

ÖZET

KAN BEYİN BARIYERİNDEN TERAPÖTİK MOLEKÜLLERİN TAŞINMASININ ARTTIRILMASI

5

Buluş, kısmen bir BBB-transmigasyon antikorunun (örneğin, TEMEMAA (CDC-50A) bağlanma antikor, FC5) dimerik bir versiyonunun, monovalent FC5 VHH ile karşılaştırıldığında BBB'ye taşınmasını büyük ölçüde geliştirdiğinin bulunmasına bağlıdır. Buluş, diğerleri arasında, kan beyin bariyerine farmakolojik olarak aktif ajanların taşınmasını artıran moleküller, kan beyin bariyerine taşımayı artıran yöntemler ve nörolojik bir bileşene sahip rahatsızlıklar ve hastalıkların tedavisinin yöntemlerini sağlar.

10

İSTEMLER

1. En az bir farmakolojik olarak aktif ajan, TMEM30A'yı bağlayan tek alanlı antikorlara dahil edilen en az iki bağlama yeri ve bir birinci Fc kısmı ve bir ikinci Fc kısmı içeren bir Fc bölgesi içeren bir kimerik protein olan bir bağlama molekülü olup, özelliği TMEM30A'yı bağlayan en az iki bağlama yerinin her biri i) doğrudan veya ii) bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla sırasıyla birinci Fc kısmına ve ikinci Fc kısmının N-ucuna kaynaştırılmasıdır, burada Fc bölgesi spesifik olarak FcRn reseptörünü bağlar.
2. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği birinci Fc kısmının ve ikinci Fc kısmının her biri bir CH2 alanı ve bir CH3 alanı içermesidir.
3. İstemler 1'e veya 2'ye göre bağlama molekülü olup, özelliği birinci Fc kısmının ve ikinci Fc kısmının her biri, bir menteşe bölgesi, bir CH2 alanı ve bir CH3 alanı içermesidir.
4. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre bağlama molekülü olup, özelliği Fc bölgesi, bir IgG antikorundan olmasıdır.
5. Önceki istemlerin herhangi birine göre bağlama molekülü olup, özelliği
 - (a) en az iki bağlama yeri, FC5 amino asit dizisini içermesidir veya
 - (b) en az iki bağlama yeri, FC5 amino asit dizisinden oluşur.

6. Önceki istemlerin herhangi birine göre bağlama molekülü olup, özelliği birinci ve/veya ikinci Fc kısmı aglikosile edilmesidir.

5 7. Önceki istemlerin herhangi birine göre bağlama molekülü olup, özelliği SEQ ID NO: 1'i içermesidir.

10 8. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği bağlama molekülü TMEM30A'yı bağlayan tek alanlı antikorlara dahil edilen en az üç bağlama yeri içermesidir, daha tercihen burada bağlama molekülü TMEM30A'yı bağlayan tek alanlı antikorlara dahil edilen en az dört bağlama yeri içerir.

15 9. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği

(a) en az iki bağlama yeri sırasıyla birinci ve ikinci Fc kısmına doğrudan genetik olarak kaynaştırılmasıdır,
(b) en az iki bağlama yeri sırasıyla birinci ve ikinci Fc kısmına bir peptit bağlayıcı içeren bir araya-giren amino
20 asit dizisi vasıtasıyla genetik olarak kaynaştırılır veya
(c) en az iki bağlama yeri sırasıyla birinci ve ikinci Fc kısmına bir peptit bağlayıcıdan oluşan bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla genetik olarak kaynaştırılır.

25 10. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği en az iki bağlama yeri sırasıyla birinci ve ikinci Fc kısımlarının N ucuna bir peptit bağlayıcı içeren bir amino asit dizisi vasıtasıyla kaynaştırılmasıdır ve
30 burada (a) birinci ve ikinci Fc kısımları farklı immünoglobülinlerden türetilir, (b) Fc-kısımlarının biri mutasyona uğratılır ve diğer Fc kısmı mutasyona uğratılmaz veya (c) her iki Fc kısmı mutasyona uğratılır ancak farklı mutasyonlar kullanılır.

35

11. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği

(a) en az iki bağlama yerinin biri, bir scFc molekülünün N-ucuna kaynaştırılmasıdır veya

5 (b) en az bir farmakolojik olarak aktif ajan, Fc bölgesinin C-ucuna kaynaştırılır.

12. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği en az bir farmakolojik olarak aktif ajan, bir küçük kimyasal varlık olmasıdır, tercihen burada küçük kimyasal varlık, bağlama molekülüne bir sistein rezidüsünde kaynaştırılır, daha tercihen burada sistein rezidüsü, bir mühendislik uygulanmış sistein rezidüsüdür.

15 13. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği en az bir farmakolojik olarak aktif ajan, bir polipeptit olmasıdır, tercihen burada en az bir farmakolojik olarak aktif ajan, bir antijen bağlama yeri içerir, daha tercihen burada antijen bağlama yeri bir TMEM30-olmayan bağlama antikorundan türetilir.

14. İstem 13'e göre bağlama molekülü olup, özelliği farmakolojik olarak aktif ajan, bir scFv molekülünden, bir Fab molekülünden ve bir tek alanlı antikordan oluşan gruptan seçilmesidir.

15. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği en az bir farmakolojik olarak aktif ajan bağlama molekülüne genetik olarak kaynaştırılmasıdır, tercihen burada en az iki bağlama yeri bir antikor molekülünün VH alanını içeren bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla genetik olarak kaynaştırılır veya burada en az iki bağlama yeri bir antikor molekülünün VL alanını içeren bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla genetik

olarak kaynaştırılır, tercihen burada araya-giren amino asit dizisi ilaveten bir peptit bağlayıcı içerir.

16. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği en az bir farmakolojik olarak aktif ajan bağlama molekülüne kovalent olarak bağlanır.

17. İstem 15'e göre bağlama molekülü olup, özelliği

(a) en az iki bağlama yeri bir aynen antikor molekülünün bir VH alanının N ucuna genetik olarak kaynaştırılmasıdır veya

(b) en az iki bağlama yeri bir aynen antikor molekülünün bir VL alanının N ucuna genetik olarak kaynaştırılır

18. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği en az iki bağlama yeri, bir aynen antikor molekülünün bir VH alanının ve bir VL alanının N ucuna genetik olarak kaynaştırılmasıdır.

19. İstem 1'e göre bağlama molekülü olup, özelliği farmasötik olarak aktif ajan, bir nöroaktif peptitten, bir küçük kimyasal varlıktan ve santral sinir sistemindeki bir hedefi bağlayan bir antikorun bir değişken bölgesinden oluşan gruptan seçilmesidir.

20. İstemler 1-19'dan herhangi birine göre bağlama molekülü olup, özelliği bir nörolojik bozukluğunu tedavi etmede kullanıma yöneliktir.

21. İstem 20'ye göre kullanım için bağlama molekülü olup, özelliği nörolojik bozukluk, bir depolama bozukluğu, kronik ağrı, epilepsi, multipl skleroz, bir proteinopati veya bir demiyelinizan bozukluğu olmasıdır.

TARİFNAME

KAN BEYİN BARIYERİNDEN TERAPÖTİK MOLEKÜLLERİN TAŞINMASININ ARTTIRILMASI

5

Buluşun Alt-Yapısı

Vücut boyunca makro-moleküllerin dağılımı genel olarak, kapiler vaskülatürün hayli fenestre endotelyal hücre astarlarını geçerek dokuların içine difüz eden kandaki makro-moleküler ile aracılık edilen difüzyondur. Makro-moleküllerin serbest difüzyonu, hayli vaskülarize olmuş beyinde gerçekleşmez. Beyin kapiler endotelyal hücreleri, dolaşım sisteminin geri kalanında görülen fenestrasyonlardan ve hayli özelleşmiş endotelyal hücre sıkı intraselüler bağlantı-yerlerinden yoksundur. Bu sıkı bağlantı-yerleri, 400 kDa'dan daha büyük olan moleküllerin kapilerin lümenal tarafından ablümenal tarafına serbest difüzyonunu önleme görevi görür. Buna ek olarak, kapilerler çeşitli transpörter sistemler, örneğin, Organik Anyon Transpörterler (OATS) ve aksi durumda endotelyal hücreler yoluyla difüz edebilen moleküllerin aktif bir şekilde taşıma gradyanlarını oluşturan Çok-İlaca Direnç (MDR) sistemlerini içerir. Sınırlayıcı bariyerlerin kombinasyonu, örneğin, toksinleri ve virüsleri içeren, avantajlı ajanların girişini önler aynı zamanda terapötik varlıkların difüzyonunu sınırlandırır. Buna ek olarak, bu sınırlayıcı kan beyin bariyerleri (BBB) potansiyel olarak terapötik proteinlerin, peptitlerin ve küçük moleküllerin farmakolojik olarak terapötik dozlarda beyin parankimasına pasif aktarımını etkili bir şekilde bloke eder.

Terapötik moleküllerin BBB endotelyal hücrelerini geçerek taşınmasını sağlamak için başarılı bir strateji, reseptör aracılı transsitoz (RMT) avantajını kullanmaktır. Bu strateji, BBB endotelyal hücreleri üzerinde, moleküllerin BBB endotelyal

hücrelerini geçerek taşınmasına tipik olarak dahil edilen, proteinleri spesifik olarak bağlayan antikorları veya molekülleri kullanır. Bu tarz antikorlar, BBB endotelyal hücrelerini geçerek transsitoz gerçekleştirirken tutturulmuş yükleri aktarmak için mekik molekülleri olarak kullanılır. Bu teknolojinin uygulamalarının örnekleri, transferrin reseptörü ve insülin reseptörleri için antikorların kullanımını içerir (Yu et al., 2011. Science Translational Medicine. Volume 3). Bu iki durumda, RMT antikorlar terapötik protein alanlarına C-ucundan kaynaştırılmıştır ve molekülleri BBB'yi geçerek taşıdığı gösterilmiştir. Ne yazık ki, yaygın şekilde kullanılan RMT hedefleri transferrin ve insülin reseptörleri çok sayıda dokuda hayli ve geniş bir şekilde eksprese edilir. Bu geniş hedef ekspresyon sonuçları, bir kısa dolaşım yarı-ömrü ile sonuçlanır, yani nihayetinde BBB endotelyal hücrelerine maruziyet ve böylece molekülün beyin içine dozlanma süresini sınırlandırır. Buna ek olarak, bu antikorlar metabolik olarak kritik hücresel fonksiyonları hedef alır, böylece bir potansiyel güvenlik riski oluşturur.

BBB'yi geçmek için aktif BBB taşıma moleküllerinden faydalanan iyileştirilmiş hedefleme kısımlarının, *örneğin*, BBB'yi geçerek trans-göç-eden antikör moleküllerinden türetilen bağlama yerlerinin, terapötiklerin beyne aktarımı için büyük bir yararı olacaktır.

Abulrob et al., (International Congress Series, Excerpta Medica, 2005, vol. 1277: 212-223), bir HRP-IgG füzyon proteinine kimyasal konjugat olan anti-TME30A tek alanlı antikör FC5'i aynı zamanda FC5 ve verotoksin-kısımları içeren bir füzyon proteinini açıklar.

Buluşun Kısa Açıklaması

Buluşun ana konusu, istemler ile tanımlanır. Buluş, en azından kısmen, bir kan beyin bariyerini (BBB) trans-göç-eden antikör, *örneğin*, bir TMEM30A (CDC-50A) bağlama antikörü (mesela, *örneğin*, tek alanlı antikör FC5), içeren bir füzyon proteininin tek-değerlikli V_{HH} 'ye kıyasla BBB'yi geçerek taşımayı büyük ölçüde güçlendirdiğinin bulunduğu bulgusuna dayanır. İlk bağlama ve BBB endotelyal taşıma deneyleri, FC5'in, bir lama tek alanlı V_{HH} antikörünün (sdAb), bir BBB endotelyal hücre katmanını geçen taşımayı kolaylaştırabildiğini göstermiştir (bakınız, *örneğin*, 7,943,129 U.S. Patenti). Bir V_{HH} 'nin dolaşımdaki yarı-ömrünün, düşük moleküler ağırlığından ve bir Fc alanının yokluğundan dolayı kısa olduğu bilinir (Jain, M., Kamal, N. ve Batra, S. K. (2007) Trends in biotechnology 25(7), 307-316; Batra, S. K., Jain, M., Wittel, U. A., Chauhan, S. C. ve Colcher, D. (2002) Current opinion in biotechnology 13(6), 603-608). İlginç bir şekilde, bu yapının dolaşımdaki yarı-ömrü bir BBB-trans-göç-eden tek alanlı antikör, bir iki-değerlikli antikör benzeri yapı ile sonuçlanarak, bir insan Fc'sinin N-ucuna kaynaştırma ile büyük ölçüde arttırılmıştır. Bu tarz bir bağlama yerinin bir Fc yapısına katılması, hücresel yüzey üzerinde eksprese edilen, varsayımsal hedefe, *örneğin*, TMEM30A'ya, bağlanmış her bir bağlama kısmını iki-değerlikli bağlama potansiyeli ile, bir iki-değerlikli molekül oluşturur. İki-değerlikli bağlama, bir avidite etkisinden dolayı görünür bağlama afinitesinde bir anlamlı değişime yön verebilir (Reynolds, J. A. (1979) Biochemistry 18(2), 264-269; Hubble, J. (1999) Molecular immunology 36(1), 13-18). Burada gösterildiği üzere, etkileşimin afinitesi arttırılmıştır. Bu afinite artışı hesaba katıldığında, Fc'nin bir iki-değerlikli molekül oluşturmak için eklenmesinin BBB'yi geçerek taşımayı anlamlı bir şekilde arttırdığı bulgusu beklenmemiştir. Bir Fc alanının eklenmesinin molekülün böbrek filtrasyonunu önleyen arttırılmış kütlesinden ve FcRn'yi bağlama ile antikör geri-dönüşümünün *in vivo* teşvik edilmesinden dolayı beta-fazı

farmakokinetiklerini uzatabilmesine rağmen, güçlendirilmiş görünür afinite artışının ayrıca bir hayli eksprese edilmiş hedefi bağlama üzerine dolaşımdaki bağlama moleküllerinin eliminasyonundan dolayı karşı etkiye de sahip olabileceğinden, arttırılmış taşıma beklenmemiştir. Bununla birlikte, en ilginç, burada gösterildiği üzere, bağlama yeri-Fc konformasyonundaki (amino ucundan karboksi ucuna doğru, yani, Fc'nin N-ucuna kaynaştırılmış bağlama yeri) füzyon proteinlerinin, Fc-bağlama yeri konformasyonundakilere (Fc'nin C-ucuna kaynaştırılmış bağlama yeri) kıyasla daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu, Fc-bağlama yeri füzyon proteinlerinin (Fc'nin C-ucuna kaynaştırılmış bağlama yeri) *in vitro* yapılan ilk deneylerde endotelial hücreleri arttırılmış bağlama gösterdiği gerçeğine rağmen doğrudur. Bağlama yeri-Fc yapılarının tek-değerlikli versiyonları da sağlanır.

Bu doğrultuda, bir yönünde, açıklama en az bir farmakolojik olarak aktif ajan ve TMEM30A'yı bağlayan en az bir bağlama yeri, *örneğin*, bir BBB trans-göç-etme bağlama yeri, içeren bir bağlama molekülü sağlar, burada TMEM30A'yı bağlayan en az bir bağlama yeri i) doğrudan veya ii) bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla bir Fc kısmının N-ucuna kaynaştırılır. Buluşun bağlaması, en az iki bağlama yeri içerir.

Açıklamanın bir yönünde, en az bir bağlama yeri, FC5 amino asit dizisi içerir. Açıklamanın bir yönünde, bağlama molekülü, TMEM30A'yı bağlayan en az iki veya en az üç (*örneğin*, iki veya üç) bağlama yeri içerir. Bir uygulamada, bağlama molekülü, TMEM30A'yı bağlayan en az üç veya en az dört (*örneğin*, üç veya dört) bağlama yeri içerir.

Açıklamanın bir yönünde, en az bir BBB trans-göç-etme yeri (*örneğin*, BBB'yi geçerek trans-göç-eden antikör

moleküllerinden türetilen bağlama yeri), Fc kısmına genetik olarak doğrudan kaynaştırılır.

5 Açıklamanın bir yönünde, en az bir BBB trans-göç-etme yeri (örneğin, BBB'yi geçerek trans-göç-ededen antikor moleküllerinden türetilen bağlama yeri), bir peptit bağlayıcı içeren bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla Fc kısmına genetik olarak kaynaştırılır.

10 Açıklamanın bir yönünde, en az bir BBB trans-göç-etme yeri (örneğin, BBB'yi geçerek trans-göç-ededen antikor moleküllerinden türetilen bağlama yeri), bir peptit bağlayıcıdan oluşan bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla Fc kısmına genetik olarak kaynaştırılır.

15 Açıklamanın bir yönünde, iki BBB trans-göç-etme yeri (örneğin, BBB'yi geçerek trans-göç-ededen antikor moleküllerinden türetilen bağlama yerleri), bir peptit bağlayıcı içeren bir amino asit dizisi vasıtasıyla bir tam Fc bölgesinin iki farklı
20 Fc kısmının N ucuna kaynaştırılır.

Açıklamanın bir yönünde, en az bir BBB trans-göç-etme yeri (örneğin, BBB'yi geçerek trans-göç-ededen antikor moleküllerinden türetilen bağlama yerleri), bir scFc
25 molekülünün N ucuna kaynaştırılır.

Bir uygulamada, en az bir farmakolojik olarak aktif ajan Fc bölgesinin C-ucuna kaynaştırılır.

30 Bir uygulamada, en az bir farmakolojik olarak aktif ajan bir küçük kimyasal varlıktır.

Bir uygulamada, küçük kimyasal varlık, bağlama molekülüne bir sistein rezidüsünde kaynaştırılır. Bir uygulamada, sistein
35 rezidüsü, bir mühendislik uygulanmış sistein rezidüsüdür.

Bir uygulamada, en az bir farmakolojik olarak aktif ajan bir polipeptittir.

- 5 Bir uygulamada, en az bir farmakolojik olarak aktif ajan bir antijen bağlama yeri (örneğin, bir BBB-trans-göç-etmeyen antikordan türetilen bir antijen bağlama yeri) içerir.

- 10 Bir uygulamada, farmakolojik olarak aktif ajan, bir scFv molekülünden, bir Fab molekülünden ve bir tek alanlı antikordan oluşan gruptan seçilir.

Bir uygulamada, en az bir farmakolojik olarak aktif ajan bağlama molekülüne genetik olarak kaynaştırılır.

- 15 Bir uygulamada, en az bir farmakolojik olarak aktif ajan bağlama molekülüne kovalent olarak bağlanır.

- 20 Açıklamanın bir yönünde, BBB trans-göç-etme yeri bir antikor molekülünün VH alanını içeren bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla genetik olarak kaynaştırılır.

- 25 Açıklamanın bir yönünde, BBB trans-göç-etme yeri bir antikor molekülünün VL alanını içeren bir araya-giren amino asit dizisi vasıtasıyla genetik olarak kaynaştırılır.

- 30 Açıklamanın bir yönünde, en az bir BBB trans-göç-etme yeri bir aynen antikor molekülünün bir VH alanının N ucuna genetik olarak kaynaştırılır.

Açıklamanın bir yönünde, en az bir BBB trans-göç-etme yeri bir aynen antikor molekülünün bir VL alanının N ucuna genetik olarak kaynaştırılır.

Açıklamanın bir yönünde, iki BBB trans-göç-etme yeri bir aynen antikör molekülünün bir VH alanının ve bir VL alanının N ucuna genetik olarak kaynaştırılır.

- 5 Bir uygulamada, araya-giren amino asit dizisi ilaveten bir peptit bağlayıcı içerir.

Bir uygulamada, farmasötik olarak aktif ajan, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: bir nöroaktif peptit, bir küçük kimyasal varlık ve santral sinir sisteminde bir hedefi bağlayan bir antikörün bir değişken bölgesi.

Bir uygulamada, buluş bir nörolojik bozukluğu tedavi etmenin, buluşun bağlama molekülünü bir süjeye uygulamayı içeren bir yönteminde kullanım için buluşun bir bağlama molekülü ile ilgilidir.

Bir uygulamada, nörolojik bozukluk bir depolama bozukluğudur. Bir uygulamada, nörolojik bozukluk kronik ağrıdır. Bir uygulamada, nörolojik bozukluk, epilepsidir. Bir uygulamada, nörolojik bozukluk multipl sklerozdur. Bir uygulamada, nörolojik bozukluk proteinopati hastalığıdır. Bir uygulamada, nörolojik bozukluk bir demiyelinizan bozukluktur.

25 Bir başka uygulamada, buluş bir nörolojik bozukluğun tedavisi için bir ilacın imalatında buluşun bir bağlama molekülünün kullanımı ile ilgilidir.

Şekillerin Kısa Açıklaması

30

Şekil 1, (a) tek başına, (b) N-ucundan (FC5-Fc) veya (c) C-ucundan (Fc-FC5) bir insan IgG1 ağırlı Fc alanına kaynaştırılmış FC5 tek ağır alanlı antikörün aynı zamanda bir farmasötik olarak aktif kısım olarak bir BBB-trans-göç-etmeyen alanı katan olası antikör-benzeri yapıların

35

(d, e) diyagram şeklindeki temsillerini gösterir. Moleküller (f) ve (g), bir FC5 tek ağır alanlı antikorun bir tam antikor molekülüne eklenmesini gösterir; tek ağır alanlı antikor, *örneğin*, VL veya VH alanına veya her ikisine, kaynaştırılabilir.

Şekil 2, Her bir saflaştırılmış proteinin 2,5 µg'ının bir %4-12'lik Bis-Tris SDS PAGE üzerindeki elektroforezini gösterir. 10-220 kD aralığındaki SDS PAGE moleküler ağırlık standartları her bir jel üzerinde etiketlenir. Panel A'da indirgememe (1) ve indirgeme sütunu (2) FC5, Panel B'de indirgememe (1) ve indirgeme sütunu (2) FC5-Fc ve Panel C'de indirgememe (1) ve indirgeme sütunu (2) Fc-FC5 gösterilir.

Şekil 3, FC5Fc'nin, FcFC5'in ve FC5'in 12F6A (hIgG1), CRL2434 (mIgG1) ve C37H (yalnızca V_{HH}) kontrol antikorları ile karşılaştırıldığında bir *in vitro* SV40 sıçan BBB transforme edilmiş endotelial hücre hattını geçerek taşınmasının arttırılmış hızını gösterir.

Şekil 4a-c. Panel 4(a), FC5-Fc'nin (○), Fc-FC5'in (■) ve bir huFc agli alanının (V_{HH} -Fc) (Δ) N-uçlarına kaynaştırılmış bir ilgisi olmayan kontrol kamelid V_{HH}'sinin bir SV40 sıçan BBB transforme edilmiş endotelial hücre hattını bağlamasını gösterir. Panel (4b), FC5-Fc'nin (○) ve Fc-FC5'in (■) bir primer sıçan BBB endotelial hücre hattını bağlamasını gösterir. Panel 4c, FC5-Fc'nin sıçan (□) veya insan (◇) ve Fc-FC5'in EBNA293 hücrelerinde geçici olarak eksprese edilen sıçan (▲) veya insan (●) TMEM30A'sını bağlamasını gösterir.

Şekil 5a-c. Panel 5a, Dalargin'e kovalent olarak çapraz-bağlanmış FC5'in (FC5-Dal) Hargreaves hayvan modelinde ağrıyı baskılama yetisini gösterir. Pati geri-çekme hızı,

bir 20 saniyelik zaman çerçevesine göre maksimum olası etkinin yüzdesi (MPE'nin %'si) olarak ifade edilir. Negatif kontrol kontralateral enflamasyon-meydana gelmeyen kontrol patisi için pati geri-çekme hızını gösterir (●) ve pozitif kontrol sıçana yalnızca PBS IV enjekte edildiğinde enflamasyon-meydana gelen patinin çabuk pati geri-çekme hızını gösterir (○). 21 mg/Kg'da (mpk) FC5-Dal'ın bir tek IV dozunun (■) etkinliği, Hargreaves hayvanda pati geri-çekme hızını baskılamak için 7 mpk'da FC5-Dal'ın üç IV dozu (□) ile karşılaştırılır. Panel 5b, değerlendirilen her bir pati için zamana karşı MPE yanıt %'si için eğri altında kalan ortalama alanı gösterir. Panel 5c, burada sıçanlara 7 mpk bir ilgisi olmayan V_{HH}-Dal'ın (gir kutuların) veya tek başına FC5'in (içi boş kutular) zaman 0'da, 1 sa'te ve 2 sa'te üç doz ile IV enjekte edildiği ilave negatif kontrol deneylerini gösterir. Kontralateral kontrol patisi de gösterilir (içi dolu daireler). Pati geri-çekme hızının supresyonu için MPE'nin %'si Hargreaves hayvanda belirlenmiştir.

Şekil 6a-d. Fc-FC5-Dal'ın etkinliği Hargreaves modelinde değerlendirilmiştir. Sıçanlar Panel 6a'da zaman 0'da ve Panel 6B'de zaman 0'da ve 2 sa'te 2 mpk'da IV dozlanmıştır. Paneller 6C'de ve 6D'de her bir sıçan zaman 0'da 6,5 mpk'da IV dozlanmıştır.

Şekil 7a-d. FC5-Fc-Dal'ın Hargreaves modelinde etkinliği, bir negatif kontrol Fc-Dal ile karşılaştırılmıştır. Zaman 0'da sıçanlar 0,5, 2,5 veya 6,0 mpk'da FC5-Fc-Dal'ın veya Fc-Dal'ın bir tek konsantrasyonu ile IV dozlanmıştır. Veriler paneller 7a'da ve 7b'de, verilen zamanda maksimum olası etki yüzdesi (MPE) olarak veya paneller 7c'de ve 7d'de eğri altında kalan alan yüzdesi olarak sunulur.

Buluşun Detaylı Açıklaması

En az bir BBB trans-göç-eden, *örneğin*, TMEM30A'yı bağlayan (CDC-50A), tek alanlı antikor (*örneğin*, bir FC5 tek alanı) içeren bir füzyon proteininin, tek-değerlikli V_{HH} ile 5 karşılaştırıldığında BBB'yi geçen taşıma büyük ölçüde arttırdığı bulunmuştur. Özel olarak, bağlama yeri-Fc konformasyonu (amino ucundan karboksi ucuna) güçlendirilmiş aktivite göstermiştir. En azından kısmen, bu anlamlı bir şekilde arttırılmış taşımaya dayanarak, kan beyin bariyerini 10 geçen arttırılmış taşınması olan moleküller, kan beyin bariyerini geçen taşımayı arttırmak için yöntemler ve bu tarz molekülleri kullanan tedavi yöntemleri burada tarif edilir.

Buluşun ilave açıklamasından önce, kolaylık olması için, 15 belirli terimler aşağıda tarif edilir:

I. Tanımlar

Burada kullanıldığı şekliyle, "protein" veya "polipeptit" 20 terimi, doğal amino asitlerin veya doğal-olmayan amino asitlerin ikisinin veya daha fazlasının bir polimerini ifade eder.

"Amino asit" terimi, alanini (Ala veya A); arjinini (Arg veya 25 R); asparajini (Asn veya N); aspartik asidi (Asp veya D); sisteini (Cys veya C); glutamini (Gln veya Q); glutamik asidi (Glu veya E); glisinini (Gly veya G); histidini (His veya H); izolösini (Ile veya I); lösini (Leu veya L); lizini (Lys veya K); metiyonini (Met veya M); fenilalanini (Phe veya F); 30 prolini (Pro veya P); serini (Ser veya S); treonini (Thr veya T); triptofanı (Trp veya W); tirozini (Tyr veya Y) ve valini (Val veya V) içerir. Geleneksel-olmayan amino asitler de buluşun kapsamı içindedir ve norlösini, omitini, norvalini, homoserini ve diğer amino asit rezidüsü analoglarını, *örneğin*, 35 Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991), kaynağında

tarif edilenleri, içerir. Bu tarz doğal oluşumlu-olmayan amino asit rezidülerini üretmek için, Noren et al., Science 244:182 (1989) ve Ellman et al., *supra*, prosedürleri kullanılabilir. Özet olarak, bu prosedürler, bir supresör tRNA'yı bir doğal oluşumlu-olmayan amino asit rezidüsü ile kimyasal olarak aktive etmeyi, akabinde *in vitro* transkripsiyonu ve RNA'nın translasyonunu içerir. Geleneksel-olmayan amino asidin uygulanması ayrıca, teknikte bilinen peptit kimyaları kullanılarak da başarılabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "polar amino asit" terimi, net sıfır yüke sahip olan, ancak bunların yan zincirlerinin farklı kısımlarında sıfır-olmayan parsiyel yüklere sahip olan amino asitleri (örneğin, M, F, W, S, Y, N, Q, C) içerir. Bu amino asitler hidrofobik etkileşimlerin ve elektrostatik etkileşimlerin parçası olabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "yükü amino asit" terimi, bunların yan zincirleri üzerinde sıfır-olmayan net yüke sahip olabilen amino asitleri (örneğin, R, K, H, E, D) içerir. Bu amino asitler hidrofobik etkileşimlerin ve elektrostatik etkileşimlerin parçası olabilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "bağlayıcı peptit" terimi, iki polipeptit dizisini birleştiren veya bağlayan, örneğin, iki polipeptit alanını bağlayan, amino asit dizilerini ifade eder, bu amino asit dizileri iki polipeptit alanını doğada doğal olarak birleştirmez veya bağlamaz. Bir uygulamada, bir bağlayıcı peptit sentetiktir. Burada kullanıldığı şekliyle, "sentetik" terimi, doğal oluşumlu olmayan amino asit dizilerini ifade eder.

Buluşun bağlayıcı peptitleri, iki amino asit dizisini peptit bağları vasıtasıyla birleştirir. Bir uygulamada, bir bağlayıcı peptit, bir BBB trans-göç-etme kısmını bir ikinci kısma, örneğin, bir Fc kısmına, alanına veya bölgesine, birleştirir. Bir uygulamada, buluşun bir bağlayıcı peptidi, bir farmakolojik olarak aktif kısmı bir lineer dizi halinde bir

ikinci kısma, *örneğin*, bir BBB trans-göç-etme kısmı veya bir Fc kısmı alanı veya bölgesi olan bir ikinci kısma, birleştirir. Bir başka uygulamada, bir bağlayıcı peptit iki farmakolojik olarak aktif kısmı birleştirir. Bir uygulamada, bir bağlayıcı peptit, bir veya birden fazla Fc kısmı alanını veya bölgesini bir Fc-olmayan kısma birleştirir veya genetik olarak kaynaştırır.

Polipeptitler bağlamında, bir "lineer dizi" veya bir "dizi", bir amino ucundan karboksil ucuna doğru olan yönde bir polipeptit içindeki amino asitlerin sırasıdır, burada dizi içinde birbirine komşu olan rezidüler polipeptidin primer yapısı içinde bitişiktir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "bağlanmış", "kaynaştırılmış" veya "füzyon" terimleri birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır. Bu terimler, kimyasal konjugasyonu veya rekombinant araçları içeren herhangi bir araç ile, iki veya daha fazla elemanın veya bileşenin birbirine birleştirilmesini ifade eder. Burada kullanıldığı şekliyle, "kovalent olarak kaynaştırılmış" veya "kovalent olarak kuple edilmiş" terimi, belirtilen kısımların bir diğerine doğrudan kovalent olarak bağlandığı veya başka şekilde bir araya-giren kısım veya kısımlar, *örneğin*, bir bağlama peptidi veya kısım, yoluyla bir diğerine dolaylı olarak kovalent olarak bağlandığı anlamına gelir. Bir tercih edilen uygulamada, kısımlar kovalent olarak kaynaştırılır. Kovalent bağlantının bir tipi bir peptit bağıdır. (*Örneğin*, heterobifonksiyonel çapraz-bağlama ajanları kullanılan) kimyasal konjugasyon yöntemleri teknikte bilinir.

Kaynaştırılmış kısımlar ayrıca genetik olarak da kaynaştırılabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "genetik olarak kaynaştırılmış", "genetik olarak bağlanmış" veya "genetik füzyon" terimi, bu proteinleri, polipeptitleri veya fragmanları şifreleyen bir tek polinükleotid molekülünün genetik ekspresyonu yoluyla, bunların münferit peptit

omurgaları vasıtasıyla iki veya daha fazla proteinin, polipeptidin veya bunların fragmanlarının ko-lineer, kovalent bağlantısını veya tutturulmasını ifade eder. Bu tarz genetik füzyon, bir tek bitişik genetik dizinin ekspresyonu ile sonuçlanır. Tercih edilen genetik füzyonlar çerçeve içindedir, yani, iki veya daha fazla açık okuma çerçevesi (ORF), orijinal ORF'lerin doğru okuma çerçevesini idame ettiren bir şekilde, bir sürekli daha uzun ORF oluşturmak için kaynaştırılır. Böylelikle, elde edilen rekombinant füzyon proteini, orijinal ORF'ler tarafından şifrelenen polipeptitlere karşılık gelen iki veya daha fazla protein segmentini içeren bir tek polipeptittir (bu segmentler, doğada normal olarak bu şekilde birleştirilmez). Bu durumda, tek polipeptit, iki polipeptit zinciri içeren dimerik moleküller üretmek için işleme sırasında yarılır.

Söz konusu polipeptitler, en az bir farmakolojik olarak aktif kısım içerir. Bir farmakolojik olarak aktif kısım, bir biyolojik bağlamda bir etki veya bir reaksiyon gerçekleştirebilen bir kısmı ifade eder. Örneğin, "farmakolojik olarak aktif kısım" terimi, bir biyolojik sistemin bileşenlerini (örneğin, biyolojik sıvı içindeki veya hücrelerin yüzeyi üzerindeki veya hücresel matriks içindeki proteinleri) bağlayan farmakolojik olarak aktif molekülleri veya bunların kısımlarını ifade eder ve bu bağlama (örneğin, aktif kısımda ve/veya bunun bağladığı bileşende (örneğin, aktif kısmın bir klevajında ve/veya bunun bağladığı bileşende, bir sinyal aktarımında veya bir hücrede veya bir süjude bir biyolojik yanıtın arttırılmasında veya inhibisyonunda bir değişim ile ölçüldüğü üzere) bir biyolojik etki ile sonuçlanır. Tercih edilen farmasötik olarak aktif kısımlar, terapötik kısımlardır.

Emsal farmakolojik olarak aktif kısımlar, örneğin, bir ilaç, bir antikör molekülünün bir antijen bağlama fragmanını veya

bunun kısmını (örneğin, F(ab), scFv, bir VH alanı veya bir VL alanı) (örneğin, bir biyolojik yanıtı vermek, indüklemek veya bloke etmek için), bir reseptörün bir ligand bağlama kısmını veya bir ligandın bir reseptör bağlama kısmını, bir enzimi, vb. içerebilir. Bir uygulamada, bir farmakolojik olarak aktif kısım, bir proteinin matür formunu içerir. Bir başka uygulamada, bir farmakolojik olarak aktif kısım, bir tam boy proteinin biyolojik aktiviteyi muhafaza eden bir kısmını içerir. Diğer emsal farmakolojik olarak aktif kısımlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, polinükleotidleri, oligonükleotidleri, karbonhidratları ve lipitleri içeren, terapötik olarak yararlı amino asitleri, peptitleri, proteinleri, nükleik asitleri içerir. Mevcut buluşun emsal farmakolojik olarak aktif kısımları, nörotrofik faktörleri, büyüme faktörlerini, enzimleri, antikorları, nörotransmitterleri, nöromodülatörleri, antibiyotikleri, antiviral ajanları, antifungal ajanları, görüntüleme ajanlarını veya saptanabilen ajanları, izotopları ve kemoterapötik ajanları ve benzerlerini içerir. Mevcut buluşun farmakolojik olarak aktif kısımları ayrıca, terapötik ajan hedef dokuya aktarıldığında aktive edilebilen ilaçları, ön-ilaçları ve öncülleri de içerir. "Farmakolojik olarak aktif kısımlar" terimi, bir BBB trans-göç-etme kısmını içerdiği anlamına gelmez. Farmakolojik olarak aktif ajanlar, BBB-trans-göç-etmeme kısımlarıdır.

Buluşun bağlama molekülleri, "kimerik" proteinlerdir veya "füzyon" proteinleridir. Bu tarz proteinler, bunun doğada doğal olarak bağlı olmadığı bir ikinci amino asit dizisine bağlanmış bir birinci amino asit dizisini içerir. Amino asit dizileri normal olarak, füzyon polipeptidi içinde bir araya getirilen ayrı proteinler halinde bulunabilir veya bunlar normal olarak, aynı protein içinde bulunabilir, ancak füzyon polipeptidinde yeni bir dizilimde yerleştirilir. Bir kimerik protein, teknikte iyi bilinen yöntemler kullanılarak, örneğin,

kimyasal sentez ile veya burada peptit bölgelerinin arzu edilen ilişki içinde şifrelendiği bir polinükleotidi oluşturma ve aktarma ile, oluşturulabilir.

5 Açıklamanın polipeptitleri, bağlama molekülleridir, yani, BBB-trans-göç-eden antikorlardan türetilen bağlama alanları veya bağlama yerleri içerir. Bir BBB trans-göç-eden antikor, buna tutturulmuş olan bir kısmın BBB'yi geçerek trans-göçünü kolaylaştırır. Emsal BBB trans-göç-eden antikor bağlama yerleri, 7,943,129 Numaralı U.S. Patenti'nde tarif edilir. Bir 10 yönünde, bir BBB trans-göç-eden antikor, TMEM30A'yı bağlar. Burada kullanıldığı şekliyle, "bağlama alanı" veya "bağlama yeri" terimleri, polipeptidin bir hedef molekül ile spesifik bağlamaya aracılık eden kısmını, bölgesini veya yerini 15 (örneğin, bir TMEM30A bağlama yerini veya BBB trans-göçünü kolaylaştıran bir başka yeri) ifade eder. Emsal bağlama alanları, bir antijen bağlama yerini (örneğin, bir VH ve/veya VL alanını) veya bu tarz bir bağlama yerini içeren molekülleri (örneğin, bir antikoru veya bir tek alanlı antikoru) içerir.

20

Açıklamanın polipeptitleri, BBB trans-göç-etme kısmı açısından tek-değerliklidir veya çok-değerliklidir, örneğin, en az 1, 2, 3, 4, 5 veya daha fazla BBB trans-göç-etme kısmı içerir.

25

Burada tarif edildiği üzere farmakolojik olarak aktif kısımlar ayrıca, örneğin, bir antikor molekülünden türetildiği şekilde, bağlama alanlarını veya bağlama yerlerini (örneğin, BBB'den trans-göç-etmeyen bir antikordan bir VH ve/veya VL alanını),

30

bu tarz bir bağlama yerini içeren molekülleri (örneğin, bir antikoru veya tek değerlikli antikoru), bir liganın bir reseptör bağlama alanını, bir reseptörün bir ligand bağlama alanını veya bir katalitik alanı da içerebilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "ligand bağlama alanı" terimi, bir 35 natif reseptörü (örneğin, hücre yüzeyi reseptörünü) veya bunun

en az bir kalitatif ligand bağlama yetisini ve tercihen karşılık gelen natif reseptörün biyolojik aktivitesini, muhafaza eden bir bölgesini veya türevini ifade eder. Burada kullanıldığı şekliyle, "reseptör bağlama alanı" terimi, bir natif ligandı veya bunun en az bir kalitatif reseptör bağlama yetisini ve tercihen karşılık gelen natif ligandın biyolojik aktivitesini, muhafaza eden bölgesini veya türevini ifade eder.

10 Bir uygulamada, buluşun polipeptitleri modifiye edilmiş antikorlardır. Burada kullanıldığı şekliyle, "modifiye edilmiş antikor" terimi, antikorların, bunların doğal oluşumlu olmadığı şekilde değiştirildiği, sentetik formlarını, *örneğin*, en az iki ağır zincir kısmı içeren, ancak iki tam ağır zincir içermeyen antikorları (*örneğin*, alanı silinmiş antikorları veya minibodileri); iki veya daha fazla farklı antijeni, *örneğin*, TMEM30A'yı ve Fc kısımlarına, alanlarına, bölgelerine veya scFc bölgelerine birleştirilmiş bir terapötik olarak ilgili hedef bağlama yerini) bağlaması için değiştirilmiş antikorların multispesifik formlarını (*örneğin*, bispesifik, trispesifik, vb.), içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "Fc bölgesi" terimi, bir polipeptidin, natif immünoglobülinin Fc bölgesine karşılık gelen, kısmı olarak, *yani*, bunun iki ağır zincirinin ilgili Fc alanlarının (veya Fc kısımlarının) dimerik birleşmesi ile oluşturulduğu şekilde, tanımlanmalıdır. Bir natif Fc bölgesi homodimeriktir ve iki polipeptit zinciri içerir. Aksine, burada kullanıldığı şekliyle, "genetik olarak-kaynaştırılmış Fc bölgesi" veya "tek-zincirli Fc bölgesi" (scFc bölgesi) terimi, *örneğin*, 20110243966 U.S. Başvurusu'nda, tarif edildiği üzere bir tek polipeptit zinciri içinde genetik olarak bağlanmış (*yani*, bir tek sürekli genetik dizi içinde şifrelenen) Fc alanlarından (veya Fc kısımlarından) oluşan bir sentetik dimerik Fc bölgesini ifade eder. Bir yönünde, bir

scFc bölgesi kullanıldığında, bağlama molekülü BBB trans-göç-etme kısmı açısından tek-değerliklidir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "Fc alanı" terimi, bir tek
5 immünoglobülin ağır zincirinin menteşe bölgesinde papain
klevaj yerine hemen upstream (yani, ağır zincir sabit
bölgesinin birinci rezidüsü 114 olarak alındığında, IgG'de
rezidü 216'dan) başlayan ve antikorun C-ucunda biten kısmını
ifade eder. Bu doğrultuda, bir tam Fc alanı, en az bir menteşe
10 bölgesi, bir CH2 alanı ve bir CH3 alanı içerir. Burada
kullanıldığı şekliyle, "Fc bölgesi" terimi, natif antikorların
(örneğin, geleneksel iki polipeptit zincirli formatta veya bir
tek zincirli Fc bölgesi olarak yapılan) Fc bölgesine benzeyen
dimerize edilmiş Fc alanlarını ifade eder.

15 Burada kullanıldığı şekliyle, "Fc alanı kısmı" veya "Fc
kısmı", bir Fc alanının veya bir Fc alanından türetilmiş bir
amino asit dizisini içerir. Belirli yönlerinde, bir Fc kısmı,
aşağıdakilerin en az birini içerir: bir menteşe (örneğin, üst,
20 orta ve/veya alt menteşe bölgesi) alanı, bir CH2 alanı, bir
CH3 alanı, bir CH4 alanı veya bunların bir varyantı, kısmı
veya fragmanı. Diğer uygulamalarda, bir Fc kısmı, bir tam Fc
alanı (yani, bir menteşe alanı, bir CH2 alanı ve bir CH3
alanı) içerir. Bir yönünde, bir Fc kısmı, bir CH3 alanına
25 (veya bunun kısmına) kaynaştırılmış bir menteşe alanı (veya
bunun kısmını) içerir. Bir başka uygulamada, bir Fc kısmı, bir
CH3 alanına (veya bunun kısmına) kaynaştırılmış bir CH2 alanı
(veya bunun kısmını) içerir. Bir başka yönünde, bir Fc kısmı,
bir CH3 alanından veya bunun kısmından oluşur. Bir başka
30 yönünde, bir Fc kısmı bir menteşe alanından (veya bunun
kısmından) ve bir CH3 alanından (veya bunun kısmından) oluşur.
Bir başka yönünde, bir Fc kısmı, bir CH2 alanından (veya bunun
kısmından) ve bir CH3 alanından oluşur. Bir başka yönünde, bir
Fc kısmı bir menteşe alanından (veya bunun kısmından) ve bir
35 CH2 alanından (veya bunun kısmından) oluşur. Bir yönünde, bir

Fc kısmı, bir CH₂ alanının en az bir kısmından (örneğin, bir CH₂ alanının tümünden veya parçasından) yoksundur.

Bir uygulamada, buluşun bir bağlama molekülü, bir polipeptit zinciri (bir scFc molekülü) olarak veya iki polipeptit zinciri halinde doğal-tip formunda bulunan, bir tam Fc bölgesi içerir.

Spesifik olarak bağlanmış, bir kompleks oluşturan, fizyolojik koşullar altında görece kararlı olan iki molekülü ifade eder.

Spesifik bağlama, genel olarak bir orta ila yüksek derecede kapasite ile düşük bir afiniteye sahip olan spesifik-olmayan bağlamadan ayırt edildiği üzere, bir yüksek afinite ve bir düşük ila orta derecede kapasite ile karakterize edilir. Tipik olarak, afinite sabiti K_A , 10^6 M^{-1} 'den büyük olduğunda veya

daha tercihen 10^8 M^{-1} 'den büyük olduğunda, bağlamanın spesifik olduğu düşünülür. Gerektiğinde, spesifik-olmayan bağlama, bağlama koşullarını çeşitlendirme ile spesifik bağlamayı büyük ölçüde etkilemeden azaltılabilir. Uygun bağlama koşulları, örneğin, moleküllerin konsantrasyonu, çözeltinin iyonik

yitiliği, sıcaklık, bağlama için verilen süre, bir bloke etme ajanının (örneğin, serum albümininin, süt kaseininin) konsantrasyonu, vb., uzmanlığı olan kişi tarafından rutin teknikler kullanılarak optimize edilebilir. Buluşun bir Fc kısmı, en azından bir Fc molekülünün teknikte FcRn bağlaması

için gerekli olduğu bilinen, burada bir neonatal reseptörü (FcRn) bağlama partneri olarak ifade edilen, kısmını içerir.

Bir FcRn bağlama partneri, FcRn bağlama partnerinin FcRn reseptörü tarafından müteakip aktif taşıma ile FcRn reseptörü tarafından spesifik olarak bağlanabilen bir moleküldür veya

bunun kısmıdır.

Mevcut buluşun FcRn bağlama partnerleri, FcRn reseptörü tarafından spesifik olarak bağlanabilen, tam IgG'yi, IgG'nin Fc fragmanını ve FcRn reseptörünün tam bağlama bölgesini içeren diğer fragmanları içeren molekülleri kapsar. Bir başka

uygulamada, buluşun bir bağlama molekülünün bir Fc kısmı alanı veya bölgesi, bunun FcRn'yi azaltılmış veya minimal bağlama gösterdiği şekilde modifiye edilir. IgG'nin Fc kısmının FcRn reseptörünü bağlayan bölgesi, X-ışını kristalografisine göre

5 tarif edilmiştir (Burmeister et al., 1994, Nature 372:379). Fc'nin FcRn ile majör temas alanı, CH2 ve CH3 alanlarının bağlantı yerine yakındır. Fc-FcRn temaslarının tümü, bir tek Ig ağır zinciri içindedir. FcRn bağlama partnerileri, tam IgG'yi, IgG'nin Fc fragmanını ve IgG'nin FcRn'nin tam bağlama

10 bölgesini içeren diğer fragmanlarını içerir. Majör temas yerleri, CH2 alanının 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 ve 314 amino asit rezidülerini ve CH3 alanının 385-387, 428 ve 433-436 amino asit rezidülerini içerir. İmmünoglobülinlerin veya immünoglobülin fragmanlarının amino

15 asit numaralandırmasına yapılan referansların tümü, Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md, kaynağına göredir.

20 IgG'nin Fc bölgesi, FcRn tarafından bağlanacak olan modifiye edilmiş IgG veya Fc fragmanları veya bunların kısımlarını üretmek için iyi bilinen prosedürlere, örneğin, yere yönlendirilmiş mutajeneze ve benzerlerine, göre modifiye edilebilir. Bu tarz modifikasyonlar, FcRn temas yerlerinden

25 uzak modifikasyonları aynı zamanda FcRn'yi bağlamayı koruyan veya hatta güçlendiren temas yerleri içindeki modifikasyonları içerir. Örneğin, insan IgG1'i Fc'sindeki (Fc γ 1) aşağıdaki tek amino asit rezidüleri FcRn için Fc bağlama afinitesinin anlamlı kaybı olmadan sübstüte edilebilir: P238A, S239A,

30 K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A,

35 A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A,

K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A ve K447A, burada, örneğin, P238A pozisyon numarası 238'de alanin ile sübstüte edilmiş doğal-tip prolini temsil eder.

Yukarıdaki mutasyonların bazıları, Fc kısmı üzerinde yeni işlevsellik sağlayabilir. Örneğin, bir uygulama, bir hayli korunmuş N-glikosilasyon yerini uzaklaştıran, N297A'yı katar. Bu mutasyonun etkisi, glikosilasyonu azaltmaktır, böylece efektör fonksiyonu ve/veya immünojenisiteyi azaltmaktır. Yukarıda tarif edilen mutasyonlardan kaynaklanan yeni işlevselliğin bir ilave örneği olarak, FcRn için afinite bazı durumlarda doğal tipinkinin ötesine arttırılabilir. Bu arttırılmış afinite, bir arttırılmış "bağlama" hızını, bir azaltılmış "ayrılma" hızını veya hem bir arttırılmış "bağlama" hızını hem de bir azaltılmış "ayrılma" hızını yansıtabilir. FcRn için bir arttırılmış afinite sağladığına inanılan mutasyonlar, T256A'yı, T307A'yı, E380A'yı ve N434A'yı (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591) içerir.

Bir uygulamada, FcRn bağlama partneri, PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:) dizisini içeren ve opsiyonel olarak ilaveten HQSLGTQ (SEQ ID NO:), HQNLSDGK (SEQ ID NO:), HQNISDGK (SEQ ID NO:) veya VISSHLGQ (SEQ ID NO:) arasından seçilen bir diziyi içeren bir polipeptittir (5,739,277 Numaralı U.S. Patenti).

Teknikte uzmanlığı olan kişiler, değiştirilmiş efektör fonksiyon ve/veya FcRn bağlama gösteren çok sayıda başka Fc mutantına veya analoguna aşına olacaktır. Buna ek olarak, immüoglobülin sabit bölgelerini (örneğin, pegile edilmiş) veya bunların fragmanlarını kimyasal olarak modifiye etme araçları (bakınız, örneğin, Aslam ve Dent 1998,

Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference, London), teknikte, örneğin, 20120003210 U.S. Başvurusu'nda, iyi bilinir.

- 5 Bir uygulamada, bir Fc kısmı, teknikte bilinen yöntemler kullanılarak, örneğin, normal olarak glikosile edilmiş rezidüleri mutasyona uğratma ile veya polipeptidin ekspresyonunu, böylece glikosilasyonun gerçekleşmediği şekilde, değiştirme ile, aglikosile edilir. Bir örnek olarak,
- 10 bir spesifik uygulama, bir hayli korunmuş N-glikosilasyon yerini uzaklaştıran, N297A mutasyonunu katar. Bir başka uygulamada, bir Fc kısmı, pozisyon 299'da bir mutasyon, örneğin, 7,863,419 U.S. Patenti'nde tarif edildiği üzere bir başka amino aside bir T299 mutasyonunu, katar. Alanine ek
- 15 olarak, diğer amino asitler Fc fonksiyonunu azaltmak için yukarıda belirtilen veya teknikte bilinen pozisyonlarda doğal-tip amino asitler için sübstüte edilebilir.

- Bir başka uygulamada, Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G.
- 20 & Williamson L.M. (1999), Eur J Immunol 29: 2613-2624 kaynağında açıklanan mutasyonlar söz konusu bağlama molekülüne uygulanabilir.

- Mutasyonlar Fc içine tek bir şekilde uygulanabilir, bu natif
- 25 Fc'den farklı olan yüzden fazla Fc kısmına sebebiyet verir. Ek olarak, bu münferit mutasyonların ikisinin, üçünün veya daha fazlasının kombinasyonları birlikte uygulanabilir, böylece yüzlerce fazla potansiyel Fc bölgesine sebebiyet verilir. Dahası, buluşun bir yapısının Fc kısımlarının biri, mutasyona
- 30 uğratılabilir ve diğer Fc kısmı hiç bir şekilde mutasyona uğratılmayabilir veya bunların her ikisi mutasyonla uğratılabilir, ancak farklı mutasyonlar kullanılır.

- Bir immünoglobülin sabit bölgesinin en az bir kısmının peptit
- 35 mimetikleri, örneğin, bir Fc fragmanının bir peptit mimetiği

veya bir FcRn bağlama partnerinin bir peptit mimetiği, de tasarlanır. Bir yönünde, peptit mimetiği faj gösterimi kullanılarak veya kimyasal kütüphane taraması vasıtasıyla tanımlanır (bakınız, *örneğin*, McCafferty et al., 1990, Nature 348:552, Kang et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; EP 0 589 877 B1).

Bir başka yönünde, buluşun bir Fc bölgesi (*örneğin*, bir scFc bölgesi) en azından bir Fc molekülünün teknikte FcγR bağlaması için gerekli olduğu bilinen kısmını içerir.

Bir yönünde, buluşun bir Fc bölgesi (*örneğin*, bir scFc bölgesi) en azından bir Fc molekülünün teknikte Protein A bağlaması için gerekli olduğu bilinen kısmını içerir. Bir yönünde, buluşun bir Fc bölgesi (*örneğin*, bir scFc bölgesi) en azından bir Fc molekülünün teknikte Protein G bağlaması için gerekli olduğu bilinen kısmını içerir. Bir yönünde, bu tarz bir molekül, FcRn'yi bağlamaz.

Burada izah edildiği üzere, bir Fc alanının ayrıca bir veya birden fazla amino asit değişimi (substitüsyonu, ilavesi veya silinmesi) içerme ile, böylece bunun bir doğal tip Fc kısmına kıyasla amino asit dizisi açısından çeşitlilik gösterdiği şekilde, de modifiye edilebileceği teknikte normal uzmanlığı olan bir kişi tarafından anlaşılacaktır. Bu tarz çok sayıda değişim veya değiştirme teknikte bilinir. Belirli emsal uygulamalarda, Fc kısmı bir efektör fonksiyonu (*örneğin*, FcγR bağlamayı) muhafaza eder ve belirli uygulamalarda, Fc kısmı efektör fonksiyondan yoksundur veya azaltılmış efektör fonksiyona sahiptir.

Buluşun bir polipeptidinin Fc alanları veya kısımları, herhangi bir izotipten (A, E, G veya M) elde edilebilir ve farklı immünoglobülin moleküllerinden türetilebilir. *Örneğin*, bir polipeptidin bir Fc alanı veya kısmı, bir IgG1

molekülünden türetilen bir CH₂ ve/veya CH₃ alanı ve bir IgG3 molekülünden türetilen bir menteşe bölgesi içerebilir. Bir başka örnekte, bir Fc alanı veya kısmı, kısmen bir IgG1 molekülünden ve kısmen bir IgG3 molekülünden türetilen bir kimerik menteşe bölgesi içerebilir. Bir başka örnekte, bir Fc alanı veya kısmı, kısmen bir IgG1 molekülünden ve kısmen bir IgG4 molekülünden türetilen bir kimerik menteşe içerebilir.

Buluşun bağlayıcı peptitlerini içeren polipeptitler, teknikte bilinen teknikler kullanılarak yapılabilir. Bir uygulamada, buluşun polipeptitleri, "rekombinant olarak üretilir", yani, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilir. Buluşun polipeptitlerini yapmak için emsal teknikler burada daha detaylı bir şekilde izah edilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı" terimi, bir etken maddenin bununla birleştirilebildiği ve kombinasyonu takiben, etken maddeyi bir süjeye uygulamak için kullanılabilen bir kimyasal bileşim veya bileşik anlamına gelir. Burada kullanıldığı şekliyle, "fizyolojik olarak kabul edilebilir" ester veya tuz terimi, etken maddenin farmasötik bileşimin herhangi bir başka içerik maddesi ile uyumlu olan, bileşimin uygulanacağı süje için zararlı olmayan bir ester veya tuz formu anlamına gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı" ayrıca, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, aşağıdakilerin birini veya birden fazlasını, da içerir: eksipiyenler; yüzey aktif ajanlar; dağıtma ajanları; inert diluentler; granüle etme ve parçalama ajanları; bağlama ajanları; yağlama ajanları; tatlandırma ajanları; aroma verme ajanları; renklendirme ajanları; koruyucular; fizyolojik olarak parçalanabilen bileşimler, örneğin, jelatin; sulu vehiküller ve çözücüler; yağlı vehiküller ve çözücüler; süspanse etme ajanları; dağıtma veya ıslatma ajanları; emülsifiye etmek ajanları; demulsentler; tamponlar; tuzlar;

kıvamlaştırma ajanları; dolgular; emülsifiye etme ajanları; antioksidanlar; stabilize etme ajanları ve farmasötik olarak kabul edilebilir polimeri veya hidrofobik materyaller. Buluşun farmasötik bileşimlerine dahil edilebilen diğer "ilave içerik maddeleri" teknikte bilinir ve örneğin, Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., kaynağında tarif edilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "bir etkili miktar" bir terapötik yanıt üretmek için yeterli olan bir miktardır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "proteinopati" terimi, yanlış-katlanmış proteinler veya agregat oluşturmuş proteinler ile karakterize edilen, bir genetik bileşene sahip olan, bozuklukları ifade eder.

II. BBB Trans-göç-eden antikorlar

Bir yönünde, bir BBB trans-göç-etme kısmı 7,943,129 U.S. Patenti'nde tarif edildiği şekildedir. Örneğin, bir uygulamada, bir BBB trans-göç-etme kısmı, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir dizide izah edilen bir amino asit dizisi içerir: 7,943,129 U.S. Patenti'nde tarif edildiği üzere SEQ ID NO:85 (FC5), SEQ ID NO:86 (FC44) ve SEQ ID NO:87 (FC7). Bir uygulamada, bir BBB trans-göç-etme kısmı, bir FC5 kısmıdır. FC5, bir kamelidden türetilen bir ağır zincir antikordur (HCA, aynı zamanda iki-zincirli, iki-zincirli ağır zincir antikoru, V_{HH} veya tek alanlı antikor olarak da ifade edilir). Yine kamelidler tarafından da üretilen IgG-tipi geleneksel dört-zincirli immünoglobülinler ile karşılaştırıldığında, bu antikorlar geleneksel immünoglobülinlerin hafif zincirlerinden ve CH1 alanlarından yoksundur. Bu doğal oluşumlu ağır zincir antikorlarının göz çarpan özelliklerinin biri, bunların değişken alanında (V_{HH} olarak gösterilir) sırasıyla 44, 45 ve 47 VL ara yüz pozisyonlarında (Kabat numaralandırması) göze çarpan Glu, Arg

ve Gly varlığıdır. Geleneksel dört-zincirli antikorların (V_H olarak gösterilir) değişken alanındaki aynı pozisyonlar neredeyse özellikle Gly, Leu ve Trp ile meşgul edilir. Bu farklılıkların, geleneksel dört-zincirli antikorların V_H alanının görece çözünmezliği ile karşılaştırıldığında, kamelid HCA değişken alanının (V_{HH}) yüksek çözünürlüğünden ve kararlılığından sorumlu olduğu düşünülür. V_{HH} alanlarının iki daha önemli özelliği, bunların karşılaştırılabilir bir şekilde daha uzun CDR3'üdür ve CDR'lerde sistein çiftlerinin yüksek insidansıdır. Sistein çiftlerinin bir disülfid köprüsünün oluşumuna aracılık ettiği ve bundan dolayı antikor birleştirme yerinin yüzey topolojisini modüle etmeye dahil edildiği görülür. Bir deve sdAb-lizozomal kompleksinin kristal yapısında, sdAb'den çıkıntı yapan ve kısmen bir CDR disülfid bağlantısı tarafından stabilize edilen bir bükülmez kıvrım, birleştirme yerinin dışına uzanır ve lizozomal aktif yerin içine derinlemesine nüfuz eder (Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3, 803-811 (1996)).

Bir yönünde, bir BBB trans-göç-eden antikor, TMEM30A'yı (C6orf67, CDC50A) bağlar. TMEM30A'yı bağlayan emsal kısımlar bilinir ve teknikte iyi bilinen yöntemler kullanılarak yapılabilir. Örneğin, TMEM30A amino asit dizisini veya bunun bir kısmını içeren bir amino asit dizisi, TMEM30A amino asit dizisini spesifik olarak tanıyan antikorlar yapmak için veya TMEM30A'yı spesifik olarak bağlayan bağlama kısımları için bağlama yerlerinin bir kütüphanesinden taramak için kullanılabilir. Bu tarz kütüphanelerden elde edilen veya kütüphanelerden türetilen bağlama yerleri buluşun bir bağlama molekülünde kullanılabilir. TMEM30A'nın amino asit dizisi aşağıda gösterilir:

Buluşun polipeptitleri, TMEM30A'yı bağlayan bir antikordan teknikte bilinen protokoller kullanılarak türetilen bir
5 değişken bölge veya bunun kısmını (örneğin, bir VL ve/veya VH alanını) içerebilir. Örneğin, değişken alan, bir insan-olmayan memelide, örneğin, mürinde, gine domuzunda, primatta, tavşanda veya sıçanda, memeliyi antijen veya bunun bir fragmanı ile immünize etme ile üretilen antikordan türetilebilir. Bakınız,
10 Harlow & Lane, *supra*. İmmünoglobülinler ilgili antijenin (örneğin, saflaştırılmış tümör ilişkili antijenlerin veya hücrelerin veya bu tarz antijenleri içeren hücresel ekstraktların) ve bir adjuvanın çok sayıda subkütan veya intraperitoneal enjeksiyonu ile üretililebilir. Bu immünizasyon
15 tipik olarak, aktive edilmiş splenositlerden veya lenfositlerden antijen-reaktif antikörlerin üretilmesini içeren bir immün yanıt meydana getirir.

Değişken bölge bir immünize edilmiş hayvanın serumundan hasat
20 edilen poliklonal antikörlardan türetilebilirken, arzu edilen değişken bölgenin bundan türetildiği monoklonal antikörların (MAb'lerin) homojen preparasyonlarını sağlamak için dalaktan, lenf nodlarından veya periferik kandan münferit lenfositleri izole etmek sıklıkla arzu edilebilir. Tavşanlar veya gine
25 domuzları tipik olarak, poliklonal antikörlar yapmak için kullanılır. Fareler tipik olarak, monoklonal antikörlar yapmak için kullanılır. Monoklonal antikörlar, bir antijen fragmanını

bir fareye enjekte etme, "hibridomlar" hazırlama ve hibridomları antijeni spesifik olarak bağlayan bir antikör için tarama ile bir fragmana karşı hazırlanabilir. Bu iyi bilinen proste (Kohler et al., (1975), Nature, 256:495),
5 antijen enjekte edilmiş olan fareden elde edilen görece kısa-ömürlü veya ölümlü, lenfositler bir ölümsüz tümör hücre hattı (örneğin, bir miyelom hücre hattı) ile kaynaştırılır, böylece, hem ölümsüz olan hem de B hücresi tarafından genetik olarak şifrelenen antikoru üretebilen hibrit hücreler veya
10 "hibridomlar" üretilir. Elde edilen hibritler, seleksiyon, seyreltme ve bir tek antikörün oluşumu için spesifik genleri içeren her bir münferit suş ile yeniden-büyütme ile tek genetik suşlara ayrılır. Bunlar, bir arzu edilen antijene karşı homojen olan ve bunların saf genetik ebeveynliğine
15 atfen, "monoklonal" olarak adlandırılan antikörler üretir.

Bu şekilde hazırlanan hibridom hücreleri, tercihen kaynaştırılmamış, parental miyelom hücrelerinin büyümesini veya sağ kalımını inhibe eden bir veya birden fazla madde
20 içeren bir uygun kültür vasatı içine ekilebilir ve burada büyütülebilir. Teknikte uzmanlığı olan kişiler, hibridomların oluşumu, seleksiyonu ve büyümesi için reaktiflerin, hücre hatlarının ve vasatların çok sayıda kaynak tarafından piyasada satıldığını ve standardize edilmiş protokollerin iyi
25 belirlendiğini anlayacaktır. Genel olarak, burada hibridom hücrelerinin büyütüldüğü kültür vasatı arzu edilen antijene karşı monoklonal antikörlerin üretimi için analiz edilir. Tercihen, hibridom hücreleri tarafından üretilen monoklonal antikörlerin bağlama özgüllüğü immünopresipitasyon ile veya
30 bir *in vitro* analiz, örneğin, bir radyoimmünoanaliz (RIA) veya enzime bağlı bağışıklık analizi (ELISA), ile belirlenir. Arzu edilen özgüllüğü, afinitesi ve/veya aktivitesi olan antikörleri üreten hibridom hücreleri tanımlandıktan sonra, klonlar sınırlı seyreltme prosedürleri ile alt-klonlanabilir
35 ve standart yöntemler ile büyütülebilir (Goding, Monoclonal

Antibodies: Principles and Practice, pp 59-103 (Academic Press, 1986)). Alt-klonlar tarafından salgılanan monoklonal antikorların geleneksel saflaştırma prosedürleri, örneğin, mesela, afinite kromatografisi (örneğin, protein-A, protein-G veya Protein-L afinite kromatografisi), hidroksilapatit kromatografisi, jel elektroforezi veya diyaliz, ile kültür vasatından, assitler sıvısından veya serumdan ayrılabilceği ilaveten anlaşılacaktır.

10 Opsiyonel olarak, antikorlar antiijenin diğer kesişmeyen fragmanlarını bağlamadan antiijenin bir spesifik bölgesini veya arzu edilen fragmanını bağlama için seçilebilir. Son bahsedilen tarama, bir antikorum antiijenin silinme mutantlarının bir koleksiyonunu bağlamasını belirleme ve hangi
15 silinme mutantlarının antikoru bağladığını belirleme ile tamamlanabilir. Bağlama, örneğin, Western blot veya ELISA, ile değerlendirilebilir. Antikoru spesifik bağlama gösteren en küçük fragman, antikorum epitopunu tanımlar. Alternatif olarak, epitop özgüllüğü, bir test ve referans antikorumun
20 antiijeni bağlama için rekabet ettiğı bir kompetisyon analizi ile belirlenebilir. Test ve referans antikorları rekabet ettiğinde, akabinde bunlar aynı epitopu veya bir antikorum bağlamasının diğerinin bağlamasına müdahale ettiğı şekilde yeterli yakınlıkta olan epitopları bağlar.

25

Arzu edilen monoklonal antikoru şifreleyen DNA, sabit bölge alanı dizilerinin (örneğin, mürin antikorların ağır ve hafif zincirlerini şifreleyen genleri spesifik olarak bağlayabilen oligonükleotid problemlerinin kullanılması ile) izolasyonu için
30 *supra* tarif edilen geleneksel prosedürlerin herhangi biri kullanılarak kolaylıkla izole edilebilir ve dizilenebilir. İzole edilmiş ve alt-klonlanmış hibridom hücreleri, bu tarz DNA'nın bir tercih edilen kaynağı görevi görebilir. Daha özel olarak, (burada tarif edildiğı üzere sentetik olabilen) izole
35 edilmiş DNA buluşun polipeptitlerine katılma amacıyla arzu

edilen değişken bölge dizilerini klonlamak için kullanılabilir.

Diğer uygulamalarda, bağlama yeri, bir tam olarak insan antikorundan türetilir. İnsan veya büyük ölçüde insan antikorları, endojen immünoglobülin üretimi yapamayan transgenik hayvanlarda (örneğin, farelerde) üretilebilir (bakınız, *örneğin*, her biri burada referans olarak eklenmiş olan, 6,075,181, 5,939,598, 5,591,669 ve 5,589,369 Numaralı U.S. Patentleri). Örneğin, kimerik ve germ-hattı mutant farelerde antikor ağır-zincir birleştirme bölgesinin homozigot silinmesinin endojen antikor üretiminin tam inhibisyonu ile sonuçlandığı tarif edilmiştir. Bir insan immünoglobülin gen diziliminin bu tarz germ hattı mutant farelere transferi, antijen yüklemesi üzerine insan antikorlarının üretimi ile sonuçlanacaktır. SCID fareleri kullanılarak insan antikorları üretmenin bir başka tercih edilen aracı, 5,811,524 Numaralı U.S. Patenti'nde açıklanır. Bu insan antikorları ile ilişkili olan genetik materyalin ayrıca burada tarif edildiği üzere izole edilebileceği ve manipüle edilebileceği de anlaşılabacaktır.

Rekombinant antikorlar üretmek için daha bir başka hayli etkili araç, Newman, Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992) kaynağında açıklanır. Spesifik olarak, bu teknik, maymun değişken alanları ve insan sabit dizileri içeren primatlaştırılmış antikorların üretimi ile sonuçlanır. Bu referans, burada bunun bütünüyle referans olarak eklenir. Dahası, bu teknik ayrıca, yaygın olarak atfedilen 5,658,570, 5,693,780 ve 5,756,096 Numaralı U.S. Patentleri'nde de tarif edilir. Bir başka uygulamada, lenfositler mikro-manipülasyon ile seçilebilir ve değişken genler izole edilebilir. Örneğin, periferik kan mononükleer hücreleri bir immünize edilmiş memeliden izole edilebilir ve *in vitro* yaklaşık 7 gün boyunca kültürlenebilir. Kültürler tarama kriterlerini karşılayan

spesifik antikorlar için taranabilir. Pozitif kuyucuklardan elde edilen hücreler izole edilebilir. Munferik Ig-üreten B hücreleri FACS ile veya bunları bir kompleman-aracılı hemolitik plak analizinde tanımlamak ile izole edilebilir. Ig-
5 üreten B hücreleri bir tüp içine mikro-manipüle edilebilir ve VH ve VL genleri, *örneğin*, RT-PCR, kullanılarak çoğaltılabilir. VH ve VL genleri bir antikor ekspresyon vektörüne klonlanabilir ve ekspresyon için hücrelere (*örneğin*, ökaryotik veya prokaryotik hücrelere) transfekte edilebilir.

10

Alternatif olarak, değişken (V) alanlar seçilen bir hayvandan değişken gen dizilerinin kütüphanelerinden elde edilebilir. Alanların, *örneğin*, V_H ve/veya V_L alanlarının, rastgele kombinasyonlarını eksprese eden kütüphaneler, arzu edilen
15 bağlama karakteristiklerine sahip olan elemanları tanımlamak için arzu edilen bir antijen ile taranabilir. Bu tarz tarama yöntemleri teknikte iyi bilinir. *Örneğin*, antikor geni repertuvarları, bir λ bakteriyofaj ekspresyon vektörüne klonlanabilir (Huse, WD ve ark.(1989). Science, 2476:1275).

20

Buna ek olarak, bunların yüzeyi üzerinde antikorlar eksprese eden hücreler (Francisco et al., (1994), PNAS, 90:10444; Georgiou et al., (1997), Nat. Biotech., 15:29; Boder ve Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15:553; Boder et al., (2000), PNAS, 97:10701; Daugherty, P. et al., (2000) J. Immunol. Methods. 243:211) veya virüsler (*örneğin*, Hoogenboom, HR. (1998), Immunotechnology 4:1; Winter et al., (1994). Annu. Rev. Immunol. 12:433; Griffiths, AD. (1998). Curr. Opin. Biotechnol. 9:102) taranabilir.

25

Teknikte uzmanlığı olan kişiler ayrıca, antikor değişken alanlarını şifreleyen DNA'nın ayrıca fajda, mayada veya bakterilerde eksprese edilen antikor kütüphanelerinden teknikte bilinen yöntemler kullanılarak türetilbileceğini de anlayacaktır. Emsal yöntemler, *örneğin*, EP 368 684 B1;
35 5,969,108 Numaralı U.S. Patenti; Hoogenboom et al., (2000)

Immunol. Today 21:371; Nagy et al., (2002) Nat. Med. 8:801; Huie et al., (2001), PNAS, 98:2682; Lui et al., (2002), J. Mol. Biol. 315:1063 kaynaklarında, izah edilir. Bir kaç yayın (örneğin, Marks et al., (1992), Bio/Technology 10:779-783),
5 zincir karma ile yüksek afiniteli insan antikorlarının üretimini aynı zamanda büyük faj kütüphaneleri yapmak için bir strateji olarak kombinasyonel enfeksiyonu ve *in vivo* rekombinasyonu tarif etmiştir. Bir başka uygulamada, ribozomal gösterim, bakteriyofajı gösterim platformu olarak değiştirmek
10 için kullanılabilir (bakınız, örneğin, Hanes et al., (1998), PNAS 95:14130; Hanes ve Pluckthun. (1999), Curr. Top. Microbiol. Immunol. 243:107; He ve Taussig. (1997), Nuc. Acids Res., 25:5132; Hanes et al., (2000), Nat. Biotechnol. 18:1287; Wilson et al., (2001), PNAS, 98:3750 veya Irving et al.,
15 (2001) J. Immunol. Methods 248:31).

Tarama için emsal kütüphaneler, inan değişken gen kütüphaneleridir. Bir insan-dışı kaynaktan V_L ve V_H alanları da kullanılabilir. Kütüphaneler naif olabilir, immünize edilmiş
20 süjelerden elde edilebilir veya yarı-sentetik olabilir (Hoogenboom ve Winter. (1992). J. Mol. Biol. 227:381; Griffiths et al., (1995) EMBO J. 13:3245; de Kruif et al., (1995). J. Mol. Biol. 248:97; Barbas et al., (1992), PNAS, 89:4457). Bir uygulamada, mutasyonlar daha büyük heterojenliğe
25 sahip olan nükleik asit moleküllerinin bir kütüphanesini oluşturmak için immünoglobülin alanlarına yapılabilir (Thompson et al., (1996), J. Mol. Biol. 256:77; Lamminmaki et al., (1999), J. Mol. Biol. 291:589; Caldwell ve Joyce. (1992), PCR Methods Appl. 2:28; Caldwell ve Joyce. (1994), PCR Methods
30 Appl. 3:S136). Standart taramam prosedürleri, yüksek afiniteli varyantları seçmek için kullanılabilir. Bir başka uygulamada, V_H ve V_L dizilerine değişimler, örneğin, teknikte bilinen teknikler kullanılarak kristal yapılarından elde edilen bilgi kullanılarak, antikor aviditesini arttırmak için yapılabilir.

Bir başka emsal kütüphane, tek alanlı antikorlar içeren bir kamelid kütüphanesidir. Emsal tek alanlı moleküller, bir antikoron bir izole edilmiş ağır zincir değişken alanını (V_H), yani, bir hafif zincir değişken alanı olmadan, bir ağır zincir değişken alanını ve bir antikoron bir izole edilmiş hafif zincir değişken alanını (V_L), yani, bir ağır zincir değişken alanı olmadan, bir hafif zincir değişken alanını, içerir. Buluşun bağlama moleküllerinde kullanılan emsal tek-alanlı antikorlar, örneğin, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993) ve Dumoulin et al., Protein Science 11:500-515 (2002), kaynaklarında tarif edildiği üzere Kamelid ağır zincir değişken alanını (yaklaşık 118 ila 136 arasındaki amino asit rezidülerini), içerir. Diğer emsal tek alanlı antikorlar, V_H veya V_L alanları içerir, bunlar ayrıca Dabs® (Domantis Ltd., Cambridge, BK) olarak da bilinir. Daha bir başka tek alanlı antikorlar, köpek balığı antikorlarını (örneğin, köpek balığı Ig-NAR'larını) içerir. Köpek balığı Ig-NAR'ları, bir değişken alanın (V -NAR) ve beş C-benzeri sabit alanın (C-NAR) bir homodimerini içerir, burada çeşitlilik 5 ila 23 rezidü uzunluğu arasında çeşitlilik gösteren bir uzatılmış CDR3 bölgesinde yoğunlaşır. Kamelid türlerinde (örneğin, lamalarda), V_{HH} olarak ifade edilen ağır zincir değişken bölgesi, tüm antijen-bağlama alanını oluşturur. Kamelid V_{HH} değişken bölgeleri ve geleneksel antikorlardan türetilenler (V_H) arasındaki ana farklılıklar, (a) V_{HH} 'de karşılık gelen bölgeye kıyasla V_H 'nin hafif zincir temas yüzeyinde daha çok hidrofobik amino asit, (b) V_{HH} 'de bir daha uzun CDR3 ve (c) V_{HH} 'de CDR1 ve CDR3 arasında bir disülfid bağın sık meydana gelişini içerir. Tek alanlı bağlama molekülleri yapmak için yöntemler, her ikisi de burada referans olarak eklenmiş olan, 6.005,079 ve 6,765,087 Numaralı U.S. Patentleri'nde tarif edilir. V_{HH} alanları içeren emsal tek alanlı antikorlar, Nanobodies®'i (Ablynx NV, Ghent, Belçika) içerir.

Dahası, mevcut buluşun polipeptitlerini üretmek için kullanışlı olan değişken bölge dizileri, çok sayıda farklı kaynaktan elde edilebilir. Örneğin, yukarıda tartışıldığı üzere, çeşitli insan geni dizileri halka açık depolar formunda erişilebilir şekildedir. Antikorların ve antikor-şifreleyen genlerin (örneğin, klinik olarak yararlı özelliklere sahip olduğu bilinen antikorların) çok sayıda dizisi yayımlanmıştır ve uygun değişken bölge dizileri (örneğin, VL ve VH dizileri) teknikte bilinen teknikler kullanılarak bu dizilerden sentezlenebilir.

Bir başka uygulamada, buluşun bir polipeptidinin bir bağlama alanı, örneğin, kamelidlerden türetilen, bir V_L zinciri yokluğunda kararlı olan, bir V_H alanından oluşur (Hamers-Casterman et al., (1993). Nature, 363:446; Desmyter et al., (1996). Nat. Struct. Biol. 3: 803; Decanniere et al., (1999). Structure, 7:361; Davies et al., (1996). Protein Eng., 9:531; Kortt et al., (1995). J. Protein Chem., 14:167).

Buluşun bir polipeptidi, bir tam olarak mürin, tam olarak insan, kimerik, beşerileştirilmiş, insan-olmayan primat veya primatlaştırılmış antikordan türetilen bir değişken alan veya CDR (CDR'ler) içerebilir. İnsan-olmayan antikorlar veya bunların fragmanları veya alanları, teknikte bilinen teknikler kullanılarak bunların immünojenisitesini azaltmak için değiştirilebilir. Beşerileştirilmiş antikorlar, insan-olmayan antikordardan türetilen, ana antikorun bağlama özelliklerini muhafaza etmesi veya büyük ölçüde muhafaza etmesi için modifiye edilmiş olan, ancak ana, insan-olmayan antikora kıyasla insanlarda daha az immünojenik olan antikordardır. Beşerileştirilmiş hedef antikorlar durumunda, bu (a) kimerik hedef antikorlar üretmek için tüm insan-olmayan değişken alanları insan sabit bölgelerine grefte etmeyi; (b) insan-olmayan tamamlayıcılık belirleme bölgelerinin (CDR'lerin) birinin veya birden fazlasının en azından bir parçasını kritik

çerçeve rezidülerinin alıkonması ile veya bu tarz alıkonma olmadan bir insan çerçeve ve sabit bölgelerine grefte etmeyi; (c) tüm insan-olmayan değişken alanları transplante etmeyi, ancak bunları yüzey rezidülerinin değiştirilmesi ile bir insan-benzeri kesit ile "gizlemeyi" içeren çeşitli yöntemler ile başarılabilir. Bu tarz yöntemler, Morrison et al., (1984), PNAS. 81: 6851-5; Morrison et al., (1988), Adv. Immunol. 44: 65-92; Verhoeyen et al., (1988), Science 239: 1534-1536; Padlan, (1991), Molec. Immun. 28: 489-498; Padlan, (1994), Molec. Immun. 31: 169-217 ve 5,585,089, 5,693,761 ve 5,693,762 Numaralı U.S. Patentleri, kaynaklarında açıklanır. De-immünizasyon ayrıca, buluşun bir polipeptidinin immünojenisitesini azaltmak için de kullanılabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "de-immünizasyon" terimi, T hücresi epitoplalarının modifikasyonunu içerir (bakınız, örneğin, WO9852976A1, WO0034317A2). Örneğin, VH ve VL dizileri analiz edilir ve tamamlayıcılık-belirleme bölgeleri (CDR'ler) ve dizi içindeki diğer önemli rezidüler ile ilişkili olan epitopların lokasyonunu gösteren her bir V bölgesinden bir insan T hücresi epitopu "haritası" üretilir. T hücresi epitopu haritasından münferit T hücresi epitopları, nihai antikorun aktivitesini değiştirmenin düşük bir riski ile alternatif amino asit süstitüsyonlarını tanımlamak için analiz edilir. Amino asit süstitüsyonlarının kombinasyonlarını içeren bir dizi alternatif VH ve VL dizisi tasarlanır ve bu diziler bunu takiben fonksiyon için test edilen buluşun bir dizi polipeptidine katılır. Tipik olarak, 12 ila 24 varyant antikor üretilir ve test edilir. Modifiye edilmiş V ve insan C bölgeleri içeren tam ağır ve hafif zincir genleri akabinde ekspresyon vektörlerine klonlanır ve müteakip plazmidler tam antikorun üretilmesi için hücre hatlarına uygulanır. Antikorlar akabinde, uygun biyokimyasal ve biyolojik analizlerde karşılaştırılır ve optimal varyant tanımlanır.

Bir uygulamada, buluşun bir polipeptidinde kullanılan değişken alanlar, bir veya birden fazla CDR'nin en azından parsiyel değişimi ile değiştirilir. Bir başka uygulamada, değişken alanlar, *örneğin*, parsiyel çerçeve bölgesi değişimi ve dizi değişimi ile, opsiyonel olarak değiştirilebilir. Bir beşerileştirilmiş değişken bölge yapmada, CDR'ler çerçeve bölgelerinin bundan türetildiği antikör ile aynı sınıftan veya hatta alt-sınıftan bir antikordan türetilebilir, bununla birlikte, CDR'lerin farklı sınıftaki bir antikordan ve tercihen farklı bir türden bir antikordan aktarılacağı tasavvur edilir. Bir değişken alanın antijen bağlama kapasitesini bir başkasına transfer etmek için CDR'lerin tümünü donör değişken bölgesinden tam CDR'ler ile değiştirmek gerekli olmayabilir. Daha ziyade yalnızca, bağlama alanının aktivitesini idame ettirmek için gerekli olan rezidüleri transfer etmek gerekli olabilir. 5,585,089, 5,693,761 ve 5,693,762 Numaralı U.S. Patentleri'nde izah edilen açıklamalar hesaba katıldığında, azaltılmış immünojenisitesi olan bir fonksiyonel antijen bağlama yeri elde etmek için rutin deneyleri yürütme ile veya deneme ve yanılma testleri ile teknikte uzmanlığı olan kişilerin yeterliliği içinde olacaktır.

FC5, buluşun bir polipeptidine katılabilen bir emsal TMEM30A bağlama kısmıdır. FC5'in amino asit dizisi, aşağıda izah edilir:

```
EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTM  
GWRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSN SVKGRF  
TISRDN AKNTVY LQMNS LKPEDTADYYCAAGSTS  
TATPLRV - - - DYWGKG TQVTVSS
```

III. Opsiyonel Bağlayıcı Peptitler

Buluşun polipeptitleri opsiyonel olarak en az bir bağlayıcı peptit içerir. Bir uygulamada, iki veya daha fazla bağlayıcı

peptit, buluşun polipeptidinin bir polipeptitinde bulunur. Bir başka uygulamada, buluşun bir polipeptidi, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veya 10 bağlayıcı peptit içerir.

- 5 Buluşun bağlayıcı peptitleri, verilen bir pozisyonda bir kere bulunabilir veya bir rekombinant polipeptit içinde verilen bir pozisyonda birden fazla kere bulunabilir (yani, bağlayıcı peptidin dizisi, dizi içinde x kere tekrar edilebilir). Örneğin, bir uygulamada, buluşun bir bağlayıcı peptidi bir
- 10 polipeptit içinde verilen bir pozisyonda 1 ila 10 kere (1 ve 10 dahil) tekrar edilir. Bir başka uygulamada, bir bağlayıcı peptit, bir polipeptit içinde verilen bir pozisyonda 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veya 10 kere bulunur.
- 15 Buluşun bağlayıcı peptitleri çeşitli uzunluklarda olabilir. Bir uygulamada, buluşun bir bağlayıcı peptidi, yaklaşık 5 ila yaklaşık 75 amino asit uzunluğundadır. Bir başka uygulamada, buluşun bir bağlayıcı peptidi, yaklaşık 5 ila yaklaşık 50 amino asit uzunluğundadır. Bir başka uygulamada, buluşun bir
- 20 bağlayıcı peptidi, yaklaşık 10 ila yaklaşık 40 amino asit uzunluğundadır. Bir başka uygulamada, buluşun bir bağlayıcı peptidi yaklaşık 15 ila yaklaşık 35 amino asit uzunluğundadır. Bir başka uygulamada, buluşun bir bağlayıcı peptidi, yaklaşık 15 ila yaklaşık 20 amino asit uzunluğundadır. Bir başka
- 25 uygulamada, buluşun bir bağlayıcı peptidi, yaklaşık 15 amino asit uzunluğundadır.

- Bağlayıcı peptitler, protein mühendisliğinde bunların sentetik biyolojide standart birleştirme parçaları haline geldiği
- 30 şekilde sıklıkla kullanılır (bakınız, örneğin, Anderson, J.C. et al., Journal of Biological Engineering 2010. 4:1 ve genetik yapılarda kullanılan standart biyolojik parçaları listeleyen partsregistry internet sitesi).

Bağlayıcı peptitler için güncel, teknikte bilinen kullanımların bazı örnekleri aşağıdakilerdeki kullanımları içerir: scFv molekülüleri (Freund et al., FEBS 1993. 320:97); tek zincirli immünoglobülin molekülüleri (Shu et al., 1993. PNAS. USA 90:7995); minibodiler (Hu et al., 1996 Cancer Res. 56:3055); CH2 alanı silinmiş antikorlar (Mueller, B.M. et al., 1990 PNAS USA. 87:5702); tek zincirli bispesifik antikorlar (Schlereth et al., 2005 Cancer Res. 65:2882); tam-boy IgG-benzeri bispesifik antikorlar (Marvin, J.S. et al., 2005 Acta Pharmacol Sin 26:649 ve orada alıntı yapılan referanslar aynı zamanda Michaelson, J.S. et al., 2009 MAbs.1:128 ve Orcutt K.D. et al., 2010 Protein Eng Des Sel. 23:221); scFv füzyon proteinleri (deGraaf et al., 2002 British Journal of Cancer 86:811); gelişmekte olan protein-fragman komplementasyon analizleri (Remy, I. et al., 2007 BioTechniques 42:137).

Ksilozu azaltanları içeren (örneğin, WO2012088461'de açıklandığı üzere) diğer emsal bağlayıcı peptitler, mevcut bağlama molekülünde kullanılabilir.

20

Bağlayıcı peptitler, bunların tutturulduğu polipeptitlerin N veya C ucuna (veya her iki ucuna) tutturulabilir.

IV. Emsal Farmasötik olarak Aktif Kısımlar

25

Tedavi edilen hastalığa veya bozukluğa veya rahatsızlığa bağlı olarak, çeşitli ilaç kargoları, *örneğin*, farmakolojik olarak aktif ajanlar veya eş-değer bir şekilde, farmasötik olarak aktif kısımlar, buluşun bağlama molekülüleri kullanılarak *in vivo* başarılı bir şekilde aktarılabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "farmasötik olarak aktif kısım" ve "farmakolojik bileşik" terimleri, bir hastalığın veya bozukluğun etkilerini tedavi etmede veya sağaltmada yararlı olan herhangi bir kısmı veya bileşiği ifade etmelidir. *Örneğin*, nörodejeneratif hastalıkları, *örneğin*, Alzheimer hastalığını, Parkinson

35

hastalığını, Huntington hastalığını, amiyotrofik lateral sklerozu (ALS'yi, Lou Gehrig hastalığını), ağır epilepsisini, depolama hastalıklarını ve multipl sklerozu, içeren hastalıklar veya bozukluklar hedef alınabilir.

5

Emsal farmasötik olarak aktif moleküller aşağıdakileri içerir: sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), gliyal hücre-hattı nörotrofik faktör (GDNF) ve insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF). Buna ek olarak, terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiş olan ve antikorlar tarafından aktarılabilen diğer bileşikler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, Madde P'yi, nöropeptit Y'yi, dalarjini, alfa sinükleini, vazoaaktif intestinal peptidi (VIP), gama-amino-bütirik asidi (GABA), dopamini, kolesistokinini (CCK), endorfinleri, enkefalinleri ve tirotropin salım hormonunu (TRH), içeren nöropeptitlerdir. İlave emsal terapötikler, sitokinleri, anksiyolitik ajanları, antikonvülsanları, polinükleotidleri ve örneğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, psikiyatrik hastalıkları, örneğin, mesela, anksiyeteyi, depresyonu, şizofreniyi ve uyku bozukluklarını aynı zamanda epilepsileri, nöbet bozukluklarını, inmeyi ve serebrovasküler bozuklukları, ensefaliti ve menenjititi, hafıza ve biliş bozukluklarını, akut ve kronik ağrıyı (örneğin, refrakter) ve fiziksel travmayı içeren tarzda nöronal bozukluklar için kullanılabilen küçük-girişimli RNA'ları içeren, transgenleri içerebilir.

Bir uygulamada, bir farmasötik olarak aktif kısım, TMEM30A'yı bağlamayan bir antijen bağlama yeri içerir. Belirli uygulamalarda, buluşun polipeptitleri, bir biyolojik etkiye aracılık eden bir TMEM30A olmayan hedef moleküle spesifik olan en az bir bağlama yerine sahiptir. Bir uygulamada, bağlama yeri (örneğin, bir hücre yüzeyi reseptörünü bağlama ve bir aktive etme sinyalinin veya inhibitör sinyalin iletimi ile sonuçlanma ile) hücresel aktivasyona veya inhibisyona aracılık

eder. Bir uygulamada, bağlama yeri (örneğin, bir hücre sinyali indüklü yol ile, kompleman fiksasyonu veya bağlama molekülü üzerinde bulunan bir yüke (örneğin, bir toksik yüke) maruziyet ile) hücrenin ölümü ile sonuçlanan veya (örneğin, hücre öldürmeye aracılık etme veya hücre öldürmeyi teşvik etme ile, bir fibrin pıhtısının lizisini teşvik etme veya pıhtı oluşumunu teşvik etme ile veya biyoyararlanılabilir olan bir maddenin miktarını modüle etme ile) bir süjede bir hastalığa veya bozukluğa aracılık eden bir sinyalin iletimini başlatabilir. Bir başka uygulamada, buluşun polipeptitleri, azaltma veya eliminasyon için hedef alınan bir antijene, *örneğin*, bir hücre yüzeyi antijenine veya bir çözünebilen antijene spesifik olan en az bir bağlama yerine sahiptir.

15 Daha başka uygulamalarda, buluşun bir polipeptidi, bir nörolojik hastalığı veya bozukluğu tedavi etmede yararlı olan bir molekülü bağlar. Örneğin, bir polipeptit bir nöronal hücre (*örneğin*, bir nöron, bir gliyal hücre veya bir) üzerinde bulunan bir antijeni bağlayabilir. Belirli uygulamalarda, bir

20 nörolojik bozukluk ile ilişkili olan antijen, *supra* tarif edilen bir otoimmün veya enflamatuvar bozukluk olabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "nörolojik hastalık veya bozukluk" terimi, bir süjede sinir sisteminin dejenere olduğu bozuklukları veya rahatsızlıkları (*örneğin*, nörodejeneratif bozuklukları aynı zamanda, sinir sisteminin uygun şekilde gelişemediği veya yaralanmayı, *örneğin*, omurilik yaralanmasını, takiben yenilenemediği bozuklukları) içerir. Mevcut buluşun bileşimleri ile tanısı koyulabilen, önlenebilen veya tedavi edilebilen nörolojik bozuklukların örnekleri,

30 bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, Multipl Sklerozu, Huntington Hastalığı'nı, Alzheimer Hastalığı'nı, Parkinson Hastalığı'nı, nöropatik ağrıyı, travmatik beyin yaralanmasını, Guillain-Barré sendromunu ve kronik enflamatuvar demiyELISAn polinöropatiyi (CIDP), içerir.

İlave emsal farmakolojik olarak aktif kısımlar, aşağıda ilaveten tartışılır:

i) Antijen Bağlama Kısımları

5

Belirli uygulamalarda, farmasötik olarak aktif kısım, örneğin, bir antikorun veya basit alanlı antikorun, en az bir antijen bağlama kısmını (bağlama yerini) içerir. Bir uygulamada, antijen bağlama kısmı bileşimi özel bir hücre tipine veya dokuya hedefler.

10

Diğer uygulamalarda, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmının bir bağlama yeri, bir antijen bağlama kısmı veya fragmanı içerebilir. "Antijen-bağlama kısmı" terimi, bir immünoglobülinin, antikorun veya antikor varyantının, antijeni bağlayan veya aynen antikor ile (yani, bunların bundan türetildiği aynen antikor ile) antijen bağlama (yani, spesifik bağlama) için rekabet eden bir polipeptit fragmanını ifade eder. Örneğin, antijen bağlama fragmanları, *supra* tarif edilen antikorlardan veya antikor varyantlarından türetilir. Antijen bağlama kısımları teknikte iyi bilinen rekombinant veya biyokimyasal yöntemler ile üretilebilir. Emsal antijen-bağlama fragmanları, (her bir değişken bölge tek başına antijeni bağlamak için yeterli olduğunda) VH'yi ve/veya VL'yi, Fv'yi, Fab'ı, (Fab')'ı ve F(ab')₂'yi içerir.

15

20

25

30

35

Diğer uygulamalarda, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, tek zincirli bağlama molekülünden (örneğin, bir tek zincirli değişken bölgeden veya scFv'den) bir bağlama yeri içerebilir. Tek zincirli antikorların üretilmesi için tarif edilen teknikler (4,694,778 Numaralı U.S. Patenti; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988) ve Ward et al., Nature 334:544-554 (1989)), tek zincirli bağlama molekülleri üretmek için uyarlanabilir. Tek zincirli antikorlar, Fv bölgesinin ağır ve

hafif zincir fragmanlarını bir amino asit köprüsü vasıtasıyla bağlama, böylece bir tek zincirli antikor ile sonuçlanma, ile oluşturulur. *E. coli*'de fonksiyonel Fv fragmanlarının birleşimi için teknikler de kullanılabilir (Skerra et al.,
5 Science 242:1038-1041 (1988)).

Belirli uygulamalarda, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir veya birden fazla bağlama yeri veya bir tek zincirli değişken bölge dizisi (scFv) içeren veya bundan
10 oluşan bölge içerir. Tek zincirli değişken bölge dizileri, bir veya birden fazla antijen bağlama yerine, örneğin, bir bağlayıcı peptit ile bir V_H alanına bağlanmış bir V_L alanına, sahip olan bir tek polipeptit içerir. V_L ve/veya V_H alanları, teknikte bilinen antikorlardan veya bunların varyantlarından
15 türetilir. ScFv molekülleri bir V_H-bağlayıcı-V_L oryantasyonunda veya V_L-bağlayıcı-V_H oryantasyonunda yapılabilir.

Belirli uygulamalarda, buluşun bir farmasötik olarak aktif
20 kısmında kullanılan bir scFv molekülü, bir stabilize edilmiş scFv molekülüdür. Bir uygulamada, stabilize edilmiş scFv molekülü, bir V_H alanı ve bir V_L alanı arasına koyulan bir bağlayıcı peptit içerebilir, burada V_H ve V_L alanları, V_H içindeki bir amino asit ve V_L alanı içindeki bir amino asit
25 arasında bir disülfid bağ ile bağlanır. Diğer uygulamalarda, stabilize edilmiş scFv molekülü, bir optimize edilmiş boya veya bileşime sahip olan bir scFv bağlayıcı içerebilir. Daha başka uygulamalarda, stabilize edilmiş scFv molekülü, en az bir stabilize etme amino asit süstitüsyonuna
30 (süstitüsyonlarına) sahip olan bir V_H veya V_L alanı içerebilir. Daha başka bir uygulamada, bir stabilize edilmiş scFv molekülü, yukarıda listelenen stabilize etme özelliklerinin en az ikisine sahip olabilir.

Stabilize edilmiş scFv molekülleri, bunun operatif olarak bağlı olduğu polipeptide iyileştirilmiş protein kararlılığına sahiptir veya iyileştirilmiş protein kararlılığı verir. Buluşun polipeptitlerinde bulunabilen emsal stabilize edilmiş scFv molekülleri 7,951,918 U.S. Patenti'nde tarif edilir. Belirli emsal uygulamalarda, buluşun farmasötik olarak aktif kısımları, bir Fc bölgesinin C-ucuna ve/veya N-ucuna bir bağlayıcı peptit vasıtasıyla operatif olarak bağlı olan en az bir scFv molekülü içerir.

10

Bir uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, arzu edilen bir hedefi tanıyan bir antikordan en az bir CDR içerir. Bir başka uygulamada, mevcut buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, arzu edilen bir hedefi tanıyan bir antikordan en az iki CDR içerir. Bir başka uygulamada, mevcut buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, arzu edilen bir hedefi tanıyan bir antikordan en az üç CDR içerir. Bir başka uygulamada, mevcut buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, arzu edilen bir hedefi tanıyan bir antikordan en az dört CDR içerir. Bir başka uygulamada, mevcut buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, arzu edilen bir hedefi tanıyan bir antikordan en az beş CDR içerir. Bir başka uygulamada, mevcut buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, arzu edilen bir hedefi tanıyan bir antikordan en az altı CDR içerir. Bir uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, (örneğin, bir bispesifik, dört-değerlikli antikor molekülü durumunda) bir antikor molekülünün bir arzu edilen hedefi tanıyan tam amino asit dizisini içerir.

30

Bağlama yerlerinin buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmında kullanım için bunlardan türetilebildiği emsal antikorlar teknikte bilinir. Örneğin, tedavide kullanım için FDA tarafından güncel olarak onaylanan antikorlar bağlama yerlerini türetmek için kullanılabilir. Bir uygulamada, bir emsal bağlama yeri, bir anti-Lingo antikorundan (bakınız,

35

örneğin, WO2008086006) türetilir. Diğer yönlerinde, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir modifiye edilmiş antikor molekülü veya antikorun bir modifiye edilmiş formundan türetilen bir antijen bağlama yeri (veya bunun kısımlarını) içerebilir. Bu tarz emsal formlar, örneğin, minibodileri, diabodileri, triabodileri, nanobodileri, kamelidleri, Dab'ları, dört-değerlikli antikorları, intradiabodileri (örneğin, Jendreyko et al., 2003. J. Biol. Chem. 278:47813), füzyon proteinlerini (örneğin, antikor sitokin füzyon proteinlerini, bir Fc reseptörünün en az bir kısmına kaynaştırılmış proteinleri) ve bispesifik antikorları, içerir. Diğer modifiye edilmiş antikorlar, örneğin, 4,745,055 Numaralı U.S. Patenti; EP 256,654'te; Faulkner et al., Nature 298:286 (1982); EP 120,694; EP 125,023; Morrison, J. Immun. 123:793 (1979); Kohler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980); Raso et al., Cancer Res. 41:2073 (1981); Morrison et al., Ann. Rev. Immunol. 2:239 (1984); Morrison, Science 229:1202 (1985); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984); EP 255,694; EP 266,663 ve WO 88/03559 kaynaklarında, tarif edilir. Yeniden-dağıtılmış immünoglobülin zincirleri de bilinir. Bakınız, örneğin, 4,444,878 Numaralı U.S. Patenti; WO 88/03565 ve EP 68,763 ve bunlarda alıntı yapılan referanslar.

Bir başka uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir antijen bağlama yeri veya bir diabodi olan bölge veya bundan türetilen bir antijen bağlama yeri içerir. Diabodiler, her biri scFv molekülüne benzeyen bir polipeptide sahip olan, ancak genel olarak her iki değişken alanı bağlayan bir kısa (örneğin, 10'dan daha az ve tercihen 1-5) amino asit rezidüsüne sahip olan, böylece aynı polipeptit zinciri üzerindeki V_L ve V_H alanlarının etkileşime giremediği, dimerik, dört-değerlikli molekülüdür. Bunun yerine, bir polipeptit zincirinin V_L ve V_H alanı, bir ikinci polipeptit zinciri üzerindeki (sırasıyla) V_H ve V_L alanı ile etkileşime

girer (bakınız, örneğin, WO 02/02781). Bir uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, en az bir genetik olarak-kaynaştırılmış Fc bölgesinin (yani, scFc bölgesinin) N-ucuna ve/veya C-ucuna operatif olarak bağlanmış bir diabodi içerir.

5

Belirli uygulamalarda, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir BBB-trans-göç-etmeyen antikor bağlama yeri (örneğin, bir TEME30A-bağlamayan tek alanlı bağlama molekülü, örneğin, bir tek alanlı antikor) içerir.

10

ii) İmmüoglobülin-Olmayan Bağlama Molekülleri

Belirli diğer uygulamalarda, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir immüoglobülin-olmayan bağlama molekülünden türetilen bir veya birden fazla bağlama yeri içerir. Burada kullanıldığı şekliyle, "immüoglobülin-olmayan bağlama molekülü" terimi, bağlama yerleri bir immüoglobülin dışındaki bir polipeptitten türetilen bir amino asit dizisi içeren bağlama molekülüdür. Antikor moleküllerinden türetilmemiş olan bağlama yerleri içeren bağlama molekülünün örnekleri, *infra* daha detaylı bir şekilde tartışılan reseptör bağlama yerlerini ve ligand bağlama yerlerini içerir.

15

20

25

30

İmmüoglobülin-olmayan farmasötik olarak aktif kısımlar, immüoglobülin süper-familiyasının bir üyesinden türetilen, bir immüoglobülin olmayan (örneğin, bir T-hücresi reseptörü veya bir hücre-adezyon proteini (örneğin, CTLA-4, N-CAM, telokin)) amino asit dizileri içerebilir. Diğer uygulamalarda, amino asit dizileri, immüoglobülin katlanmasına dayanmayan (örneğin, mesela, ankirin tekrar proteinleri veya fibronektinler), ancak bununla beraber bir hedefi spesifik olarak bağlayabilen bir protein topolojisi içerebilir.

İmmünoglobülin-olmayan temelli farmasötik olarak aktif kısımlar, yapay olarak çeşitlendirilmiş bağlama yerlerine sahip olan bağlama moleküllerinin bir kütüphanesinden bir hedef-bağlama varyantının seleksiyonu veya izolasyonu ile tanımlanabilir. Çeşitlendirilmiş kütüphaneler, tamamen rastgele yaklaşımlar (örneğin, hataya-eğimli PCR, ekzon karma veya yönlendirilmiş evrim) kullanılarak veya teknikte-bilinen tasarım stratejileri yardımıyla üretilebilir. Örneğin, bağlama yeri bunun soydaş hedef molekülü ile etkileşime girdiğinde genel olarak dahil edilen amino asit pozisyonları, dejenere kodonların, trinükleotidlerin, rastgele peptitlerin veya tüm kıvrımların bağlama yerini şifreleyen nükleik asit içinde karşılık gelen pozisyonlardan içeri yerleştirilmesi ile randomize edilebilir (bakınız, *örneğin*, 20040132028 Numaralı U.S. Yayını). Amino asi pozisyonlarının lokasyonu, hedef molekül ile kompleks halindeki bağlama yerinin kristal yapısının araştırılması ile tanımlanabilir. Randomizasyon için aday pozisyonlar, kıvrımları, düz yüzeyleri heliksleri ve bağlama yerinin bağlama kavitelerini içerir. Belirli uygulamalarda, bağlama yeri içinde çeşitlendirme için büyük olasılıkla adaylar olan amino asitler bunların immünoglobülin katlanması ile homolojisi ile tanımlanabilir. Örneğin, fibronektinin CDR-benzeri kıvrımları içindeki rezidüler fibronektin bağlama moleküllerinin bir kütüphanesini üretmek için randomize edilebilir (bakınız, *örneğin*, Koide et al., J. Mol. Biol., 284: 1141-1151 (1998)). Bağlama yerinin randomize edilebilen diğer kısımları düz yüzeyleri içerir. Seleksiyon, teknikte-bilinen yöntemler, *örneğin*, faj gösterimi, maya gösterimi veya ribozom gösterimi, ile başarılabılır.

30

Bir uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir fibronektin bağlama molekülünden bir bağlama yeri içerir. Fibronektin bağlama molekülleri (*örneğin*, Fibronektin tip I, II veya III alanları içeren moleküller), immünoglobülinlerin aksine, intra-zincir disülfid bağlara dayanmayan, CDR-benzeri

35

kıvrımlar gösterir. Fibronektin polipeptitleri yapmak için yöntemler, örneğin, WO 01/64942'de ve 6,673,901, 6,703,199, 7,078,490 ve 7,119,171 Numaralı U.S. Patentleri'nde tarif edilir. Bir emsal uygulamada, fibronektin polipeptidi, AdNectin®'dir (Adnexus Therapeutics, Waltham, MA).

Bir başka uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir Affibody®'den (Abcam, Cambridge, MA) bir bağlama yeri içerir. Affibodiler, stafilokoksal Protein A'nın (SPA) immünoglobülin bağlama alanlarından (bakınız, örneğin, Nord et al., Nat. Biotechnol., 15: 772-777 (1997)) türetilir. Affibodi bağlama yerleri yapmak için yöntemler, 6,740,734 ve 6,602,977 U.S. Patentleri'nde ve WO 00/63243'te tarif edilir. Bir başka uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir

Anticalin®'den bir bağlama yeri içerir (Pieris AG, Friesing, Almanya). Antikalinler (aynı zamanda lipokalinler olarak da bilinir), fonksiyonu bunların varil/kıvrım bölgesindeki hedef molekülleri bağlamak olan bir çeşitli β -varil proteini familyasının üyeleridir. Lipokalin bağlama yerlerine, varilin sarmallarını bağlayan kıvrım dizilerini randomize etme ile mühendislik uygulanabilir (bakınız, örneğin, Schlehuber et al., Drug Discov. Today, 10: 23-33 (2005); Beste et al., PNAS, 96: 1898-1903 (1999). Buluşun bağlama moleküllerinde kullanılan antikalin bağlama yerleri, *Pieris brassica*'nın

Bilin-bağlama proteininin (BBP) 28 ila 45, 58 ila 69, 86 ila 99 ve 114 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarını içeren lineer polipeptit dizisinin dizi pozisyonlarına karşılık gelen dört segment içinde mutasyona uğratılmış lipokalin familyasının polipeptitlerinden başlayarak elde edilebilir.

Antikalin bağlama yerlerini yapmak için diğer yöntemler, WO99/16873'te ve WO 05/019254'te tarif edilir. Bir başka uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir sistein açısından zengin polipeptitten bir bağlama yeri içerir. Mevcut buluşun tatbikinde kullanılan sistein açısından zengin alanlar tipik olarak, bir α -heliks, bir β yaprak veya

bir β -varil yapısı oluşturmaz. Tipik olarak, disülfid bağlar, alanın bir üç-boyutlu yapıya katlanmasını teşvik eder. Genel olarak, sistein açısından zengin alanlar, en az iki disülfid bağa, daha tipik olarak en az üç disülfid bağa, sahiptir. Bir

5 emsal sistein açısından zengin polipeptit, bir A alanı proteinidir. A-alanları (bazen, "kompleman-tipi tekrarlar" olarak adlandırılır", yaklaşık 30-50 veya 30-65 amino asit içerir. Bazı uygulamalarda, alanlar, yaklaşık 35-45 amino asit ve bazı durumlarda yaklaşık 40 amino asit içerir. 30-50 amino

10 asit içinde, yaklaşık 6 sistein rezidüsü vardır. Altı sistein rezidüsünün, disülfid bağları tipik olarak aşağıdaki sisteinler arasında bulunur: C1 ve C3, C2 ve C5, C4 ve C6. A alanı, bir ligand bağlama kısmını oluşturur. Alanın sistein rezidüleri, bir kompakt, kararlı, fonksiyonel olarak bağımsız

15 kısım oluşturmak için disülfid bağlanır. Bu tekrarların kümeleri, bir ligand bağlama alanını yapar ve diferansiyel kümelenme, ligand bağlama açısından özgüllük verebilir. A- alanları içeren emsal proteinler, *örneğin*, kompleman bileşenlerini (*örneğin*, C6, C7, C8, C9 ve Faktör I), serin

20 proteazlarını (*örneğin*, enteropeptidazı, matriptazı ve korini), transmembran proteinleri (*örneğin*, ST7, LRP3, LRP5 ve LRP6) ve endositik reseptörleri (*örneğin*, Sortilin ile ilgili reseptörü, LDL-reseptörünü, VLDLR'yi, LRP1'i, LRP2'yi ve ApoER2'yi), içerir. Arzu edilen bir bağlama özgüllüğü olan A

25 alanı proteinleri yapmak için yöntemler, *örneğin*, WO 02/088171'de ve WO 04/044011'de, açıklanır. Diğer uygulamalarda, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir tekrar proteininden bir bağlama alanı içerir. Tekrar proteinleri, küçük (*örneğin*, yaklaşık 20 ila yaklaşık 40 amino

30 asitlik rezidülerin) yapısal birimlerinin ardışık kopyalarını veya sürekli alanlar oluşturmak için birlikte istiflenen tekrarlar içeren proteinlerdir. Tekrar proteinleri, protein içindeki tekrarların sayısını ayarlama ile bir özel hedef bağlama yerine uyması için modifiye edilebilir. Emsal tekrar

35 proteinleri, Tasarlanmış Ankirin Tekrar Proteinleri'ni (*yani*,

bir DARPin®'leri, Molecular Partners, Zurich, İsviçre)
(bakınız, *örneğin*, Binz et al., Nat. Biotechnol., 22: 575-582
(2004)) veya lösün açısından zengin tekrar proteinlerini
(yani, LRRP'leri) (bakınız, *örneğin*, Pancer et al., Nature,
5 430: 174-180 (2004)) içerir. Ankirin tekrar birimlerinin
şimdiye kadar belirlenmiş tersiyer yapılarının tümü, bir β -
keskin-dönüşten akabinde iki anti-paralel α -heliksten oluşan
ve tekrar birimini sonraki tekrar birimine bağlayan bir kıvrım
ile sonlanan bir karakteristik paylaşır. Ankirin tekrar
10 birimlerinden inşa edilen alanlar, tekrar birimlerini bir
uzatılmış ve kavisli yapı halinde istifleme ile oluşturulur.
Bofa balıklarının ve diğer çenesiz balıkların adaptif immün
sisteminin parçasından elde edilen LRRP bağlama yerleri,
lenfosit matürasyonu sırasında lösün açısından zengin tekrar
15 genlerinin bir takımının rekombinasyonu ile oluşturulması
açısından antikorlara benzer. DARPin veya LRRP bağlama yerleri
yapmak için yöntemler, WO 02/20565'te ve WO 06/083275'te tarif
edilir. buluşun bağlama molekülünde kullanılabilen diğer
immünoglobülin-olmayan bağlama yerleri, Src homoloji
20 alanlarından (*örneğin*, SH2 veya SH3 alanlarından), PDZ
alanlarından, beta-laktamazdan, yüksek afiniteli proteaz
inhibitörlerinden veya küçük disülfid bağlama proteini
iskelelerinden, *örneğin*, akrep toksinlerinden türetilen
bağlama yerleri içerir. Bu moleküllerden türetilen bağlama
25 yerleri yapmak için yöntemler, teknikte açıklanmıştır,
bakınız, *örneğin*, Silverman et al., Nat. Biotechnol., 23(12):
1493-4 (2005); Panni et al., J. Biol. Chem., 277: 21666-21674
(2002), Schneider et al., Nat. Biotechnol., 17: 170-175
(1999); Legendre et al., Protein Sci., 11:1506-1518 (2002);
30 Stoop et al., Nat. Biotechnol., 21: 1063-1068 (2003) ve Vita
et al., PNAS, 92: 6404-6408 (1995). Daha başka bağlama
yerleri, bir EGF-benzeri alandan, bir Kringle-alanından, bir
PAN alanından, bir Gla alanından, bir SRCR alanından, bir
Kunitz/Bovin pankreatik tripsin İnhibitörü alanından, bir
35 Kazal-tipi serin proteazı inhibitörü alanından, bir Trefoil

(P-tipi) alanından, bir von Willebrand faktörü tip C alanından, bir Anafilatoksin-benzeri alandan, bir CUB alanından, bir tiroglobülin tip I tekrarından, LDL-reseptörü sınıf A alanından, bir Sushi alanından, bir Link alanından, 5 bir Trombospondin tip I alanından, bir İmmünoglobülin-benzeri alandan, bir C-tipi lektin alanından, bir MAM alanından, bir von Willebrand faktörü tip A alanından, bir Somatomedin B alanından, bir WAP-tipi dört disülfid çekirdekli alandan, bir F5/8 tipi C alanından, bir Hemopeksin alanından, bir Laminin- 10 tipi EGF-benzeri alandan, bir C2 alanından, bir CTLA-4 alanından ve teknikte normal uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinen bu tarz diğer alanlardan aynı zamanda bunların türevlerinden ve/veya varyantlarından oluşan gruptan seçilen bir bağlama alanından türetilebilir. İlave immünoglobülin- 15 olmayan polipeptitler, Avimers®'i (Avidia, Inc., Mountain View, CA -bakınız, WO 06/055689 Numaralı Uluslararası PCT Yayını ve 2006/0234299 U.S. Patenti Yayını), Telobodies®'i (Biotech Studio, Cambridge, MA), Evibodies®'i (Evogenix, Sydney, Avustralya -bakınız, 7,166,697 Numaralı U.S. Patenti) 20 ve Microbodies®'i (Nascacell Technologies, Munich, Almanya) içerir.

iii) Reseptörlerin veya Ligandların Bağlama Kısımları

25 Diğer yönlerinde, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, bir reseptörün bir ligand bağlama kısmıdır ve/veya bir ligandın bir reseptör bağlama kısmıdır.

Diğer emsal uygulamalarda, buluşun bir farmasötik olarak aktif 30 kısmı, aşağıdaki proteinlerin birinden veya birden fazlasından türetilen bir veya birden fazla ligand bağlama alanı veya reseptör bağlama alanı içerebilir:

a. Sitokinler ve Sitokin Reseptörleri

Sitokinler, lenfositlerin proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonel aktivasyonu üzerinde pleiotropik etkilere sahiptir. Çeşitli sitokinlerden veya bunların reseptör bağlama kısımlarından buluşun füzyon proteinlerinde yararlanılabilir.

5 Emsal sitokinler, interleokinleri (örneğin, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13 ve IL-18), koloni stimüle etme faktörlerini (CSF'leri) (örneğin, granülosit CSF'yi (G-CSF), granülosit-makrofaj CSF'yi (GM-CSF) ve monosit makrofaj CSF'yi (M-CSF)), tümör nekroz faktörünü
10 (TNF) alfa ve beta, sitotoksik T lenfosit antijeni 4'ü (CTLA-4) ve interferonları, örneğin, interferon-a'yı, β 'yi veya γ 'yı (4,925,793 ve 4,929,554 Numaralı U.S. Patentleri) içerir.

Sitokin reseptörleri tipik olarak, bir ligand-spesifik alfa
15 zincirinden ve bir ortak beta zincirinden oluşur. Emsal sitokin reseptörleri, GM-CSF, IL-3 (5,639,605 Numaralı U.S. Patenti), IL-4 (5,599,905 Numaralı U.S. Patenti), IL-5 (5,453,491 Numaralı U.S. Patenti), IL10 reseptörü, IFN γ (EP0240975) ve reseptörlerin TNF familyası (örneğin, TNF α
20 (örneğin, TNFR-1 (EP 417, 563), TNFR-2 (EP 417,014) lenfotoksin beta reseptörü) için olanları içerir.

b. Adezyon Proteinleri

25 Adezyon moleküller, hücrelerin birbiri ile etkileşim kurmasına izin veren membrana bağlı proteinlerdir. Lökosit yuvalanma reseptörlerini ve hücrel adezyon moleküllerini içeren çeşitli adezyon proteinleri veya bunların reseptör bağlama kısımları buluşun bir füzyon proteinine katılabilir. Lökosit
30 yuvalanma reseptörleri, enflamasyon sırasında lökosit hücre yüzeyleri üzerinde eksprese edilir ve ekstraselüler matriks bileşenlerini bağlamaya aracılık eden β -1 integrinleri (örneğin, VLA-1, 2, 3, 4, 5 ve 6) ve vasküler endotelyum üzerindeki hücrel adezyon moleküllerini (CAM'ları) bağlayan
35 β 2-integrinleri (örneğin, LFA-1, LPAM-1, CR3 ve CR4 içerir.

Emsal CAM'lar ICAM-1'i, ICAM-2'yi, VCAM-1'i ve MAdCAM-1'i içerir. Diğer CAM'lar E-selektini, L-selektini ve P-selektini içeren selektin familyasınıninkileri içerir.

5 c. Kemokinler

Kemokinler, lökositlerin bir enfeksiyon yerine doğru göçünü stimüle eden kemotaktik proteinler, de buluşun bir füzyon proteinine katılabilir. Emsal kemokinler, Makrofaj enflamatuvar proteinleri (MIP-1- α ve MIP-1- β), nötrofil kemotaktik faktörünü ve RANTES'i (aktivasyon üzerine regüle edilmiş, normal olarak T-hücresi eksprese edilmiş ve salgılanmış) içerir.

15 d. Hormonlar

Buluşun füzyon proteinlerde farmakolojik olarak aktif kısımlar olarak kullanım için emsal büyüme hormonları, renini, insan büyüme hormonunu (HGH; 5,834,598 Numaralı U.S. Patenti), N-metiyonil insan büyüme hormonunu; bovin büyüme hormonunu; büyüme hormonu salım faktörünü; paratiroit hormonunu (PTH); tiroit stimüle etme hormonunu (TSH); tiroksini; proinsülini ve insülini (5,157,021 ve 6,576,608 Numaralı U.S. Patentleri); folikül stimüle etme hormonunu (FSH); kalsitonini, lüteinleyici hormonu (LH), leptini, glukagonları; bombesini; somatotropini; müllerien-inhibe etme maddesini; relaksini ve prorelaksini; gonadotropin-ilişkili peptidi; prolaktini; plasental laktojeni; OB proteinini veya müllerien-inhibe etme maddesini içerir.

30

e. Reseptörler ve Ligandlar

Bir uygulamada, buluşun bir farmasötik olarak aktif kısmı, ligandın veya reseptörün bağlama yerini (yerlerini) (örneğin, bir reseptörün ekstraselüler alanını (ECD)) en az bir genetik

35

olarak kaynaştırılmış Fc bölgesi (yani, scFc bölgesi) ile birleştirir. Belirli uygulamalarda, bir reseptörün ligand-bağlama kısmının bağlama yeri veya alanı, bir antikor veya antikor varyantı tarafından bağlanmış bir reseptörden türetilir. Diğer uygulamalarda, bir reseptörün ligand bağlama kısmı, İmmüoglobülin (Ig) süperfamilyasının bir reseptöründen (örneğin, bir çözünebilen T-hücresi reseptöründen, örneğin, mTCR® (Medigene AG, Munich, Almanya), *supra* tarif edilen TNF reseptörü süperfamilyasının bir reseptöründen (örneğin, bir immüoadhesinin bir çözünebilen TNF α reseptöründen), Gliyal Hücre-Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF) reseptörü familyasının bir reseptöründen (örneğin, GFR α 3'ten), G-proteinine kuple edilmiş reseptör (GPCR) süperfamilyasının bir reseptöründen, Tirozin Kinaz (TK) reseptörü süperfamilyasının bir reseptöründen, Ligand-Kapılanmış (LG) süperfamilyanın bir reseptöründen, kemokin reseptörü süperfamilyasının bir reseptöründen, IL-1/Toll-benzeri Reseptör (TLR) süperfamilyasından ve bir sitokin reseptörü süperfamilyasından oluşan gruptan seçilen bir reseptörden türetilir.

Diğer uygulamalarda, bir ligandın reseptör-bağlama kısmının bağlama yeri veya alanı, bir antikor veya antikor varyantı tarafından bağlanmış bir ligandan türetilir. Örneğin, ligand İmmüoglobülin (Ig) süperfamilyasının bir reseptöründen, TNF reseptörü süperfamilyasının bir reseptöründen, G-proteinine kuple edilmiş reseptör (GPCR) süperfamilyasının bir reseptöründen, Tirozin Kinaz (TK) reseptörü süperfamilyasının bir reseptöründen, Ligand-Kapılanmış (LG) süperfamilyanın bir reseptöründen, kemokin reseptörü süperfamilyasının bir reseptöründen, IL-1/Toll-benzeri Reseptör (TLR) süperfamilyasından ve bir sitokin reseptörü süperfamilyasından oluşan gruptan seçilen bir reseptörü bağlayabilir. Bir emsal uygulamada, bir ligandın reseptör-bağlama kısmının bağlama yeri, TNF ligandı

süperfamilyasına ait olan bir liganddan (örneğin, CD40L) türetilir.

Büyüme faktörleri veya bunların reseptörleri (veya bunların reseptör bağlama veya ligand bağlama kısımları) buluşun füzyon proteinlerine katılabilir. Emsal büyüme faktörleri, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü'nü (VEGF) ve bunun izoformlarını (5,194,596 Numaralı U.S. Patenti); aFGF'yi ve bFGF'yi içeren; Fibroblastik Büyüme Faktörleri'ni (FGF), atriyal natriüretik faktörü (ANF); hepatik büyüme faktörlerini (HGF'leri; 5,227,158 ve 6,099,841 Numaralı U.S. Patentleri), nörotrofik faktörleri, örneğin, kemik-kaynaklı nörotrofik faktörü (BDNF), gliyal hücre kaynaklı nörotrofik faktör ligandlarını (örneğin, GDNF'yi, nötürini, artemini ve persefini), nörotrofin-3'ü, -4'ü, -5'i veya -6'yı (NT-3, NT-4, NT-5 veya NT-6) veya bir sinir büyüme faktörünü, örneğin, NGF- β platelet-kaynaklı büyüme faktörünü (PDGF) (4,889,919, 4,845,075, 5,910,574 ve 5,877,016 Numaralı U.S. Patentleri); transforme etme büyüme faktörlerini (TGF), örneğin, TGF-alfa'yı ve TGF-beta'yı (WO 90/14359), kemik morfogenetik proteini (BMP) içeren osteoindüktif faktörleri; insülin-benzeri büyüme faktörleri-I'i ve -II'yi (IGF-I ve IGF-II; 6,403,764 ve 6,506,874 Numaralı U.S. Patentleri); Eritropoietini (EPO); Trombopoietini (TPO; kök-hücre faktörü (SCF), trombopoietini (TPO, c-Mpl ligandını) ve Wnt polipeptitlerini (6,159,462 Numaralı U.S. Patenti) içerir.

Buluşun farmakolojik olarak aktif kısımları olarak kullanılabilen emsal büyüme faktörü reseptörleri, EGF reseptörlerini; VEGF reseptörlerini (örneğin, Flt1 veya Flk1/KDR), PDGF reseptörlerini (WO 90/14425); HGF reseptörlerini (5,648,273 ve 5,686,292 Numaralı U.S. Patentleri) ve NGF'yi, BDNF'yi ve NT-3'ü bağlayan, p75^{NTR} veya p75 olarak da adlandırılan, düşük afiniteli reseptörü (LNGFR) ve reseptör tirozin kinazlarının trk familyasının üyeleri olan

(örneğin, trkA, trkB (EP 455,460), trkC (EP 522,530)) yüksek afiniteli reseptörleri içeren nörotrofik reseptörleri içerir.

f. İlaçlar

5

Bir başka uygulamada, bir farmakolojik olarak aktif ajan, hastalığın tedavisinde, küründe, önlenmesinde veya tanısında kullanılan veya aksi durumda fiziksel veya ruhsal iyilik-halini arttırmak için kullanılan bir etkin maddedir. Bu tarz
10 ilaçlar kimyasal varlıklar olabilir ve bu tarz emsal varlıklar burada daha detaylı bir şekilde tarif edilir.

15

Mevcut buluş, sinir sistemini etkileyen bozuklukların tedavisi amacıyla başka ajanları aktarmak için uygulanabilir ve bu ayrıca, tanısall amaçlar için de uygulanabilir. SSS bozukluklarının tedavisi için ajanların tercih edilen sınıfları aşağıdakileri içerir:

20

Sinaptik ve nöroefektör bağlantısal yerlerde etki eden ilaçlar; genel ve lokal analjezikler ve anestetikler, örneğin, opioid analjezikleri ve antagonistleri; hipnotikler ve sedatifler; psikiyatrik bozuklukların, örneğin, depresyonun, şizofreninin, tedavi için ilaçlar; anti-epileptikler ve antikonvülsanlar; Huntington
25 hastalığı, yaşlanma ve Alzheimer hastalığı; nöro-koruyucu ajanlar (örneğin, eksitatör amino asit antagonistleri ve nörotropik faktörler) ve nörorejeneratif ajanlar; trofik faktörler, örneğin, beyin kaynaklı nörotrofik faktör, siliyer nörotrofik faktör veya sinir büyüme faktörü; SSS
30 travmasının veya inmenin tedavisinde amaçlanan ilaçlar ve bağımlılığın ve ilaç sınıstimalinin tedavisi için ilaçlar; otakaidler ve anti-enflamatuvar ilaçlar; parazitik enfeksiyonlar ve mikrobiyal hastalıklar için kemoterapötik ajanlar; immünosüpresif ajanlar ve anti-kanser ilaçları;
35 hormonlar ve hormon antagonistleri; ağır metaller ve ağır

5 metal antagonistleri; metalik-olmayan toksik ajanlar için
antagonistler; kanserin tedavisi için sitostatik ajanlar;
nükleer tıpta ve radyasyon terapisinde kullanım için
tanısal maddeler, immüno-aktif ve immüno-reaktif ajanlar
ve çok sayıda başka ajan, örneğin, aktarıcılar ve bunların
ilgili reseptör-agonistleri ve -antagonistleri, bunların
ilgili öncülleri veya metabolitler; antibiyotikler,
antispazmodikler, antihistaminler, anti-kusturucu ilaçlar,
gevşeticiler, stimülanlar, "yolcu" ve "rehber"
10 oligonükleotidler, serebral dilatörler, psikotropikler,
anti-manikler, vasküler dilatörler ve konstriktörler,
anti-hipertansifler, migren tedavileri, hipnotikler,
hiper- veya hipo-glisemik ajanlar, mineral veya besinsel
ajanlar, anti-obezite ilaçları, anabolikler ve anti-
15 astmatikler.

Tipik etken maddeler (örneğin, ilaçlar) sinir sistemini
etkileyen herhangi bir madde olabilir veya sinir sisteminin
tanısal testleri için kullanılabilir. Bunlar Gilman et al.,
20 (1990), "Goodman and Gilman's--The Pharmacological Basis of
Therapeutics", Pergamon Press, New York, tarafından tarif
edilir ve aşağıdaki ajanları içerir:

asetilkolin ve sentetik kolin esterleri, doğal oluşumlu
kolinomimetik alkaloidler ve bunlar sentetik türdeşleri,
25 antikolinesteraz ajanlar, gangliyonik stimülanlar,
atropin, skopolamin ve ilgili antimuskarinik ilaçlar,
katekolaminler ve sempatomimetik ilaçlar, örneğin,
epinefrin, norepinefrin ve dopamin, adrenerjik agonistler,
adrenerjik reseptör antagonistleri, aktarıcılar, örneğin,
30 GABA, glisin, glutamat, asetilkolin, dopamin, 5-
hidroksitriptamin ve histamin, nöroaktif peptitler;

analjezikler ve anestetikler, örneğin, analjezikleri ve
antagonistleri; preanestetik ve anestetik ilaçlar,
35 örneğin, benzodiazepinler, barbitüratlar, antihistaminler,

fenotiyazinler ve bütülfenonlar; opioidler; antiemetikler; antikolinerjik ilaçlar, örneğin, atropin, skopolamin veya glikopirrolat; kokain; kloral türevleri; etiklorvinol; glutetimi; metiprilon; meprobamat; paraldehit; disülfiram; morfin, fentanil ve nalokson;

santral olarak aktif antitüssif ajanlar;

psikiyatrik ilaçlar, örneğin, fenotiyazinler, tiyoksantenler ve diğer heterosiklik bileşikler (örneğin, halperidol); trisiklik antidepresanlar, örneğin, desimipramin ve imipramin; atipik antidepresanlar (örneğin, floksetin ve trazodon), monoamin oksidaz inhibitörleri, örneğin, izokarboksazid; lityum tuzları; anksiyolitikler, örneğin, klordiazepoksid ve diazepam;

hidantoinleri içeren anti-epileptikler, antikonvülsan barbitüratlar, iminostilbinler (örneğin, karbamazepin), süksinimidler, valproik asit, okzazolidinedionlar ve benzodiazepinler.

anti-Parkinson ilaçları, örneğin, L-DOPA/CARBIDOPA, apomorfin, amantadin, ergolinler, selegelin, ropinorol, bromokriptin mesilat ve antikolinerjik ajanlar;

antispastisite ajanları, örneğin, baklofen, diazepam ve dantrolen;

nöro-koruyucu ajanlar, örneğin, eksitatör amino asit antagonistleri, nörotrofik faktörler ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör, siliyer nörotrofik faktör veya sinir büyüme faktörü; nörotrofin(NT) 3 (NT3); NT4 ve NT5; gangliyositler; nörorejeneratif ajanlar;

bağımlılığın ve ilaç suiistimalinin tedavisi için ilaçlar, opioid antagonistlerini ve antidepresanları içerir;

otakaidler ve anti-enflamatuvar ilaçlar, örneğin, histamin, bradikinin, kallidin ve bunların ilgili agonistleri ve antagonistleri;

- 5 parazitik enfeksiyonlar ve mikrobiyal hastalıklar için kemoterapötik ajanlar;
alkilleme ajanlarını (örneğin, nitrozoüreleri) ve antimetabolitleri içeren anti-kanser ilaçları; nitrojen mustardları, etilenaminler ve metilmelaminler;
10 alkilsülfonatlar; folik asit analogları; pirimidin analogları, pürin analogları, vinka alkaloidleri ve antibiyotikler.

- Mevcut buluş ayrıca, anti-kusturucu ilaçların, gevşeticilerin,
15 stimülanların, "yolcu" ve "rehber" oligonükleotidlerin, serebral dilatörlerin, psikotropiklerin, vasküler dilatörlerin ve konstriktörlerin, anti-hipertansiflerin, migren tedavilerinin, hiper- veya hipo-glisemik ajanların, mineral veya besinsel ajanların, anti-obezite ilaçlarının,
20 anaboliklerin ve anti-astmatiklerin, anti-enflamatuvar ilaçların, örneğin, fenilbütazonun, indometasinin, naproksenin, ibuprofenin, flurbiprofenin, diklofenağın, deksametazonun, prednisonun ve prednisolonun; serebral vazodilatörlerin, örneğin, soloktidilumun, vinkaminin,
25 naftidrofüril okzalatın, ko-dergokrin mesilatın, siklandelatın, papaverinin, nikotinik asidin, anti-enfektif ajanların, örneğin, eritromisin stearatın ve sefaleksinin, adrenokortikotropik hormonun, adenosin deaminaz ribonükleazın, alkalın fosfatazın, anjiyotensinin, antikorların, arjinazın,
30 arjinin deamineain, asparajinazın, seruleinin, kalsitoninin, kemotripsinin, kolesistokininin, pıhtılaşma faktörlerinin, dinorfinlerin, endorfinlerin, endorfinlerin, enkefalinlerin, enkefalinlerin, eritropoietinin, gastrin-salım peptidinin, glukagonun, hemoglobinin, hipotalmik salım faktörlerinin,
35 interferonun, katakalsinin, motilinin, nöropeptit Y'nin,

nörotensinin, doğal oluşumlu olmayan opioidlerin, oksitosinin, papainin, paratiroid hormonunun, peptitlerin, prolaktinin, çözünebilen CD-4'ün, somatomedinin, somatostatinin, somatostatinin, somatotropinin, süperoksit dismutazın, tiroit
5 stimülan hormonun, doku plazminojen aktivatörünün, tripsinin, vasopressinin ve bu tarz peptitlerin analoglarının aynı zamanda başka uygun enzimlerin, hormonların, proteinlerin, polipeptitlerin, enzim-protein konjugatlarının, antikor-hapten konjugatlarının, viral epitopların, vb. aktarımı için de
10 yararlıdır.

V. Polipeptitlerin Emsal Formatları

Bağlama moleküllerinin emsal formatları, eşlik eden
15 Şekiller'de izah edilir. Örneğin, Şekil 1, burada farmasötik olarak aktif kısmın gösterilmediği örnekleri (örneğin, farmasötik olarak aktif kısımların buna eklenebildiği FC5Fc ve FcFC5 iskelelerini) aynı zamanda burada farmasötik olarak aktif kısmın bir antikor bağlama yeri olduğu örnekleri içerir.
20 Örneğin, bir uygulamada, bir bağlama molekülünün bir iskelesi (yani, bir farmasötik olarak aktif kısmın buna eklenebildiği bir yapı), bir Fc bölgesine, alanına veya kısmına kovalent olarak bağlanmış (örneğin, genetik olarak kaynaştırılmış) iki BBB trans-göç-etme kısmı içerir. BBB trans-göç-etme kısımları,
25 doğrudan veya bir bağlayıcı peptit vasıtasıyla bağlanabilir. Bir tercih edilen yönünde, BBB trans-göç-etme kısımları Fc bölgesinin, alanının veya kısmının N ucuna bağlanabilir. Bir yönünde, ilave bağlama kısımları (örneğin, scFv molekülleri formunda TME30A-olmayan farmakolojik olarak aktif kısımlar)
30 ayrıca, Fc bölgesinin, alanının veya kısmının C ucuna da bağlanabilir.

Bir başka yönünde, ilave BBB trans-göç-etme kısımları, Fc bölgesinin, alanının veya kısmının C ucuna bağlanabilir. BBB

trans-göç-etme kısımları doğrudan veya bir bağlayıcı peptit vasıtasıyla bağlanabilir.

5 Bir başka yönünde, bir bağlama molekülü, bir aynen antikör molekülünün VH alanına N-ucundan kaynaştırılmış olan bir BBB trans-göç-etme kısmı içerir. Bir başka yönünde, bir bağlama molekülü, bir aynen antikör molekülünün VL alanına N-ucundan kaynaştırılmış olan bir BBB trans-göç-etme kısmı içerir. Daha başka yönünde, bir bağlama molekülü, bir aynen antikör
10 molekülüne C-ucundan kaynaştırılmış iki BBB trans-göç-etme kısmı içerir. BBB trans-göç-etme kısımları doğrudan veya bir bağlayıcı peptit vasıtasıyla bağlanabilir.

15 Farmasötik olarak aktif kısımların (veya ilave farmakolojik olarak aktif kısımların) teknikte bilinen yöntemler kullanılarak bu yapıların herhangi birine tutturabileceği anlaşılabacaktır.

20 Bir uygulamada, buluşun polipeptitleri (farmasötik olarak aktif kısım açısından monomerik olan, ancak BBB trans-göç-etme kısımları açısından multimerik (*örneğin*, dimerik) olan bir molekül oluşturan) yalnızca bir farmasötik olarak aktif kısım içerir. Bir başka uygulamada, buluşun bir polipeptidi, birden fazla farmakolojik olarak aktif kısım, *örneğin*, 2, 3, 4, 5, 6,
25 7, 8, 9, 10 veya daha fazla farmakolojik olarak aktif kısım, içerir. Farmasötik olarak aktif kısımları aynı veya farklı olabilir.

30 Buluşun bir uygulamasında, bir farmasötik olarak aktif kısım, bir Fc alanının, bölgesinin veya kısmının N-ucuna bir bağlayıcı peptit vasıtasıyla operatif olarak bağlanır. Bir başka uygulamada, farmakolojik olarak aktif kısım, bir Fc alanının, bölgesinin veya kısmının C-ucuna bir bağlayıcı peptit vasıtasıyla operatif olarak bağlanır.

Diğer uygulamalarda, iki veya daha fazla farmasötik olarak aktif kısım, seri halde (örneğin, bir bağlayıcı peptit vasıtasıyla) birbirine bağlanır. Bir uygulamada, farmasötik olarak aktif kısımların tandem dizilimi, bir Fc bölgesinin, alanının veya kısmının C-ucuna veya N-ucuna bir bağlayıcı peptit vasıtasıyla operatif olarak bağlanır.

Proteinleri farmakolojik olarak aktif bileşiklere konjuge etmenin, bağlamanın ve kuple etmenin diğer yöntemleri alanda iyi bilinir. Örneğin, bakınız, Wu A M, Senter P D, Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates, Nat. Biotechnol. 2005 September; 23(9):1137-46 ve Trail P A, King H D, Dubowchik G M, Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer, Cancer Immunol Immunother. 2003 May; 52(5):328-37; Saito G, Swanson J A, Lee K D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, Adv Drug Deliv Rev. 2003 Feb. 10; 55(2):199-215. Ayrıca, mevcut antikorlar, bir farmasötik olarak aktif bileşik ile yüklenmiş lipozom, nano-parçacıklar veya başka analog taşıyıcılar ile kombinasyon halinde sağlanabilir. Bu tarz bileşimleri hazırlamanın yöntemleri alanda bilinir (bakınız, örneğin, Sugano et al., Antibody Targeting of Doxorubicin-loaded Liposomes Suppresses the Growth and Metastatic Spread of Established Human Lung Tumor Xenografts in Severe Combined Immunodeficient Mice Cancer Research 60, 6942-6949, Dec. 15, 2000 ve Martin et al., Nanomaterials in Analytical Chemistry, Analytical Chemistry News & Features, May 1, 1998; pp. 322 A-327 A).

Çok sayıda efektör molekül, bağlama polipeptitlerinin bunlara bağlanabildiği uygun fonksiyonel gruplardan yoksundur. Bir uygulamada, bir efektör molekül, örneğin, bir ilaç veya ön-ilâç, bir bağlama molekülü yoluyla polipeptide tutturulur. Bir uygulamada, bağlama molekülü, özel bir yerde sitotoksitenin

aktivasyonuna izin veren bir kimyasal bağ içerir. Uygun kimyasal bağlar teknikte iyi bilinir ve disülfid bağlar, asit labil bağlar, fotolabil bağlar, peptidaz labil bağlar, sülfidril ve maleimid grupları arasında oluşturulan tiyoeter bağlar ve esteraz labil bağlar içerir. En tercihen, bağlama molekülü bir disülfid bağ veya bir tiyoeter bağ içerir. Buluşa uygun şekilde, bağlama molekülü tercihen, bir reaktif kimyasal grup içerir. Özel olarak tercih edilen reaktif kimyasal gruplar, N-süksinimidil esterleridir ve N-sülfosüksinimidil esterleridir. Bir tercih edilen uygulamada, reaktif kimyasal grup, tiyol grupları arasında disülfid bağlama vasıtasıyla efektöre kovalent olarak bağlanabilir. Bir uygulamada, bir efektör molekül bir tiyol grubu içermesi için modifiye edilir. Teknikte normal uzmanlığı olan bir kişi, bir tiyol grubunun bir hidrojen atomuna bağlanmış bir sülfür atomu içerdiğini ve ayrıca tipik olarak teknikte "--SH" veya "RSH" olarak gösterilebilen bir sülfidril grubu olarak da ifade edildiğini anlayacaktır.

Bir uygulamada, bir bağlama molekülü, bir efektör molekülü buluşun bir polipeptidi ile birleştirmek için kullanılabilir. Bağlama molekülü, yarılabilen veya yarılamayan molekül olabilir. Bir uygulamada, yarılabilen bağlama molekülü bir redoks ile yarılabilen bağlama moleküldür, böylece bağlama molekülü bir düşük redoks potansiyeli olan ortamlarda, örneğin, serbest sülfidril grupları olan moleküllerin daha yüksek konsantrasyonlarını içeren sitoplazmada ve diğer bölgelerde, yarılabilir. Redoks potansiyelindeki bir değişimden dolayı yarılabilen bağlama moleküllerinin örnekleri, disülfidler içerenleri içerir. Klevaj stimulusu, buluşun bağlama proteininin intraselüler alımı üzerine sağlanabilir, burada sitoplazmanın düşük redoks potansiyeli, bağlama molekülünün klevajını kolaylaştırır. Bir başka uygulamada, pH'taki bir düşüş, maytansinoid kargosunun hedef hücre içine salımını tetikler. pH'taki düşüş, çok sayıdaki

fizyolojik ve patolojik proseste, örneğin, endozom taşımacılığında, tümör büyümesinde, enflamasyonda ve miyokardiyal iskemiden, gösterilir. pH, bir fizyolojik 7,4'ten endozomlarda 5-6'ya veya lizozomlarda 4-5'e düşer. Kanser hücrelerinin lizozomlarını veya endozomlarını hedef almak için kullanılabilen asit duyarlı bağlama moleküllerinin örnekleri, asit ile yarılabilen bağları olanları, örneğin, asetallarda, ketallarda, ortoesterlerde, hidrazonlarda, tritillerde, cis-akonitillerde veya tiyokarbamoillerde bulunabilenleri bulunanları, içerir (bakınız, örneğin, Willner et al., (1993), Bioconj. Chem., 4: 521-7; 4,569,789, 4,631,190, 5,306,809 ve 5,665,358 Numaralı U.S. Patentleri). Diğer emsal asit-duyarlı bağlama molekülleri, Phe-Lys ve Val-Lys dipeptit dizilerini içerir (King et al., (2002), J. Med. Chem., 45: 4336-43). Klvaj stimulusu, düşük pH endozomal kompartımanlara (örneğin, lizozomlara) intraselüler alım taşımacılığı üzerine sağlanabilir. Diğer emsal asit ile yarılabilen bağlama molekülleri, iki veya daha fazla maytansinoidin tutturulması için iki veya daha fazla asit ile yarılabilen bağ içeren moleküllerdir (King et al., (1999), Bioconj. Chem., 10: 279-88; WO 98/19705).

Yarılabilen bağlama molekülleri, bir özel hedef hücre, örneğin, lizozomal veya tümör-ilişkili enzimler, ile ilişkili olan biyolojik olarak sağlanan klvaj ajanlarına duyarlı olabilir. Enzimatik olarak yarılabilen bağlama moleküllerinin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, peptitleri ve esterleri, içerir. Emsal enzim ile yarılabilen bağlama molekülleri, tümör-ilişkili proteazlara duyarlı olanları, örneğin, Katepsin B'yi veya plazmini, içerir (Dubowchik et al., (1999), Pharm. Ther., 83: 67-123; Dubowchik et al., (1998), Bioorg. Med. Chem. Lett., 8: 3341-52; de Groot et al., (2000), J. Med. Chem., 43: 3093-102; de Groot et al., 1999)m 42: 5277-83). Katepsin B ile yarılabilen yerler, valin-sitrüllin ve fenilalanin-lizin dipeptit dizilerini içerir

(Doronina et al., (2003), Nat. Biotech., 21(7): 778-84); Dubowchik et al., (2002), Bioconjug. Chem., 13: 855-69). Diğer emsal enzim ile yarılabilen yerler, trouse proteazları, örneğin, Thimet Oligopeptidaz (TOP), nötrofiller, makrofajlar ve diğer granülositler tarafından tercihlili bir şekilde salınan bir enzim, tarafından tanınan 4 ila 16 amino asitlik oligopeptit dizileri (örneğin, Suc- β -Ala-Leu-Ala-Leu) tarafından oluşturulanları içerir.

10 Belirli özel yönlerinde, buluşun bir bağlama polipeptidi, multispesifiktir, örneğin, bir birinci molekülü veya bir molekülün epitopunu bağlayan en az bir bağlama yerine ve bir ikinci molekülü veya birinci molekülün bir ikinci epitopunu bağlayan en az bir ikinci bağlama yerine sahiptir. Buluşun 15 multispesifik bağlama molekülüleri en az iki bağlama yeri içerebilir. Belirli uygulamalarda, buluşun bir multispesifik bağlama molekülünün en az iki bağlama yeri, BBB trans-göç-etme yerleridir.

20 VI. Bağlama Moleküllerinin Sentezi

Buluşun bir polipeptidinin formatı seçildiğinde, polipeptit üretmek için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu tarz yöntemler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, kimyasal sentez 25 tekniklerini ve rekombinant DNA ekspresyonu tekniklerini, içerir.

Bir yönünde, açıklama buluşun bir polipeptit molekülünü şifreleyen bir nükleik asit dizisi içeren bir nükleik asit 30 yapısı ile ilgilidir. Kodun denejere olmasından dolayı, çeşitli nükleik asit dizilerinin polipeptidin amino asit dizisini şifreleyeceği anlaşılabacaktır. Arzu edilen polinükleotid, teknikte bilinen yöntemler kullanılarak (örneğin, de novo katı-faz DNA sentezi ile veya hedef

polipeptidi şifreleyen bir erkenden hazırlanmış polinükleotidin PCR mutajenezi ile) üretilebilir.

5 Oligonükleotid-aracılı mutajenez, (örneğin, bir Fc varyant kısmı içine) bir amino asit süstitüsyonunu şifreleyen bir kodonu uygulamak amacıyla bir süstitüsyonu, çerçeve-içi içeri-yerleştirmeyi veya değiştirmeyi (örneğin, değiştirilmiş kodonu) hazırlamak için bir yöntemdir. Örneğin, başlangıç polipeptit DNA'sı, arzu edilen mutasyonu şifreleyen bir
10 oligonükleotidi bir tek-sarmallı DNA şablonuna hibridize etme ile değiştirilir. Hibridizasyondan sonra, bir DNA polimeraz, oligonükleotid primerini katan şablonun bir tüm ikinci komplementer sarmalını sentezlemek için kullanılır. Bir yönünde, genetik mühendisliği, örneğin, primer-temelli PCR
15 mutajenezi, buluşun bir polipeptidini şifreleyen bir polinükleotidi üretmek için, burada tanımlandığı üzere, bir değişimi katmak için yeterlidir.

Rekombinant üretim için, polipeptidi şifreleyen bir
20 polinükleotid dizisi, uygun bir ekspresyon vehikülü, yani, içeri yerleştirilen kodlama dizisinin transkripsiyonu ve translasyonu için gerekli olan elemanları veya bir RNA viral vektörü durumunda, replikasyon ve translasyon için gerekli olan elemanları içeren bir vektör, içine yerleştirilir.

25 Polipeptidi şifreleyen nükleik asit, uygun okuma çerçevesi içinde vektör içine yerleştirilir. Ekspresyon vektörü akabinde, polipeptidi eksprese edecek olan uygun bir hedef hücre içine transfekte edilir. Teknikte bilinen transfeksiyon
30 teknikleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, kalsiyum fosfat presipitasyonunu (Wigler et al., 1978, Cell 14: 725) ve elektroporasyonu (Neumann et al., 1982, EMBO, J. 1: 841), içerir. Çeşitli konak-ekspresyon vektörü sistemlerinden, ökaryotik hücrelerde burada tarif edilen polipeptidi eksprese
35 etmek için yararlanılabilir. Bir yönünde, ökaryotik hücre,

memeli hücrelerini içeren bir hayvan hücresidir (örneğin, CHO, BHK, Cos, HeLa hücreleridir). Polipeptit bir ökaryotik hücre içinde eksprese edildiğinde, polipeptidi şifreleyen DNA ayrıca, polipeptidin salgılanmasına izin verecek olan bir
5 sinyal dizisini de kodlayabilir. Teknikte uzmanlığı olan bir kişi, protein aktarıldığında, sinyal dizisinin matür polipeptidi oluşturmak için hücre tarafından yarıldığını anlayacaktır. Bir uygulamada, buluş, buluşun bir bağlayıcı peptidini içeren matür polipeptitler ile ilgilidir. Alternatif
10 olarak, bir sinyal dizisi dahil edilmediğine, polipeptit hücreleri lize etme ile geri-kazanılabilir.

Buluşun polipeptidi ayrıca, bir transgenik hayvanda, örneğin, bir kemirgende, keçide, koyunda, domuzda veya inekte, de
15 sentezlenebilir. "Transgenik hayvan" terimi, bunların genomu için bir yabancı gen katmış olan insan-olmayan hayvanları ifade eder. Bu gen germ-hattı dokularında bulunduğundan, bu ebeveynlerden yavruya geçirilir. Ekzojen genler, tek-hücreli embriyolara uygulanır (Brinster et al., 1985, Proc. Natl.
20 Acad.Sci. USA 82: 4438). İmmünoglobülin molekülleri üreten transgenikleri içeren, transgenik hayvanları üretmenin yöntemleri teknikte bilinir (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6376; McKnight et al., 1983, Cell 34: 335; Brinster et al., 1983, Nature 306: 332; Ritchie et al., 1984,
25 Nature 312: 517; Baldassarre et al., 2003, Theriogenology 59: 831; Robl et al., 2003, Theriogenology 59: 107; Malassagne et al., 2003, Xenotransplantation 10 (3): 267).

Ekspresyon vektörleri, rekombinant bir şekilde üretilen
30 polipeptidin kolay saflaştırılmasına veya tanımlanmasına izin veren etiketleri kodlayabilir. Örnekler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, diziyi kodlayan burada tarif edilen polipeptidin burada lac z kodlama bölgesi ile çerçeve içi vektör içine bağlanabildiği, böylece bir hibrit proteinin
35 üretildiği, pUR278 vektörünü (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:

1791), içerir; pGEX vektörleri, bir glutatyon S-transferaz (GST) etiketi ile proteinleri eksprese etmek için kullanılabilir. Bu proteinler genel olarak çözünebilir ve glutatyon-agaroz bilyelere adsorpsiyon, akabinde serbest glutatyon varlığında elüsyon ile hücrelerden kolaylıkla saflaştırılabilir. Vektörler, saflaştırmadan sonra etiketini kolay uzaklaştırılması için klevaj yerleri (örneğin, PreCission Protease (Pharmacia, Peapack, N. J.)) içerir.

10 Bu buluşun amaçları için, teknikte bilinen çok sayıda farklı ekspresyon vektörü sistemi kullanılabilir.

Bu ekspresyon vektörleri tipik olarak, epizomlar olarak veya konak kromozomal DNA'sının bir integral parçası olarak konak organizmalar içinde kopyalanabilir. Ekspresyon vektörleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, promotörleri (örneğin, doğal olarak ilişkili veya heterolog promotörleri), hızlandırıcıları, sinyal dizilerini, uç-birleştirme sinyallerini, hızlandırıcı elemanları ve transkripsiyon sonlandırma dizilerini, içeren ekspresyon kontrol dizileri içerebilir. Tercihen, ekspresyon kontrol dizileri, ökaryotik konak hücreleri transforme veya transfekte edebilen vektörlerdeki ökaryotik promotör sistemleridir. Ekspresyon vektörleri ayrıca, hayvan virüslerinden, örneğin, bovin papillom virüsünden, poliyom virüsünden, adenovirüsten, vaksiniya virüsünden, bakulovirüsten, retrovirüslerden (RSV, MMTV veya MOMLV), sitomegalovirüsten (CMV) veya SV40 virüsünden, türetilen DNA elemanlarından da yararlanabilir. Diğerleri, iç ribozom bağlama yerleri içeren polisistronik sistemlerin kullanımını içerir.

Yaygın olarak, ekspresyon vektörleri, arzu edilen DNA dizileri ile transforme edilmiş bu hücrelerin saptanmasına olanak sağlamak için seleksiyon belirteçleri (örneğin, ampisilin-direnci, higromisin-direnci, tetrasiklin direnci veya neomisin

direnci) içerir (bakınız, *örneğin*, Itakura et al., 4,704,362 U.S. Patenti). DNA'yı bunların kromozomları içine entegre etmiş olan hücreler, transfekte edilmiş konak hücrelerin seleksiyonuna izin veren bir veya birden fazla belirteci uygulama ile seçilebilir. Belirteç bir oksotrofik konağa prototrofi, biyosit direnci (*örneğin*, antibiyotikler) veya ağır metallere, *örneğin*, bakıra, direnç sağlayabilir. Seçilebilen belirteç geni, eksprese edilecek olan DNA dizilerine doğrudan bağlanabilir veya aynı hücre içine kotransformasyon ile uygulanabilir. Mevcut buluşun polipeptitleri polisistronik yapıları kullanılarak eksprese edilebilir. Bu ekspresyon sistemlerinde, söz konusu çok sayıda gen ürünü, *örneğin*, multimer bağlama proteininin çok sayıda polipeptidi, bir tek polisistronik yapıdan üretilebilir. Bu sistemler ökaryotik konak hücrelerde buluşun polipeptitlerin görece yüksek düzeylerini sağlamak için bir iç ribozom giriş yerini (IRES) avantajlı bir şekilde kullanılır. Uygun IRES dizileri, ayrıca burada da eklenmiş olan 6,193,980 Numaralı U.S. Patenti'nde açıklanır. Teknikte uzmanlığı olan kişiler, bu tarz ekspresyon sistemlerinin mevcut başvuruda açıklanan polipeptitlerin tam aralığını etkili bir şekilde üretmek için kullanılabileceğini anlayacaktır.

Daha genel olarak, bir polipeptidi şifreleyen vektör veya DNA dizisi hazırlandığında, ekspresyon vektörü uygun bir konak hücre içine uygulanabilir. Yani, konak hücreler transforme edilebilir. Plazmidin konak hücre içine uygulanması, teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinen çeşitli teknikler ile başarılı bir şekilde tamamlanabilir. Bunlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, (elektroforezi ve elektroporasyonu içeren) transfeksiyonu, protoplast füzyonunu, kalsiyum fosfat presipitasyonunu, zarf içine alınmış DNA ile hücre füzyonunu, mikro-enjeksiyonu ve aynen virüs ile enfeksiyonu, içerir. Bakınız, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors,

Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). En tercihen, konak içine plazmid uygulanması elektroporasyon vasıtasıyla yapılır. Transforme edilmiş hücreler, hafif zincirlerin ve ağır zincirlerin üretilmesi için uygun olan koşullar altında büyütülür ve ağır ve/veya hafif zincir protein sentezi için analiz edilir. Emsal analiz teknikleri, enzime bağlı bağışıklık analizini (ELISA), radyoimmünoanalizi (RIA) veya flüoresans-aktif edilmiş hücre ayırıcı analizi (FACS), immünohistokimyası ve benzerlerini içerir.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, "transformasyon" terimi, DNA'nın bir alıcı konak hücre içine uygulanmasını, bunun genotipi değiştirdiğini ve sonuç olarak alıcı hücrede bir değişim ile sonuçlandığını, ifade etmek için geniş bir anlamda kullanılmalıdır.

15

Bu aynı hatlar boyunca, "konak hücreler", rekombinant DNA teknikleri kullanılarak yapılan ve en az bir heterolog geni şifreleyen vektörler ile transforme edilmiş hücreleri ifade eder. Polipeptitlerin rekombinant konaklardan izolasyonu için proseslerin açıklamalarında, "hücre" ve "hücre kültürü" terimleri, bu açık bir şekilde aksini ifade etmedikçe, polipeptidin kaynağını göstermek için birbirleri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır. Bir başka ifadeyle, polipeptidin "hücrelerden" geri-kazanılması, tam hücrelerin aşağı çökecek şekilde döndürülmesinden veya hem vasatı hem de süspanse edilmiş hücreleri içeren hücre kültüründen geri-kazanılma anlamına gelebilir.

20

25

30

35

Protein ekspresyonu için kullanılan konak hücre hattı en tercihen, memeli orijinlidir; teknikte uzmanlığı olan kişilerin burada eksprese edilecek olan arzu edilen gen ürünü için en uygun olan özel konak hücreyi tercihli bir şekilde belirleme yetisine sahip olduğuna inanılır. Emsal konak hücre hatları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, DG44'ü ve

DUXB11'i (Çin Hamsterı Over hatları, DHFR eksi), HELA'yı (insan servikal karsinomu), CVI'yı (maymun böbrek hattı), COS'u (CVI'nın SV40 T antijeni taşıyan bir türevi), R1610'u (Çin hamsterı fibroblastı) BALBC/3T3'ü (fare fibroblastı), HAK
5 (hamster böbrek hattı), SP2/O'yı (fare miyelomu), P3x63-Ag3.653'ü (fare miyelomu), BFA-1c1BPT'yi (bovin endotelial hücreleri), RAJI'yı (insan lenfosit) ve 293'ü (insan böbreği), içerir. CHO hücreleri özel olarak tercih edilir. Konak hücre hatlarına tipik olarak, ticari kaynaklardan,
10 Amerikan Doku Kültürü Koleksiyonu'ndan veya yayımlanmış literatürden erişilebilir.

Buluşun polipeptitlerini şifreleyen genler ayrıca, memeli-olmayan hücrelerde, örneğin, bakterilerde veya maya veya bitki
15 hücrelerinde, de eksprese edilebilir. Bu açıdan, çeşitli tek-hücreli memeli-olmayan mikroorganizmaların, örneğin, bakterilerin, yani, kültürlerde veya fermentasyonda büyütülebilenlerin, transforme edilebileceği anlaşılabilecektir. Transformasyona duyarlı olan bakteriler, *enterobacteriaceae*,
20 örneğin *Escherichia coli* veya *Salmonella* suşlarını; *Bacillaceae*, örneğin, *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* ve *Haemophilus influenzae*, üyelerini içerir. Bakteriler içinde eksprese edildiğinde, ilaveten polipeptitlerin tipik olarak inklüzyon cisimciklerinin parçası
25 haline geldiği de anlaşılabilecektir. Polipeptitlerin izole edilmesi, saflaştırılması ve akabinde fonksiyonel moleküller halinde birleştirilmesi gerekir.

Prokaryotlara ek olarak, ökaryotik mikroplar da
30 kullanılabilir. Çok sayıda başka suşun yaygın bir şekilde erişilebilir olmasına rağmen, *Saccharomyces cerevisiae* veya yaygın ekmek mayası ökaryotik mikroorganizmalar arasında en yaygın şekilde kullanılır. *Saccharomyces* içinde ekspresyon için, örneğin, YRp7 plazmidi (Stinchcomb et al., Nature,
35 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper

et al., Gene, 10:157 (1980)) yaygın bir şekilde kullanılır. Bu plazmid, triptofan içinde büyüme yetisinden yoksun olan mayanın bir mutant suşu için bir seleksiyon belirteci sağlayan TRP1 genini halihazırda içerir, örneğin, ATCC No. 44076 veya PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). Maya konak hücresi genomunun bir karakteristiği olarak trpI lezyonunun varlığı, triptofan yokluğunda büyüme ile transformasyonu saptamak için etkili bir ortam sağlar. Diğer maya konakları, örneğin, *Pichia*, da kullanılabilir. Ekspresyon kontrol dizilerine (örneğin, promotörlere), bir replikasyon orijinine, sonlandırma dizilerine ve arzu edildiği üzere benzerlerine sahip olan maya ekspresyon vektörleri. Tipik promotörler, 3-fosfogliserat kinaz ve başka glikolitik enzimler içerir. İndüklenebilen maya promotörleri, diğerleri arasında, alkol dehidrojenazdan, izositokrom C'den ve metanolden, maltozdan ve galaktozdan yararlanmadan sorumlu olan enzimlerden promotörler, içerir.

Alternatif olarak, polipeptit-kodlayan nükleotid dizileri, bir transgenik hayvanın genomu içine uygulama ve transgenik hayvanın sütünde müteakip ekspresyon için transgenlere katılabilir (bakınız, örneğin, Deboer et al., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489 ve Meade et al., US 5,849,992). Uygun transgenler, bir mamari bezi spesifik genden, örneğin, kaseinden veya beta laktoglobülinden, bir promotör ve hızlandırıcı ile operatif bağlantı halinde polipeptitler için kodlama dizileri içerir.

İn vitro üretim, arzu edilen polipeptitlerin büyük miktarlarını vermesi için ölçek-büyütmeye olanak sağlar. Doku kültürü koşulları altında büyük-ölçekte memeli hücre kültürasyonu için teknikler teknikte bilinir ve örneğin, bir hava-basma reaktörü içinde veya bir sürekli karıştırıcılı reaktör içinde, homojen süspansiyon kültürünü veya örneğin, içi boş lifler, mikro-kapsüller içinde, agaroz mikro-bilyeler

veya seramik kartuşlar üzerinde, immobilize edilmiş veya kısıtlanmış hücre kültürünü içerir. Gerektiğinde ve/veya arzu edildiğinde, polipeptitlerin çözeltileri, *örneğin*, bir sentetik menteşe bölgesi polipeptidinin tercihli biyosentezinden sonra veya burada tarif edilen HIC kromatografi adımı öncesinde veya sırasında, geleneksel kromatografi yöntemleri, *örneğin*, jel filtrasyonu, iyon-değişim kromatografisi, DEAE-selüloz üzerinde kromatografi ve/veya (immüno-)afinite kromatografisi, ile saflaştırılabilir. Bir afinite etiket dizisi (*örneğin*, bir His(6) etiketi) opsiyonel olarak, downstream saflaştırmayı kolaylaştırmak için polipeptit dizisine tutturulabilir veya dahil edilebilir.

15 Teknikte uzmanlığı olan kişiler buluş ile bağlantılı şekilde kullanım için daha küçük peptitleri kolaylıkla sentezleyebilir. Sentetik peptitler hazırlamak için standart prosedürler teknikte iyi bilinir. Peptitler Merrifield'in katı faz peptit sentezi (SPPS) yöntemi (J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1964)) kullanılarak veya teknikte iyi bilinen standart çözelti yöntemleri kullanılarak (bakınız, *örneğin*, Bodanzsky, M., Principles of Peptide Synthesis 2nd revised ed. (Springer-Verlag, 1988 ve 1993)) sentezlenebilir. Alternatif olarak, teknikte iyi bilinen eş-zamanlı çok sayıda peptit sentezi (SMPS) teknikleri kullanılabilir. Merrifield yöntemi ile hazırlanan peptitler, bir otomatikleştirilmiş peptit sentezleyici, *örneğin*, Applied Biosystems 431 A-01 Peptide Synthesizer (Mountain View, Calif.), kullanılarak veya Houghten, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 82:5131 (1985) tarafından 25 tarif edilen manuel peptit sentezi tekniği kullanılarak sentezlenebilir. Peptitler, aktif grupları, *örneğin*, bir t-bütildikarbonat (t-BOC) grubu veya bir florenilmetoksi karbonil (FMOC) grubu, kullanılarak gerektiği şekilde korunan amino asitler veya amino asit analogları kullanılarak 30 sentezlenebilir veya teknikte bilinen yöntemler kullanılarak

sentezlenebilir. Katı faz yöntemi kullanılarak sentezlenen peptitler, tümü piyasada satılan 4-metilbenzhidrilamin (MBHA), 4-(oksimetil)-fenilasetamidometil ve 4-(hidroksimetil)fenoksimetil-kopoli(stiren-%1 divinilbenzen) içeren reçinelere (Wang reçinesine) veya De Grado ve Kaiser, J. Org. Chem. 47:3258 (1982) tarafından tarif edildiği üzere sentezlenebilen p-nitrobenzofenon oksim polimere (oksim reçinesine) tutturulabilir.

10 VII. Bağlama Moleküllerinin Saflaştırılması

Eksprese edildiğinde, buluşun polipeptitleri, *örneğin*, amonyum sülfat presipitasyonunu, afinite kolon kromatografisini, HPLC saflaştırmasını, jel elektroforezini ve benzerlerini, içeren, teknikteki standart prosedürlere göre saflaştırılabilir (bakınız genel olarak, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982))). Bir yeni sentezlenmiş peptit ayrıca, bir yöntem, *örneğin*, ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) veya peptidin boyutuna veya yüküne dayanan diğer ayırma yöntemleri kullanılarak da saflaştırılabilir. Dahası, saflaştırılmış peptit, bu ve diğer iyi bilinen yöntemler, *örneğin*, amino asit analizi ve kütle spektrometrisi, kullanılarak karakterize edilebilir.

25 Farmasötik kullanımlar için, en az yaklaşık %90 ila 95 homojenliği olan büyük ölçüde saf proteinler tercih edilir ve %98 ila 99 veya daha yüksek olan homojenlik en çok tercih edilir.

30 VIII. Uygulama Yöntemleri

Buluşun polipeptitlerini hazırlamanın ve bir süjeye uygulamanın yöntemleri teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinir veya kolaylıkla belirlenir.

Bir süjeye uygulama için bileşimler, buluşun bir bağlama molekülünü şifreleyen bir nükleotid dizisi içeren nükleik asit moleküllerini (gen terapisi uygulamaları için) aynı zamanda polipeptit moleküllerini içerir.

5

Uygulama yöntemleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, intradermal, intramüsküler, intraperitoneal, intravenöz, subkütan, intranazal, epidural ve oral yolları, içerir. Konjugatlar, herhangi bir uygun yol ile, örneğin, infüzyon veya bolus enjeksiyon ile, epitelyal veya mukokütanöz astarlar (örneğin, oral mukoza, rektal ve intestinal mukoza, vb.) yoluyla emilim ile uygulanabilir ve diğer farmakolojik olarak aktif ajanlar ile birlikte uygulanabilir. Uygulama sistemik veya lokal olabilir.

15

Belirli durumlarda, buluşun farmasötik bileşimlerini intraventriküler ve intratekal enjeksiyonu içeren, herhangi bir uygun yol ile santral sinir sistemine doğrudan uygulamak arzu edilebilir; intraventriküler enjeksiyon, örneğin, bir rezervuara, örneğin, bir Ommaya rezervuarına, tutturulmuş, bir intraventriküler kateter ile kolaylaştırılabilir.

20

Pulmoner veya nazal uygulama ayrıca, örneğin, bir solunum cihazı veya nebulizör ve bir aerosolize etme ajanı ile formülasyon kullanımı ile, de kullanılabilir.

25

Bir başka uygulamada, konjugatlar, bir kontrollü salım sistemi içinde aktarılabilir. Bir uygulamada, bir pompa kullanılabilir (bakınız, Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgety* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). Daha başka bir uygulamada, bir kontrollü salım sistemi, terapötik hedefe, yani, beyne, yakın yerleştirilebilir, böylece sistemik dozun yalnızca bir fraksiyonuna gerek duyulur (bakınız, örneğin,

30

Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Diğer kontrollü salım sistemleri, Langer (Science 249:1527-1533 (1990)) tarafından derlemede tartışılır.

Süje tercihen, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, hayvanları, örneğin, inekleri, domuzları, atları, tavukları, kedileri, köpekleri, vb., içeren bir hayvandır ve tercihen bir memelidir ve en tercihen insandır.

Genel olarak, enjeksiyon için uygun bir farmasötik bileşim bir tampon (örneğin, asetat, fosfat veya sitrat tamponu), bir sürfaktan (örneğin, Polisorbat), opsiyonel olarak bir stabilazör ajan (örneğin, insan albümini), vb., içerebilir. Bununla birlikte, burada öğretiler ile uyumlu olan diğer yöntemlerde, polipeptitler advers hücrel popülasyon yerine doğrudan aktarılabilir, böylece hastalıklı dokunun terapötik ajana maruziyeti arttırılabilir.

20

Parenteral uygulama için preparasyonlar, steril sulu veya sulu-olmayan çözeltileri, süspansiyonları ve emülsiyonları içerir. Sulu-olmayan çözücülerin örnekleri, propilen glikoldür, polietilen glikoldür, bitkisel sıvı yağlardır, örneğin, zeytinyağıdır ve enjektabl organik esterlerdir, örneğin, etil oleattır. Sulu taşıyıcılar, salini ve tamponlanmış vasatları içeren, suyu, alkolik/sulu çözeltileri, emülsiyonları veya süspansiyonları içerir. Söz konusu buluşta, farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, 0,01-0,1M ve tercihen 0,05 M fosfat tamponu veya %0,8 salin, içerir. Diğer yaygın parenteral vehiküller, sodyum fosfat çözeltilerini, Ringer dekstrozunu, dekstrozu ve sodyum klorürü, laktatlanmış Ringer'i veya fikse edilmiş sıvı yağları içerir. İntravenöz vehiküller, sıvı ve besinsel tazeleyicileri, elektrolit tazeleyicilerini, örneğin,

35

Ringer dekstrozu temelli olanları ve benzerlerini içerir. Koruyucular ve başka katkı maddeleri, örneğin, mesela, antimikrobiyaller, antioksidanlar, şelatlama ajanları ve inert gazlar ve benzerleri, de bulunabilir.

5

Daha özel olarak, enjektabl kullanım için uygun farmasötik bileşimler, (suda çözünebilir olduğunda) steril sulu çözeltileri veya dispersiyonları ve steril enjektabl çözeltilerin veya dispersiyonların ekstemporane preparasyonu için steril tozları içerir. Bu tarz durumlarda, bileşimin steril olması gerekir ve bileşim kolay enjekte edilebilirliğin gerçekleşeceği derecede sıvı olmalıdır. Bu, üretim ve saklama koşulları altında kararlı olmalıdır ve tercihen mikroorganizmaların, örneğin, bakterilerin ve fungusların, kotanime etme etkisine karşı korunacaktır. Taşıyıcı, örneğin, suyu, etanolü, poliolü (örneğin, gliserolü, propilen glikolü ve sıvı polietilen glikolü ve benzerlerini), içeren bir çözücü veya dispersiyon vasatı ve bunların uygun karışımları olabilir. Uygun akışkanlık, örneğin, bir kaplama, örneğin, lesitin, kullanımı ile, dispersiyon durumunda gerekli olan parçacık boyutunun idamesi ile ve sürfaktanların kullanımı ile, idame ettirilebilir.

Mikroorganizmaların etkisinin önlenmesi, çeşitli antibakteriyel ve antifungal ajanlar, örneğin, parabenler, klorobütanol, fenol, askorbik asit, timerosal ve benzerleri, ile başarılabilir. Çoğu durumda, bileşimin izotonik ajanlar, örneğin, şekerler, polialkoller, örneğin, mannitol, sorbitol veya sodyum klorür, içermesi tercih edilebilir olacaktır. Enjektabl bileşimlerin uzatılmış emilimi, bileşime emilimi geciktiren bir ajanı, örneğin, alüminyum monostearatı ve jelatini, dahil etme ile gerçekleştirilebilir.

Herhangi bir durumda, steril enjektabl çözeltiler bir aktif bileşimi (örneğin, kendi başına veya diğer aktif ajanlar ile

kombinasyon halinde bir polipeptidi) burada listelenen içerik maddelerinin biri veya bir kombinasyonu ile uygun bir çözücü içinde gerekli olan miktarda katma, gerektiği üzere, akabinde filtrelenmiş sterilizasyon, ile hazırlanabilir. Genel olarak, 5 dispersiyonlar aktif bileşiği bir bazik dispersiyon vasatı ve yukarıda listelenenlerden gerekli olan diğer içerik maddelerini içeren bir steril vehiküle katma ile hazırlanır. Steril enjektabl çözeltilerin preparasyonu için steril tozlar durumunda, preparasyonun tercih edilen yöntemleri, bir etken 10 maddenin artı bunun bir önceden steril-filtreden geçirilmiş çözeltisinden herhangi bir ilave arzu edilen içerik maddesinin bir tozunu üreten, vakum ile kurutmadır ve dondurarak-kurutmadır. Enjeksiyonlar için preparasyonlar teknikte iyi bilinen yöntemlere göre aseptik koşullar altında işlenir, 15 kaplar, örneğin, ampuller, paketler, şişeler, enjektörler veya viyaller, içine doldurulur ve sızdırmaz hale getirilir. İlaveten, preparasyonlar, tercihen ilgili bileşimlerin otoimmün veya neoplastik bozuklarından muzdarip olan veya otoimmün veya neoplastik bozuklarına yatkın olan bir süjeyi 20 tedavi etmek için yararlı olduğunu gösteren etiketlere veya kullanma talimatına sahip olacak olan bir kit formunda ambalajlanabilir ve satılabilir.

Mevcut buluşun bileşimlerinin, rahatsızlıkların tedavisi için, 25 etkili dozları uygulama araçlarını, hedef yeri, hastanın fizyolojik durumunu, hastanın insan veya bir hayvan olmasını, uygulanan diğer ilaçları ve tedavinin profilaktik veya terapötik olmasını içeren çok sayıda farklı faktöre bağlı olarak çeşitlilik gösterebilir. Genel olarak, hasta bir 30 insandır, ancak transgenik memelileri içeren insan-olmayan memeliler de tedavi edilebilir.

Tedavi dozajları, güvenliği ve etkinliği optimize etmek için teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinen rutin 35 yöntemler kullanılarak titre edilebilir. Bir uygulamada,

buluşun bir polipeptidi, hastalara önceden uygulanmış olan, ancak bir geleneksel bağlayıcı peptit yerine buluşun bir bağlayıcı peptidini içermesi için modifiye edilmiş olan bir polipeptittir. Bu tarz durumlarda, polipeptidin uygulanan dozağı, önceden güvenli ve etkili olduğu bulunan, yani, bakım standardı, ile uyumlu olacaktır.

Buluşun polipeptitleri, çok sayıda çok sayıda defada uygulanabilir. Tek dozajlar arasındaki aralıklar, haftalık, aylık veya yıllık olabilir. Aralıklar ayrıca, hastada polipeptidin, polipeptit hedefinin veya antijenin kan düzeylerini ölçme ile gösterildiğı üzere düzensiz de olabilir. Bazı yöntemlerde, dozaj bir özel *in vivo* konsantrasyonu başarmak için uygulanabilir. Alternatif olarak, burada olgunun daha az sık uygulamaya gerek duyduğu, bir sürdürülmüş salımlı formülasyon olarak uygulanabilir. Dozaj ve sıklık, hastada polipeptidin yarı-ömrüne bağılı olarak çeşitlilik gösterir.

Uygulamanın dozağı ve sıklığı, tedavinin profilaktik veya terapötik olmasına bağılı olarak çeşitlilik gösterebilir. Profilaktik uygulamalarda, buluşun polipeptitlerini veya bunların bir kokteylini içeren bileşimler hastanın direncini güçlendirmek için halihazırda hastalık halinde olmayan bir hastaya uygulanır. Bu tarz bir miktar, bir "profilaktik etkili doz" olarak tanımlanır. Bir görece düşük dozaj, uzun bir zaman periyodu boyunca görece sık-olmayan aralıklarla uygulanabilir. Bazı hastalar, yaşamlarının kalanı boyunca tedaviyi almaya devam eder.

Terapötik uygulamalarda, bir görece kısa aralıklarla bir görece yüksek dozaj uygulanabilir, bazen hastalığın progresyonu azaltılana veya sonlandırılana kadar ve tercihen hasta hastalığın semptomlarının parsiyel veya tam sağaltılmasını gösterene kadar gerekli olabilir.

İlaveten, mevcut buluşun moleküllerinin (örneğin, bir birleştirilmiş terapötik rejim sağlamak için) bir ajan veya ajanlar ile bağlantılı olarak veya kombinasyon halinde kullanılabileceği ilaveten anlaşılabilecektir. Buluşun bir molekülünün bunlarla birleştirilebileceği emsal ajanlar, tedavi edilmekte olan özel bir bozukluk için güncel bakım standardını temsil eden ajanları içerir. Bu tarz ajanlar, doğada kimyasal veya biyolojik olabilir. "Biyolojik" veya "biyolojik ajan" terimi, canlı organizmalardan yapılan herhangi bir farmasötik olarak aktif ajanı ve/veya bunların bir terapötik olarak kullanım için amaçlanan ürünlerini ifade eder.

Buluşun polipeptitleri opsiyonel olarak, tedaviye (örneğin, profilaktik veya terapötik) ihtiyacı olan bozukluğu veya rahatsızlığı tedavi etmede etkili olan diğer ajanlar ile kombinasyon halinde uygulanabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, buluşun polipeptitlerinin bir adjuvan terapi ile bağlantılı olarak veya kombinasyon halinde uygulanması, terapinin ve açıklanan polipeptitlerin sıralı, simultane, eş-süreli, eş-zamanlı, birlikte veya aynı zamanda uygulanması veya tatbiki anlamına gelir. Teknikte uzmanlığı olan kişiler, birleştirilmiş terapötik rejimin çeşitli bileşenlerinin uygulanmasının veya tatbikinin, tedavinin genel etkililiğini güçlendirmek için zamanlanabileceğini anlayacaktır. Örneğin, kemoterapötik veya biyolojik ajanlar, söz konusu bağlama molekülleri ile bağlantılı bir şekilde tedavinin standart, iyi bilinen süreçlerinde uygulanabilir. Uzmanlığı olan bir kişi (örneğin, bir hekim), seçilen yardımcı terapiye ve mevcut spesifikasyonun öğretilerine göre gereksiz deneyler olmadan etkili birleştirilmiş terapötik rejimleri kolaylıkla ayırt edebilecektir.

Bir uygulamada, bir polipeptit bir nükleik asit molekülü olarak uygulama ile bir hastada üretilebilir. Nükleik asit molekülleri, vektör, plazmid, lipozom, DNA enjeksiyonu, elektroporasyon, gen tabancası, intravenöz olarak enjeksiyon veya hepatik arter infüzyonu vasıtasıyla olanları içeren, teknikte bilinen teknikler kullanılarak uygulanabilir. Gen terapisi uygulamalarında kullanım için vektörler teknikte bilinir.

- 10 Mevcut buluşun polipeptitleri ile kombinasyon halinde kullanılacak olan ajanın miktarı, süjeden süjeye çeşitlilik gösterebilir veya teknikte bilinene göre uygulanabilir. Bakınız, örneğin, Bruce A Chabner et al., Antineoplastic Agents, in GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 ((Joel G. Hardman et al., eds., 9th ed. 15 1996). Bir başka uygulamada, bu tarz bir ajanın bakım standardı ile tutarlı olan bir miktarı uygulanır.

- Önceden tartışıldığı üzere, mevcut buluşun polipeptitleri, 20 memeli bozukluklarının *in vivo* tedavi için bir farmasötik olarak etkili miktarda uygulanabilir. Bu açıdan, buluşun molekülünün uygulamayı kolaylaştırmak ve aktif ajanın kararlılığını teşvik etmek için formüle edilebileceği anlaşılabilecektir. Tercihen, mevcut buluşa uygun şekilde 25 farmasötik bileşimler, bir farmasötik olarak kabul edilebilir, toksik-olmayan, steril taşıyıcı, örneğin, fizyolojik salin, toksik-olmayan tamponlar, koruyucular ve benzerlerini içerir. Mevcut başvurunun amaçları için, bir terapötik ajana konjuge edilmiş veya konjuge edilmemiş, buluşun bir polipeptidinin bir 30 farmasötik olarak etkili miktarı, bir antijeni etkili bağlama sağlamak için ve bir yarar sağlamak için, örneğin, bir hastalığın veya bozukluğun semptomlarını sağıaltmak için veya bir maddeyi veya bir hücreyi saptamak için yeterli olan bir miktar anlamına geldiği kabul edilmelidir. Tümör hücreleri 35 durumunda, polipeptit tercihen, neoplastik veya immünoreaktif

hücreler üzerinde seçilmiş immünoreaktif antijenler ile etkileşime girebilecektir ve bu hücrelerin ölümünde bir artış sağlayacaktır. Elbette, mevcut buluşun farmasötik bileşimleri, polipeptidin bir farmasötik olarak etkili miktarını sağlamak için tekli veya çoklu dozlar halinde uygulanabilir.

Mevcut açıklamanın kapsamına uygun olarak, buluşun molekülü bir terapötik veya profilaktik etki üretmek için yeterli olan bir miktarda tedavinin yukarıda-bahsedilen yöntemlerine uygun şekilde bir insana veya başka hayvana uygulanabilir.

Uygulama modu ve dozaj formları elbette, bileşiklerin verilen tedavi uygulaması için arzu edilebilir ve etkili olan terapötik miktarlarını etkileyecektir. Bir terapötik olarak etkili miktar, hastalığın başlamasını önlemek, geciktirmek veya şiddetini azaltmak için gerekli olan miktardır veya bir devam eden hastalığı durdurmak veya azaltmak için gerekli olan bir miktardır. Bu miktarın faktörlere, örneğin, alıcının ağırlığına ve sağlığına, transforme edilmekte olan hücrelerin tipine, mevcut bileşimlerin uygulama moduna ve tedavi edilmekte olan tıbbi bozukluğun tipine, bağlı olarak çeşitlilik göstereceği teknikte uzmanlığı olan bir kişi için halihazırda aşikar olacaktır.

Buluş ayrıca, buluşun farmasötik bileşimlerinin içerik maddelerinin biri veya birden fazlası ile doldurulmuş bir veya birden fazla kap içeren bir farmasötik paket veya kit de sağlar. Farmasötiklerin veya biyolojik ürünlerin imalatını, kullanımını veya satışını düzenleyen bir devlet dairesi tarafından reçete edilmiş formda, ajans tarafından insan uygulaması için imalat, kullanım veya satış onayını yansıtan, bir bildiri bu tarz kap (kaplar) ile opsiyonel olarak ilişkilendirilebilir.

Bu buluş ilaveten, sınırlayıcı olarak anlam çıkarılmaması gereken aşağıdaki örnekleri ile açıklanır.

Örnekler

5

FC5 moleküllerinin ekspresyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu: FC5, *E. coli*'de eksprese edilmiştir ve çözünebilen proteini periplazmik boşluktan salmak için ozmotik şok kullanılarak saflaştırılmıştır. Çözünebilen His etiketli FC5 akabinde, bir nikel kolon üzerinde lizattan fraktojel SE üzerinde katyon değişimi ile yakalanmıştır, bunu superdex 200 üzerinde jel filtrasyonu izlemiştir. Kamelid Vhh, SDS-PAGE ile karakterize edilmiştir (Şekil 2a-c). FC5-Fc, Fc-FC5 ve FC5-scrum-Fc önceden tarif edilen yöntemlere göre DG44 CHO hücre hatlarında eksprese edilmiştir. Arzu edilen hFc'yi içeren proteinler, pH'ı 7,0'a ayarlama ve proteini önceden dengelenmiş bir 5ml HiTrap rProteinA FF kolonu (GE Healthcare) üzerinde yakalama ile CHO hücresi fermantasyon vasatından (1L) saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış tüm proteinler, hiç jeneralize endotoksin bağımlı BBB açıklığı gerçekleşmeyeceğini garanti etmek için enjeksiyondan önce endotoksinin düzeyleri için karakterize edilmiştir. Sonuçlar Tablo I'de gösterilir. Nöroaktif peptitler, Dalargin, Galanin veya NPY, Uto et al., 1991 (Uto, I., Ishimatsu, T., Hirayama, H., Ueda, S., Tsuruta, J. ve Kambara, T. (1991) Journal of immunological methods 138(1), 87-94) kaynaklarında tarif edilen yöntemler kullanılarak bir süksinimidil-4-(N-maleimidometil)sikloheksan-1-karboksilat (SMCC) bifonksiyonel kimyasal bağlayıcı kullanılarak arzu edilen moleküle (FC5, FC5-Fc) bağlanmıştır. Bağlanacak olan her bir peptit C-ucu üzerinde bir sisteamid analoğu ile sentezlenmiştir, bu SMCC bifonksiyonel çapraz-bağlama kimyasını kullanarak peptidin serbest sistein vasıtasıyla protein üzerindeki lizin yan zincirlerini C-ucu çapraz-bağlamasına izin vermiştir. Çapraz-bağlamayı takiben, her bir etiketlenmiş molekül, çapraz-bağlama reaksiyonu

sırasında oluşturulan herhangi bir agregatı elimine etmek için S-200 preparatif jel filtrasyonu ile saflaştırılmıştır. Her bir FC5 alanına veya FC5-Fc alanlarına bağlanmış Dalargin, NPY veya Galanin peptitlerinin ortalama sayısı kütle spektrometiris ile belirlenmiştir. Tablo I, her bir FC5, FC5-Fc veya Fc-FC5 alanına bağlanmış peptitlerin ortalama sayısını gösterir.

FC5 içeren moleküllerin dolaşımdaki farmakokinetikleri: BBB endotelyumunun FC5 içeren antikorların her birine maruziyetinin farmakokinetiklerini anlamak için, moleküller sıçanlarda belirlenmiştir. Hayvanlar, bir insan Fc alanına N-ucundan (FC5-Fc) veya C-ucundan (Fc-FC5) kaynaştırılmış olan FC5 Vhh ile 3 mpk'da intraperitoneal olarak dozlanmıştır. FC5-Fc'nin veya Fc-FC5'in plazma içinde konsantrasyonları, ELISA ile çeşitli zaman noktalarında belirlenmiştir. Sonuçlar, her bir yapının beta-fazı yarı-ömürlerini belirlemek için analiz edilmiştir (Tablo II). Sonuçlar, Fc'nin geri-dönüşüm sağladığı iyi bilindiğinden ve daha büyük kütle böbrek filtrasyonunu önleyeceğinden, tek başına FC5 Vhh için olana kıyasla bir insan Fc'sine kaynaştırıldığında FC5-Fc'nin ve Fc-FC5'in yarı-ömürünün anlamlı olarak daha uzun olduğunu göstermiştir (Holt, L. J., Herring, C., Jespers, L. S., Woolven, B. P. ve Tomlinson, I. M. (2003) Trends in biotechnology 21(11), 484-490).

FC5 içeren moleküllerin in vitro taşınma hızı: Her bir FC5 içeren protein için in vivo BBB'yi geçen akı hızlarını modellemek için bir in vitro BBB endotelial hücre katmanı kullandık. İn vitro model, küçük moleküller ile geçirimsizlik için doğrulanmış bir tek-katmanlı analiz sisteminde ölümsüz hale getirilmiş erişkin sıçan beyni endotelial hücrelerinin (SV-ARBE) bir tek-katmanını kullanır (Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R. D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J. E., Raub, T. J., Stanimirovic,

D., Terasaki, T., Oberg, J. O. ve Osterberg, T. (2005) *Toxicol in vitro* 19(3), 299-334). İn vitro akı hızı belirlemeleri için yöntemler, (Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G. K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A. ve Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, ed. 2010, 383-401) kaynaklarında tarif edilenlere neredeyse özdeştir. İçeri-akı hızları, SV-ARBEC hücre katmanını geçen FC5, FC5-Fc ve Fc-FC5 için belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 3'te gösterildiği şekildedir.

10

FC5 moleküllerinin TMEM30A için bağlama afinitesi: Her bir molekülün bağlama afinitesi, taze izole edilmiş sıçan BBB endotelyal hücreleri, SV40 transforme edilmiş sıçan BBB endotelyal hücreleri (Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G. K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A. ve Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, ed. 2010, 383-401) ve önceden tanımlanmış hedef TMEM30A ile geçici bir şekilde transfekte edilmiş Hek293 hücreleri kullanılarak ayrı Flüoresan Akış Sitometrisi analizinde değerlendirilmiştir. Her bir hücre hattı için bağlama eğrileri, Şekil 4A-C'e gösterilir ve hesaplanan afinite değerleri Tablo III'tedir. Sonuçlar, FC5Fc'nin primer sıçan BBB endotelyal hücrelerini bağlamasının 11 nM olan bir afiniteye sahip olduğunu gösterirken, SV40 transforme edilmiş hücre hattını bağlama 75 nM olan bir EC50 değeri, yaklaşık 7 kat daha zayıf bağlama, ile sonuçlanır. Sıçan TMEM30A geçici bir şekilde transforme edilmiş Hek293 hücre-hattını bağlama 1700 nM civarında bir afinite ile sonuçlanırken, bu primer BBB endotelyal hücre hattını bağlamaya kıyasla neredeyse 170 kat daha zayıftır. Bu veriler, FC5-Fc'nin akış sitometrisi ile ölçüldüğünde tek başına FC5 Vhh ile karşılaştırıldığında görünür afinite kayda değer bir artışa sahip olduğunu gösterir, bu FC5-Fc'nin TMEM-30A eksprese eden hücreleri iki-dişli avidite ile bağladığını öne sürer.

35

Hayvan modellerinde etkinlik değerlendirmesi: FC5 Vhh alanı dimerizasyonunun molekülün RMT vasıtasıyla BBB'yi geçen bir moleküler yükü aktarmak için bir transpöster olarak işlev gösterme yetisi üzerinde etkiye sahip olacak olmasının neyi etkileyeceğini değerlendirmek için, bu moleküllerin aktivitesi hayvan modellerinde değerlendirilmiştir. Çok sayıda faktörün taşımının etkililiğini etkileyebileceğı bilinir, örneğın, bir anti-transferrin reseptörü antikorunun bir kaç kat bile olsa afinitesini düşürmenin molekülün etkili bir şekilde BBB trans- göçü gerçekleştirme yetisi üzerinde bir pozitif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Yu, Y. J., Zhang, Y., Kenrick, M., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., Atwal, J., Elliott, J. M., Prabhu, S., Watts, R. J. ve Dennis, M. S. Science translational medicine 3(84), 84ra44). Bu kavrama göre, FC5 Vhh'nin Fc dimerizasyonu üzerine anlamlı afinite güçlenmesinin FC5 Vhh'nin bir etkili BBB taşıma molekülü olarak işlev gösterme yetisini negatif bir şekilde etkilediğı tahmin edilecektir. Bundan dolayı, nöroaktif peptidin buna bağlanmış olduğu, her bir molekülün farklı bir FC5 valansına sahip olduğu, moleküllerin potensi bir *in vivo* modelde değerlendirilmiştir.

Hargreaves modeli, bir patide Freud adjuvanının enjeksiyonu ile indüklenmiş termal ağrıya arttırılmış duyarlılığı ölçer. Termal ağrı, bir altı amino asitlik peptit olan Dalargin'in beynin peri-akuaduktal kısmında eksprese edilen mu ağrı reseptörlerini bağlaması üzerine baskılanabilir. İntravenöz olarak enjekte edilmiş Dalargin, BBB'yi geçemez ve ağrı supresyonu ile sonuçlanmaz, bununla birlikte, ICV enjeksiyonu Dalargin'in mu reseptörlerine difüz etmesine ve mu reseptörlerini bloke etmesine, böylece ağrıyı bloke etmesine olanak sağlar. Böylelikle, intravenöz olarak enjekte edilmiş Dalargin'in, BBB'yi geçerek taşımaya ve ağrının supresyonuna olanak sağlamak için bir reseptör aracılı transpöster bağlanması gerekir. Dalargin'in FC5 içeren moleküller tarafından aracılık edilen BBB'yi geçerek taşınmasına

değerlendirmek için, Hargreaves hayvan modeli, Dalargin'e bağlanmış çeşitli FC5 Vhh moleküler formlarının potensini karşılaştırmak için kullanılmıştır. FC5-Dalargin için negatif kontrol molekülü, EG2-Dalargin'dir ve FC5-Fc-Dalargin için Fc-FC5-Dalargin'dir.

Pozitif ve negatif test maddelerinin karşılaştırılabilirliğini garanti etmek için FC5-Dal ve EG2-Dal, her bir Vhh'ye bağlanmış Dalargin peptitlerinin oranının karşılaştırılabilir olduğunu göstermek için kütle spektrometrisi ile karakterize edilmiştir (Tablo I).

Intravenöz (IV) enjeksiyondan önce, her bir molekül başlangıçta, tüm bağlanmış moleküllerin fonksiyonel olarak aktif olmasını ve ağrı supresyonunu indükleyebilmesini garanti etmek için bir pozitif kontrol olarak intraserebroventriküler (ICV) enjeksiyon ile test edilmiştir. Moleküller doğrudan beyin omurilik sıvısının içine enjekte edildiğinden ve periakuaduktal mu ağrı reseptörlerine difüz edebildiğinden ve periakuaduktal mu ağrı reseptörlerini bloke edebildiğinden, hem negatif kontrol hem de pozitif test moleküllerinin ICV enjeksiyon üzerine ağrıyı baskılaması beklenenecektir. ICV enjeksiyon ile değerlendirildiğinde, tüm olgularda, tek başına FC5-Dal, EG2-Dal, FC5-Fc-Dal, Fc-FC5-Dal veya Dalargin, Dalargin'in aktarılan miktarına göre benzer potens vermiştir. Sonra, her bir Dalargin etiketli molekül ve karşılık gelen Dalargin etiketli kontrol proteini, IV uygulama üzerine etkinlik için değerlendirilmiştir. Başlangıç olarak, kontrole (EG2-Dal) kıyasla FC5-Dal'ın etkinliği karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, tek başına morfin ile gözlenebilen supresyonun düzeyine benzer tam ağrı supresyonunun başarıldığını gösterir (Şekil 5a & b). Başlangıç ağrı supresyonunu gözlemlemeden önce gerekli olduğu üzere FC5-Dal'ın her bir doz için her bir kg için 7,5 mg'da (mpk) üç dozunu bildirmek ilginçtir. Buna ek olarak, hayvanlar her bir kg için 7,5 mg'da (mpk) benzer

şekilde üç kere dozlandıktan sonra bile, kontrol grubu ağrının supresyonunu göstermemiştir. Bu sonuçlar, FC5'in bir reseptör aracılı taşıyıcı olarak işlev gösterebildiğini, Dalargin'i BBB'yi geçerek beyin parankiması içine taşıyabildiğini ve Dalargin'in mu ağrı reseptörlerini bağlamasına ve bloke etmesine olanak sağlayabildiğini gösterirken ve konfirme ederken, kontrol EG2-Dalargin ağrı supresyonu göstermemiştir. Bu sonuçlar Tablo IV'te özetlenir.

10 Dimerize edilmiş FC5 formları, FC5-Fc ve Fc-FC5, BBB endotelyal hücreleri üzerinde TMEM30A için çok farklı bağlama afiniteleri göstermiştir (Tablo III). Hargreaves ağrı modelinde güçlendirilmiş afinitenin iyileştirilmiş potens ile korele olup olmadığını belirlemek için, hem FC5-Fc-dal hem de 15 Fc-FC5-dal ağrı supresyonu için değerlendirilmiştir. IV enjeksiyonu takiben, Fc-FC5-dal, etkinlik göstermemiş iken (Şekil 6a-d), FC5-Fc-dal (Şekil 7a & 7c) ağrı supresyonunda hayli etkilidir. Ek olarak, negatif kontrol Fc-Dal, *in vivo* etkinlik göstermemiştir (Şekil 7b & 7d). FC5-Fc, başlangıçta 20 0,5 mpk'da bir tek doz ile bile, ilk 0,5 sa'ten sonra %50'lik bir ortalama MPE ile, birinci saat içinde ağrıyı azaltmada etkinlik göstermiştir. FC5-dal'ın potensini FC5-Fc-dal ile karşılaştırma, 21 mpk'da bir tek FC5-dal dozunun 0,5 mpk'a FC5-Fc-Dal ile yaklaşık aynı düzeyde ağrı supresyonu verdiğini 25 göstermiştir. Enjekte edilmiş Dalargin'in molar oranına göre, FC5-Fc-Dal, Hargreaves modelinde ağrıyı baskılama yetisinde FC5-Dal ile karşılaştırıldığında yaklaşık 80 kat daha büyük olan bir potens gösterir. FC5-Fc-Dal'ın 2,5 mpk'daki bir ikinci dozu, olası maksimum ağrı supresyonunu vermesi için bir 30 hayvanda yeterli olmuştur. Hargreaves ağrı modelinde gözlenen FC5-Fc-Dal'ın, Fc-FC5-Dal'ın ve FC5-Dal'ın gözlenen güçlendirilmiş biyolojik aktivitesi, Tablo II'de özetlendiği üzere FC5-Fc'nin daha yüksek afinitesi ve daha yüksek etkinliği ile koreledir.

Buna ek olarak, ağrı supresyonu için benzer etkinlikler başka nöroaktif peptitler kullanılarak başarılabilir. Örneğin, FC5'e veya FC5-Fc'ye bağlanmış, yukarıda tarif edilene özdeş kimyası olan, bir 29 amino asitlik 3,2 kD'luk peptit olan Galanin, Hargreaves modelinde kronik ağrıyı baskılamıştır. Aksine, tek başına Fc'ye bağlanmış Galanin etkili ağrı rahatlatması sağlayamamıştır. Hem ICV pozitif kontrol hem de IV enjeksiyonları için sonuçlar Tablo VI'da özetlenir. Bağlı Galanin'in bunun soydaş reseptörleri GalR1'i ve GalR2'yi bağlama ve hem negatif kontrolde hem de test moleküllerinde ağrıyı baskılama aktivitesini doğrulamak için, tüm moleküller test edilmiştir ve bunların ICV -enjeksiyonundan sonra ağrıyı baskıladığı gösterilmiştir (Tablo VI). IV enjekte edildiğinde, yalnızca, FC5 içeren moleküllere, FC5'e veya FC5-Fc'ye, bağlanmış Galanin ağrıyı *in vivo* baskılayabilmiştir. FC5-Fc'ye kıyasla FC5'e bağlanmış Galanin'in Hargreaves hayvan modelinde ağrıyı azaltmak için gerekli olan dozlamında anlamlı bir farklılık vardır. 6 mpk olan bir tek dozdaki Galanin-FC5 (Tablo VI) %8'lik bir MPE ile sonuçlanırken, FC5-Fc-Gal'ın bir tek dozu %45'lik bir MPE ile sonuçlanmıştır.

Pentilentetrazolün (PTZ) intraperitoneal uygulanması, sıçanlarda nöbetleri indükler ve Epileptik nöbetlerin bir modeli olarak kullanılmaktadır (Chen, J.W.; Naylor, D.E.; Wasterlain, C.G. Advances in the pathophysiology of status epilepticus. Acta Neurol. Scand. Suppl., 2007, 186, 7-15.; Werner, F.M.; Coveñas, R. Neuropeptides involved in schizophrenia, Curr. Top. Neurochem., 2005, 4, 35-49.; Werner, F.M.; Coveñas, R. In: Focus on Neuropeptide Research, Coveñas, Mangas and Narváez, Eds.; Transworld Research Network: Trivandrum, 2007; pp. 299-339; Werner, F.M.; Coveñas, R. Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in major depression. Int. J. Neurosci., 2010, 120, 455-70). Nöroaktif peptitlerin, örneğin, Galanin'in ve Nöropeptit Y'nin, PTZ indüklü nöbetlerden koruma sağladığı bilinir (Mazarati 1998a;

Mazarati, A M., Hohmann, J. G., Bacon, A, Liu, H., Sankar, R., Steiner, R. A, Wynick, D. et al., Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2000, 20(16), 6276-81). Mazarati et al., (Mazarati A, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. J Neurosci 1998, 18:10070 -10077). Bu sonuçlar, Galanin'in sıçan hipokampusünden deplesyonunun kendi kendine devam eden epileptikus halinin gelişmesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, Galanin'in beynin hipokampal bölgesine enjeksiyonu nöbetleri baskılayabilir (Mazarati A, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. J Neurosci 1998, 18:10070 -10077; Mazarati AM, Halaszi E, Telegdy G Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxinkindled seizure syndrome in rats. Brain Res 1992, 589:164 -166). Bununla birlikte, intravenöz olarak verilen nöroaktif peptitler BBB'yi geçemez ve bunların küçük boyutundan dolayı kısa bir yarı-ömre sahiptir (Jain, Kamal ve Batra. Trends Biotechnol. Vol 25. ed.: 2007:307-16, Batra, Jain, Wittel, Chauhan ve Colcher. Curr Opin Biotechnol. Vol 13. ed.: 2002:603-8). Galanin'in PTZ modelindeki etkinliği hem FC5'e, tek alanlı antikora, hem de FC5-Fc'ye bağlanmış Galanin'i test etme ile değerlendirilmiştir. Her iki yapının da BBB taşımasını güçlendirmesinin beklenmesine rağmen, FC5-Fc yapısının burada, bunun varsayımsal hedefi TMEM30A'yı istekli bağlamasından dolayı arttırılmış pratik afiniteye sahip olduğu ve arttırılmış boyuttan ve Fc bağımlı geri-dönüşümden dolayı çok daha uzun bir yarı-ömre sahip olduğu gösterilmiştir.

PTZ indüklü nöbet modelinde, söz konusu ajan IV veya direkt hipokampal enjeksiyon ile enjekte edilir. Hipokampal enjeksiyon ajanı doğrudan etki yerine aktarır, bu Galanin'in bunun soydaş reseptörlerini bağlamasına ve nöbetin başlamasını önlemesine olanak sağlar. Buna ek olarak, her bir molekülün direkt hipokampal enjeksiyonu, her bir moleküle, Fc'ye, FC5'e veya FC5-Fc'ye, bağlanmış Galanin'in nöbet baskılayıcı aktiviteyi muhafaza ettiğini göstermek için bir pozitif kontrol görevi görür. Her bir molekülün uygulanan dozu, yakın 5 molar eş-değer Galanin dozları vermesi için çeşitlendirilmiştir. Pozitif kontrol çalışması için, erkek Wistar sıçanları (4-6 haftalık), aşağıdakilerin birinin bir intrahipokampal enjeksiyonunu almıştır: 5 µL'lik bir nihai hacimde valproik asit, Gal-Cya veya FC5-Gal, akabinde 15 dakika sonra, nöbetleri indüklemek için 50 mpk PTZ'nin bir IP enjeksiyonu.

FC5'e, FC5-Fc'ye veya Fc'ye bağlanmış Galanin'in BBB'yi geçmek için etkililiğini değerlendirmek amacıyla, bu moleküllerin her biri Şekil 7A'da ve 7B'de detaylandırıldığı üzere sistemik olarak enjekte edilmiştir. Sistemik çalışma için, sıçanlar Gal-Cya'nın veya FC5-Gal'ın (kuyruk veni yoluyla) 1, 2 veya 3 intravenöz enjeksiyonunu veya FC5-Fc-Gal'ın veya Fc-Gal'ın bir tek dozunu almıştır. Her bir olguda, IP'yi takiben, 50 mpk olan bir dozda PTZ enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulanmıştır ve sıçanların hareketleri 30 dakika boyunca kaydedilmiştir.

Kaydedilmiş tüm hareketler akabinde incelenmiştir ve nöbetlerin başlama zamanı ve nöbet süreci süresi aşağıdaki üç karakteristik davranışsal değişimin her biri için bir önyargısız araştırmacı tarafından ölçülmüştür: birinci miyoklonik hareketler (FMJ; kulak, baş ve omuz seğirmeleri ile karakterize edilir), birinci klonik nöbet (FCJ; minimal nöbetler, baş kaslarının ön-ayakların klonüsü, tüm vücudun

istemersiz hareketleri ve doğrultma refleksi ile zıplama hareketleri ile karakterize edilir) ve birinci tonik jeneralize ekstansiyon (TGE; doğrultma yetisinin kaybı, ön- ve arka-ayakların fleksiyonu veya ekstansiyonu ve tüm vücudun klonüsü ile karakterize edilir).

Tablo VIIa, her bir molekülün intrahipokampal enjeksiyonları için sonuçları gösterir. 50 mpk PTZ'nin IP enjeksiyonu, her bir nöbet tipinin, en az ciddi FMJ'den en ciddi nöbet formu jeneralize toniğe çok çabuk progresyon ile miyoklonik, klonik ve jeneralize toniğin, çabuk başlaması ile sonuçlanmıştır. PTZ indüklü nöbet başlamasını parsiyel olarak baskıladığı bilinen bir küçük molekül olan Valproik asit (Pollack G.M., Shen D.D. J Pharmacol Methods. (1985) Apr;13(2):135-46.), miyoklonik ve klonik nöbetlerin başlamasında gözlenen yaklaşık bir 100 saniyelik gecikme ile, üç nöbet tipinin tümünü anlamlı bir şekilde geciktirmiştir, ancak nöbet başlamasını tamamen önlememiştir. Tek başına veya FC5'e bağlanmış Galanin'in intrahipokampal enjeksiyonu, miyoklonik nöbetlerin anlamlı gecikmesi ve aha ciddi klonik ve jeneralize tonik nöbetlerin tam önlenmesi ile sonuçlanmıştır.

Her bir molekülün intravenöz dozlamı ile elde edilen sonuçlar, Tablo VIIb'de gösterilir. PTZ, her bir nöbet tipinin çabuk başlamasına yol açar ve 11,2 mpk IV dozlam Valproik asit miyoklonik ve klonik nöbetlerin başlamasını baskılar. İntravenöz Galanin ve Galanin-Fc, nöroaktif peptidin bir kısa ve uzun yarı-ömürlü versiyonu, nöbet başlamasının sırasıyla hiç gecikmemesi veya çok az gecikmesi ile sonuçlanmıştır. PTZ dozlamından 1 saat önce, 6 mpk'da dozlanan FC5-galanin miyoklonik nöbetin anlamlı gecikmesi ve klonik ve jeneralize klonik nöbetlerin tam supresyonu ile sonuçlanmıştır. PTZ dozlamından iki saat önce FC5-Fc-Galanin'in bir tek dozu da, miyoklonik nöbetin anlamlı bir gecikmesi ve klonik ve

jeneralize klonik nöbetlerin tam supresyonu ile sonuçlanmıştır.

Bu sonuçlardan bir kaç neticeye ulaşılabilir. FC5', Fc'ye veya
5 FC5-Fc'ye bağlanmış Galanin, Hargreaves modelinde ICV
dozlandığında gösterildiği üzere eş-değer aktiviteyi muhafaza
eder (Tablolar IV & V), buna ek olarak Tablo VIIa, PTZ nöbet
modelinde sıçanların hipokampusüne enjekte edildiğinde tek
başına Galanin'e bir molar temelde eş-değer aktivite
10 göstermiştir. Aksine, tek başına veya hFc molekülüne
tutturulmuş bir uzun ömürlü molekül olarak Galanin kan-beyin
bariyerini etkili bir şekilde geçmez ve PTZ indüklü nöbetleri
baskılar. Yalnızca, FC5-Galanin olarak veya FC5-Fc-Galanin
olarak, FC5'e tutturulduğunda, Galanin BBB'yi geçebilir ve PTZ
15 indüklü nöbetleri etkili bir şekilde geciktirebilir ve
baskılayabilir. FC5-Fc'ye bağlanmış Galanin bir molar dozlam
karşılaştırmasına göre nöbetlerin azalmasında tek başına FC5'e
bağlanmış Galanin'e kıyasla çok daha fazla etkilidir; spesifik
olarak, bu en az on altı kat daha güçlüdür. Buna ek olarak,
20 FC5-Fc Galanin, FC5-Galanin ile karşılaştırıldığında birinci
miyoklonik nöbetin başlaması için geçen sürede daha büyük bir
gecikmesi göstermiştir. Bu sonuçlar, FC5-Fc'nin iyileştirilmiş
yarı-ömrünün ve bunun hedefi için pratik afinite artışının,
Galanin'in BBB'yi geçerek aktarımını iyileştirdiğini ve FC5
25 Galanin'e kıyasla PTZ nöbet modelinde daha etkili nöbet
azalması ile sonuçlandığını gösterir.

Tablo I. Eksprese edilmiş ve saflaştırılmış moleküllerin
karakterizasyonu.

30

Molekül	FC5 ⁽¹⁾ (EAG2333)	FC5-	Fc-	Fc
plazmid		FC ⁽²⁾ (EAG2345)	FC5 ⁽²⁾ (EAG2304)	
Hesaplanan	15,375	78,725	78,924	51,896
Mwt				

Molekül	FC5 ⁽¹⁾ (EAG2333)	FC5-	Fc-	Fc
plazmid		FC ⁽²⁾ (EAG2345)	FC5 ⁽²⁾ (EAG2304)	
(moleküler				
ağırlık)				
(Dalton)				
Endotoksin	<1	<1	<1	<1
(EU/mg)				
LS Mwt	16,860	77,530	78,950	57,800
(moleküler				
ağırlık)				
(Dalton)				
Analitik				
SEC'de pikin				
alanının				
saflık %'si	99.7	98.9	95.0	99.7
Ort. bağlı				
Dalargin				
peptitleri⁽³⁾	1.5	1.5	1.5	1.0

(1) myc etiketi EQKLISEEDL, C-uçları (1202 mwt), C-terminal His etiketi 5H içerir.

(2) Fc alanları, insan IgG1'idir ve agli'dir (tüm Fc alanları, Fc N-glikosilasyonunu elimine etmek için hIgG dizisinde bir T299A nokta mutasyonu içerir)
hIgG

(3) FC5-Fc alanlarına kovalent olarak bağlanmış olan Dalargin'lerin ortalama sayısını belirlemek için MS ile değerlendirilmiştir.

Tablo II. Bir hFc'ye kaynaştırılmış FC5 alanlarının farmakokinetik yarı-ömür belirlemeleri.

	FC5-Fc	Fc-FC5	hIgG1
Analiz	Flüoresans ELISA	Flüoresans	Flüoresans ELISA

	FC5-Fc	Fc-FC5	hIgG1
formatı			
Beta-fazı	39,4	35,7	38,6
yarı ömür			
(sa)	43,5	48	

Yarı-ömür, sıçan serumundan insan Fc'sinin ELISA saptaması ile veya AL680 etiketli moleküller ile belirlenmiştir ve flüoresans serumlardan belirlenmiştir. Burada yarı-ömrün ELISA'ya kıyasla flüoresans ile belirlendiği moleküller arasında farklılık gözlenmemiştir. Moleküller 3 mpk'da intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

Tablo III. Hargreaves modelinde FC5-Dal'ın, FC5-Fc-Dal'ın ve Fc-FC5-Dal'ın bağlama afinitelerinin ve bağlı etkinliğinin, etkinliğin ve BBB endotelial hücrelerine afinitenin korelasyonunu gösteren, özeti.

Molekül	Afinite (nM)		
	FC5	FC5-Fc	Fc-FC5
Primer sıçan BBB EC	>2000	11	1700
SV-ARBEC		75	ND
Sıçan Aortik endotelial		1700	
Hargreaves modelinde FC5-Dal'a kıyasla potens katı	1	80	<0,1

Tablo IV. Tek başına veya FC5'e bağlanmış Dalargin ile Hargreaves modelinde kronik ağrı supresyonunun özeti

Molekül	ICV		IV	
	Doz (µg)	MPE %'si	Doz (mg/kg)	MPE %'si

Molekül	ICV		IV	
	Doz (µg)	MPE 'si	Doz (mg/kg)	MPE 'si
PBS	5	0 ± 0,8	800 (µL)	0 ± 0,6
Dalargin	2	35 ± 1	0,34 x 3 enj	0,3 ± 0,3
FC5	69,75	0 ± 2	7 x 3 enj	1,9 ± 0,3
EG2	69,75	0 ± 2	7 x 3 enj	0 ± 1,3
A20.1			7,84 x 3 enj	2,2 ± 0,3
FC5- Dalargin	74,4	47 ± 2	7 x 3 enj	41 ± 0,5
EG2- Dalargin	74,4	31 ± 1	7 x 3 enj	2,0 ± 0
A20.1- Dalargin			2,49 x 3 enj	3,1 ± 0
FC5 + Dalargin			(0,65 µg + 7 mg/Kg) x 3 enj	0 ± 1,6

Kronik ağrı supresyonu, maksimum olası etkinin yüzdesi (MPE %'si) olarak ifade edilir.

Değer, ölçüm zaman çerçevesi boyunca kontralateral kontrol patisine kıyasla ağrı baskılanmış hayvan için eğri altında kalan alana göredir. ICV veya IV enjekte edilmiş moleküller etkinliği, Hargreaves modelinde maksimum olası etkinin bir yüzdesi (MPE %'si) olarak gösterilir. A20.1 ve EG2, FC5 ile ilgisi olmayan, BBB endotelial hücreleri için görünür afiniteye sahip olmayan, tek alanları antikorlardır. İntravenöz (IV) dozlam değerleri için mpk cinsinden doz, her

bir enjeksiyon için miktar akabinde enjeksiyonların sayısı olarak gösterilir.

5 Tablo V. Fc'ye bağlanmış Dalargin ve FC5-Fc'ye bağlanmış Dalargin ile Hargreaves modelinde kronik ağrı supresyonunun özeti.

molekül	ICV		IV	
	Doz (µg)	MPE %'si	Doz (mg/kg)	MPE %'si
FC5-Fc-Dal	11,5	43 ± 3	6	46 ± 2
Fc Dal	9,3	55 ± 2	6	5 ± 2
FC5-Fc + FC5-Fc-Dal			2,5 + 6	32 ± 7

10 İkinci deneyde, bağlanmamış FC5-Fc'nin bir IV dozu gösterilen konsantrasyonlarda FC5-Fc-Dal eklenmesinden önce IV enjekte edilmiştir.

Tablo VI. Fc'ye, FC5-Fc'ye veya FC5'e bağlanmış Galanın ile Hargreaves modelinde kronik ağrı supresyonu.

molekül	ICV		IV	
	Doz (µg)	MPE %'si	(mg/kg)	MPE %'si
Galanin	2	54 ± 1	1	0 ± 1
Fc-Gal	11.2	49 ± 1	6	2 ± 1
FC5-Gal	10.87	49 ± 2	6	8 ± 1
FC5-Fc-Gal	11.4	49 ± 2	6	45 ± 2

15 FC5-Gal için çoklu dozlar durumunda, dozlar 1 saat aralıklarla uygulanmıştır. Üçüncü deneyde, bağlanmamış FC5-Fc'nin bir IV dozu gösterilen konsantrasyonlarda FC5-Fc-Dal eklenmesinden önce IV enjekte edilmiştir.

Tablo VII: Sıçan PTZ modelinde hipokampal enjeksiyon (a) veya IV enjeksiyon (b) kullanılarak nöbet başlaması için geçen sürenin karşılaştırması

a) Hipokampal enjeksiyon.

Nöbet başlaması için geçen saniye cinsinden süre				
molekül	Doz (µg)	Miyoklonik (s)	Klonik	Tonik Jeneralize
yalnızca PTZ	50 mg/kg	0 ± 2	0 ± 6	0 ± 0.5
Valproik asit	11.2	100 ± 6	100 ± 9	2 ± 1
Galanin	1,82	104 ± 0	önlendi	önlendi
FC5- Galanin	11,9	82 ± 4	önlendi	önlendi

b) İntravenöz enjeksiyon.

Nöbet başlaması için geçen saniye cinsinden süre				
molekül	Doz (mg/kg)	Miyoklonik (s)	Klonik	Tonik Jeneralize
yalnızca PTZ	50 mg/kg	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 0.5
Valproik asit	11,2	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 0
Galanin	1 x 2 enj	0.5 ± 5	0 ± 2	2 ± 4
Fc-Gal	6	2 ± 1	18 ± 2	17 ± 2
FC5- Galanin	6 x 3 enj	47 ± 3	önlendi	önlendi

a) Hipokampal
enjeksiyon.

**Nöbet başlaması için geçen saniye
cinsinden süre**

molekül	Doz (µg)	Miyoklonik (s)	Klonik	Tonik Jeneralize
FC5-Fc- Galanin	6	101 ± 28	önlendi	önlendi

Sıçanların PTZ ile IP dozlamasını takiben, her bir nöbet tipinin başlaması için geçen süre aşağıda gösterilmiştir; FMJ, FCJ ve TGE test edilmiştir. Nöbet tipleri *supra* daha detaylı bir şekilde tarif edilir. (a) IP uygulanmış PTZ, her bir nöbet tipi için geçen kontrol süresini oluşturur. PTZ'nin IP enjeksiyonundan önce Valproik Asit'in, Galanin'in veya FC5-Galanin'in hipokampal enjeksiyonu, maksimum etkiyi oluşturur, bu moleküllerin her biri her bir nöbet tipi için süreye sahip olabilir. (b) Valproik Asit'in, pozitif kontrol, Galanin'in (1 x 3 enjeksiyon doz, her bir doz 1 saat aralıklardır, PTZ dozlamından 45 dakika önce tamamlanmıştır) veya FC5-Galanin'in (1 x 3 doz, her bir doz 1 saat aralıklardır, PTZ dozlamından 45 dakika önce tamamlanmıştır) IV dozlamı, FC5-Fc-Gal veya Fc-Gal, her ikisi de IP PTZ enjeksiyonunun ölçümlerinden 2 saat önce dozlanmıştır, bu moleküllerin her biri IV dozlam üzerine etkiye sahip olabilir. Fc-Gal, molekül FC5 F(ab) fragmanından yoksun olduğundan, ancak FC5-Fc'ye bir benzer *in vivo* PK'ya sahip olduğundan, negatif kontrol görevi görür.

20

Dizil: FC5-agli (T299A)hFc. (pEAG2345) dizisi

DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREFVSRITW
GGDNTFYNSVSKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATP
LRVDYWGKGTQVTVSSAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Dizi2: agli (T299A) hFc-FC5. (pEAG2403) dizisi

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGSGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYT
MGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGRTISRDNKNTVYLQMNSL
KPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSS

Dizi3: Scrambled FC5-agli (T299A)hFc (pYL605) dizisi

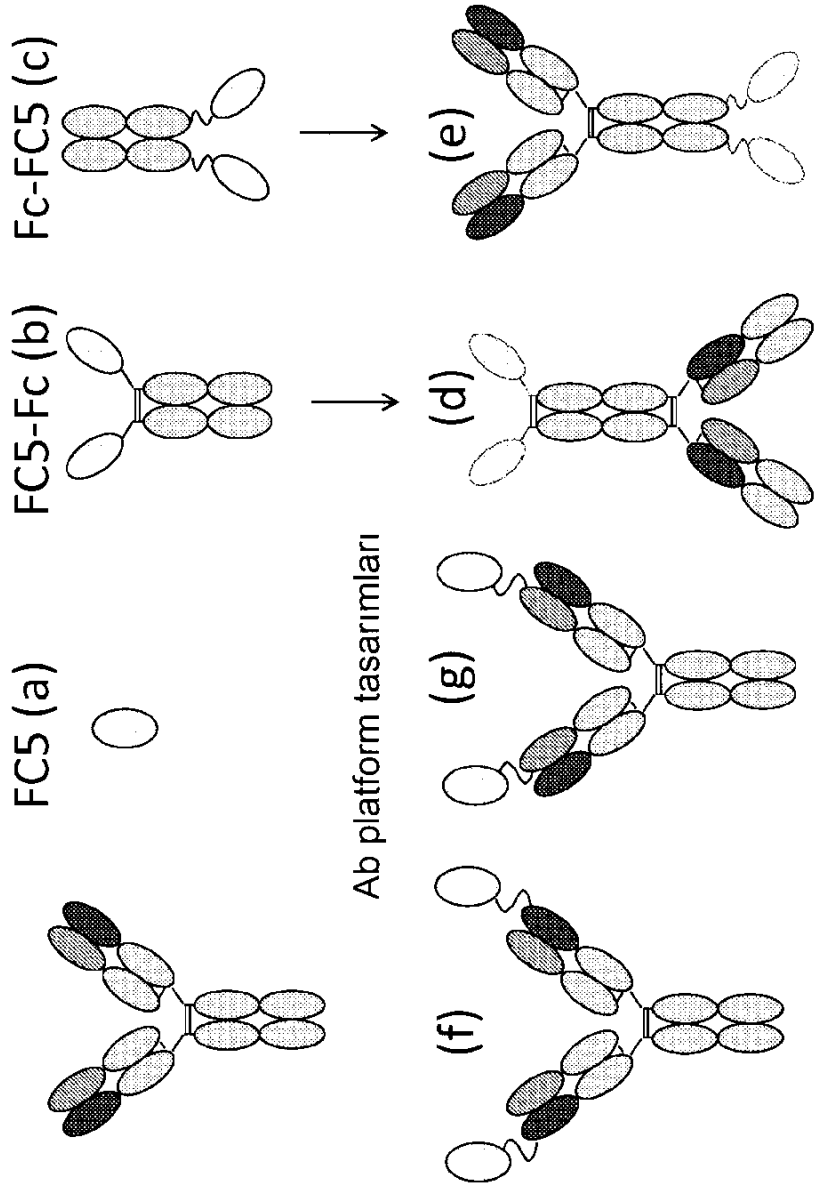
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGSGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYT
MGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGRTISRDNKNTVYLQMNSL
KPEDTADYYCAADAGSTGSYGSFDYWGKGTQVTVSS

5

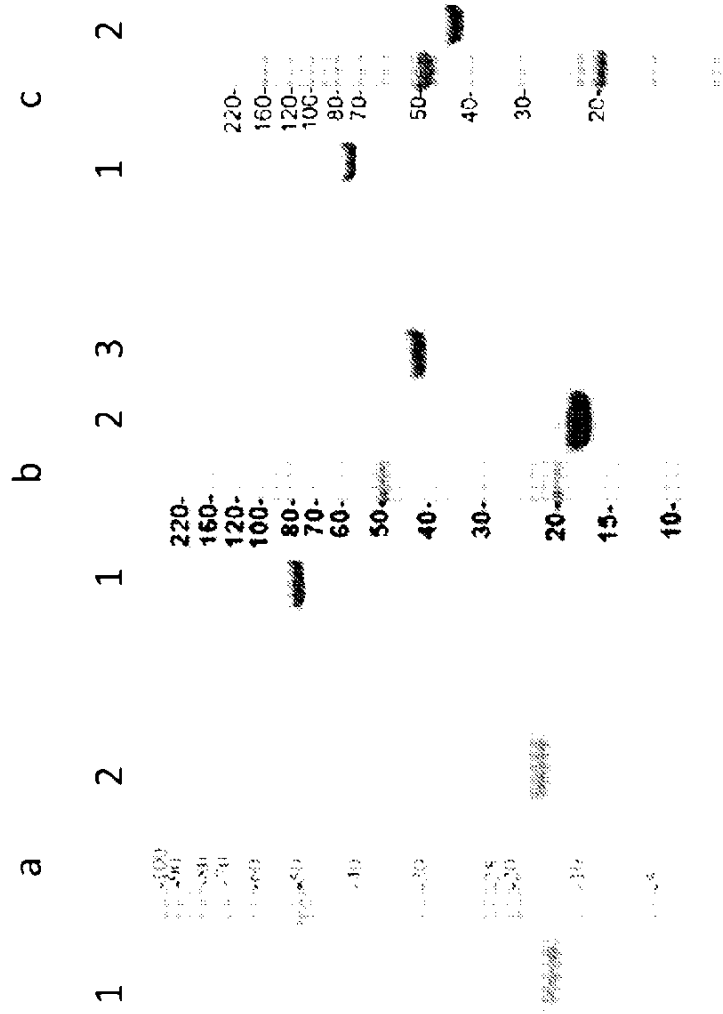
Eş-değerler

10 Teknikte uzmanlığı olan kişiler, rutin deneylerden fazlasını kullanmadan, burada tarif edilen buluşun spesifik uygulamaları için çok sayıda eş-değeri fark edecektir veya meydana çıkarabilecektir.

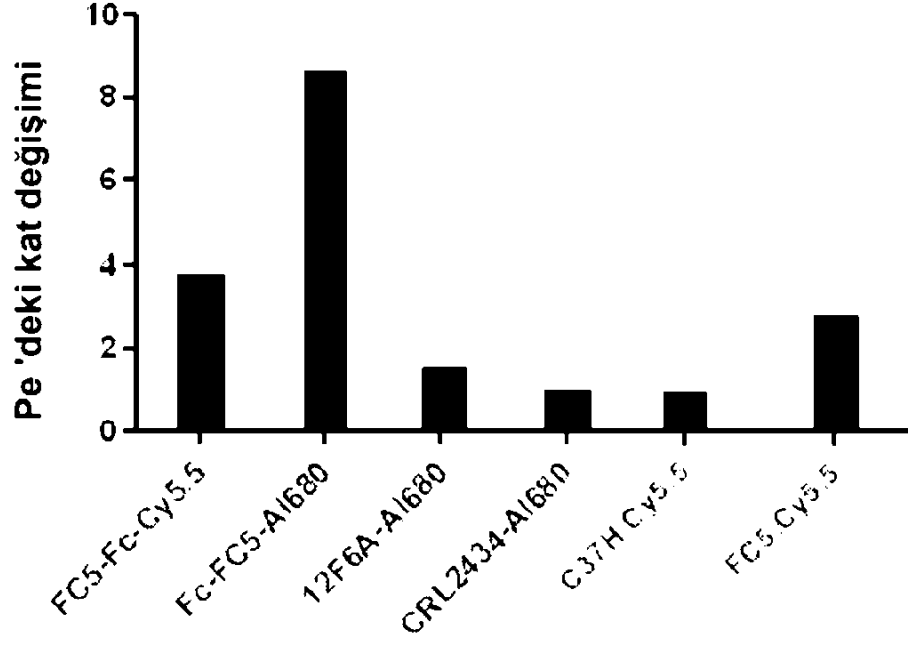
Şekil 1



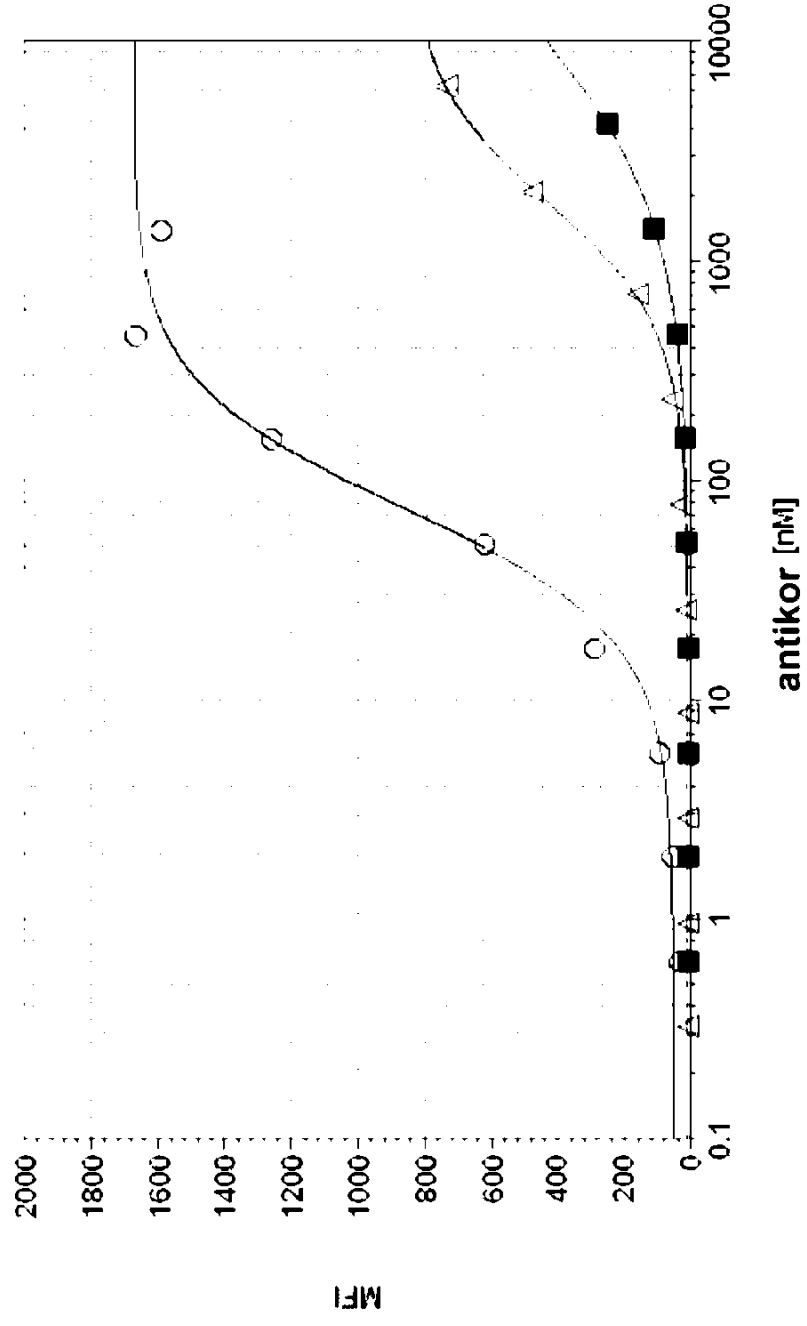
Şekil 2



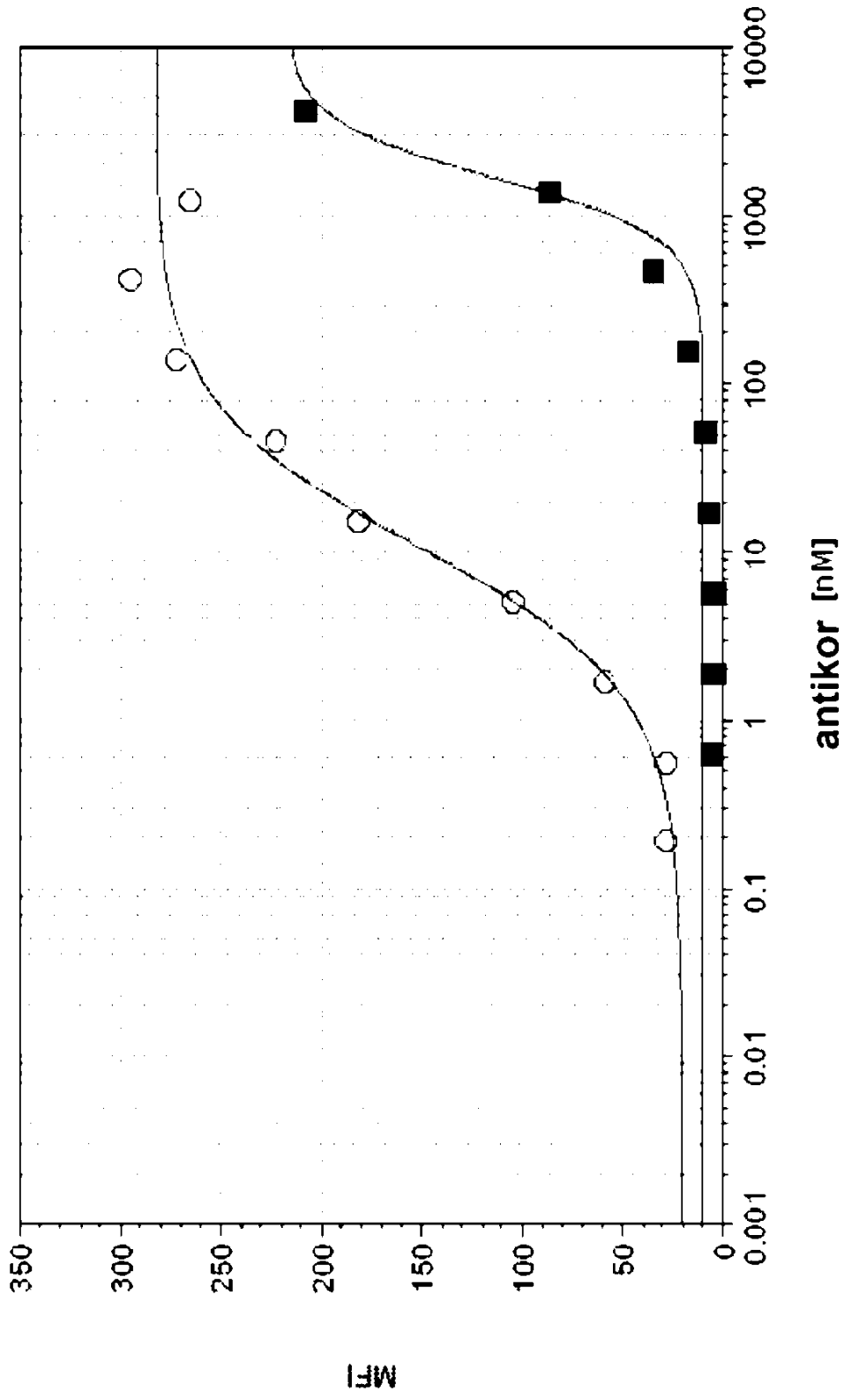
Şekil 3



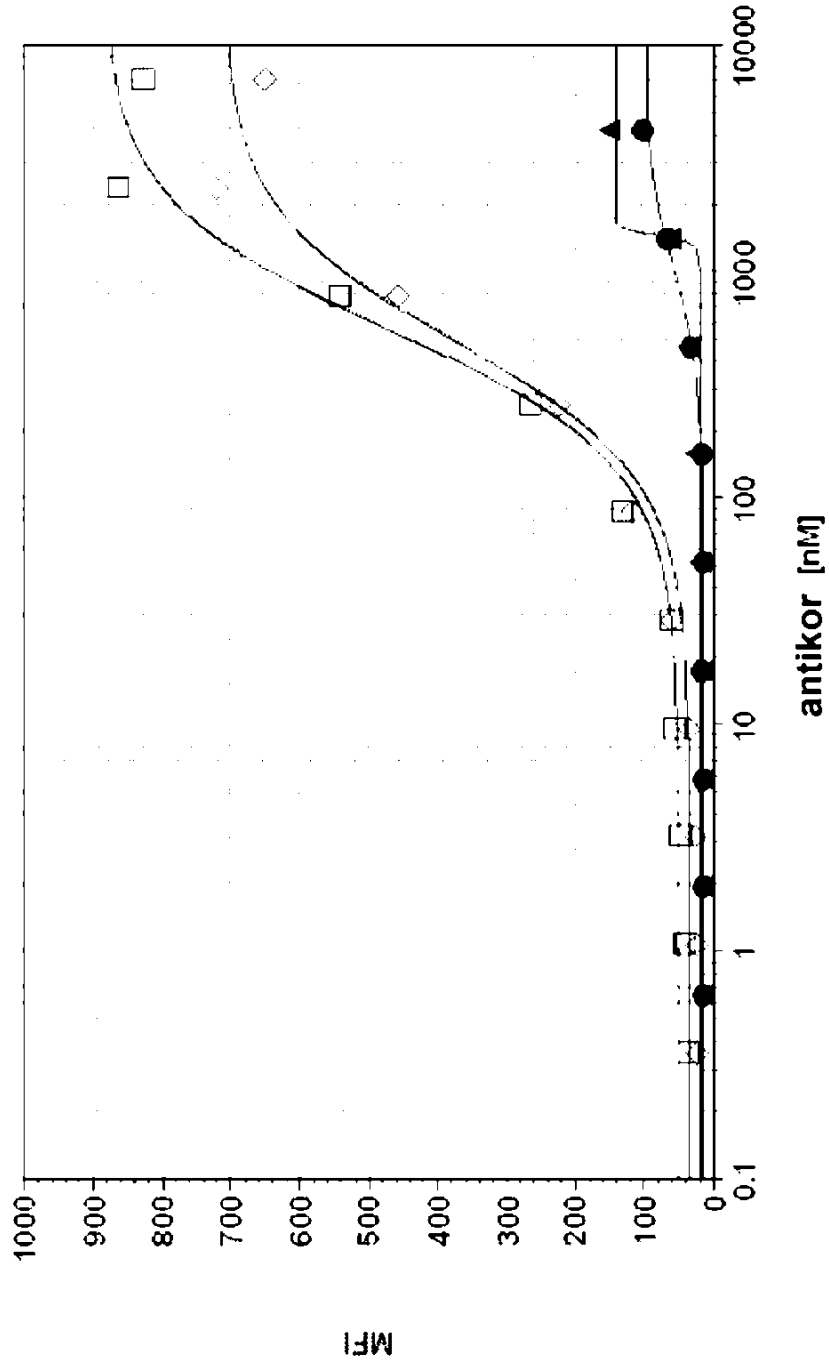
Şekil 4a



Şekil 4b

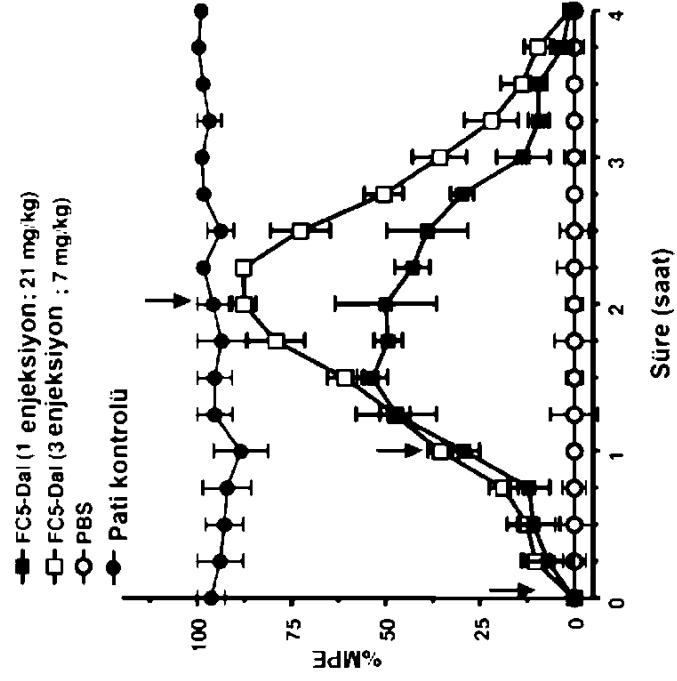


Şekil 4c

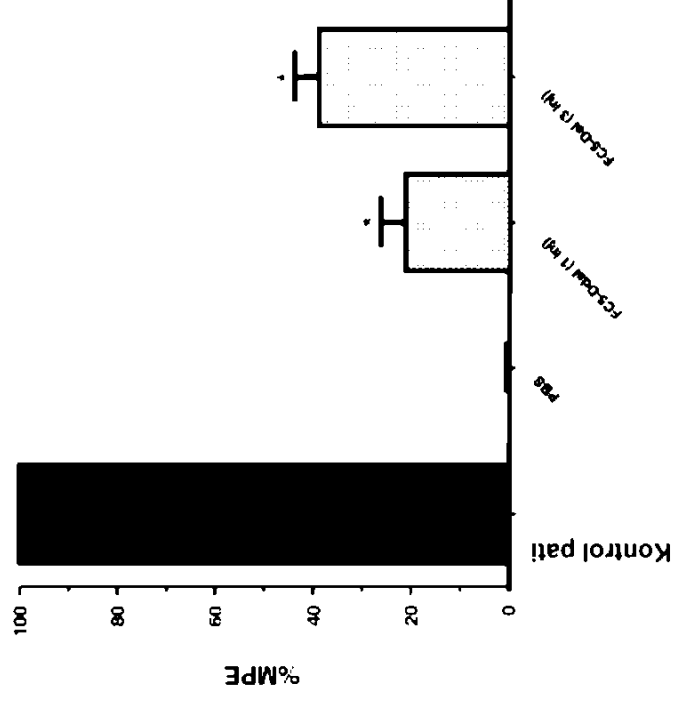


Şekil 5

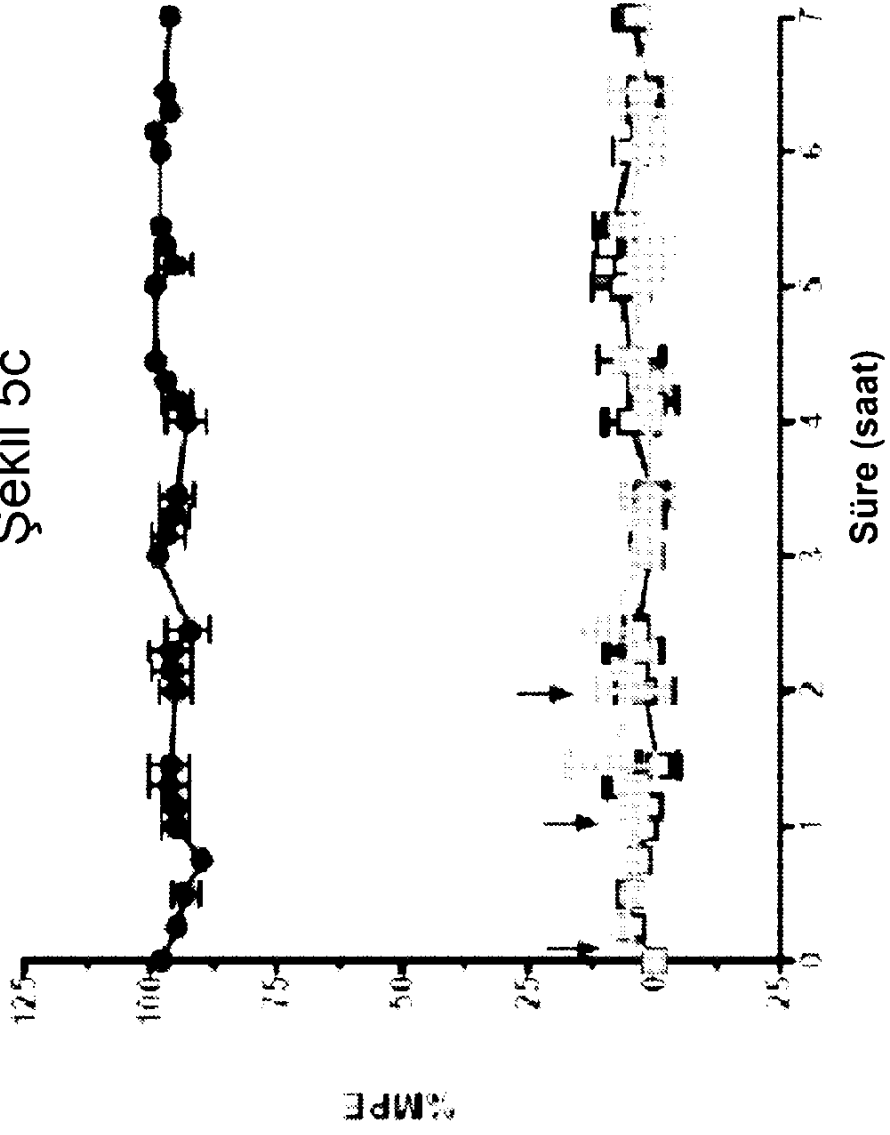
(a)



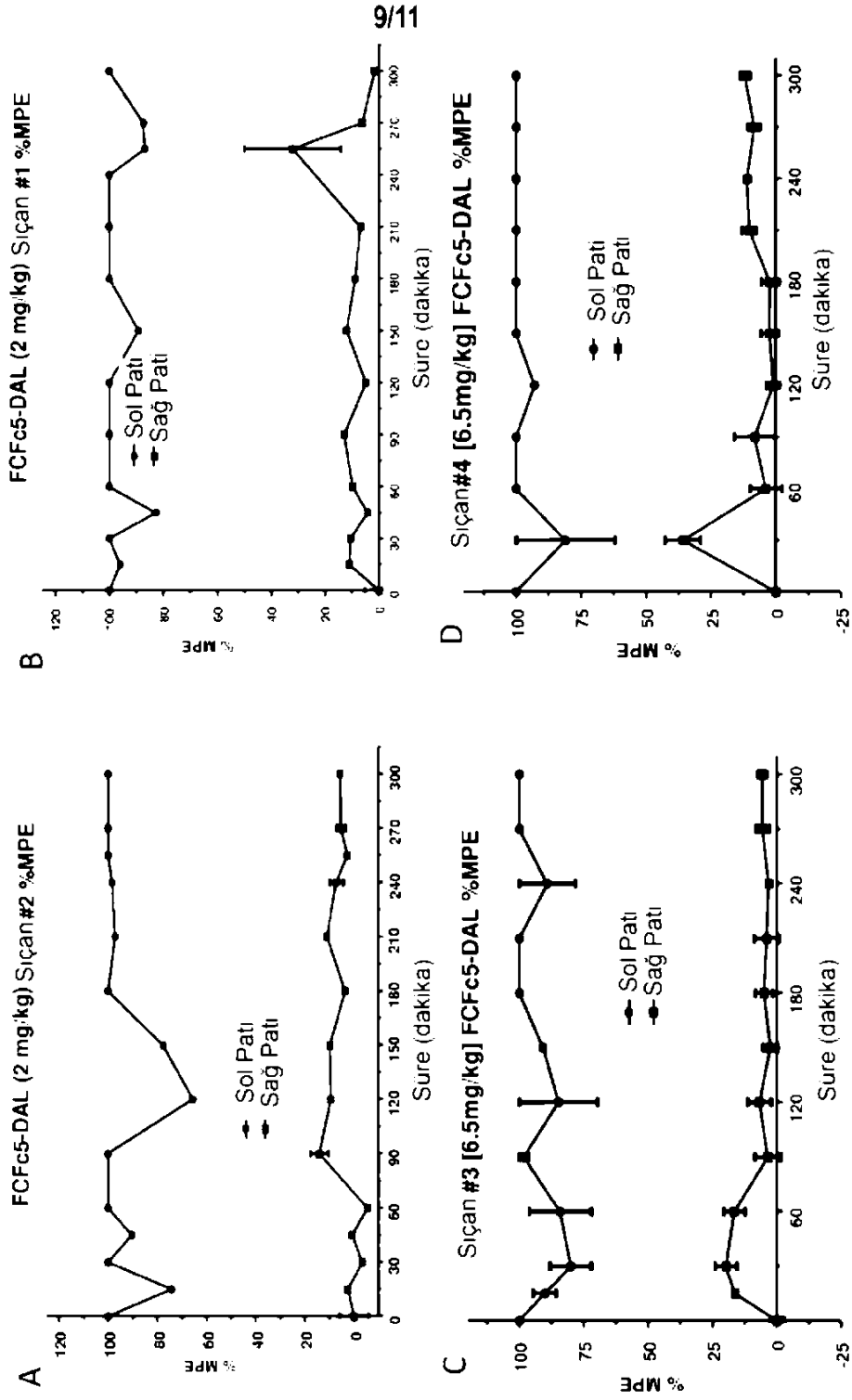
(b)



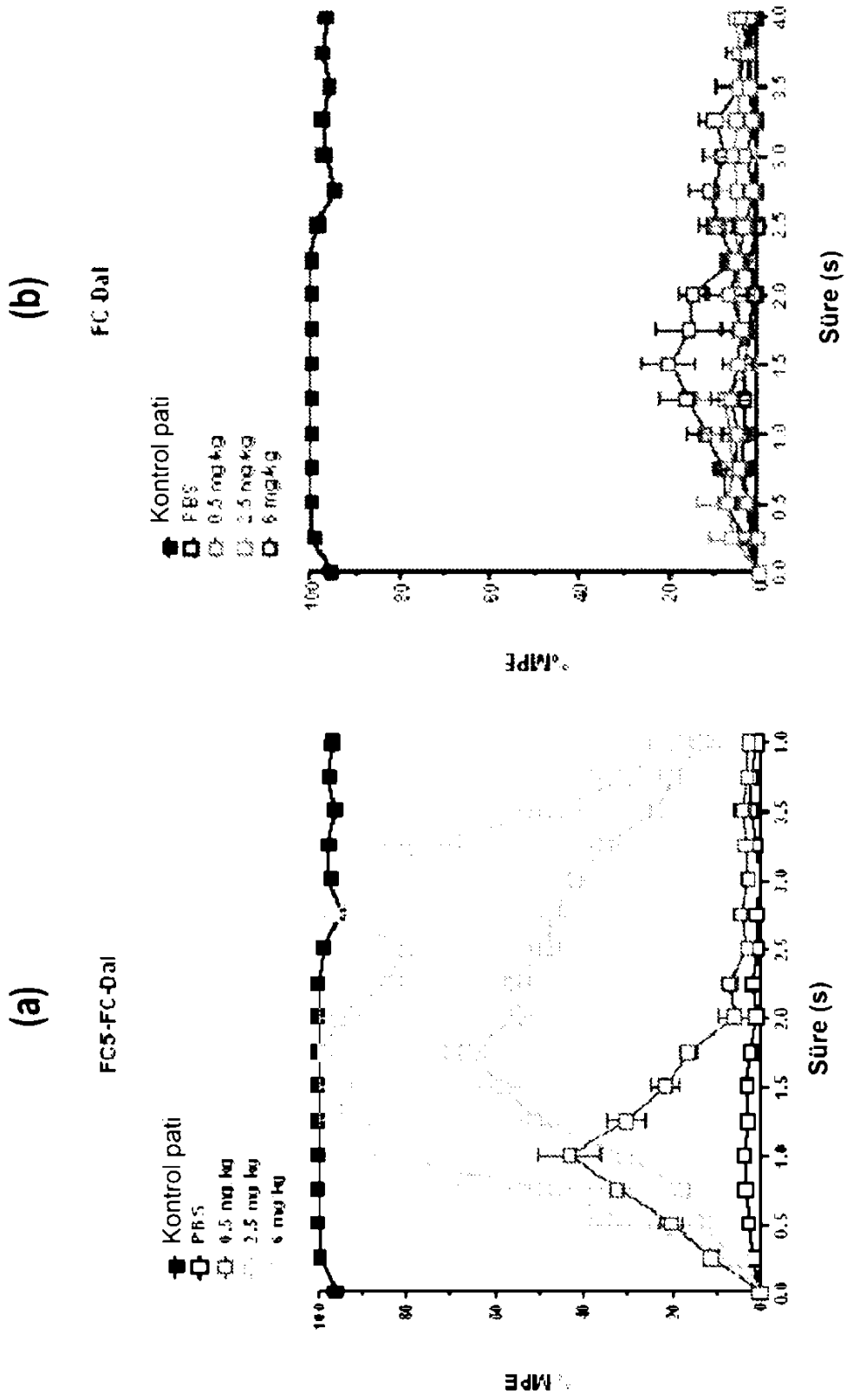
Şekil 5c



Şekil 6

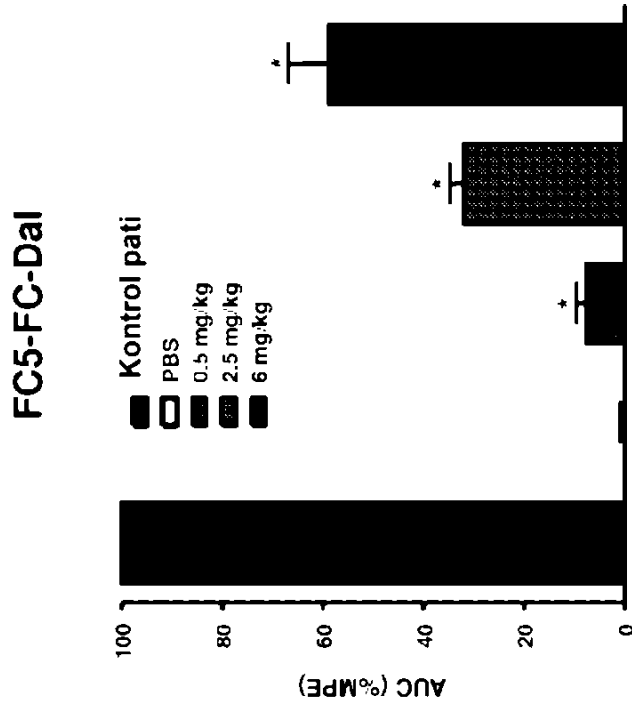


Şekil 7



Şekil 7

(c)



(d)

