kolaylaştırıcıları, poliadenilasyon sinyalleri ve geliştiricileri kullandığı bilinmektedir.

20

Bir nükleik asit, diğer bir nükleik asit dizilimi ile fonksiyonel ilişkide olduğunda “uygulanabilir şekilde bağlanmış” olmaktadır. Örneğin, bir ön dizilim veya sekretuar lider için olan DNA, Eğer polipeptidin salgılanmasına katılımda bulunan bir ön protein olarak ifade edilmişse, bir polipeptit için DNA'ya uygulanabilir şekilde bağlanabilir; bir kolaylaştırıcı veya geliştirici, dizilimin uyarılmasına etki ediyorsa, bir kodlama dizilimine uygulanabilir şekilde bağlanabilir; veya ribozom bağlayıcı alan, yorumlamayı kolaylaştırmak için konumlandırılmışsa, bir kodlama dizilimine uygulanabilir şekilde bağlanabilir. Genelde, “uygulanabilir şekilde bağlanmış” terimi bağlanmış olan DNA dizilimlerinin bitişik ve, bir sekretuar lider durumda olduğunda ise bitişik ve okuma yapısındadır. Bununla birlikte, geliştiricilerin bitişik olması gerekmemektedir. Bağlama, uygun kısıtlama alanlarında ligasyon ile sağlanmaktadır. Eğer bu türden alanlar yoksa, sentetik oligonükleotid adaptörler veya bağlayıcılar geleneksel uygulamaya uygun olarak kullanılırlar.

- Burada kullanıldığı şekilde, “hücre”, “hücre çizgisi” ve “hücre kültürü” ifadeleri değiştirilebilir şekilde kullanılmıştır ve bu tür bütün belirlemeler soy içermektedir. Dahası, “transformant” ve “dönüştürülmüş hücre” kelimeleri, ilk denek hücreyi ve transferlerin sayısına bakılmaksızın oradan türetilmiş kültürleri içermektedir. Bütün
- 5 soyun, kasıtlı veya kasıtsız mutasyonlara bağlı olarak DNA içeriği içinde tamamen benzer olmadığı anlaşılmıştır. Mutant soy, dahi edildiği özgün olarak dönüştürülmüş hücre için taramadan geçirildiğinde aynı özelliğe veya biyolojik aktiviteye sahip olmaktadır. Farklı belirlemeler istendiğinde, bu bağlamdan uzak olmaktadır.
- 10 Burada kullanıldığı şekilde, “polimeraz zincir reaksiyon” ve “PCR” belirli miktarda nükleik asit, RNA ve/veya DNA’nın yok denecek kadar az miktarlarının ABD Patent No. 4.683.195’de belirttiği şekilde güçlendirildiği prosedürü veya tekniği ifade etmektedir. Genellikle, ilgilenilen bölgenin veya daha ilerisinin sonundan gelen dizilim bilgisinin mevcut olması gereklidir, böylelikle oligonükleotid primerler tasarlanabilecektir; bu
- 15 primerler güçlendirilecek olan örneğin karşıt dizilerine doğru bir dizilim içinde özdeş veya benzer olmalıdır. İki primerin terminal nükleotidleri güçlendirilmiş materyalin uçları ile örtüşebilir. PCR, belirli RNA dizilimlerini, toplam genomik DNA’dan gelen belirli DNA dizilimlerini ve toplam hücresel RNA, bakteriyofaj veya plazmid dizilimlerden kopyası çıkartılmış cDNA’yi güçlendirmek için kullanılabilir. Bakınız Mullis ve arkadaşları (1987)
- 20 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.) Burada kullanıldığı şekilde PCR, bir primer olarak bilinen nükleik asidin kullanılmasını içeren nükleik asit test örneğini güçlendirmek için olan nükleik asit polimeraz reaksiyon yönteminin bir örneği, veya tek örneği, olarak kullanılabilir.
- 25 Burada kullanıldığı şekilde “germline dizilimi” terimi, kemirgen (örn. fare) ve insan germline dizilimleri dahil olarak yeniden düzenlenmemiş immünoglobulin DNA dizilimlerini ifade etmektedir. Herhangi uygun yeniden düzenlenmemiş immünoglobulin DNA kaynağı kullanılabilir. İnsan germline dizilimleri, örneğin Birleşik Devletler Ulusal Sağlık Enstitülülere Artrit ve Muskuloskeletal ve Cilt Hastalıkları Enstitüsü internet
- 30 sayfasındaki JOINSOLVER® germline veri bankasından elde edilebilir. Fare germline dizilimleri Giudicelli ve arkadaşları (2005) Nucleic Acids Res. 33:D256-D261 makalesinde belirtilen şekilde elde edilebilir.
- Potansiyel etkinleştirici veya engelleyici etmen ile birlikte belirlenmiş protein, gen, hücre
- 35 veya organizma içeren örnekler ve deneyler kullanarak ve etmen olmadan kontrol

- örnekleri karşılaştırılarak IL-23 aktivitesinin kapsamı incelenebilir. Kontrol örnekleri, örn. etmen ile işlenmiş olmayan, %100 göreceli aktivite değerine ayarlanırlar. Kontrol ile ilgili aktivite değeri yaklaşık %90 veya daha az, genellikle %85 veya daha az, genellikle %75 veya daha az, çoğunlukla %70 veya daha az, ekseriyetle %65 veya daha az, 5 umumiyetle %60 veya daha az, tipik olarak %55 veya daha az, çoğunlukla %50 veya daha az, çoğunlukla %45 veya daha az, çoğunlukla %40 veya daha az, tercihen %35 veya daha az, tercihen %30 veya daha az, en çok tercih edilen %25 veya daha az olduğunda inhibisyon sağlanır. Kontrol ile ilgili aktivite değeri yaklaşık %110, genelde en azından %120, genellikle en azından %140, çoğunlukla %160, çoğunlukla en 10 azından %180, çoğunlukla en azından 2-misli, çoğunlukla en azından 2,5-misli, genellikle en azından 5-misli, ekseriyetle en azından 10-misli, tercihen en azından 20-misli, daha çok tercihen edilen en azından 40-misli ve en çok tercihen edilen 40-misli üzerinde olduğunda aktivasyon elde edilmektedir.
- 15 Aktivasyon veya inhibisyonadaki bitim noktaları aşağıdaki şekilde izlenebilir. Bir hücrenin, fizyolojik sıvının, dokunun, organın ve hayvan veya insan deneğin aktivasyon, inhibisyon ve tedaviye olan tepkisi bir bitim noktası ile izlenebilir. Bitim noktası, sitokin, toksik oksijen veya proteaz salınımı gibi inflamasyon belirtileri, onkojenikliği veya hücre degranülasyon veya salgılamının önceden belirlenmiş miktar 20 veya yüzdesini içerebilir. Bitim noktası, iyon akış veya taşınmanın önceden belirlenmiş miktarı; hücre göçü; hücre yapışması; hücre çoğalması; metastaz potansiyeli; hücre farklılaşması ve fenotipteki değişiklik; inflamasyon, apoptoz, değişim, hücre döngüsü veya metastaz ile ilgili gen ifadesindeki değişiklikler içermektedir. (bakınız, Knight (2000) Ann. Clin. Lab. Sci. 30:145-158; Hood ve Cheresch (2002) Nature Rev. Cancer 25 2:91-100; Timme ve arkadaşları (2003) Curr. Drug Targets 4:251-261; Robbins ve Itzkowitz (2002) Med. Clin. North Am. 86:1467-1495; Grady ve Markowitz (2002) Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3:101-128; Bauer, ve arkadaşları (2001) Glia 36:235-243; Stanimirovic ve Satoh (2000) Brain Pathol. 10:113-126).
- 30 İnhibisyonun bitim noktası genellikle kontrolün %75'i veya daha azı, tercihen kontrolün %50'si veya daha azı, tercihen kontrolün %25'i veya daha azı ve en çok tercih edilen şekilde kontrolün %10'u veya daha azıdır. Genel olarak, aktivasyonun bitim noktası kontrolün en az %150'si, tercihen kontrolün en az iki katı, tercihen kontrolün en az dört katı ve en çok tercih edilen şekilde kontrolün en az on katıdır.

“Küçük molekül”, moleküler ağırlığı 10 kDa’dan daha az, genellikle 2 kDa’dan az ve tercihen 1 kDa’dan az olan bir molekül olarak tanımlanmıştır. Küçük moleküller, bunlarla sınırlı olmaksızın, organik olmayan molekülleri, organik molekülleri, organik olmayan bileşen içeren organik molekülleri, radyoaktif atom içeren molekülleri, sentetik molekülleri, peptit taklitleri ve antikor taklitleri içermektedir. Bir tedavi edici olarak, küçük bir molekül büyük olanlara oranla hücrelere daha kolay nüfuz edebilen, aşamalı bozunmaya daha karşı daha hassas ve bağışıklık tepkisi göstermeye daha elverişlidir. Antikorların ve sitokinlerin peptit taklitleri, aynı zamanda küçük molekül toksinleri, gibi küçük moleküller tanımlanmıştır. Bakınız, *örneğin* Casset ve arkadaşları (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 307:198-205; Muyldermans (2001) J. Biotechnol. 74:277-302; Li (2000) Nat. Biotechnol. 18:1251-1256; Apostolopoulos ve arkadaşları (2002) Curr. Med. Chem. 9:411-420; Monfardini ve arkadaşları (2002) Curr. Pharm. Des. 8:2185-2199; Domingues ve arkadaşları (1999) Nat. Struct. Biol. 6:652-656; Sato ve Sone (2003) Biochem. J. 371:603-608; U.S. Patent No. 6,326,482.

“Özellikle” veya “seçilerek”, bir ligand/alıcı, antikor/antijen veya diğer bağlantı çiftine atıfta bulunulurken, heterojen proteinler ve diğer biyolojik ürünler popülasyonu içindeki proteinin mevcudiyetini belirleyen bağlayıcı reaksiyonu göstermektedir. Dahası, uygulanan koşullar altında, belirlenmiş bir ligand belirli bir alıcıya bağlanmış ve örnek içinde var olan diğer proteinlere dikkate değer bir oranda bağlanmamaktadır. Burada kullanıldığı şekilde, bir antikor IL-23p19 özellikle verilen dizilimi (bu durumda IL-23p19) içeren polipeptide bağlandığı denildiğinde, bu durum IL-23p19 dizilimi içeren polipeptide bağlandığını, IL-23p19 dizilimi içermeyen proteinlere bağlanmadığını göstermektedir. Örnek olarak, IL-23p19 içeren bir polipeptide özellikle bağlanmış olan bir antikor, FLAG®-işaretli formdaki bir IL-23p19’ye bağlanabilir fakat diğer FLAG®-işaretli proteinlere bağlanmaz.

Antikor veya bir antikorun antijen-bağlayıcı alanından türetilmiş bağlantı bileşiminin kendi antijeni ile olan benzeşimi geliştirilmiş yöntemle ilgili olmayan antijenleri olan benzeşiminden en azından iki misli daha büyük, tercihen en azından on katı daha büyük, tercihen en azından yirmi misli daha büyük ve en çok tercih edilen şekilde 100 katı daha büyük oranda bağlanmaktadır. Tercihen edilen uygulamada, örn. Statcchard analizi ile antikorun yaklaşık 10^9 litre/mol’dan daha fazla bir benzeşimi bulunmaktadır. Munsen ve arkadaşları (1980) Analyt. Biochem. 107:220-239.

Burada kullanıldığı şekilde “bağışıklık sistemini düzenleyici etken”, bağışıklık tepkisini bastırmak veya düzenlemek için olan doğal veya sentetik etkenleri ifade etmektedir. Bağışıklık tepkisi humoral veya hücreselel tepki olabilir. Bağışıklık sistemini düzenleyici etkenler, bağışıklık sistemini baskılayan veya anti-inflamatuar etkenleri kapsamaktadır.

5

Burada kullanılan “bağışıklık sistemini baskılayan etmenler”, “bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar” veya “bağışıklık sistemini koruyucular”, bağışıklık sistemi aktivitesini engellemek veya önlemek için bağışıklık sistemini baskılama tedavisinde kullanılan tedavi edicilerdir. Klinik olarak, nakledilmiş organların ve dokuların (örn. kemik iliği, kalp, karaciğer) reddedilmesini önlemek ve/veya otoimmün hastalıkların veya yüksek ihtimalle otoimmün orijinli hastalıkların (örn. romatoid artrit, miyastenia gravis, sistemik lupus eritematoz, ülseratif kolit, multipl skleroz) tedavisi için kullanılmaktadır. Bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar dört grupta sınıflandırılabilir: glukokortikoid sitostatikler; antikorlar (Biyolojik Tepki Değiştiriciler veya DMARDlar dahil); immünofilin olarak kullanılan ilaçlar; proliferatif bozuklukların tedavisinde kullanılan bilinen kemoterapötik etmenler dahil diğer ilaçlar). Özellikle multipl skleroz için, mevcut bulustaki antikorlar kopaksonlar olarak bilinen miyelin bağlantılı yeni tür protein-benzeri tedavi ediciler ile birlikte verilebilirler.

20 “Anti-inflamatuar etmenler” ve “anti-inflamatuar ilaçlar”, steroid yapı olan ve olmayan tedavi edicileri temsil etmektedir. Kortikosteroidler olarak da bilinen steroidler, kortizola en yakından benzeyen, böbreküstü bezleri tarafından doğal yollarla üretilen bir hormondur. Steroidler, sistemik vaskülit (kan damarlarının kızarması) ve Miyozit (kasların inflamasyonu) gibi belirli inflamasyon koşulların temel tedavisinde kullanılmaktadır. Steroidler ayrıca, romatoid artrit (vücudun her iki tarafındaki eklemlerdeki kronik inflammatuar artrit); sistemik lupus eritematoz (olağandışı bağışıklık sistemi çalışmasının neden olduğu genelleşmiş hastalık); Sjögren sendromu (kuru gözler ve ağız ile oluşan kronik hastalık) gibi inflammatuar koşulların tedavisinde seçilerek kullanılabilir.

30

Steroid olmayan, anti-inflamatuar ilaçlar, genelde NSAIDler olarak kısaltılan, ağrı kesici, ateş düşürücü ve anti-inflamatuar etkileri olan – ağrı, ateş ve iltihaplanmayı azaltan- ilaçlardır. “Steroid olmayan” terimi, benzer eikosanoid-bastırıcı, anti-inflamatuar etkisi olan (diğer bir çok etkilerinin arasında) steroid ilaçlardan ayrıtılması için kullanılmıştır. NSAIDler genellikle aşağıdaki koşullarda semptomların

35

giderilmesini belirtmektedir: romatoid artrit; osteoartrit; inflamatuvar artropatiler (ankilozan spondilit, psoriatik artrit, Reiter sendromu); akut gut hastalığı; ağrılı ve zor menstürasyon, metastatik kemik ağrısı; baş ağrısı ve migren; ameliyat sonrası ağrı; inflamasyon ve doku yaralanmasına bağlı hafif-orta ağrı; ateşlenme ve renal kolik).

5 NSAIDler salisilatlar, arilaklanoik asitler, 2-arylpropionic asitler (profenler), N-arilantranilik asitler (fenamik asitler), oksikamlar, koksibler ve sülfonanilidleri içermektedir.

II. Genel

10

Mevcut buluş, istemlerde tanımlandığı üzere geliştirilmiş anti-IL-23 antikoru ve istemlerde tanımlandığı üzere bunların inflamatuvar, otoimmün ve proliferatif bozukluklardaki kullanımını öngörmektedir.

15

Çeşitli sayıdaki sitokinlerin patolojide veya nörolojik bozuklukların tamir edilmesinde rolü vardır. IL-6, IL-17, interferon-gamma (IFN γ) ve granulosit koloni-uyarıcı etmeni (GM-CSF) multipl skleroz ile ilişkilendirilmiştir. Matusevicius ve arkadaşları (1999) *Multipl Sclerosis* 5:101-104; Lock ve arkadaşları (2002) *Nature Med.* 8:500-508. IL-1alfa, IL-1beta, ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta 1 (TGF-beta1) ALS, Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında rol oynamaktadır. Hoozemans ve arkadaşları (2001) *Exp. Gerontol.* 36:559-570; Griffin ve Mrak (2002) *J. Leukocyte Biol.* 72:233-238; Ilzecka ve arkadaşları (2002) *Cytokine* 20:239-243. TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8, interferon-gamma ve IL-17 beyin anemisine olan tepkiyi düzenlediği izlenimi vermektedir. Bakınız, *örneğin* Kostulas ve arkadaşları (1999) *Stroke* 30:2174-2179; Li ve arkadaşları (2001) *J. Neuroimmunol.* 116:5-14. Vasküler endotelial hücre büyüme faktörü (VEGF) ALS ile ilişkilendirilmiştir. Cleveland ve Rothstein (2001) *Nature* 2:806-819.

20

25

Crohn hastalığı, çölyak hastalığı ve hassas bağırsak sendromu gibi inflamatuvar bağırsak bozuklukları bağışıklık sistemi hücreleri ve sitokinler tarafından yönetilirler.

30

Örneğin, Crohn hastalığı artırılmış IL-12 ve IFN γ ile ilişkilendirilirken, ülseratif kolit artırılmış IL-5, IL-13 ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGFbeta) ile ilişkilendirilmektedir. IL-17 ekspresyonu Crohn hastalığının ve ülseratif kolitte artış meydana getirebilir. *Bakınız, örn.,* Podolsky (2002) *New Engl. J. Med.* 347:417-429; Bouma ve Strober (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3:521-533; Bhan ve arkadaşları (1999) *Immunol. Rev.* 169:195-207; Hanauer (1996) *New Engl. J. Med.* 334:841-848; Green

35

(2003) The Lancet 362:383-391; McManus (2003) New Engl. J. Med. 348:2573-2574; Horwitz ve Fisher (2001) New Engl. J. Med. 344:1846-1850; Andoh ve arkadaşları (2002) Int. J. Mol. Med. 10:631-634; Nielsen ve arkadaşları (2003) Scand. J. Gastroenterol. 38:180-185; Fujino ve arkadaşları (2003) Gut 52:65-70.

5

IL-23 alıcısı, IL-23R ve IL-12R β 1 alt ünitelerinin heterodimerik bir tümleşigidir. Parham ve arkadaşları (2000) J. Immunol. 168:5699. IL-12. IL-12 alıcısı, IL-12R β 1 ve IL-12R β 2 alt ünitelerinin tümleşigidir. Bakınız, Presky ve arkadaşları (1996) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:14002. IL-23R, inflamatuvar bağırsak bozuklukları, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit içinde kritik genetik bir faktör olarak ima edilmektedir. Duerr ve arkadaşları (2006) Scienceexpress 26-October-2006:1. Genom çapındaki ilişkilendirme çalışması, IL-23R'nin yüksek oranda Crohn hastalığı için, bu hastalığı karşı yüksek oranda koruma sunmakta olan olağandışı kodlama varyantı (Arg381 Gln) ile beraber, ilişkilendirildiğini ortaya koymaktadır. Bu genetik ilişkilendirme, IL-23 ve alıcısının IBD'yi tedavi etmek için yeni tedavi edici yaklaşımlar olduğu varsayımındaki önceki biyolojik buluşları (Yen ve arkadaşları (2006) J. Clin. Investigation 116:1218) onaylamaktadır.

Derinin, eklemlerin, CNS, aynı zamanda proliferatif bozuklukların inflamatuvar hastalıkları benzer tedavi tepkileri ortaya koymakta, dahası IL-23 blokajı bu gibi bağışıklık aracılığıyla ortaya çıkan inflamatuvar bozuklukların inhibisyonunu sistemik enfeksiyonları ile savaşmak için barındırma kabiliyetini kapsamadan sağlamalıdır. IL-23'ü tersine çevirmek, inflamatuvar bağırsak hastalığı, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, romatoid artrit, psoriatik artrit, sedef hastalığı, ankilozan spondilit ve atopik dermatit ile ilişkilendirilmiş inflamasyonu hafifletmektedir. IL-23 engelleyicilerin kullanılması, kanser ve multipl skleroz, tip 1 diyabet ve SSE gibi otoimmün bozukluklar gibi proliferatif bozuklukların inhibisyonunu sağlayacaktır. Çeşitli bozukluklardaki IL-23 tanımlamaları aşağıdaki yayınlanmış PCT uygulamalarında bulunabilir: WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; ve WO 01/18051. IL-23 önleyicileri, bakteriyel, mikobakteriyel, viral ve mantarsı enfeksiyonlar gibi kronik enfeksiyonlar dahil olarak, enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı görülmektedir.

IL-23'ün p19 alt ünitesi, hematopoietik sitokin 'uzun zincir' ailesinin (Oppmann ve arkadaşları (2000) yukarıda verilmektedir) bir üyesidir ve yukarı-yukarı-aşağı-aşağı topoloji ile A, B, C ve D olarak isimlendirilmiş dört adet sıkıştırılmış a-heliksler içermektedir. Bu dört heliks 3 polipeptit ile bağlantılıdır. A-B ve C-D döngüleri, paralel

35

- helikslere göreceli olarak bağlı oldukları sürece biçimlendirilmişlerdir. Kısa B-C döngüsü paralel olmayan B ve C döngülerine bağlıdır. IL-23'ün p19 alt ünitesi sarmalsı sitokinlerin IL-6 ailesinin bir üyesidir. Bu sitokin ailesi, kendi aynı soydan gelen alıcılarına üç korunumlu epitoplar ile bağlıdır (site I, II ve III; Bravo ve Heath (2000) EMBO J. 19:2399-2411). p19 alt ünitesi bu üç sitokin alıcı alt ünitesi ile uygun bir sinyal gönderme tümleşliği oluşturmak için etkileşim halindedir. Bir hücre içinde açığa vurulduğunda, p19 alt ünitesi öncelikle IL-12 ile paylaştığı p40 alt ünitesi ile bir kompleks oluşturur. Yukarıda belirtildiği üzere, p19p40 kompleksi, bir heterodimerik protein ve IL-23 olarak adlandırılarak hücreden gizlenir. Bakınız, örn., Oppmann ve arkadaşları, *yukarıda verilmektedir*. Hücresel alıcı kompleksi, IL-6/IL-12 sitokin ailesi uzun sinyal gönderme alıcı alt ünitenin iki adet üyesinden oluşan IL-23 sinyaline uyum sağlamak için gereklidir, IL-23-özgü IL-23R (bakınız, örn., Parham ve arkadaşları, *yukarıda verilmektedir*) ve IL-12Rb1, IL-12 ile paylaşılmaktadır.
- 15 'Uzun zincir' sitokin/alıcı tanımlamanın yapısal temeline doğru olan anlayış, geniş alanlardaki protein yüzeylerinin sitokin – alıcı tümleşiklerinin formasyonu için gömülmüş olmasına rağmen, etkileşimin benzerliği bir kaç, genelde sıkıca kümelenmiş amino asit kalıntılarının bağlama ara yüzeyinin merkezinde enerjik bir 'sıcak nokta' oluşturduğunu göstermektedir. Geniş protein-protein ara yüzünün bağlanma enerjisine hakim olan
- 20 kalıntıların kimliği "fonksiyonel epitop" olarak adlandırılmıştır. Etkileşimin benzerliği (dolayısıyla biyolojik spesifiklik) bu nedenle ligand ve alıcının fonksiyonel epitopların yapısal tamamlayıcılığı ile tanımlanmaktadır. Detaylı mutagenез çalışmaları, sitokinler ve alıcıların fonksiyonel epitoplarını oluşturan en belirgin kalıntıların triptofan, kutupsuz yan zincirlerin alifatik bileşenleri gibi kutupsuz yan zincirler ya da polipeptit omurga ile
- 25 ilgili hidrofobik temaslar olduğunu göstermektedir. Bağlayıcı enerji için, kutupsuz olan 'çekirdek' daha az önemi olan polar kalıntıları halkası ile sarılmıştır. Kinetik çalışmalar fonksiyonel epitopların birincil görevinin tümleşğin çözünüm oranını düşürerek protein-protein etkileşimini dengelemesi olduğu göstermektedir. Sitokin ve alıcı arasındaki ilk temas rastlantısal dağılım veya bir çok stabil olmayan temasları üreten protein
- 30 yüzeylerinin 'yuvarlanması' olduğunu varsayılmaktadır. Tümleşik, alıcı ve ligandın fonksiyonel epitopları birbirine geçtiğinde dengelenmektedir. Bakınız, örn., Bravo ve Heath, *yukarıda verilmektedir*.

III. IL-23'e özgü Antikorların Üretimi

Monoklonal antikorların üretilmesi için uygun olan herhangi bir yöntem kullanılabilir. Örneğin, bir alıcı bağlanmış veya bağlanmamış (örn. doğal olarak meydana gelen) formdaki IL-23 heterodimer veya onun bir parçası ile bağışıklık kazandırılabilir. Uygun herhangi bir bağışıklık kazandırma yöntemi kullanılabilir. Bu gibi yöntemler, destekleyiciler, diğer immünostimülanlar, tekrarlayan arttırıcı bağışıklıkları içerebilir ve bir veya daha fazla bağışıklık yolu kullanılabilir.

Uygun herhangi bir IL-23 kaynağı, burada açıklanmış olan bileşimler ve yöntemlerle, özellikle p19 alt ünitesi için, insan olmayan antikorların üretilmesi için immünojen olarak kullanılabilir. Bu tür oluşumlar, bunlarla sınırlı olmaksızın, bilinen rekombinant, sentetik, kimyasal ve enzimatik bozunum vasıtasıyla oluşturulmuş olan bağlanmış veya doğal olarak meydana gelen heterodimerler, peptit(ler) ve epitopları içermektedir.

Herhangi bir formdaki antijen, biyolojik olarak etkin bir antikor üretmek için yeterli olan antikoru üretmek için kullanılabilir. Dahası, temin edilen antijen, tekli epitop, çoklu epitoplar veya tek başına protein veya tekniğin bilinen durumu ile bir veya daha fazla bağışıklık sağlayıcılığı arttıran etken olabilir. Elde edilen antijen, izole edilmiş tam-uzunlukta bir protein, bir hücre yüzeyi protein (örn. en azından bir kısım antijen ile nükleik asit verilmiş hücrelerin bağışıklık kazandırılması) veya çözünür karakterli bir protein (örn. sadece proteinin hücre dışı etki alanı kısmı ile bağışıklık kazandırılmış) olabilir. Antijen genetik olarak değiştirilmiş hücre içinde üretilir. Antijeni kodlayan DNA genomik veya genomik olmayabilir (örn. cDNA) ve hücre dışı etki alanının en azından bir kısmını kodlamaktadır. Burada kullanıldığı şekilde "kısım" terimi, uygun görüldüğü şekilde, ilgilenilen antijenin bağışıklık sağlayıcı epitopunu oluşturmak için asgari sayıdaki amino asitleri veya nükleik asitleri ifade etmektedir. İlgiilenilen hücrelerin transformasyonu için adenoviral vektörler, plazmidler ve katyonik lipidler gibi viral olmayan vektörler dahil olarak, bunlarla sınırlı olmaksızın, herhangi bir genetik vektör olabilir.

IL-23'ü inhibe etmek için istenilen biyolojik özelliklere sahip bir antikoru elde etmek için herhangi uygun bir yöntem kullanılabilir. Fare, kemiriciler, primatlar, insanlar gibi çeşitli memeli konaklardan alınan monoklonal antikorları (mAbs) hazırlamak istenildiğinde, bu gibi monoklonal antikorları hazırlama tekniklerinin anlatımı aşağıdaki kaynaklarda bulunabilir; *örneğin* Stites ve arkadaşları (ed.) BASIC ve CLINICAL IMMUNOLOGY (4. Baskı) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, ve Harlow ve Lane (1988)

- ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press; Goding (1986) MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES ve PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, NY. Dahası, monoklonal antikorlar bu bilim dalında uzmanlaşmış araştırmacıların tanındık olduğu çeşitli teknikler ile sağlanabilir. Genel olarak, istenilen antijen ile bağışıklık
- 5 kazandırılmış olan hayvandan alınan dalak hücreleri miyelom hücreleri ile sıradan şekilde füzyona girmesiyle ölümsüzleşmiştir. Bakınız, Kohler ve Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6:511-519. Ölümsüzleştirmenin alternatif yöntemleri, Epstein Barr Virüsü ile transformasyon, onkojenler veya retrovirüsler veya bilinen diğer yöntemleri içermektedir. Bakınız, *örneğin* Doyle ve arkadaşları (ed. 1994 ve periodic supplements)
- 10 CELL ve TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, New York, NY. Tek bir ölümsüzleştirilmiş hücreden meydana gelen koloniler, istenilen özgünlükteki antikorların üretimi ve antijenlerin benzeşimi için incelenmekte ve bu gibi hücrelerden üretilen monoklonal antikorların miktarı, omurgalı konağın periton boşluğu içerisinde enjekte edilmesi dahil olarak, çeşitli teknikler ile geliştirilebilir. Alternatif
- 15 olarak, insan B hücrelerinden gelen DNA'yi tarayarak monoklonal antikorun veya bununla ilgili antijen bağlayıcı parçayı kodlayan DNA dizilimlerini izole etmek için Huse ve arkadaşları (1989) Science 246:1275-1281 tarafından genel protokolün ana hatları kullanılabilir.
- 20 Diğer uygun teknikler aşamadaki veya benzer vektörlerdeki antikor yığından seçilmesini kapsamaktadır. Bakınız, Huse ve arkadaşları *yukarıda verilmektedir*, ve Ward ve arkadaşları (1989) Nature 341:544-546. Burada açıklanan polipeptitler ve mevcut buluşun antikorları, kimerik veya hümanize antikorlar dahil şekilde değiştirim olmaksızın kullanılabilir. Çoğunlukla polipeptitler ve antikorlar, eşdeğerli olarak veya
- 25 olmayarak, saptanabilir bir sinyali oluşturmak için bir madde birleştirerek etiketlenebilirler. Çok çeşitli etiketler ve bağlanım teknikleri bilinmekte ve hem bilimsel hem de patent kaynakçalarında kapsamlı şekilde rapor edilmiştir. Uygun olan etiketler, radyonüklidler, enzimler, substratlar, eşçarpanlar, engelleyiciler, floresan parçalar, kimyasal parlaklık parçaları, manyetik partiküller ve benzerlerini içermektedir. Bu tür
- 30 etiketlerin kullanımını gösteren patentler: ABD Patent No. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; ve 4.366.241'dir. Ayrıca, rekombinant bağışıklık sistemi destekleyiciler üretilebilir. bakınız Cabilly U.S. Patent No. 4.816.567; ve Queen ve arkadaşları (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; veya transgenik fare içinde gerçekleştirilebilir. Bakınız Mendez ve arkadaşları (1997) Nature
- 35 Genetics 15:146-156. Ayrıca bakınız Abgenix ve Medarex teknolojileri.

IL-23'ün önceden belirlenmiş parçalarına karşı olan antikorlar veya bağlayıcı bileşimler, polipeptitlerin, parçaların, peptitlerin bağlayıcıları ve taşıyıcı proteinli epitoplar ile hayvanlara bağışıklık kazandırılma arttırılabilir. Monoklonal antikorlar, istenilen antikorun gizlendiği hücrelerden hazırlanmaktadır. Bu antikorlar, normal veya kusurlu IL-23'e bağlanması için taranabilirler. Bu monoklonal antikorlar özellikle ELISA tarafından belirlenmiş olan yaklaşık 1 μ M'nin asgari olarak K_d , genellikle en azından 300 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM veya daha iyisi ile bağlanmıştır. Uygun olan insan olmayan antikorlar, aşağıdaki Örnekler 5 ve 6'da anlatıldığı şekilde biyolojik ölçümler kullanılarak belirlenebilir.

10

Antikor 13B8'i dışı vuran bir hibridom Kayıt Numarası PTA-7803 ile 17 Ağustos 2006 tarihinde Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonda (ATCC - Manassas, Virginia, ABD) Budapeşte Anlaşmasına uygun olarak depolanmıştır.

15 **IV. IL-23'e özgü Antikorların İnsanlaştırılması**

Uygun herhangi bir insan olmayan antikor çok değişkenli alan için kaynak olarak kullanılabilir. İnsan olmayan antikorlar için olan kaynaklara, bunlarla sınırlı olmaksızın, fare, lagamorfalar (tavşanlar dahil), büyükbaş hayvanlar ve primatlar dahildir. Esas itibarıyla hümanize antikorlar, istenilen özgüllüğe, benzeşime ve kapasiteye sahip fare, sıçan, tavşan veya insan olmayan primat gibi insan olmayan türlerden (donör antikor) alınan çok değişken bölge kalıntıları ile değiştirilen alıcının çok değişkenli bölge kalıntıları içindeki insan immünoglobulinleridir (alıcı antikor). Bazı durumlarda, insan immünoglobulinin Fv çerçeve bölgesi (FR) kalıntıları ilgili insan olmayan kalıntılar ile değiştirilir. Dahası, hümanize antikorlar alıcı antikor veya donör antikorunda bulunmayan kalıntıları içerebilirler. Bu modifikasyonlar, istenilen biyolojik aktivitenin antikor performansını geliştirmek için yapılmaktadır. Detaylı bilgi için, bakınız Jones ve arkadaşları (1986) Nature 321:522-525; Reichmann ve arkadaşları (1988) Nature 332:323-329; ve Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596.

30

Genetik mühendislik yöntemleri ile üretilen antikorlar aşağıdaki makalelerde anlatılmıştır, örn. Boss ve arkadaşları (U.S. Pat. No. 4,816,397), Cabilly ve arkadaşları (U.S. Pat. No. 4,816,567), Law ve arkadaşları (Avrupa Patent Başvuru Yayını No. EP438310A1) ve Winter (Avrupa Patent No. EP239400B1).

35

Hümanize anti-IL-23 antikorunun amino asit dizilim varyantları, hümanize anti-IL-23 antikor DNA'ya yapılan uygun nükleotid değişikliklerinin uygulanması veya peptit sentezi ile yapılmaktadır. Bu gibi varyantlar, hümanize anti-IL-23 antikor için gösterilen amino asit dizilimleri içerisindeki kalıntılardan çıkarılmalar ve/veya eklemeler ve/veya

5 değiştirmeleri içermektedir. Çıkartma, ekleme ve değiştirme kombinasyonlarından herhangi biri, nihai oluşum istenilen karakteristik özelliklere ulaşması için nihai oluşum aşamasında yapılmaktadır. Amino asit değişiklikleri, glikosilasyon alanlarının sayısının veya pozisyonun değiştirilmesi gibi hümanize IL-23 antikorunun post-translasyonel süreçlerini değiştirebilir.

10

Hümanize anti-IL-23p19 antikor polipeptidin belirli kalıntıları veya bölgelerini belirlemek için kullanışlı bir yöntem, Cunningham ve Wells (1989) Science 244: 1081-1085 tarafından anlatılmış olan “alanın tarama mutagenез” olarak adlandırılan tercih edilen mutagenез lokasyonlarıdır. Burada, amino asitlerin IL-23 antijen ile etkileşimini

15 etkilemek için bir kalıntı veya hedef grup kalıntıları nötr veya negatif olarak yüklenmiş amino asit (tercihen alanin veya polialinin) ile belirlenir (Arg, Asp, His, Lys ve Glu gibi yüklenmiş kalıntılar) veya değiştirilir. Değiştirmelere fonksiyonel hassaslık gösteren amino asit kalıntıları sonrasında, değişim alanlarında veya onlar için eklenen ve diğer varyantların uygulanmasıyla rafine edilirler. Böylelikle, amino asit dizilimin varyasyonun

20 uygulanacağı alan önceden belirlendiğinde, mutasyonun doğasında tek başına önceden belirlenmesi gerekmemektedir. Örnek olarak, alandaki bir mutasyonun performansını analiz etmek için Ala taraması veya rastlantısal mutagenез, hedef dizgi veya bölgede gerçekleştirilir ve dışı vuran hümanize anti-IL23p19 antikor varyantı istenilen aktivite için taranır.

25

Amino asit dizilim yerleştirmeleri, yüz veya daha fazla kalıntı, aynı zamanda tek veya çoklu amino asit kalıntılarının içinde bulunan dizilimleri de, kapsayan polipeptitlere olan tek bir kalıntıdan gelen amino- ve/veya karboksil-terminal füzyonları içermektedir. Terminal yerleştirme örnekleri, N-terminal metiyonil kalıntı veya bir epitop etiketine

30 kaynaşmış antikor ile birlikte hümanize anti-IL-23 antikorunu içermektedir. Hümanize anti-IL-23 antikor molekülünü diğer yerleştirme varyantları, antikorun serum yarı ömrünü arttıran bir enzim veya polipeptidin hümanize anti-IL-23 antikorunun N- veya C-sınırına olan füzyonu içermektedir.

Diğer bir tip varyant ise amino asit değiştirme varyantıdır. hümanize anti-IL-23 antikorunda içinde en azından bir adet amino asit kalıntısına sahip olan bu varyantlar çıkartılır ve yerlerine farklı bir kalıntı yerleştirilir. Değişim mutagenез için olan yakından ilgilenilen alanlar çok değişkenli döngüleri içermekte fakat FR alterasyonları da dikkatle izlenmektedir.

Antikoru diğer tip amino asit varyantı antikoru orijinal glikosilasyon örüntüsünü değiştirmektedir. Değiştirmek ile kastedilen antikorda bulunan bir veya daha fazla karbonhidrat parçasını çıkartılması ve/veya antikorda bulunmayan bir veya daha fazla glikosilasyon alanının eklenmesidir. Antikorların glikosilasyonu genellikle N-bağlantılı veya O-bağlantılıdır. N-bağlantılı olan, asparajin kalıntısının yan zincirine olan karbonhidrat parçasının eklenmesidir. X'in prolin haricindeki herhangi amino asit olduğu asparajin-X-Serin ve asparajin-X-treonin tripeptit dizilimleri asparajin yan zincirine olan karbonhidrat parçasının enzimatik olarak eklenmesi için tanınma dizilimleridir. Dahası, bu tripeptit dizilimlerin bir polipeptit içinde olması potansiyel bir glikosilasyon alanı oluşturmaktadır. O-bağlantılı glikosilasyon, N-asetilgalaktozamin, galaktoz veya ksiloz şekerlerinden birinin hidroksilamin aside, genellikle serin veya treonin, 5-hidroksiprolin veya 5-hidroksilinin kullanılmış olmasına rağmen eklenmesini ifade etmektedir.

Glikosilasyon alanlarının antikora eklenmesi, yukarıda belirtilen tripeptit dizilimlerinden (N-bağlantılı glikosilasyon alanları için) biri veya daha fazlasını içeren amino asit diziliminin değiştirilmesi ile kolaylıkla sağlanmaktadır. Değiştirme bir veya daha fazla serin veya treonin kalıntısının orijinal antikor dizilimine eklenmesi veya çıkartılması ile gerçekleştirilebilir.

Amino asit varyantının diğer türü ise nihai hümanize antikor için daha iyi kimyasal stabilite sağlamak için kalıntıların çıkartılmasıdır. Örneğin, bir asparajin (N) kalıntısı bir kemirgen CDR ile herhangi NG dizilimindeki potansiyel izoaspartat formasyonunu azaltmak için değiştirilebilir. Aynı sorun DG diziliminde de ortaya çıkabilir. Reissner ve Aswad (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60:1281. İzaoaspartat formasyon, antikoru kendi hedef antijenine bağlanmasını zayıflatır veya tamamen ortadan kaldırabilir. Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 at 734. Bir uygulamada asparajin, glutamin (Q) ile değiştirilmiştir. Buna ek olarak kemirgen CDRler içindeki metionin kalıntıları, antijen bağlanma benzeşimini ve ayrıca nihai antikor hazırlamadaki moleküler

heterojenliğe katkıda bulunmak için metionin sülfürün okside olma olasılığını azalmak için değiştirilebilir. Bir uygulamada metionin, alanin (A) ile değiştirilmiştir. Bu gibi değiştirmeleri olan antikorlar, değiştirmelerin IL-23p19 bağlanma benzeşim için kabul edilemeyen seviyelere düşmemesi için bilahare taranmaktadır.

5

Hümanize IL-23'e özgü antikorlarının amino asit dizilim varyantlarını kodlayan nükleik asit molekülleri bu bilim dalında bilinen çeşitli yöntemlerle hazırlanmaktadır. Bu yöntemler, bunlarla sınırlı olmaksızın, doğal kaynaktan izolasyonu (doğal olarak ortaya çıkan amino asit dizilim varyantları durumunda) veya oligonükleotid-yoluyla (veya alan-
10 yönlendirmeli) mutagenezi, PCR mutagenezi ve daha önceden hazırlanmış varyantın kaset mutagenezi veya hümanize anti-IL-23p19 antikorunun varyant olmayan bir versiyonunu içermektedir.

Normal olarak, hümanize anti-IL-23 antikorun amino asit dizilim varyantları, tercihen en
15 azından %80, tercihen en azından %85, tercihen en azından %90 ve en çok tercih edilen şekilde en azından %95, 98 ve 99 ağır veya hafif zinciri olan orijinal hümanize amino asit dizilimleri ile birlikte en azından %75'lik bir amino asit dizilimine sahiptir. Bu dizilime ilişkin tanımlama veya homoloji, dizilimlerin ve uygulamaya konulan aralıkların hizalanmasından sonra, eğer gerekli ise, azami dizilim özdeşlik yüzdesinin başarıyla
20 gerçekleştirilmesi ve dizilim özdeşliğinin bir parçası olarak herhangi korunumlu değişiklikleri dikkate almaksızın hümanize anti-IL-23 kalıntıları ile özdeş olan aday dizilimler içindeki amino asit kalıntılarının yüzdesi olarak burada tanımlanmıştır. N-terminal, C-terminal veya antikor dizilimine yapılan dahili genişletmeler, çıkarımlar veya eklentiler dizilim özdeşliğini veya homolojisini etkileyecek şekilde yorumlanmayacaktır.

25

Hümanize antikor, IgM, IgG, IgD, IgA, ve IgE dahil olarak herhangi tipteki bir immünoglobulinden seçilebilir. Antikorun, IgC antikor olması tercih edilir. IgG₁, IgG₂, IgG₃, ve IgG₄ dahil olarak, IgG'nin herhangi bir izotopu kullanılabilir. IgG izotoplarının varyantları da dikkatle izlenmektedir. Hümanize antikor birden fazla sınıf veya izotoptan
30 gelen dizilimler içerebilir. İstenilen biyolojik aktivitenin oluşturulması için gerekli sabit etki alanı dizilimlerinin optimizasyonu, aşağıda belirtilen biyolojik deneylerdeki antikorların taranması ile kolaylıkla başarılmaktadır.

Aynı şekilde, hafif zincirin herhangi bir sınıfı buradaki bileşimler ve yöntemlerde kullanılabilir. Özellikle, bunlarla ilgili kappa, lambda ve de varyantları mevcut bileşim ve yöntemlerde yararlıdır.

- 5 İnsan olmayan antikordan gelen CDR dizilimlerinin herhangi uygun bir kısmı kullanılabilir. CDR dizilimleri, kullanılan insan ve insan olmayan antikor diziliminden farklı CDR dizilimden en azından bir kalıntının değiştirme, ekleme veya çıkarım ile mutasyona uğratılabilir. Bu tür mutasyonların minimal olması geliştirilmiştir. Genellikle, hümanize antikor kalıntılarını en az %75'i, çoğunlukla %90'ı ve en çok tercih edilen
- 10 şekilde %95'inden fazlasıyla insan olmayan CDR kalıntıları ile uyumludur.

- İnsan olan antikordan gelen FR dizilimlerinin herhangi uygun bir kısmı kullanılabilir. FR dizilimleri, kullanılan insan ve insan olmayan antikor diziliminden farklı FR dizilimden en azından bir kalıntının değiştirme, ekleme veya çıkarım ile mutasyona uğratılabilir. Bu
- 15 tür mutasyonların minimal olması geliştirilmiştir. Genellikle, hümanize antikor kalıntılarını en az %75'i, çoğunlukla %90'ı ve en çok tercih edilen şekilde %95'inden fazlasıyla insan olmayan FR kalıntıları ile uyumludur.

- CDR ve FR kalıntıları, Kabat'ın standart dizilim tanımlamasına göre belirlenmiştir.
- 20 Kabat ve arkadaşları (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. SEQ ID NO: 1-5 çeşitli fare anti-insan IL-23p19 antikorlarının ağır zincir değişken etki alanlarını ve SEQ ID NO: 9-13 ise hafif zincir değişken etki alan dizilimlerini tanımlamaktadır. ŞEKİLLER 1 ve 2, burada açıklanan çeşitli antikorlarının ağır ve hafif zincir değişken etki alanlarının dizilim sırasını
- 25 göstermektedir. CDRler şekiller içinde belirtilmiş ve her bir CDR dizilimi Tablo 7'de belirtilen kendine özgü Dizilim Tanımlayıcıları ile birlikte sunulmuştur.

- Antikor 13B8'in hümanize formları temin edilmiştir. Hümanize hafif zincir 13B8 dizilimi (kappa sabit bölgesi ile) SEQ ID NO: 14'de verilmiş, ve hafif zincir etki alanı bu dizilimin
- 30 1-108 kalıntılarını içermektedir. Hümanize 13B8 dizilimin üç versiyonu (yl sabit bölgesi ile) SEQ ID NO: 6-8'de verilmiş, ve ağır zincir değişken etki alanı bu dizilimlerin 1-116 kalıntılarını içermektedir. 13B8 ağır zincir varyantları, parental dizilimden olan farkları koyu puntıyla belirtilmiş şekilde, Tablo 2'de gösterilmiştir. Met (M), kalıntının oksidasyon potansiyelini ve antikoru etkisizleşmesini önlemek için Lys (K)'ye
- 35 değiştirilmiştir. AQKLQ'nun NEMFE için değiştirilmesi, antikoru insanlaştırmak için

seçilmiş olan insan çerçevesinden gelen germline dizilimi ile birlikte fare CDR diziliminin yer değiştirmesidir.

Tablo 2

Antikor 13B8 CDRH2 Varyantları

Antikor	CDRH2 Dizilimi	SEQ ID NO:
m13B8, h13B8-a	QIFPASGSADYNEMFEG	24
h13B8-b	QIFPASGSADYNEKFEG	25
h13B8-c	QIFPASGSADYAQKLQG	26

5

Burada açıklanmış olan diğer antikorların hümanize formları, parental kemirgen antikor CDRlerin SEQ ID NO: 14 ve 6'de verilmiş olan hümanize 13B8 için olan hafif ve ağır zincir dizilimleri içerisine basitçe değiştirilmesi ile oluşturulabilir. Bu yaklaşım, antikor 13B8'in CDRleri ile yüksek homolojiye sahip CDRleri olan antikor zincirleri için büyük

10

ihtimale başarılı olabilir, örn. ağır zincir üzerindeki klon 11C1 ve hafif zincir üzerindeki klonlar 11C1 ve 21D1. Alternatif olarak, fare antikorlar burada ana başlıkları ile verilen yaklaşımlar, örn. Örnek 2'deki, kullanılarak bağımsız şekilde insanlaştırılabilir.

15

Bir uygulamada CDRlar, burada (SEQ ID NO: 15-46) açıklanan, Tablo 1'deki veriler kullanılarak belirlenmiş olan, açıklanan dizilime ilişkin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veya daha fazla korunumlu amino asit değiştirmeleri içeren herhangi bir CDR diziliminin varyantlarını içermektedir.

20

Öngörülen diğer bir konuda kimerik antikorlardır. Yukarıda belirtildiği şekilde kendine özgü korlar, belirli türlerden türetilmiş veya belirli antikor sınıfına veya alt sınıfına ait antikorların içindeki ilgili dizilimler ile benzer veya türdeş olan ağır ve/veya hafif zincir kısımları içermekte, bu esnada zincir(ler)in geri kalan bölümü diğer türlerden türetilmiş veya diğer antikor sınıfına veya alt sınıfına, aynı zamanda bu gibi antikorların parçalarına da, ait olan antikorların içindeki ilgili dizilimler ile, istenilen biyolojik aktiviteyi

25

gösterdikleri sürece benzer veya türdeşler. Bakınız, ABD Patent No. 4,816,567; ve Morrison ve arkadaşları (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855.

Bispesifik antikorlarda mevcut yöntemler ve kompozisyonlarda yararlıdır. Burada kullanıldığı şekilde, "bispesifik antikor" terimi, genellikle monoklonal antikor, en azından

iki farklı antijenik epitop için bağlanma özgünlüğüne sahip bir antikoru ifade etmektedir, örn. IL-23p19 ve IL-17. Bir uygulamada, epitoplar aynı antijenden gelmektedir. Diğer bir uygulamada ise, epitoplar iki farklı antijenden gelmektedir. Bispesifik antikolar üretmek için olan yöntemler bilinmektedir. Örneğin bispesifik antikolar, iki adet immünoglobulin ağır zincir/hafif zincir çiftinin beraber dışavurumu kullanılarak rekombinant olarak üretilirler. Bakınız, Milstein ve arkadaşları (1983) Nature 305: 537-39. Alternatif olarak, bispesifik antikolar kimyasal bağlanım kullanılarak hazırlanabilirler. Bakınız, Brennan ve arkadaşları (1985) Science 229:81. Bispesifik antikolar, bispesifik antikor parçaları içermektedir. Bakınız, Holliger ve arkadaşları (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48, Gruber ve arkadaşları (1994) J. Immunol. 152:5368.

Diğer uygulamalarda, farklı sabit etki alanları burada verilen hümanize V_L ve V_H bölgelerine eklenebilir. Örnek olarak, eğer mevcut buluştaki antikorun (veya parçanın) amaçlanan kendine özgü kullanımı, değiştirilmiş etkileyici özellikleri için gerekli ise, IgG1'den ziyade ağır zincir sabit etki alanı kullanılabilir. IgG1 antikoları, tamamlayıcı aktivasyon ve antikor-bağımsız hücrel sitotoksite gibi uzun yarılanma süresi ve dengeleyici özellikler sağlamasına rağmen, bu tür aktiviteler antikorun bütün kullanımları için istenilmeyebilir. BU gibi durumlarda örneğin IgG4 kullanılabilir.

20 V. Hümanize Anti-IL-3'ün Biyolojik Aktivitesi

Hümanize anti-IL-23 antikoruna arzu edilir olarak burada belirtilen özelliklere sahip olan antikolar, *vücut dışında* önleyici biyolojik aktivite veya uygun bağlama afinitesi için taramadan geçirilebilir. İlgilenilen antikor ile bağlanan insan IL-23'ündeki (yani p19 alt birimindeki) epitopu bağlayan antikoları taramadan geçirmek için (*örneğin*, sitokin reseptörüne bağlanmasını engelleyenler), ANTİKORLAR, LABORATUAR EL KİTABI'nda (ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow ve David Lane (1988)) anlatılan şekilde rutin bir çapraz bloklama deneyi yapılabilir. Aynı epitopu bağlayan antikoların bu tür deneylerde çapraz bloklaması olasıdır ancak tüm çapraz bloklama antikolarının tam olarak aynı epitopu bağlaması gerekmez çünkü çapraz bloklama örtüşen epitoplarda veya hatta yakınlardaki örtüşmeyen epitoplarda antikolar tarafından antikoların bağlanmasının uzamsal olarak engellenmesinden kaynaklanabilir.

35 Alternatif olarak *örneğin*, Champe vd. (1995) J. Biol. Chem. 270:1388-1394'te

açıklandığı gibi epitop haritalama, antikorun ilgilenilen epitopu bağlayıp bağlamadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilebilir. Cunningham ve Wells (1989) Science 244: 1081-1085'de anlatıldığı gibi "Alanın tarama mutagenesi" veya insan IL-23'ündeki amino asit kalıntılarının başka bir nokta mutagenes şekli de mevcut buluşun anti-IL-23 antikoruna için işlevsel epitopun belirlenmesinde kullanılabilir. Ancak, mutagenes çalışmaları IL-23'ün genel üç boyutlu yapısı için çok önemli olan ancak antikor-antijen temaslarına doğrudan dahil olmayan amino asit kalıntılarını da ortaya çıkarabilir ve bu nedenle, bu yöntem kullanılarak belirlenen işlevsel bir epitopu teyit etmek için başka yöntemler gerekebilir.

10

Spesifik bir antikor tarafından bağlanan epitop, ayrıca insan IL-23'ü p19'unun parçalarından oluşan peptitlere antikorların bağlanmasını değerlendirerek de belirlenebilir (SEQ ID NO: 47). IL-12 ile IL-23'ün p40 dizisi, Gen Bankası Erişim No. P29460'da bulunmaktadır. IL-23p19 dizisini kapsayan örtüşen peptitlerin bir serisi 15 örneğin doğrudan (peptidin bir antikorun mikrotitre plakasının bir çukurcuğuna bağlanmış olan IL-23p19'a bağlanmasını önleme yeteneğinin değerlendirildiği) bir ELISA'da, rekabetçi bir ELISA'da veya bir çip üzerinde bağlama için sentezlenebilir ve taranabilir. Bu tür peptit tarama yöntemleri bazı süresiz işlevsel epitopları, yani IL-23p19 polipeptit zincirinin primer dizisi boyunca bitişik olmayan amino asidi kalıntılarını 20 içeren işlevsel epitopları tespit etme yetisine sahip olmayabilir.

Mevcut buluştaki antikorlar tarafından bağlanan epitop, serbest olduklarında ve ilgilenilen antikor ile bir tümleşğe bağlı olduklarında kararsız amid hidrojenlerin H-D değişim oranlarının NMR belirlemesi dahil X-ışını kristal yapı belirlemesi (örneğin, 25 WO2005/044853), moleküler modelleme ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopi gibi yapısal yöntemler ile de belirlenebilir. (Zinn-Justin vd.(1992) Biochemistry 31:11335-11347; Zinn-Justin vd. (1993) Biochemistry 32:6884-6891).

X-ışını kristalografisi ile ilgili olarak, kristalizasyon tekniğın bilinen yöntemlerinden 30 herhangi biri kullanılarak gerçekleştirilebilir (örneğin Giege vd. (1994) Acta Crystallogr. D50:339-350; McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189:1-23), örneğin mikro-seri (örneğin Chayen (1997) Structure 5:1269-1274), asılı damla buhar difüzyonu (örneğin McPherson (1976) J Biol. Chem. 251:6300-6303), ekme ve diyaliz kullanılarak gerçekleştirilebilir. En az 1 mg/mL ve tercihen yaklaşık 10 mg/mL ila 20 mg/mL arasında 35 konsantrasyona sahip bir protein müstahzarı kullanılması arzu edilir. Kristalizasyon

tercihen 5000 ila 7000 Da arasında ve daha çok arzu edilir şekilde yaklaşık 6000 Da civarında, konsantrasyonları %10 ila %30 aralığında (w/v) olmak üzere, polietilen glikol 1000-20,000 (PEG; 100 ile 20.000 Da arasında değişen aralıktaki ortalama molekül ağırlığı) içeren presipitan solüsyonunda en iyi şekilde elde edilebilir. Ayrıca %0,5 ila %20 aralığındaki konsantrasyona örneğin glikol gibi bir protein stabilize edici madde eklenmesi de arzu edilebilir. Sodyum klorid, lityum klorid veya sodyum sitrat gibi uygun bir tuz da tercihen 1 mM ila 1000 mM aralığındaki konsantrasyondaki presipitan solüsyonunda arzu edilebilir. Presipitan sıklıkla 7.0 ila 8.5'te örneğin pH 8.0'de yaklaşık 4.0'dan yaklaşık 10.0'a kadar bir pH'a tamponlanabilir. Presipitan solüsyonunda faydalı olan spesifik tamponlar farklılık gösterebilir ve teknikte iyi bilinmektedir. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York. Faydalı tampon örnekleri arasında HEPES, Tris, MES ve asetat yer almaktadır ancak bunlarla sınırlı değildir. Kristaller 2°C, 4°C, 8°C ve 26°C dahil çok çeşitli sıcaklıklarda yetiştirilebilir.

Antikor:antijen kristalleri iyi bilinen X-ışını kırınım teknikleri kullanılarak çalışılabilir ve X-PLOR gibi bilgisayar yazılımları kullanılarak yeniden tanımlanabilir (Yale University, 1992, Molecular Simulations, Inc. tarafından dağıtılmıştır; bkz. örneğin Blundell & Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114 & 115, H. W. Wyckoff vd. ed., Academic Press; ABD Patent Başvurusu Yayın No. 2004/0014194), ve BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, ed.; Roversi vd. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323).

Mevcut buluşun bir antikorlu olarak aynı epitopa bağlanan ilave antikorlar örneğin epitopa bağlanması için IL-23'e karşı yükseltelen antikorlar taranarak veya epitop dizisini içeren insan IL-23'ünün bir parçasını içeren bir peptit ile bir hayvana bağışıklık kazandırılarak elde edilebilir. Aynı işlevsel epitopa bağlanan antikorların reseptörlerin bağlanmasını engelleme gibi benzer biyolojik aktiviteler sergilemeleri beklenebilir ve bu tür aktiviteler antikorların işlevsel deneyleri ile teyit edilebilir.

Antikor afiniteleri (örneğin. insan IL-23'ü için) standart analiz kullanılarak belirlenebilir. Tercih edilen hümanize antikorlar, insan IL-23p19'u ile a K_d değeri yaklaşık 1×10^{-7} olacak şekilde bağlananlardır; tercihen yaklaşık 1×10^{-8} 'dan fazla değildir; daha da arzu edilen şekilde 1×10^{-9} 'dan fazla değildir; ve en çok arzu edilen şekilde 1×10^{-10} 'dan veya hatta 1×10^{-11} M'den fazla değildir.

Bunların mevcut bileşimlerde ve yöntemlerde faydalı olan antikorları ve parçaları biyolojik olarak aktif antikorlar ve parçalardır. Burada kullanıldığı şekliyle, "biyolojik olarak aktif" ifadesi arzu edilen antijenik epitopu bağlayabilen ve doğrudan veya dolaylı olarak biyolojik bir etkiye sahip olan bir antikora veya bir antikör parçasına işaret etmektedir. Tipik olarak, bu etkiler IL-23'ün reseptörünü bağlayamaması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Burada kullanıldığı şekliyle, "spesifik" terimi antikörün hedef antijen epitopuna seçici bağlanmasına işaret etmektedir. Antikörler, spesifik koşullar altında IL-23'e bağlanmayı alakasız bir antijene veya antijen karışımına bağlanmayla karşılaştırarak bağlanmanın özgüllüğü ile ilgili olarak test edilebilir. Antikör alakasız antijenle veya antijen karışımıyla karşılaştırıldığında IL-23'e en az 10 tercihen 50 kat daha fazla bağlanıyorsa, özgül olarak kabul edilir. IL-12'ye bağlanan antikör, IL-23'e özgü bir antikör değildir. IL-23p19'a "özellikle bağlanan" antikör, IL-23p19-türevi dizileri içermeyen proteinlere bağlanmaz, yani burada kullanılan şekliyle "spesifiklik" IL-23p19'un özgüllüğüyle ilgilidir ve söz konusu proteinde var olabilen diğer dizilerin hiç biriyle ilgili değildir. Örneğin, burada kullanılan şekliyle, IL-23p19'a "özellikle bağlanan" bir antikör, IL-23p19- içeren bir füzyon proteini olan FLAG®-hIL-23p19'a ve FLAG® peptit etiketine tipik olarak bağlanacaktır ancak tek başına veya IL-23p19 dışında bir protein ile füzyona girdiğinde FLAG® peptik takına bağlanmaz.

20

Mevcut buluşun önleyici IL-23p19'a özgü antikörler gibi IL-23'e özgü bağlayıcı bileşikler, peritoneal makrofajlar tarafından IL-1 β ve TNF ve T_H17 T hücreleri tarafından IL-17 üretimi dahil ancak bununla sınırlı olmamak kaydıyla herhangi bir şekilde kendi biyolojik aktivitesini önleyebilir. *Bkz.* Langrish vd. (2004) Immunol. Rev. 202:96-105. Anti-IL-23p19 antikörler ayrıca IL-17A, IL-17F, CCL7, CCL17, CCL20, CCL22, CCR1 ve GM-CSF'nin gen ifadesini önleyebilecektir. *Bkz.* Langrish vd. (2005) J. Exp. Med. 201:233-240. Buluşun anti-IL-23p19 antikörleri, IL-23'ün T_H17 hücrelerinin dağılımını veya hayatta kalmasını iyileştirme yetisini de bloke edecektir. Cua ve Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559. Tasarlanan Anti-IL-23p19'nın önleyici aktivitesi, inflamatuvar, oto-immun ve proliferatif rahatsızlıkların tedavisinde faydalı olacaktır. bu tür rahatsızlıkların örnekleri PCT patent başvurusu yayınları WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631 ve WO 01/18051'da tarif edilmektedir.

35

VI. Farmasötik Bileşimler

IL-23p19 antikorunu içeren farmasötik veya steril bileşimler hazırlamak için, sitokin analoğu veya muteini, bunların antikoru veya bunların nükleik asidi farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı veya ekspiyan ile karıştırılır. *Bkz., örneğin.,* Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack
5 Publishing Company, Easton, PA (1984).

Örneğin liyofilize tozlar, sulu karışımlar, sulu solüsyonlar veya süspansiyonlar şeklinde fizyolojik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, ekspiyanlar veya stabilizörler ile karıştırarak terapötik maddelerin ve teşhis maddelerinin formülasyonları hazırlanabilir. *Bkz.*
10 *örneğin.,* Hardman vd. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, ve Wilkins, New York, NY; Avis vd. (ed.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, vd. (ed.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel
15 Dekker, NY; Lieberman vd. (ed.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner ve Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

Tek başına veya immün baskılayıcı bir maddeyle birlikte verilen antikor karışımlarının toksikliği veya terapötik etkinliği örneğin LD₅₀'nin (Popülasyonun %50'si üzerinde öldürücü etkiye sahip dozun) ve ED₅₀'nin (Popülasyonun %50'si üzerinde terapötik olarak etkili olan dozun) belirlenmesi için hücre kültürlerinde veya deney hayvanları üzerinde standart farmasötik prosedürler ile belirlenebilir. Toksik ve terapötik etkiler arasındaki doz oranı terapötik endekstir ve LD₅₀'nin ED₅₀'ye oranı olarak ifade edilebilir.
20 Yüksek terapötik endeksleri olan antikorlar tercih edilmektedir. Bu hücre kültürü deneylerinden ve hayvanlar üzerinde yürütülen çalışmalardan elde edilen veriler, insanlarda kullanılmaya mahsus dozaj aralığının formüle edilmesinde kullanılabilir. Bu tür bileşiklerin dozajı tercihen ED₅₀'yi çok az toksiklikle veya hiç toksiklik olmadan içeren, dolaşımdaki konsantrasyonların aralığındadır.. Bu aralıktaki dozaj, kullanılan
25 dozaj formuna ve kullanılan verme rotasına bağlı olarak değişiklik gösterebilir.

İdare modu özellikle önemli değildir. Uygun verme rotaları örneğin oral, rektal, transmukozal veya intestinal olarak vermeyi; intramüsküler, intradermal, subkütanoz, intramedüler enjeksiyonlar, intratekal, direkt intraventriküler, intravenöz, intraperitoneal,
35 intranazal veya intraoküler enjeksiyonlar dahil parenteral tevziyi içermektedir.

Farmasötik bileşimde veya mevcut bildirimdeki yöntemin uygulanmasında kullanılan antikorun verilmesi oral alınımla, inhalasyon, topikal uygulama veya kutanoz, subkütanoz, intraperitoneal, parenteral, intraarteryal veya intravenöz enjeksiyon gibi birçok geleneksel yol ile gerçekleştirilebilir.

5

Alternatif olarak, antikoru sistematik bir şekilde değil de örneğin antikorun doğrudan immünopatoloji ile karakterize olan artritlik ekleme veya patojen ile indüklenmiş lezyona, sıklıkla depoda veya sürdürülebilir salınım formülasyonunda enjekte edilmesi yoluyla, lokal olarak vermek de mümkündür. Dahası, antikoru hedeflenen ilaç tevzi sisteminde, 10 örneğin doğrudan immünopatoloji ile karakterize olan artritlik eklemi veya patojen ile indüklenmiş lezyonu hedef olan dokuya özgü antikor ile kaplanmış örneğin bir lipazomda hedeflenen ilaç tevzi sisteminde vermek de mümkündür. Lipozomlar, hastalıklı doku tarafından hedeflenecek ve seçici olarak alınacaktır.

15 Bir terapötik için ilaç verme rejiminin seçilmesi varlığın serum veya doku değişim oranı semptomların düzeyi, varlığın immünojenitesi ve biyolojik matristeki hedef hücrelerin erişilebilirliği gibi birçok faktöre bağlıdır. Tercihen, ilaç verme rejimi hastaya tevzi edilen terapötik miktarını kabul edilebilir düzeyde yan etkilerle tutarlı bir şekilde maksimize eder. Buna göre, tevzi edilen biyolojinin miktarı kısmen spesifik varlığa ve tedavi edilen 20 koşulun ciddiyetine bağlıdır. Uygun antikor, sitokin ve küçük molekül seçimine ilişkin rehberlik mevcuttur. *Bkz. örneğin, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, 25 NY; Baert vd. (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom vd. (1999) New Engl. J. Med 341:1966-1973; Slamon vd. (2001) New Engl. J. Med 344:783-792; Beniaminovitz vd. (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh vd. (2003) New Engl. J. Med 348:24-32; Lipsky vd. (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602.*

30 Uygun dozun belirlenmesi bir klinisyen tarafından, örneğin tedaviyi etkilediğinden şüphelenilen veya tedaviyi etkilediği tahmin edilen veya bilinen parametreleri veya faktörleri kullanarak yapılır Genel olarak, doz optimum dozdan biraz daha az bir miktarda başlar ve her türlü olumsuz yan etkiye göre, arzu edilen veya optimum etki elde edilene kadar doz azar azar artırılır. Önemli diyagnostik önlemler arasında 35 semptomlarla ilgili olanlar, örneğin inflamasyon veya üretilen inflamatuvar sitokinlerin

düzeyi yer alır. Tercihen kullanılacak olan biyolojik tedavi edecek hayvanla esas itibarıyla aynı türden türetilir (örneğin insan öznelerin tedavisi için hümanize antikor), böylece reaktifite karşı olabilecek her türlü bağışıklık tepkisi minimize edilir.

- 5 Antikorlar, antikor parçaları ve sitokinler sürekli infüzyonla veya aralıklı dozlarla, örneğin günde bir, haftada 1-7 kez, bir hafta boyunca, iki hafta boyunca, aylık olarak, iki ayda bir, vs. sağlanabilir. Dozlar intravenöz olarak, subkütanoz olarak, topikal olarak, oral olarak, nazal olarak, rektal olarak, intramüsküler olarak, intraserebral olarak, intraspinal olarak veya inhalasyon yoluyla sağlanabilir. Arzu edilmeyen yan etkileri
- 10 önemli ölçüde engelleyen maksimum dozu veya doz frekansını içeren doz protokolü tercih edilir. Toplam haftalık doz genel olarak en az 0.05 µg/kg, 0.2 µg/kg, 0.5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0.2 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg vücut ağırlığı kadardır veya daha fazladır. *Bakınız örneğin* Yang vd. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold vd. (2002) New Engl. J Med. 346:1692-1698; Liu vd.
- 15 (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji vd. (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144. Küçük bir moleküler terapötüğün, örneğin bir peptit mimetiğün, doğal ürünün veya organik kimyasalın arzu edilen tozu, mol/kg esasına göre antikor veya polipeptit için olanla aynı miktardadır.
- 20 Burada kullanılan şekliyle, "önlemek" veya "tedavi etmek" veya "tedavi" oto-immün hastalıkla veya patojen ile indüklenmiş immünopatolojiyle ve/veya gelişecek veya gelişmesi beklenmekte olan bu tür semptomların ciddiyetindeki azalmayla ilişkilendirilmiş olan, semptomların gelişmesinin ertelenmesini kapsamaktadır. Terimler ayrıca mevcut kontrol edilmeyen veya istenmeyen oto-immün ile ilgili veya patojen ile
- 25 indüklenmiş immünopatoloji semptomlarının iyileştirilmesini, ilave semptomların ortaya çıkmasının önlenmesini ve söz konusu semptomların altında yatan sebeplerin iyileştirilmesini veya önlenmesini de içermektedir. Bu nedenle terimler, oto-immün veya patojen ile indüklenmiş immünopatoloji hastalığı veya semptomu olan veya bu tür bir hastalık veya semptom geliştirme ihtimali olan omurgalı özne için faydalı bir sonucun
- 30 elde edildiğini ifade etmektedir.

Burada kullanılan şekliyle, "terapötik olarak etkili miktar" veya "etkili miktar" IL-23p19'a özgü bağlayıcı bileşenin, örneğin ve antikorum tek başına veya ilave bir terapötik maddeyle bir hücreye, dokuya veya özneye verilen, oto-immün hastalığın veya hastalık

35 veya durum ile ilişkilendirilmiş olan patojen ile indüklenmiş immünopatolojinin veya

hastalığın gelişiminin önlenmesinde veya iyileştirilmesinde etkili olan miktarına işaret etmektedir. Terapötik olarak etkili doz ayrıca semptomların iyileştirilmesine, *yani*, ilgili tıbbi durumun tedavi edilmesine, iyileşmesine, önlenmesine veya iyileştirilmesine veya söz konusu koşulların tedavi, iyileşme, önlenme veya iyileşme oranında bir artışa

5 neden olmaya yeterli bileşik miktarına işaret etmektedir. Tek başına verilen tek bir aktif maddeye uygulandığında, terapötik olarak etkili doz sadece söz konusu aktif maddeye işaret etmektedir. Bir kombinasyona uygulandığında, terapötik olarak etkili doz birlikte, seri şeklinde veya eş zamanlı olarak verilmiş olmasına bakılmaksızın söz konusu terapötik etkiye neden olan aktif maddelerin birleşik miktarlarına işaret etmektedir.

10 Terapötüğün etkili miktarı tipik olarak semptomları en az %10, genellikle en az %20; tercihen en az %30; daha çok arzu edilir şekilde en az %40 ve en çok arzu edilir şekilde en az %50 oranında azaltacaktır.

İkinci bir terapötik maddeyle, örneğin sitokin, antikor, steroid, kemoterapötik madde,

15 antibiyotik veya radyasyon ile ortak verme veya tedavi yöntemleri teknikte iyi bilinmektedir, bkz. örneğin Hardman vd. (ed.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. baskı McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner ve Longo (ed.) (2001)

20 Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. Buluşun farmasötik bileşimi ayrıca diğer immün baskılayıcı veya immüno modüle edici maddeler de içerebilir. Anti-inflamatuar maddeler, kortikosteroidler, siklosporin, takrolimus (*yani*, FK-506), sirolimus, interferonlar, çözülebilir sitokin reseptörleri (*örneğin*, sTNRF ve sIL-1R), sitokin aktivitelerini nötralize edici maddeler (*örneğin*,

25 infliksmab, etanersept), mikofenolat mofetil, 15-deoksipergualin, talidomit, glatiramer, azatiyoprin, leflunomit, siklofosfamid, metotreksat ve benzerleri dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla uygun olan her türlü immün baskılayıcı madde kullanılabilir. Farmasötik bileşim ayrıca fototerapi ve radyasyon gibi diğer terapötik modalitelerle birlikte de kullanılabilir.

30

Tipik veterinerlikle ilgili, deneysel veya araştırma amaçlı süljeler arasında maymunlar, köpekler, kediler, sıçanlar, fareler, tavşanlar, Gine domuzları, atlar ve insanlar yer almaktadır.

35 VII. Antikor Üretimi

- Mevcut buluştaki antikorların rekombinant üretimine mahsus bir uygulamada, iki zinciri kodlayan nükleik asitler izole edilmiş ve daha fazla klonlanmaları için (DNA'nın amplifikasyonu için) veya ekspresyon için bir veya daha fazla yinelenabilir vektörün içine yerleştirilmiştir. Monoklonal antikoru kodlayan DNA halihazırda izole edilmiş ve konvansiyonel prosedürler (örneğin antikoru ağır ve hafif zincirlerini kodlayan genlere özellikle bağlanabilen oligonükleotid problemler kullanarak) kullanarak dizilmiştir. Birçok vektör mevcuttur. Vektör bileşenleri genellikle aşağıdakilerden birini veya daha fazlasını içermektedir ancak bunlarla sınırlı değildir: sinyal dizisi, replikasyonun kaynağı, bir veya daha fazla markör gen, iyileştirici bir unsur, bir itici ve transkripsiyon terminasyon dizisi. Mevcut buluşun bir uygulamasında, hümanize Anti-IL-23p19 antikoru hafif ve ağır zincirleri aynı vektörden, yani plazmidten veya adenovial vektörden ifade edilmektedir.
- 15 Mevcut buluşun antikorları, teknikte bilinen yöntemlerden herhangi biriyle üretilebilir. Bir uygulamada, antikorlar Çin hamsterinin over (CHO) hücreleri, insan embriyonik böbrek (HEK) 293 hücreleri, fare miyelom NSO hücreleri, bebek hamster böbrek (BHK) hücreleri, *Spodoptera frugiperda* ovarian (Sf9) hücreleri gibi kültürlerde memeli veya böcek hücreleri olarak ifade edilmektedir. Bir uygulamada, CHO hücrelerinden saklanan antikorlar iyileştirilmiş ve protein A, katyon değişimi, anyon değişimi, hidrofobik etkileşim ve hidroksiapatit kromatografi gibi standart kromatografik yöntemlerle saflaştırılmıştır. Ortaya çıkan antikorlar, 20 mM sodyum asetat, pH 5.5, konsantre edilmiş ve saklanmıştır.
- 25 Mevcut buluşun başka bir uygulamasında, antikorlar WO2005/040395'te tarif edilen yöntemlere göre levürde üretilmiştir. Kısaca, ilgili antikoru bireysel hafif veya ağır zincirlerini kodlayan vektörler, farklı levür haploid hücrelerine, örneğin levür haploid hücrelerinin isteğe bağlı olarak tamamlayıcı oksotrof olduğu, levürün farklı eşleşme türlerine *Pichia pastoris* tanıtılmaktadır. Dönüştürülmüş haploid levür hücreleri daha sonra eşlenebilir veya hem ağır hem de hafif zincir üretebilen diploid bir levür hücresiyle kaynaştırılabilir. Daha sonra diploid suş tamamen toplanmış ve biyolojik olarak aktif antikoru gizleyebilir. İki zincirinin göreceli ekspresyon düzeyleri örneğin farklı kopya sayılarıyla vektör kullanarak, farklı güce sahip transkripsiyonel kolaylaştırıcı kullanarak veya zincirlerinin birini veya her ikisini de kodlayan genlerin

transkripsiyonunu sağlayan indüklenabilir kolaylaştırıcılardan ekspresyon başlatarak optimize edilebilir.

5 Bir uygulamada, farklı Anti-IL-23p19 antikorların ("asıl" antikorlar) çoğunluğunun ilgili ağır ve hafif zincirleri, hafif zincirlerin çoğunluğu ifade eden bir eşleşme türünün haploid levür suşlarından oluşan bir set ve ağır zincirlerinin çoğunluğu ifade eden farklı bir eşleşme türünün haploid levür suşlarından oluşan bir set oluşturmak için levür haploid hücrelerine tanıtılır. Haploid suşların bu setleri hafi ve ağır zincirlerin çeşitli olası permutasyonlarından oluşan antikorların tümleşik setini ifade eden bir seri diploid levür 10 hücresi üretmek için eşleştirilebilir (veya sferoplastlar olarak kaynaştırılabilir. Daha sonra antikorların tümleşik seti, antikordardan herhangi birinin orijinal antikordardan üstün (örneğin IL-23 için daha yüksek afinite) özelliklere sahip olup olmadığını belirlemek için taranabilir. *Bkz. örneğin*, WO2005/040395.

15 Mevcut buluşun başka bir uygulamasında, antikorlar, antikora göre değişebilen alanın kısımlarının molekül ağırlığı yaklaşık 13kDa olan bir polipeptit ile bağlantılı olduğu insan alanı antikorlarıdır. *Bkz. örneğin* ABD Patent Yayın No. 2004/0110941. Bu tür tek alan, düşük moleküler ağırlık maddeleri, sentez kolaylığı, dayanıklılık ve ilaç verme rotası ile ilgili olarak sayısız avantaj sağlamaktadır.

20

VIII. Kullanımlar

Mevcut bildirim örneğin merkezi sinir sistemindeki, periferik sinir sisteminde ve gastrointestinal kanaldaki inflamatuvar rahatsızlıkların ve durumların yanı sıra otoimmün 25 ve proliferatif rahatsızlıkların da teşhis ve tedavisine mahsus, geliştirilmiş anti-IL-23 antikorların ve bunların parçalarının kullanımına yönelik yöntemler sağlamaktadır. Buluş, insan denekte bağışıklık tepkisinin baskılanmasında kullanılmaya yönelik, örneğin artrit, sedef, inflamatuvar bağırsak hastalığı, multipl skleroz, sistemik lupus eritematozus, diyabet ve kanserden oluşan gruptan seçilen bir bouzklüğün tedavisinde 30 kullanılmaya yönelik istemlerde tanımlanan antikoru veya antijen bağlayıcı parçasını sağlar, burada bağışıklık tepkisi, inflamatuvar bir tepki veya otoimmün bir tepkidir.

Örneğin tekrarlayan-düzelen MS ve primer-progresif MS, Alzheimer hastalığı, amiotrofik lateral skleroz (yani ALS: Lou Gehrig hastalığı), iskemik beyin hasarı, prion 35 hastalıkları ve HIV ile ilişkilendirile demans dahil multipl sklerozun (MS) tedavisine

yönelik yöntemler sağlanmaktadır. Ayrıca nöropatik ağrının, post-travmatik nöropatilerin, Guillain-Barre sendromunun (GBS), periferik polinöropatinin ve sinir rejenerasyonunun tedavisine yönelik yöntemler de sağlanmaktadır.

- 5 Aşağıdaki özelliklerden, semptomlardan, yönlerden, belirtilerden birini veya daha fazlasını veya multipl sklerozun veya sinir sistemindeki diğer inflamatuvar bozukluğun veya durumun belirtilerini tedavi etmeye veya iyileştirmeye mahsus yöntemler sağlanmaktadır: beyin lezyonları, miyelin lezyonları, demiyelinizasyon, demiyelinize plaklar, görme bozuklukları, denge veya koordinasyon kaybı, spastiklik, duyu
- 10 bozuklukları, enkontinans, ağrı, zayıflık, yorgunluk, felç, kognitif yetersizlik, bradifreni, diplopi, optik nörit, parestezi, yürüyüş ataksisi, yorgunluk, Uhthoff sendromu, nevralji, afazi, apraksi, nöbetler, görüş alanı kaybı, demans, ekstrapiramidal fenomenler, depresyon, sağlık veya diğer duygusal semptomlar, kronik progresif miyelopati ve gadolinyum artırıcı lezyonlar, uyarılmış olası kayıtlar veya beyin omurilik sıvısının
- 15 incelenmesi gibi manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile tespit edilen bir semptom. bkz, örneğin., Kenealy vd. (2003) J. Neuroimmunol. 143:7-12; Noseworthy vd. (2000) New Engl. J. Med 343:938-952; Miller vd. (2003) New Engl. J. Med 348:15-23; Chang vd. (2002) New Engl. J. Med. 346:165-173; Bruck and Stadelmann (2003) Neurol. Sci. 24 Suppl.5:S265-S267.

20

- Dahası, mevcut bildirim inflamatuvar bağırsak bozukluklarının tedavisi ve teşhisine yönelik yöntemleri sağlar ve buluş, örneğin Crohn hastalığı, ülseratif kolit, çölyak hastalığı ve huzursuz bağırsak sendromu gibi istemlerde tanımlanan inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanılmaya yönelik istemlerde tanımlanan antikoru
- 25 veya antijen bağlayıcı parçasını sağlar. Aşağıdaki özelliklerden, semptomlardan, yönlerden, belirtilerden birini veya daha fazlasını veya inflamatuvar bağırsak hastalığının belirtilerini tedavi etmeye veya iyileştirmeye mahsus yöntemler sağlanmaktadır: gıdaların kötü emilimi, değiştirilmiş bağırsak hareketliliği, enfeksiyon, ateş, karın ağrısı, ishal, rektal kanama, kilo kaybı, kötü beslenme belirtileri, perianal hastalık, karın kütlesi
- 30 ve büyümemesi; ayrıca, striktür, çıbanlar, toksik megakolon, perforasyon gibi intestinal komplikasyonlar ve kanser ve aşınma, aftöz ve lineer ülserler, taş görüntüsü, yalancı polipler ve rektal tutulum gibi endoskopik bulgular dahil ve ayrıca levür karşıtı antikolar. Bkz., örneğin., Podolsky, yukarıda verilmektedir, Hanauer, yukarıda verilmektedir, Horwitz ve Fisher, yukarıda verilmektedir.

Ayrıca sedef hastalığı, atopik dermatit gibi inflamatuvar rahatsızlıkların, romatoid artrit, osteoartrit ve psoriatik artrit dahil artrit, sistemik lupus eritematoz ve tip I diyabet gibi oto-immün rahatsızlıkların ve kanser gibi proliferatif rahatsızlıkların tedavisi için düşünülmüştür. *Bkz. örneğin*, PCT patent başvuruları yayınları WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; ve WO 01/18051.

Mevcut buluştaki IL-23p19 bağlayıcı bileşikler ayrıca IL-17A, IL-17F, IL-1 β , IL-6 ve TGF- β dahil olmak ancak bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla diğer sitokinlerin (örneğin antikörlerin) bir veya daha fazla antagonistiyle birlikte de kullanılabilir. *Bkz. örneğin*, Veldhoen (2006) Immunity 24:179-189; Dong (2006) Nat. Rev. Immunol. 6(4):329-333. Çeşitli uygulamalarda, buluşun IL-23p19 bağlayıcı bileşiği, Anti-IL-17A antikör gibi başka bir antagonistin veya antagonistlerin verilmesinden önce, veya aynı anda veya verilmesinden sonra verilir. Bir uygulamada, advers bağışıklık tepkisinin (örneğin MS, Crohn Hastalığı) erken akut evresinin tedavisinde tek başına veya mevcut buluşun IL-23 antagonist antikoruyla birlikte bir IL-17A bağlama bileşeni kullanılır. Sonraki durumda, advers tepkinin baskılamasını korumak için IL-17A bağlama bileşeni dereceli olarak azaltılabilir ve tek başına IL-23 antagonisti ile tedaviye devam edilebilir. Alternatif olarak mevcut buluşun bir IL-23p19 bağlayıcı bileşiğinin IL-1 β , IL-6 ve/veya TGF- β antagonistleri ile eş zamanlı olarak, bunlardan önce veya sonra verilebilir. *Bkz. Cua and Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559; Tato ve O'Shea (2006) Nature 441:166-168; Iwakura and Ishigame (2006) J. Clin. Invest. 116:1218-1222.*

Buluş, buluşu spesifik uygulamalarla kısıtlaması planlanmamış olan, aşağıda belirtilen örneklerle atıfta bulunmak suretiyle en iyi şekilde anlaşılmaktadır. Burada tarif edilen spesifik uygulamalar, sadece örnek olmaları içindir ve buluş, ekli istemlerin şartlarıyla, sınırlandırılmaktadır.

ÖRNEKLER

Örnek 1

Genel Yöntemler

Moleküler biyolojideki standart yöntemler tarif edilmektedir. Maniatis vd. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, NY; Sambrook ve Russell (2001) Molecular Cloning, 3. baskı Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) Recombinant DNA Cilt 217, Academic Press, San Diego, CA. Standart yöntemler ayrıca Ausbel vd. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Cilt 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY'de de belirtilmektedir, burada bakteri hücrelerinde klonlama ve DNA mutagenesi (1. Cilt), memeli hücrelerinde klonlama ve levür (2. Cilt), glikokonjugatlar ve protein ekspresyonu (3. Cilt) ve biyoenformatik (4. Cilt) de tarif edilmektedir).

İmmunopresipitasyon, kromatografi, elektroforez, santrifüjlenme ve kristalizasyon dahil protein saflaştırmasına yönelik yöntemler tarif edilmektedir. Coligan vd. (2000) Current Protocols in Protein Science, Cilt 1, John Wiley and Sons, Inc., New York. Kimyasal analiz, kimyasal modifikasyon, ötelenme sonrası modifikasyon, füzyon proteinlerinin üretimi, proteinlerin glikosilasyonu tarif edilmektedir. *Bkz. örneğin.*, Coligan vd. (2000) Current Protocols in Protein Science, Cilt 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel vd. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Cilt 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, sayfa 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, St. Louis, MO; sayfa 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., sayfa 384-391. Poliklonal ve monoklonal antikörlerin üretimi, saflaştırması ve fragmentasyonu tarif edilmektedir. Coligan vd. (2001) Current Protocols in Immunology, Cilt 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow ve Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow ve Lane, *yukarıda verilmektedir*. Ligand/reseptör etkileşimini karakterize edici standart teknikler mevcuttur. *Bkz. örneğin.*, Coligan vd. (2001) Current Protocols in Immunology, Cilt 4, John Wiley, Inc., New York.

Floresan etkin hücre sınıflandırma tespit sistemleri (FACS®) dahil akış sitometrisi yöntemleri mevcuttur. *Bkz. örneğin.*, Owens vd. (1994) Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) Flow Cytometry, 2. baskı.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. Nükleik asit primerleri ve problemleri, polipeptitleri ve antikörleri dahil nükleik asitleri modifiye etmeye uygun ve örneğin teşhis reaktifleri olarak kullanılmaya mahsus floresan reaktifleri mevcuttur. Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO.

Bağıışıklık sistemi histolojisindeki standart yöntemler tarif edilmektedir. *Bkz. örneğin* Muller-Harmelink (ed.) (1986) Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, vd. (2000) Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams, ve Wilkins, Phila, PA; Louis, vd. (2002) Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NY.

Örneğin antijen parçalarını, lider dizilerini, protein katlamasını, işlevsel alanları, glikosilasyon alanlarını ve dizi hizalamalarını belirlemeye mahsus yazılım paketleri ve veri tabanları mevcuttur. *Bkz. örneğin* Gen Bankası, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne vd. :121816. 741-742; Menne vd. (2000) Bioinformatics Applications Note 16:741-742; Wren vd. (2002) Comput. Methods Programs Biomed. 68:177-181; von Heijne (1983) Eur. J. Biochem. 133:17-21; von Heijne (1986) Nucleic Acids Res. 14:4683-4690.

Örnek 2

İnsan Karşıtı IL-23p19 Antikorların Üretilmesi ve İnsanlaştırılması

20

İnsan karşıtı IL-23p19 antikorlar, IL-23p19 nakavt farelere kimerik IL-23 ile bağıışıklık kazandırarak üretildi (insan p19: fare p40). Standart yöntemlerle monoklonal antikorlar hazırlandı.

25

Fare antikor 13B8'in değıışken alanlarının insanlaştırılması (fare IgG1/kappa) esas itibariyle PCT patent başvurusu yayınları WO 2005/047324 ve WO 2005/047326'da tarif edilen şekilde gerçekleştirildi.

30

Kısaca, antikor 13B8'in insan olmayan VH alanının amino asit dizisi, IGHV1 ve IGHV4 alt gruplarından birer temsilci ve IGHV3 alt grubundan üç temsilciden oluşan beş insan VH germline amino asit dizisinden oluşan bir grup ile karşılaştırıldı. VH alt grupları M.-P. Lefranc (2001) "Nomenclature of the Human İmmünoglobulin Heavy (IGH) Genes", Experimental and Clinical Immunogenetics 18:100-116 adlı yayında sıralanmıştır. Antikor 13B8, alt grup VH1'de insan ağır zincir germline DP-14'e karşı en yüksek skoru elde etmiştir.

35

Antikor 13B8'in VL dizisi VL'nin kappa alt sınıfıdır. İnsan olmayan VL alanının amino asit dizisi, dört insan VL kappa germline amino asit dizisinden oluşan bir gruba karşılaştırıldı. Dört taneden oluşan grup, V. Barbie & M.-P. Lefranc (1998) "The Human İmmünoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments", Experimental and Clinical Immunogenetics 15:171-183 ve M.-P. Lefranc (2001) "Nomenclature of the Human İmmünoglobulin Kappa (IGK) Genes", Experimental and Clinical Immunogenetics 18:161-174'te sıralanan dört yerleşik insan VL alt grubunun her birinden alınan birer temsilciden oluşur. Dört alt grup ayrıca Kabat vd. (1991 - 5th Ed.) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U. S. Department of Health and Human Services, NIH Pub. 91-3242, sayfa 103-130'da sıralanan dört alt gruba da karşılık gelir. Antikor 13B8, alt grup VLkl'de insan hafif zincir germline Z-012'ye karşı en yüksek skoru elde etmiştir.

İlave amino asit ikameleri *yukarıda verilmektedir* olarak tartışıldığı ve SEQ ID NO'lar: 24-26'da açıklandığı gibi yapıldı. Hümanize 13B8 ağır ve hafif zinciri değişken alanlar, sırasıyla, bir insan y1 (IgG1) ağır zincir sürekli alanı ve bir kappa hafif zincir sürekli alanı, kodlayan vektörlere klonlandı. Ortaya çıkan hümanize 13B8 antikor (IgG1/kappa) insana ve sinomolgus maymununa ait IL-23'e bağlanmakta ancak insana ait IL-12'ye, insana ait p40'a veya fareye ait IL-23'e bağlanmaktadır.

Değişken ağır ve hafif zincirlerin hedef amino asit dizileri belirlendikten sonra, hümanize antikor boyu boyunca kodlayan plazmidler üretilebilir. Plazmid diziler, Kuntel mutagenezi (Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 82:488-492) kullanarak DNA dizisini hedeflenen hümanize antikor dizilerine değiştirmek amacıyla değiştirilebilir. Eş zamanlı olarak, optimal ekspresyon potansiyeli için kodon optimizasyonu da gerçekleştirilebilir.

Burada tarif edilen diğer antikorların hümanize formları, hümanize 13B8 antikor için tarif edilen insan çerçevelerini ikame ederek veya bu Örnekte tarif edilen yöntemlerle en iyi insan çerçevelerinin seçilmesine yönelik prosedürleri tekrar ederek oluşturulabilir. Burada tarif edilen insan çerçevelerinin hümanize antikor 13B8'in bir parçası olarak ikamesi, 13B8'e benzer, CDR dizilerine sahip antikora çok uygundur.

Örnek 3

KinExA Teknolojisini Kullanarak Hümanize İnsan Karşıtı IL-23 İçin Dengeleme Dağılım Süreklisinin (K_d) Belirlenmesi

İnsan karşıtı IL-23 antikorlar için dengeleme dağılımı süreklisi (K_d) KinExA 3000 aleti kullanılarak belirlenir. Sapidyne Instruments Inc., Boise Idaho, USA. KinExA, antikor, antijen ve ankor-antijen tümleşği karışımındaki tümleşik olmayan antikorun konsantrasyonunu ölçmeye dayalı Kinetik Dışlama Deneyi yönteminin ilkesini kullanır. Serbest antikorun konsantrasyonu karışımı çok kısa bir süreliğine katı fazdaki immobilize antijene moruz bırakarak ölçülür. Uygulamada bu, solüsyon aşamasındaki antijen-antikor karışımını bir akış hücresinde yakalanan antijen kaplı partikülleri geçecek şekilde akıtarak sağlanır. Alet tarafından üretilen veriler, özel yazılımlarla analiz edilir. Dengeleme süreklileri, aşağıdaki varsayımlara dayalı bir matematik teorisi kullanarak hesaplanır:

1. Bağlama, dengeleme için tersine döndürülebilir bağlama denklemini takip eder.

$$k_{on} [Ab] [Ag] = k_{off} [AbAg]$$
2. Antikor ve antijen 1:1 bağlanır ve toplam antikor, antijen-antikor tümleşği artı serbest antikora eşittir.
3. Aletin sinyali, serbest antikor konsantrasyonu ile lineer olarak ilgilidir.

20

98 mikron PMMA partikülü (Sapidyne, Cat No. 440198) Sapidyne'nin "Kısa bağlayıcı kolları olan veya bağlayıcı kolları olmayan biyotinlenmiş ligandlar ile PMMA partiküllerinin kaplanmasına dair protokol"üne göre biyotinlenmiş IL-23 ile kaplanır. Bu deneyde, biyotinlenmiş IL-23 fare IL-12p40'ı ve insan IL-23p19'u tümleşği içermektedir. EZ-link TFP PEO-biyotin (Pierce, Kat. No. 21219) biyotinlenmiş IL-23'ü imalatçının tavsiyelerine uygun olarak yapmakta kullanılmaktadır (Pierce bülteni 0874). Tüm deney prosedürleri, KinExA 3000 kılavuzuna uygun olarak yapılmaktadır.

Anti-IL-23p19 antikorların bağlanması, antikorların ii disülfid bağlantılı zincir, insan p19'u (SEQ ID NO: 47) ve insan p40'ı (Gen Bankası Erişim No. P29460) içerdiği bağlı olmayan (yerel) insan IL-23'ü ile bir seri konsantrasyonda önceden inkübe edildiği bir yarışmalı bağlama deneyinde değerlendirilir. Bağlanmamış antikorların ve IL-23 ile bağlanmış antikorların bir karışımından oluşan ortaya çıkan örnekler, daha sonra bir önceki paragrafta tarif edilen rhIL-23 ("elastikine") PMMA partiküllerinin üzerine akıtılır.

PMMA partikülleri tarafından yakalanan antikorların miktarı daha sonra floresan olarak etiketlenen ikincil antikorlar kullanılarak tespit edilir.

5 Tablo 3 her antikor için tekrarlama belirlemeleri dahil KinExA analizinin sonuçlarını gösterir.

Tablo 3

KinExA Tarafından Belirlenen K_d Değerleri

Antikor	K_d (pM)
m13B8	15, 52
hum13B8-a	64 ± 40 , 110, 365, 447
hum13B8-b	47, 470, 520
hum13B8-c	47, 52, 470

Örnek 4

10

BIAcore Teknolojisini Kullanarak Hümanize İnsan Karşıtı IL-23p19 Antikorlar İçin Dengeleme Dağılım Süreklisinin (K_d) Belirlenmesi

15 BIAcore belirlemeleri esas olarak yaygın bir şekilde atanan ABD Patent Başvurusu Yayın No. 2007/0048315'in 4. Örneğinde tarif edilen şekilde gerçekleştirilmektedir. Kısaca, ligandlar (anti-IL-23 mAbs) standart amin kaplini prosedürünü kullanarak BIAcore CM5 sensör çipi üzerinde immobilize edilir. IL-23, çeşitli konsantrasyonlar üretmek için PBS'de sulandırılır. Çeşitli etkileşimlerin kinetik süreklileri BIAevaluation yazılımının 3.1 sürümü kullanılarak belirlenir. K_d hesaplanan ayrışma ve birleşme oranı
20 süreklilerini kullanarak belirlenir.

Tablo 4 tekrarlama belirlemeleri dahil BIAcore tarafından belirlenen K_d değerlerini göstermektedir.

Tablo 4

BIAcore Tarafından Belirlenen K_d

Antikor	K_d (pM)
---------	------------

BIAcore Tarafından Belirlenen K_d

Antikor	K_d (pM)
m13B8	173.228
hum13B8-a	72-104, 68-100, 81-129
hum13B8-b	77-129, 69-116
hum13B8-c	92-153

Örnek 5

Anti-IL-23 Antikorların Nötrleştirilmesinin Değerlendirilmesi için Proliferasyon 5 Bio-deneyleri

Monoklonal bir antikorun IL-23'ü biyolojik olarak nötrleştirme yetisi, rekombinant IL-23 reseptörlerini ifade eden hücreleri kullanan kısa vadeli proliferasyon bio-deneylerinin uygulanması yoluyla değerlendirildi. IL-23R transfektan hücre hattı (Ba/F3-2.2lo-hIL-23R) hem hIL-23R'yi hem de hIL-12R β 1'i ifade eder ve hem insan IL-23'üne hem de sinomolgus maymununun IL-23'üne cevap verir. Transfektan Ba/F3-2.2lo hücreleri insan IL-23'üne cevap olarak çoğalır ve cevap nötrleştirici Anti-IL-23 antikor tarafından önlenabilir. Doza cevap veren eğrinin lineer bölgesinde, plato yakınında ve EC50'nin üzerinde seçilen IL-23 konsantrasyonuna karşı bir antikor titre edilir. Proliferasyonun olup olmadığı metabolik aktiviteyi tesit etmeye dayalı büyüme endikatörü olan Alamar Blue kullanarak korolimetrik yollarla ölçülür. Bir antikorun IL-23'ü nötrleştirme yetisi IC50 değerine göre veya IL-23 proliferasyonunun yarı maksimal inhibisyonunu indükleyen antikor konsantrasyonuna göre değerlendirilir.

Ba/F3 transfektanları RPMI-1640 ortamında, %10 fetal buzağı serumunda, 50 μ M 2-merkaptetanolda, 2 mM L-glutaminde, 50 μ g/mL penisilin-streptomisinde ve 10 ng/mL fare IL-3'ünde tutulur. Ba/F3 proliferasyon bio-deneyleri RPMI-1640 ortamında, %10 fetal buzağı serumunda, 50 μ M 2-merkaptetanolda, 2 mM L-glutaminde, 50 μ g/mL penisilin-streptomisinde gerçekleştirilir.

25

Prosedür

Deneyler, 96-çukurcuklu dibi düz plakada (Falcon 3072 veya benzeri) çukurcuk başına 150 µL'de gerçekleştirilir. Anti-IL-23 antikorlar, 30-60 dk boyunca IL-23 ile önceden inkübe edilir, sonra 40-48 saat kadar hücreler ve inkübasyon eklenir. Alamar Blue (Biosource Kat #DAL1100) eklenir ve 5-12 saat boyunca gelişmesine izin verilir. Daha sonra 570 nm ve 600 nm'de soğurma okunur (VERSAmax Microplate Reader, Molecular Probes, Eugene, Oregon, ABD) ve OD₅₇₀₋₆₀₀ elde edilir.

Hücreler sağlıklı bir büyüme durumunda, genellikle $3-8 \times 10^5/\text{mL}$ yoğunluklarında kullanılır. Hücreler hesaplanır, topaklanır, bio-deney ortamında iki kez yıkanır ve kaplama için uygun yoğunlukta süspansiyon halinde tutulur. IL-23'ün seri 1:3 seyrelmeleri (bio-deney ortamında 25:50 µL) kullanılarak IL-23 doz cevabı gerçekleştirilir. 3 ng/ml (50 pM) kadar IL-23 konsantrasyonu antikor deneylerinde kullanılmak üzere seçilir. Seri 1:3 seyrelmeler (bio-deney ortamında 25:50 µL) kullanılarak nötrleştirici antikor doz cevabı da gerçekleştirilir.

IC₅₀ değerleri, soğurmanın sitokine veya antikor konsantrasyonuna karşı çizildiği ve IC₅₀ değerlerinin sigmoidal doz cevabının lineer olmayan gerilemesi (eğri fiti) kullanılarak belirlendiği GraphPad Prism® 3.0 yazılımı (Graphpad Software Inc., San Diego, California, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

Tablo 5 anti-IL-23p19 antikorların Ba/F3 hücre proliferasyonunun bloklanması için IC₅₀ değerlerini gösterir. Bazı antikorlar için çoklu belirlemelerin değerleri dahil edilmiştir.

Tablo 5

Anti-IL-23 Antikorlar Tarafından Ba/F3 Hücre Dağılımının Bloke Edilmesi için IC₅₀ Değerleri

Antikor	IC ₅₀ (pM)
m13B8	700
hum13B8-a	1100, 1100
hum13B8-b	1200, 1100
hum13B8-c	1100, 2200

25 Örnek 6

IL-17 Üretimine Dayalı IL-23 İçin Fare Splenosit Deneyi

Mevcut buluşa göre anti-IL-23p19'un biyolojik aktivitesi, Aggarwal vd. (2003) J. Biol. Chem. 278:1910 ve Stumhofer vd. (2006) Nature Immunol. 7:937'de açıklandığı gibi, esas itibariyle splenosit deneyi kullanılarak değerlendirilir. Fare splenosit deneyi, fare splenositi tarafından yapılan IL-17 üretiminin bir düzeyi olarak bir örnekte IL-23 aktivitesini ölçer. Anti-IL-23p19 antikorların önleyici aktivitesi daha sonra, verilen bir örnekte IL-23 aktivitesini %50 kadar azaltmak için gerekli olan antikor konsantrasyonunun belirlenmesiyle değerlendirilir (IC₅₀). Bu deneyde ölçülen şekliyle IC₅₀ dengeleme dağılımı bağlama süreklisinden (K_d) daha fazladır veya buna eşittir yani K_d IC₅₀'ye eşit veya bundan daha düşük olabilir. Her zaman olduğu gibi daha düşük IC₅₀ ve K_d değerleri daha yüksek aktiviteleri ve afiniteleri yansıtır.

Kısaca, dalaklar 8-12 haftalık dişi C57BL/6J farelerden elde edilmiştir (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, ABD). Dalaklar öğütülür, iki kez pelletlenir ve bir hücre süzgeci (70 µm naylon) ile filtrelenir. Elde edilen hücreler 96-çukurcuklu plakada (4 X 10⁵ hücre/çukurcuk) insan IL-23'ü (10 ng/ml, ~170 pM) ve fare anti-CD3e antikorlarıyla (1 µg/ml) birlikte (BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, ABD), analiz edilecek olan anti-IL-23p19 antikor ile veya o olmadan kültürlenir. Anti IL-23p19 antikorlar 10 µg/ml'de ve 3 katlı seyreltme serisinde eklenir. Hücreler 72 saat boyunca kültürlenir, pelletlenir ve üst faz sandviç ELISA ile IL-17 seviyeleri için analiz edilir.

IL-17 ELISA aşağıda açıklanan şekilde gerçekleştirilir. Plakalar gece 4°C'de yıkanmış ve bloklanmış olan yakalama anti-IL-17 antikoruyla (100 ng/çukurcuk) kaplanır. Örnekler ve standartlar eklenir ve oda sıcaklığında iki saat boyunca çalkalanarak inkübe edilir. Plakalar yıkanır ve biyotinlenmiş anti-IL-17 tespit antikor (100 ng/çukurcuk) eklenir ve oda sıcaklığında bir saat boyunca çalkalanarak inkübe edilir. Yakalama ve tespit antikorları her ikisi de fare IL-17'sine bağlanan ancak çapraz olarak birbirini bloke etmeyen farklı antikorlardır. Plakalar yıkanır ve bağlama tespit antikoru streptavidin-HRP (yaban turbu peroksidazı) ve TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) kullanılarak tespit edilir. Daha sonra plaka 450-650 nm'de okunur ve örneklerdeki IL-17 konsantrasyonu standartlarla karşılaştırılarak hesaplanır.

Splenosit deneyi IC₅₀ değerleri, bazı tekrarlar dahil Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6

Splenosit Deneyi IC50'ler

Antikor Klonu	IC50 (pM)
m13B8	28,54,64
hum13B8-a	71-108
hum13B8-b	110, 221
hum13B8-c	515

Örnek 7**5 Anti-IL-23p19 Antikoru 13B8-b'nin Hazırlanmasının Karakterizasyonu**

Hümanize anti-IL-23p19 antikor 13B8-b, sırasıyla SEQ ID NO: 49 ve 50'de belirtildiği gibi, 13B8-b'nin ağır ve hafif zincirlerini kodlayan vektör saklayan DNA dizilerini kullanarak memeli hücrelerinden hazırlanmaktadır.

10

BIAcore analiz ile analiz edildiğinde Hum 13B8-b'nin insan IL-23'ü için 297 pM K_d 'si vardır, bu özellikle Örnek 4'te tarif edildiği gibidir (*yukarıda verilmektedir*).

15

Hum13B8-b'nin biyolojik aktivitesi Ba/F3 proliferasyon deneyi kullanarak, asıl itibariyle Örnek 5'te tarif edildiği gibi değerlendirilir (*yukarıda verilmektedir*), ancak IL-23'nin 50 pM'si yerine 340 pM'si proliferasyonu uyarmak amacıyla kullanılır. Anti-IL-23p19 antikorların önleyici aktivitesi (IC50), verilen bir örnekte IL-23 aktivitesini %50 kadar azaltmak için gerekli olan antikor konsantrasyonunun belirlenmesiyle değerlendirilir Her zaman olduğu gibi daha düşük IC50 daha yüksek aktiviteleri yansıtır. Hum13B8-b, Ba/F3 proliferasyon deneyinde 187 pM'nin bir IC50'sini sergiler.

20

25

Hum13B8-b'nin biyolojik aktivitesi esas itibariyle Örnek 6'da(*yukarıda verilmektedir*) tarif edildiği gibi, insan splenosit deneyi kullanılarak da değerlendirilir ancak splenositler fare yerine insan dalaklarından elde edilir, hiçbir anti-CD3e antikor kullanılmaz ve IL-17 yerine IFN- γ okunur. Deney, insan primer splenositleri tarafından üretilen IFN- γ düzeyini belirleyerek bir örnekteki IL-23 aktivitesini ölçer. İnsan splenositleri, anti-IL-23p19 antikoru hum13B8-b'nin çeşitli konsantrasyonlarının

mevcudiyetinde insan IL-23'üne (170 pM) maruz bırakılır. IFN- γ sandviç ELISA ile tespit edilir. Hum13B8-b, insan splenositi deneyinde 59-144 pM'nin bir IC50'sini sergiler.

- 5 Hum13B8-b'nin biyolojik aktivitesi, esas itibariyle Parham vd. (2002) J. Immunol. 168:5699'de açıklanan şekilde, KIT225 STAT-3 fosforilasyon deneyi kullanılarak değerlendirilir. İnsan KIT225 hücreleri, lösemik T hücre hattı anti-IL-23p19 antikorunu hum13B8-b'nin çeşitli konsantrasyonlarının mevcudiyetinde veya antikor olmadan 138 pM insan IL-23 ile uyarılmaktadır. IL-23 aktivitesi, STAT3 fosforilasyon düzeyinin tespit edilmesiyle ölçülür. Hum13B8-b, KIT225 deneyinde 130 pM'nin bir IC50'sini sergiler.

Örnek 8

Hümanize Anti-IL-23p19 Antikoru 13B8-b'nin Epitopu

- 15 Hümanize antikor 13B8-b'nin insan IL-23p19'una bağlanması için epitop (SEQ ID NO: 47) X-ışını kristalografisi ile belirlendi. Hümanize anti-IL-23p19 antikor 13B8-b'nin ve bağlı olmayan ve p19 ile p40 alt birimlerini içeren insan IL-23'ünün bir Fab parçasının bir tümleşigi için koordinatlar belirlendi. Kristal yapısını belirlemek için kullanılan IL-23'teki p40 alt biriminin Asn222'nin Gln ile değiştirildiği bir N222Q ikamesi vardır. İnsan IL-23p19'unun dizisi SEQ ID NO: 47'de bulunur ve insan IL-12/IL-23 p40'ın olgun şeklinin dizisi Gen Bankası Erişim No. 29460'ın kalıntıları 23-328'de bulunur. Hümanize anti-IL-23p19 antikor 13B8-b, hümanize 13B8-b ağır zinciri (SEQ ID NO: 7) hümanize 13B8-b hafif zincir (SEQ ID NO: 14) içermektedir. Kristalizasyon şartları %15 polietilen glikol 4000, 60 mM sodyum asetat, 100 mM TRIS-HCl'dir (pH 8). Kristaller ayrıca pH 8'de veya bu civarda diğer tamponlarla da elde edilebilir.

- Antikor 13B8-b üzerindeki 4.0Å içindeki IL-23 amino asit kalıntıları arasında K20, T23, W26, S27, P30, E82, S95, L96, L97, P98, D99, P101, G103, Q104, H106, A107 ve L110 yer almaktadır. İlave kalıntılar L24, L85, T91, S100 ve V102 5.0Å içindeydi. IL-23p19 üzerindeki amino asit kalıntısı, kalıntının herhangi bir atomunun koordinatları, antikoru herhangi bir atomunun koordinatlarına verilen mesafedeyse, antikoru verilen mesafesinde (örneğin 4.0Å veya 5.0Å) kabul edilir.

- 35 Bu temas edilen kalıntıların büyük bölümü, IL-23p19'un primer yapısı boyunca iki ana

kümeye dahildir, ilk küme kalıntılar 20-30'u (11 kalıntının 6'sı antikorun 5.0Å'sındadır ve 11 kalıntının 5'i antikorun 4.0Å'sındadır) ve ikinci küme kalıntılar 82-110'u içerir (29 kalıntının 16'sı antikorun 5.0Å'sındadır ve 29 kalıntının 12'si antikorun 4.0Å'sındadır). Bu kümeler, kalıntıların %30, %40, %45, %50 veya %54'ünün 4.0Å veya 5.0Å'da olduğu, bitişikteki IL-23p19'un amino asit kalıntılarının 11 tanesinin veya daha fazlasının gerilmesinden oluşan epitoplara tanımlar.

Bu kümelerin herhangi birine veya her ikisine de bağlanan antikorların antikor 13B8-b'nin bağlanmasını bloke etmesi beklenir ve benzer biyolojik aktiviteler sergilemesi beklenir.

Tablo 7 dizi listesindeki dizilerin kısa bir tarifnamesini içermektedir.

Tablo 7

Dizi Kimlikleri

SEQ ID NO:	Tanım
1	m1A11V _H
2	m11C1 V _H
3	m5F5 V _H
4	m21D1 V _H
5	m13B8 V _H
6	hum13B8 HC-a
7	hum13B8 HC-b
8	hum13B8 HC-c
9	m1A11 V _L
10	m11C1 V _L
11	m5F5 V _L
12	m21D1 V _L
13	m13B8 V _L
14	hum13B8 LC

Dizi Kimlikleri

SEQ ID NO:	Tanım
15	m1A11 CDRH1
16	m11C1 CDRH1
17	m5F5 CDRH1
18	m21D1 CDRH1
19	m13B8 CDRH1
20	m1A11 CDRH2
21	m11C1 CDRH2
22	m5F5 CDRH2
23	m21D1 CDRH2
24	m13B8 CDRH2-a
25	h13B8 CDRH2-b
26	h13B8 CDRH2-c
27	m1A11 CDRH3
28	m11C1 CDRH3
29	m5F5 CDRH3
30	m21D1 CDRH3
31	m13B8 CDRH3
32	m1A11 CDRL1
33	m11C1 CDRL1
34	m5F5 CDRL1
35	m21D1 CDRL1
36	m13B8 CDRL1
37	m1A11 CDRL2
38	m11C1 CDRL2

Dizi Kimlikleri

SEQ ID NO:	Tanım
39	m5F5 CDRL2
40	m21D1 CDRL2
41	m13B8 CDRL2
42	m1A11 CDRL3
43	m11C1 CDRL3
44	m5F5 CDRL3
45	m21D1 CDRL3
46	m13B8 CDRL3
47	insan IL-23p 19
48	fare IL-23p 19
49	hum13B8-b HC DNA
50	hum13B8 LC DNA

DİZİ LİSTESİ

- <110> Schering Corporation
- 5 <120> Geliştirilmiş Anti-IL-23p19 Antikorlar
- <130> P32094EP-PCT
- <140> PCT/US2008/002333
- <141> 2008-02-20
- <150> 60/891,409
- 10 <151> 2007-02-23
- <160> 50
- <170> PatentIn versiyon 3.4
- <210> 1
- <211> 117
- 15 <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Gln Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

His Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Ala

```

1           5           10           15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Ala Tyr
      20      25      30

Trp Met Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45

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

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100      105      110

Thr Val Ser Ala
      115

```

<210> 3

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

```

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20      25      30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Asp Leu Glu Trp Ile
      35      40      45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Val Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Arg Phe
      50      55      60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80

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

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp
      100      105      110

```

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Phe
20 25 30

Phe Ile His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asn His Asp Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Asp
65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Asn Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 5

10 <211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

His Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Glu Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Thr Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 6

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> İnsan çerçeveleri, kemirgen CDR'leri

<220>

10 <221> DOMAIN

<222> (1)..(116)

<223> Değişken Alan

<400> 6

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 7

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> İnsan çerçeveleri, kemirgen CDR'leri

<220>

<221> ALAN

10 <222> (1)..(116)

<223> Değişken Alan

<400> 7

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130	135	140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
	165	170
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
	180	185
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
	195	200
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
	210	215
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	250
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
	260	265
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
	275	280
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
	290	295
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
	340	345
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
	355	360
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
	370	375
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
		400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 8

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> İnsan çerçeveleri, kemirgen CDR'leri

<220>

10 <221> ALAN

<222> (1)..(116)

<223> Değişken Alan

<400> 8

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Glu Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 10

<211> 108

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 11

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Ile Thr
 20 25 30

Ser Asn Asp Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Ser Phe Thr
 35 40 45

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly
 65 70 75 80

Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
 85 90 95

Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 12

10 <211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Asp Leu Lys Arg
100 105

<210> 13

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Arg Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Phe Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 14

10 <211> 214

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> İnsan çerçeveleri, kemirgen CDR'leri

<220>

<221> ALAN

5 <222> (1)..(108)

<223> Değişken Alan

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210
 <210> 15
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 15
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Tyr Ile Gln
 1 5 10
 <210> 16
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16
 Gly Tyr Ile Phe Ser Ala Tyr Trp Met Thr
 1 5 10
 15 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 17
 20 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 18
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Phe Phe Ile His
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus
 <400> 19
 Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr Trp Met Thr
 1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 20

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 21

Gln Ile Phe Pro Val Arg Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Ile Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Val Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Trp Ile Phe Pro Gly Asn His Asp Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Bir amino asit ornatımı ile kemirgen CDR'si

<400> 25

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Glu
1 5 10 15

10 Gly

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

15 <220>

<223> Dört amino asit ornatımı ile kemirgen CDR'si

<400> 26

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 27

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Gln Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

25 <210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28
 Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 29
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 29
 Gly Gly Asn Tyr Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 30
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 30
 Gly Gly Gly Asn Leu Pro Tyr
 1 5
 15 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 31
 20 Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 32
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus
 <400> 33
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <400> 34
 Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Ile Thr Ser Asn Asp Ala Asn
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 35
 Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 36
 Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 37
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 37
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5
 25 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 38
 Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5
 30 <210> 39
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 39
 Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro
 1 5
 5 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 40
 Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5
 10 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 41
 Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus
 <400> 42
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 43
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 43
 Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 44
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 44

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 45

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 46

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

15 <210> 47

<211> 170

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

<210> 48

<211> 175

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Val	Pro	Arg	Ser	Ser	Ser	Pro	Asp	Trp	Ala	Gln	Cys	Gln	Gln	Leu	Ser
1				5					10					15	
Arg	Asn	Leu	Cys	Met	Leu	Ala	Trp	Asn	Ala	His	Ala	Pro	Ala	Gly	His
			20					25					30		

Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr Lys Asn Asn Val
35 40 45

Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Lys Asp
50 55 60

Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly Leu Ala Phe Tyr
65 70 75 80

Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu Pro Ala Leu Leu
85 90 95

Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu Leu Gly Leu Ser
100 105 110

Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr Gln Gln Met Pro
115 120 125

Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu Leu Arg Ser Lys
130 135 140

Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala Ala Arg Val Phe
145 150 155 160

Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val Pro Thr Ala
165 170 175

<210> 49

<211> 1398

5 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> İnsan sürekli ve çerçeve bölgeleri, kemirgen CDR'leri

<400> 49

atggctgtgc tggggtgct gttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt gctgtcccag	60
gtgcagctgg tgcagtcctg cgctgaggtg aagaagcctg ggcctccgt gaaggtctcc	120
tgcaaggctt ctggtacat cttcatcacc tactggatga cctgggtgcg gcaggcccct	180
ggccaggggc tggagtggat gggccagatc ttccctgccg gcggtctgc agactacaac	240
gagaagtctg aaggcagat caccatgacc acagacacat ccaccagcac agcctacatg	300
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacc gccgtgtatt actgtgccag aggcggtggc	360
ggattcgctt actggggcca gggcacctg gtcaccgtct ccagcgctag caccaagggc	420
ccatcggtct tccccctggc accctectcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg	480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgctcgtggaa ctcaaggccc	540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtt gtccctacagt cctcaggact ctactccctc	600

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttggggcacc agacctacat ctgcaacgtg 660
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtgt agcccaaatc ttgtgacaaa 720
 actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc 780
 tcccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
 gtcaqcgctc tcaccgtcct qcaccaggac tgqctgaatg qcaagqagta caagtqcaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggqacg 1080
 ccccgagAAC cacaggtgtA caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggc caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaatga 1398

<210> 50

<211> 702

5 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> İnsan sürekli ve çerçeve bölgeleri, kemirgen CDR'leri

<400> 50

atggctccag tgcagctgct ggggctgctg gtgctgttcc tgcagccat gagatgtgat 60
 atccagatga cccagctctc atcttccctg tctgcctctg tgggagacag agtgaccatc 120
 acctgcagga ccagcgagaa catctacagc tacctggcct ggtatcagca gaagccaggg 180
 aagqccccct aqctgctgat ctataacgcc aagacccttg ctgaaggqgt gccatccaag 240
 ttcaqcgqca qcgqctctgq gacagacttc accctgacca tcagcagcct gcagcctgag 300
 gacttcgcca cctactactg tcagcaccac tacggaattc cattcacctt cggccagggc 360
 accaagggtg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tgttcatctt cctccatct 420
 gatgagcagc tgaagtctgg aactgcctcc gtggtgtgcc tgcgaataa ctcttatccc 480
 agagaggcca aggtgcagtg gaagggtgat aacgcctcc agagcgcaa ctcccaggag 540
 agcgtgacag aqcaqgacag caagcagcgc acctacagcc tgagcagcac cctgacctg 600
 agcaaaqcaq actacgagaa acacaaggtg tacgcctgcg aqgtgaccca tcaggqccctg 660
 10 agcagccccg tgacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa 702

```

                                ---CDRH1---
m1A11  EVQLQQSGPELVKTGASVNI SCKAS GYSFTAYYIQ WVKQSRGKSLEWIG
m11C1  HVQLQQSGPEVVRPGASVKLSCKAS GYIFSAYWMT WVKQRPQGQGLEWIG
m5F5   QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKAS GYTFTSYGIS WVKQRTGQDLEWIG
m21D1  QVQLQQSGLELVKPGSSSLKISCKAS GYSFTSFFIH WLKQRPQGQGLEWIG
m13B8  HVQLQQSGPELVVRPGASVELSCKAS GYIFITYWMT WVKQRPQGQGLEWIG
h13B8a QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYIFITYWMT WVRQAPQGQGLEWMG
h13B8b QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYIFITYWMT WVRQAPQGQGLEWMG
h13B8c QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYIFITYWMT WVRQAPQGQGLEWMG

```

```

                -----CDRH2-----
m1A11  YISCYNGATRYNQKFKG KATFTVDTSSRTAYMQFSSLTSEDSAVYFCAR
m11C1  QIFPVRGSADYNEIFEG KATLTVDTSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAR
m5F5   EIYPRSVNSYYNERFKG KATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAR
m21D1  WIFPGNHDVEYNEKFKG KATLTADTSSSTADMHLSSLTSEDSAVYFCAR
m13B8  QIFPASGSADYNEMFEG KATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR
h13B8a QIFPASGSADYNEMFEG RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
h13B8b QIFPASGSADYNEKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
h13B8c QIFPASGSADYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR

```

```

                -----CDRH3-----
m1A11  QGFYAMDY          WGQGTSVTVSS
m11C1  GGGGFAY          WGQGTLVTVSA
m5F5   GGNYYGRNYGDYFDY WGQGTTTLTVSS
m21D1  GGGNL-----PY  WGQGTLVTVSA
m13B8  GGGGFAY          WGQGTLVTVSA
h13B8a GGGGFAY          WGQGTLVTVSS
h13B8b GGGGFAY          WGQGTLVTVSS
h13B8c GGGGFAY          WGQGTLVTVSS

```

Şekil 1

```

-----CDRL1-----
m1A11  NVVMTQTPLTLSVTIGQPASISC KSSQSLLDSDGKT-YLN
m11C1  DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RASENIYS-----YLA
m5F5   SQAVVTQESALTTSPGETVTLTC RSSTGAVITSN---DAN
m21D1  DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RTSENIYS-----YLA
m13B8  DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RTSENIYS-----YLA
h13B8  DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RTSENIYS-----YLA

```

```

-CDRL2-
m1A11  WLLQRPQGSPKRLIY LVSKLDS GVPDRFTGSGSGT
m11C1  WYQEKWGKSPQLLVY NAKTLAE GVPSRFSGSGSGT
m5F5   WVQEKPDHSFTGLIG GTNNRAP GVPARFSGSLIGD
m21D1  WYQQKPGKAPKLLIY NAKTLAE GVPSRFSGSGSGT
m13B8  WYQQKQGKSPQLLVY NAKTLAE GVPSRFSGSGSGT
h13B8  WYQQKPGKAPKLLIY NAKTLAE GVPSRFSGSGSGT

```

```

--CDRL3--
m1A11  DFTLKISRVEAEDLGLYYC WQGFHFPFT FGSGTKLEIKR
m11C1  QFSLKINSLQSEDFGSYYC QHHYGTPFT FGSGTKLEIKR
m5F5   KAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWV FGGGTKLTVLG
m21D1  DFTLTISLQPEDFATYYC QHHYGIPFT FGQGTKVEIKR
m13B8  QFSLKINRLQPEDFGRYFC QHHYGIPFT FGSGTKLEIKR
h13B8  DFTLTISLQPEDFATYYC QHHYGIPFT FGQGTKVEIKR

```

Şekil 2