

ÖZET**ANTI-TRANSGLUTAMİNAZ 2 ANTİKORLARI**

Buluş, TG2 inhibitörleri ve bu nevi inhibitörleri sağlama ve kullanma metotları ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Bir antikör ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçası olup, transglutaminaz tip 2'nin (TG2) çekirdek bölgesi içerisindeki bir epitopi seçici olarak bağlamakta olup ve lizin ve Nε(γ-glutamil)lizin izopeptit bağlarına sahip olan glutamini çapraz bağlayan insan TG2'sini inhibe etmekte olup, **özellığı**; içerisinde antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının aşağıdaki amino asit sekanslarını içermesidir:

(i) KASQDINSYLT (LCDR1);

LVNRLVD (LCDR2);

LQYDDFPYT (LCDR3);

THAMS (HCDR1);

TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); ve

(HCDR3); ya da

(ii) KASQDINSYLT (LCDR1);

LTNRLMD (LCDR2);

LQYVDFPYT (LCDR3);

SSAMS (HCDR1);

TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); ve

LISPY (HCDR3); ya da

(iii) KASQDINSYLT (LCDR1);

RTNRLFD (LCDR2);

LQYDDFPYT (LCDR3);

SSAMS (HCDR1);

TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2); ve

LISLY (HCDR3).

2. İstem 1'in antikör ya da bunun antijen bağlayıcı kısmı olup, **özellığı**; içerisinde antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının aşağıdakilere sahip olmasıdır:

(a) DITMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILY

LVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISLQPEDFATYYCLQYDDF

PYTFGQGKVEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge

ve

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWVRQAPGK

GLEWVATISSGGRSTYYPDSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA

EDTAVYFCARLISTYWGQGTLVTVSS sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge; ya da

(b) DIKMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLI
YLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQEFLITSSSLQPEDFATYYCLQYVD
FPYTFGQGGTKVEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge,
ve

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGIIFSSSAMS WVRQAPGKG
LEWVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKLISPYWGQGTLVTVSS sekansını içeren bir ağır zincir
değişken bölge; ya da

(c) EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIY
RTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISSSLQPEDFGTYCLQYDDF
PYTFGGGGTKLEIK ya da
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPK
SLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTSSSLQPEDFATYYCLQY
DDFPYTFGQGGTKVEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken
bölge, ve

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSSAMS WVRQAPGK
GLEWVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAKLISLYWGQGTLVTVSS sekansını içeren bir ağır
zincir değişken bölge.

3. Bir antikor ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçası olup, transglutaminaz tip 2'nin (TG2) çekirdek bölgesi içerisindeki bir epitopi seçici olarak bağlamakta olup ve lizin ve Nε(γ-glutamil)lizin izopeptit bağlarına sahip olan glutamini çapraz bağlayan insan TG2'sini inhibe etmekte olup, **özelliği**; aşağıdakilere sahip olmasıdır:

(a) DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLQKP
GQSPKFLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIY
YCFQGSHVPFTFGGGGTKLEIK sekansını içeren bir hafif zincir
değişken bölge, ve
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQ
GLEWIGYINPYNDGAKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTS
EDSAVYYCARLSSDYWGQGTTTLTVSS sekansını içeren bir ağır
zincir değişken bölge;

ya da

- (b) DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKP
 GQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVAEDLGV
 YYCLQVSHVPFTFGSGTKLEIK sekansını içeren bir hafif zincir
 5 değişken bölge, ve
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCASGYTFTSYVMHWVKQKPGQ
 GLEWIGFINPYNDGTKYNEKFKGKATLTSDKASTTAYMELSSLTSE
 DSAVYYCARFSSGYWGQGTTTLTVSS sekansını içeren bir ağır
 zincir değişken bölge;

ya da

- (c) DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKP
 GQSPKFLIYKVS RFSG VPD RFSGSGSGTDFTLRISSEAEADLGVY
 YCFQGSHPFTFGGGTKLEIK sekansını içeren bir hafif zincir
 10 değişken bölge, ve
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQG
 LEWIGYINPYNDGARYNEKFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSE
 DSAVYYCARLSSDYWGQGTTTLTVSS sekansını içeren bir ağır
 zincir değişken bölge;

ya da

- (d) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSV DMYWYQQKPGSSPR
 LLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADATYYCQQ
 WNSSPLTFGAGTKLELK sekansını içeren bir hafif zincir değişken
 20 bölge, ve
 QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGK
 25 GLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTAD
 TATYYCARSWTTAPFAFWGQGLTVTVSA sekansını içeren bir ağır
 zincir değişken bölge;

ya da

- (e) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPR
 LLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADATFYCQQ
 WSSSPLTFGAGTKLELK sekansını içeren bir hafif zincir değişken
 30 bölge, ve
 QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGK
 GLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSSNQVFLKITSVDTAD

TATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVTVSA sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge;
ya da

(f) QAWTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIQUEKPDHL
FTGLIAGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCAL
WYSNYWVFGGGTKVTVLG sekansını içeren bir hafif zincir
değişken bölge, ve
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHWVKQNLGK
SLEWIGYINPKNGVIYYNQKFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSE
DSAVYYCATALTYWGQGLTVTVSA sekansını içeren bir ağır zincir
değişken bölge;
ya da

(g) DWMTQTPLTSLVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLFQRP
GQSPRRLIYLVSKLDSGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV
YYCVQGTTHFPYTFGGGKLEIK sekansını içeren bir hafif zincir
değişken bölge, ve
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGL
KWMGWINTSSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLSKSED
TATYFCARPEVAYWGQGLTVTVSA sekansını içeren bir ağır zincir
değişken bölge.

4. Önceki istemlerden herhangi birinin antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçası olup, **özelliliği**; içerisinde:

(a) antikör veya bunun antijen bağlayıcı parçasının, sağlam bir antikoru içerir ya da bundan oluşması;

(b) antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir antijen bağlayıcı parça içermesi ya da bunlardan oluşması: bir Fv parçası, örnek olarak bir tek zincirli Fv parçası ya da bir disülfür bağlı Fv parçası; bir Fab parçası; ve bir Fab benzeri parçası, örnek olarak bir Fab' parçası ya da bir F(ab)₂ parçası;

(c) antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının bir IgG1, IgG2, IgG3 ya da IgG4 olmasıdır.

5. Bir polinükleotit olup, **özelliliği**; İstemler 1 ila 4 arasındakilerden herhangi birine göre bir antikör ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçasını kodlamasıdır.

6. Bir bileşik olup, **özelliği**; İstemler 1 ila 4 arasındakilerin herhangi birine göre bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını ve ilave olarak bir kısım, örnek olarak bir kolayca tespit edilebilir kısmı, ve/ veya bir doğrudan doğruya ya da dolaylı olarak sitotoksik olan kısmı içermesidir.
- 5 7. Bir farmasötik bileşim/ formül olup, İstemler 1 ila 4 arasındakilerden herhangi birine göre bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, ya da İstem 5'e göre bir polinükleotidi, ya da İstem 6'ya göre bir bileşiği, bir farmasötik olarak kabul edilebilir ara madde, yardımcı madde, seyreltici ya da taşıyıcıya sahip olan, isteğe bağlı olarak ilave olarak bir ya da daha fazla ilave aktif içerik
- 10 maddesi içeren bir karışım içerisinde içermekte olup, tercihen **özelliği**; içerisinde bileşimin/ formülün bir hastaya intravenöz, intramüsküler, ya da deri altı verme için formüle edilmiş olmasıdır.
8. Parçaların bir kiti olup, **özelliği**; İstemler 1 ila 4 arasındakilerden herhangi birine göre bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, ya da İstem 5'e
- 15 göre bir polinükleotidi, ya da İstem 6'ya göre bir bileşiği; ve bir ilave maddeyi içermesidir.
9. İstemler 1 ila 4 arasındakilerden herhangi birine göre bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parça, ya da İstem 5'e göre bir polinükleotit, ya da İstem 6'ya göre bir bileşik olup, **özelliği**; bir ilaç içerisinde kullanım için olmasıdır.
- 20 10. İstemler 1 ila 4 arasındakilerden herhangi birine göre bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parça, ya da İstem 5'e göre bir polinükleotit, ya da İstem 6'ya göre bir bileşik olup, **özelliği**; Çölyak hastalığı, anormal yara iyileşmesi, skarlaşma, hipertrofik skarlar, oküler skarlaşma, inflamatuvar bağırsak hastalığı, maküler dejenerasyon, sedef hastalığı, fibroz ile ilgili hastalıklar
- 25 (örnek olarak, karaciğer fibrozu,, interstisyel akciğer hastalığı ve fibrotik akciğer hastalığı gibi pulmoner fibrozis, akciğer fibrozisi, miyelofibroz, glomerüloskleroz ve tübulointerstisyel fibrozis gibi böbrek fibrozu), ateroskleroz, restenoz, inflamatuvar hastalıklar, oto immün hastalıklar, nörodejeneratif/ nörolojik hastalıklar (örnek olarak Huntington hastalığı,
- 30 Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, poliglutamin hastalığı, spinobüler müsküler atropi, dentatorubral pallidoluysian atrofi, spinocerebellar ataksi 1,2, 3, 6, 7 ve 12, rubropallidal atrofi, spinocerebellar palsy) , Li-Fraumeni sendromunda glioblastom ve sporadik glioblastom gibi blastomlar, malign melanom, pankreatik duktal adenokarsinomas, miyeloid lösemi, akut miyeloid

lösemi, miyelodisplastik sendrom, miyeloproliferatif sendrom, jinekolojik kanser, Kaposi sarkomu, Hansen hastalığı ve/ veya kollajen kolitin, tedavisi ve/ veya teşhis edilmesinde kullanım için olmasıdır.

- 5 **11.** TG2 enzim aktivitesini azaltmak ya da inhibe etmek için bir in vitro metot olup, **özellığı**; metodun İstemler 1 ila 4 arasındakilerden herhangi birine göre bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, ya da İstem 5'e göre bir polinükleotidi, ya da İstem 6'ya göre bir bileşiği, TG2 içeren bir numuneye, örnek olarak TG2 içeren bir doku ya da hücre numunesine uygulamak için olmasıdır.
- 10 **12.** İstemler 1 ila 4 arasındakilerden herhangi birine göre bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, ya da İstem 6'ya göre bir bileşiği üretmek için bir metot olup, **özellığı**; metodun İstem 5'e göre bir polinükleotidi eksprese etmeyi içermesidir.

TARİFNAME

ANTİ-TRANSGLUTAMİNAZ 2 ANTİKORLARI

Mevcut buluş, TG2 inhibitörleri ve bu nevi inhibitörleri sağlama ve kullanma metotları ile ilgilidir.

- 5 Transglutaminaz tip 2 (TG2; aynı zamanda doku transglutaminaz, tTg olarak da bilinir), kan pıhtılaşması için kritik olan Faktör XIIIa'yı ve bunun yanı sıra keratinositlerin terminal farklılaşmasında rol oynayan Keratinosit Transglutaminaz (TG1) ve Epidermal Transglutaminaz (TGI) ve Epidermal Transglutaminaz (TG1)'i içeren daha geniş 9 üyeli transglutaminaz ailesinin bir parçasıdır. Buna ilave olarak, 10 bugüne kadar kesin bir rolün belirlenemediği 4 ila 7 arasındaki TG tipleri gibi başka TG ailesi üyeleri de mevcuttur.

- TG2, temel olarak $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})$ lizin izo-dipeptit bağlarının oluşumunu katalize ederek protein çapraz bağlayan bir enzim olarak işlev görür. TG2'nin yüksek ekspresyonu, çeşitli doku skarları, çeşitli beyin hastalıklarında nörofibriler yumak oluşumu ve bazı 15 kanserlerde kemoterapiye direnç gibi çeşitli patolojiler ile ilişkili olan anormal protein çapraz bağlanmasına yol açar. TG2 aynı zamanda proteinleri deamide etme yeteneğine sahiptir. TG2 gliadini deamide eder ve TG2/ Gliadin kompleksi çölyak hastalığında birincil otoantijendir. İlave olarak, TG2 bir GTP bağlanma fonksiyonuna sahiptir ve bu bir patolojik rol ile bağlantılı olmamasına rağmen, bir GTPaz olarak 20 işlev görebilir.

- Yükseltilmiş TG2 aktivitesi temel olarak karaciğer [2], pulmoner [3], kalp [4] ve böbrek fibrozuna [5] ve bunun yanında ateroskleroza [6] yol açan anormal yara iyileşmesi [1] ile ilişkilidir. Skarlaşma ve fibroz süreci, arttırılmış olan sentez ile ve en önemlisi, TG2'nin interstisyel boşluğa arttırılmış olan ihracı ile bağlantılıdır. Hücre dışına 25 çıktıktan sonra, TG2 fibronektin ve kollajen gibi hücre dışı matriks (ECM) proteinlerini bir $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})$ lizin di-peptit bağı [8] ekleyerek çapraz bağlayabilir. Çalışmalar bunun mevcut ECM bileşenlerinin birikimini hızlandırabileceğini, aynı zamanda matris metaloproteinaz (MMP) sistemi tarafından proteolitik klirens karşı direnç sağladığını göstermiştir [9, 10]. Birlikte ele alındığında, bu ECM proteinlerinin birikmesine ve 30 dolayısı ile de yara dokusu oluşmasına neden olur [9]. İlave olarak, TG2, skarlaşma işleminde [11] latent TGF- β 'nin aktivasyonunda ortaya çıkan bir role sahiptir ve ayrıca

interlökin-6 [12] ve tümör nekroz faktörü- α aktivasyon yolları [13] ile de ilişkilendirilmiştir.

TG2'nin in vitro inhibisyonu, hücre dışı matris seviyelerini düşürür [14], TG2 nakavt farelerden türetilen hücreler daha düşük olgun ECM seviyelerine sahiptir [9]. Pan TG inhibitörlerinin kronik böbrek hastalığı modellerinde in vivo uygulaması glomerüloskleroz ve tübulointerstisyel fibrozisin böbrek fonksiyonlarını koruyarak gelişimini azaltır [15, 16]. Tek taraflı üreter tıkanmasına maruz kalan TG2 nakavt farede de benzer faydalar görülmektedir [17].

Beynin dejeneratif bölgesinde, proteinlerin TG2'nin oluşumunda rol oynadığı protein agregalarının varlığı ile karakterize edilen çok sayıda nörodejeneratif hastalık vardır. En iyi karakterize edilen Huntington hastalığındadır. Huntington proteini (htt), N terminal etki alanında genişletilmiş olan poliglutamin tekrarları içerir. Vahşi tip htt, 35'ten daha az ardışık glutamini içerirken, hastalık ile ilgili olan htt, tipik olarak mükemmel bir TG2 substratı yapan, 40 ardışık glutamine sahiptir. Daha sonra, çözünmez olan agregalar Huntington hastalığı hastalarının striatum ve korteksinde oluşturulur. Agregaların frekansı, hastalığın ciddiyeti ile iyi koreledir.

Alzheimer hastalığı, toplanmış olan amiloyit β proteininin ve tau proteininin yüksek oranda fosforlanmış bir halini içeren hücre içi nörofibriler yumaklardan oluşmuş olan hücre dışı senil plakların varlığının tipik bir örneğidir. Bu plaklar, büyük miktarda ϵ (γ -glutamil) lizin izo-dipeptit bağı içerir.

Son olarak, Parkinson hastalığının bir özelliği, yine ϵ (γ -glutamil) lizin izo-dipeptit bağları içeren etkilenen nöronların sitoplazmasında Lewy gövdeleri adı verilen alfa-sinüklein agregalarının varlığıdır. Yukarıda sözü edilen proteinlerin tümü, in vitro olarak TG2'nin iyi substratlarıdır. İlave olarak, beynin etkilenen bölgesi, aynı hastalarda beynin etkilenmemiş bölgelerine göre daha yüksek seviyelerde TG2 proteini içerir. Hastalıkla ilgili toplanmış olan proteinler için TG2 substrat özgüllüğü ve artan TG2 ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyon, her hastalıkta enzimatik olarak aktif TG2 için bir rol olduğunu gösterir.

TG inhibitörlerinin, nörodejeneratif hastalıkların çoklu biyolojik modellerinde terapötik etkiler gösterdiği gösterilmiştir. COS-7 hücrelerini alfa sinüklein ve TG2 ile aynı anda transfekte eden Parkinson hastalığının bir hücre kültürü modelinde, Parkinson hastalığındaki Lewy cisimlerini anımsatan kovalent sinüklein agregaları, C277S

agrega oluşumunu indüklemeye konusunda başarısız olan TG2 mutantının inaktive ettiği için, enzimatik olarak aktif TG2'ye neden olur ve buna bağımlıdır. Bu transfeğe edilmiş olan hücrelerin sistamin ile işlenmesi, alfa sinüklein agregalarının miktarının yanı sıra agregaları içeren hücrelerin yüzdesini de önemli ölçüde azaltmıştır. Normal

5 uzunlukta ve genişletilmiş olan poliglutamin tekrarlı proteinler, Huntington hastalığı gibi genişletilmiş olan CAG hastalıklarını temsil eden proteinleri tekrar eden, hücre hatlarına transfeğe edilmiş olan ve agregalar oluşturduğu gösterilen iki başka rapor daha vardır. Bu hücre çizgilerinin TG rekabetçi inhibitör monodansilkadaverin ile işlenmesi, nükleer parçalanmada bir azalmaya yol açarken, sistamin ile işleme tabi

10 tutma hem nükleer parçalanmada bir azalmaya hem de protein agrega oluşumunda bir azalmaya yol açmıştır. Pan TG inhibitörünün bir örneği, Zedira GmbH'den temin edilebilen ve NTU283 ya da r283 olarak birçok yayında belirtilen 1,3-Dimetil-2 -[(2-okso-propil)tiyo] imidazolyum klorürdür.

Sistamin, Huntington hastalığının fare modellerinde dozlandığı zaman in vivo faydalı

15 bir terapötik etkiye sahiptir. Sistamin ile dozlanan Huntington R6/2 fareleri, iyileştirilmiş olan motor fonksiyonlarına, daha az ağır kilo kaybına ve tedavi edilmeyen kontrollere kıyasla hayatta kalmada artış göstermişlerdir. Önemli olarak, beyin homojenatlarındaki ex vivo TG2 aktivitesi, enjeksiyondan en az 60 dakika sonra sistamin ile dozajdan sonra düşük olmuştur. Huntington hastalığının farklı bir

20 fare modelinde, YAC128 suşu, sistamin, striatal atrofi seviyesini azaltabilmiştir, ancak hayvan ağırlığını ya da motor fonksiyonunu iyileştirememiştir, ancak sistaminin hücresel ve doku seviyesinde yararlı bir etkisi olduğunu göstermiştir ancak hastalık semptomlarında etki gösterememiştir.

Sistaminin Huntington fareleri üzerindeki faydalı terapötik etkisinin, TG2

25 inhibisyonundan bağımsız olduğuna dair en inandırıcı kanıt, TG2'nin yokluğunda nörodejenerasyona duyarlı bir tür oluşturmak için R6/2 Huntington faresini TG2 nakavt faresi ile çaprazlamaktan geçmiştir. R6/2 TG2^{-/-} fareleri, sistamin ile işleme tabi tutulduğu zaman, geliştirilmiş motor fonksiyonu ve artan ömrü, sistamin ile tedavi edilen R6/2 TG2^{+/+} farelerinde görülen iyileşmeden istatistiksel olarak farklı

30 olmamıştır. Ek olarak, R6/1 ve R6/2 TG2^{-/-} fareler, bu modellerde TG2 transamidasyon aktivitesinden bağımsız olarak protein toplanması mekanizmasını düşündüren R6/1 ve R6/2 TG2^{+/+} farelerine kıyas ile artan nöronal protein agrega seviyelerine sahiptir. Bununla birlikte, R6/2 TG2^{-/-} farelerin, motor disfonksiyonunun

başlangıcında bir gecikme gösterdiği ve R6/2 TG2^{+/+} farelerine kıyas ile arttırılmış olan hayatta kalımları, TG2 için, R6/2 modeli içerisinde nörodejenerasyonun patojenezi içerisinde bir rolü belirttiği dikkat çekicidir.

5 TG2 aynı zamanda Batı Avrupa'daki 100 kişiden 1'ini etkileyen çölyak hastalığının da ağır bir şekilde kapsamındadır. Çölyak lafı, buğday, arpa ve çavdarda bulunan prolaminler adı verilen bir protein sınıfının neden olduğu ince bağırsağın T hücre aracılı inflamatuvar bir bozukluğudur. Bu proteinlerin yüksek prolin ve glutamin içeriği, onları sindirim sırasında doğal mide, pankreas ve bağırsak proteazlarına ve peptidazlara karşı dirençli kılar. Elde edilen peptit parçaları ince bağırsakta 10 sindirilmemiş olarak kalır ve intestinal lamina propiaya erişim sağlar, burada TG2 ile modifikasyondan sonra, intestinal yapının inflamasyonuna ve tahrip olmasına neden olan bir T hücre aracılı immün tepkiyi uyarabilirler. Intestinal TG2, prolamin peptidlerindeki spesifik glutamin kalıntılarını, glutamat kalıntılarını deamide eder. HLA-DQ2/8 bireylerinde, bu modifiye peptitler, sınıf II MHC molekülleri 15 tarafından karşılık gelen otoreaktif T hücrelerine sunulur. Prolaminler yüksek glutamin içeriğine sahip olmasına rağmen (yaklaşık olarak % 30 ila 35 arasında), bu glutamin kalıntılarının sadece birkaçı insan TG2'sini hedef almaktadır. TG2 ile işleme tabi tutulmuş olan prolaminlerin TG2 substrat özgülüğü, DQ2 bağlanma benzeşimi ve T hücresi uyarıcı potansiyeli arasındaki mükemmel bir korelasyon, peptid 20 deamidasyonuna TG2 tarafından aracılık edildiğini ve hastalığın ciddiyetinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığını gösterir. İlave olarak, çölyak hastaları TG2 gliadin komplekslerine karşı bir otoantikor yanıtı üretir. Bu anti TG2 antikoru, hem hücre dışı TG2 ile birlikte lokalize oldukları gösterilmiş olan ince bağırsakta, hem de bir teşhis hastalığı işaretleyicisi olarak kullanıldığı kanda bulunur.

25 Çölyak hastalığının hayvan modellerinin olmamasına rağmen, ex vivo deneyler TG2 inhibisyonunun çölyak sprueya sahip olan hastalara fayda sağlama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Çölyak hastası ince bağırsak biyopsilerini ya TG2 ile işleme tabi tutulmuş olan (deamide edilmiş olan) ya da TG2 ile işleme tabi tutulmamış olan (deamide edilmemiş olan) glüten dijestleri ile kültürleme, her iki 30 durumda da deamide edilmemiş olan glüten peptitlerinin yerine deamide edilmiş olan glüten peptitlerini tercihli olarak tanıyan hasta T hücresi hatlarının üretilmesi ile sonuçlanmıştır. Aynı zamanda, sistamin ile çölyak biyopsileri içerisinde endojen TG2'nin aktivitesini bloke edilmesi sureti ile, sonuçta ortaya çıkan T hücre hatlarının

yarısından fazlası, sistamin ile işleme tabi tutulmamış olan kontrollere kıyas ile proliferatif tepkileri azaltmıştır. Hücre hatları, deamide edilmemiş olan dijestlere iyi bir şekilde tepki vermemiştir. Bu sonuçlar, çölyak intestinal biyopsileri içerisindeki glütene karşı tepki veren T hücresi popülasyonunun doğal olarak, deamide edilmemiş olan peptitlerin aksine, deamide edilmiş olan gluten peptitlerini tanımaya doğru yönlendirilmiş olduğunu, bu biyopsiler içerisindeki endojen TG2 aktivitesinin doğal halinde gluten peptit deamidasyonu ile sonuçlanabileceğini ve çölyak biyopsilerinin TG2 inhibitörleri ile işleme tabi tutmanın glütene karşı tepki veren T hücrelerinin proliferatif yanıtını azaltabileceğini göstermektedir.

- 10 Bir başka çalışma, pan TG inhibitörü 2-[(2-oksopropil) tiyo] imidazolyum inhibitörünün, hem çölyak sprue hastalarından hem de kontrollerden alınan ince doku kesitlerinde gluten peptidlerinin endojen proteinlere doğal halinde çapraz bağlanmasını önleyebildiğini göstermiştir. Daha da önemlisi, yazarlar, sağlam çölyak ince intestinal biyopsilerinin 2-[(2-oksopropil)tiyo] imidazolyum ile inkübasyonunun, 15 immüno dominant bir gluten peptidinin deamide edilmemiş olan formu tarafından indüklenen T hücre aktivasyonunu önlediğini göstermişlerdir. Buna karşılık, TG inhibisyonu, biyopsiler aynı peptidin deamide edilmiş olan versiyonu ile inkübe edildiği zaman, T hücre aktivasyonunu kontrol etmede etkisiz olmuştur. Bu sonuçlar, çölyak hasta biyopsilerinde endojen TG2'nin inhibe edilmesinin gluten peptit 20 deamidasyonunu önleyebileceğini ve dolayısı ile T hücre aktivasyonunu azaltabildiğini göstermektedir.

- Çok sayıda gözlem, TG2'nin belirli kanser türlerinin gelişiminde rol oynadığı hipotezini desteklemektedir. Çok sayıda çalışma, TG2 proteininin, gliyoblastomlar, malign melanomlar ve pankreas duktal adenokarsinomları gibi kanserlerdeki sağlıklı dokuya göre kanserli dokuda upregüle edildiğini göstermiştir. Belirli hücre tiplerinde, 25 TG2 protein ekspresyon seviyelerinin siRNA aşağı regülasyonu sırasında ya da TG' inhibitörleri ile işleme tabi tutulmanın bu hücreleri apoptoza sentezlemesi sırasında, TG2'nin hücreler üzerinde anti apoptotik etkiler uyguladığı gösterilirken, kemoterapötik direnç ile TG2 ekspresyon seviyelerine sahip bazı kanserlerin 30 metastatik potansiyeli arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Öte yandan, aynı zamanda bazı kanser türlerinde TG2 ekspresyonunun aşağı regülasyonunun da raporları mevcuttur [18]. Son zamanlarda, TG2'nin yüksek metastatik kanser hücrelerinde aşağı regüle edilmiş bir protein olan GPR56 için bir

bağlanma ortağı olduğu, bunun da TG2'nin GPR56 ile etkileşimi sayesinde bir tümör bastırıcı protein olarak hareket edebileceği anlamına geldiği gösterilmiştir;

Güncel transglutaminaz inhibitörleri 3 ana sınıfa ayrılır:1) Doğal amin substratları ile rekabet eden rekabetçi amin inhibitörleri (örnek olarak, sistamin ve spermin); 2) GTP ve bir tiyeno[2,3-d] pirimidin-4-on asilhidrazit omurgası ile yeni keşfedilen bir bileşik sınıfı gibi geri dönüşümlü allosterik inhibitörleri; ve 3) 2-[(2-oksopropil) tiyo] imidazolyum türevleri (asetilat aktif site sistein), 3-halo-4,5-dihidroisoksazoller (aktif bölgede stabil bir iminotioeter oluşturur) ve karbbenziloksi-L-glutaminil içeren geri dönüşümsüz inhibitörler eklenen çeşitli reaktif kısımlara sahip glisin analogları.

10 Çoğu yukarıdaki deney sistemlerinde kullanılmış ve faydalı sonuçlar göstermiştir. Bununla birlikte, bu inhibitörlerin hiçbirisi, hepsi transglutaminaz ailesi katalitik çekirdeğindeki korunmuş katalitik triadı hedef aldıkları için, TG izoform özgüllüğü göstermez. Sonuç olarak, tümü, potansiyel olarak, beklenebilecek yan etkiler nedeni ile insan hastalıklarında etkili bir şekilde önleyen Faktör XIIIa, TGI ve TG3'ün birlikte
15 inhibe edilmesinin dezavantajına sahiptir.

WO 2006/100679, yüksek anti TG2 antikor titreleri olan üç yetişkin çölyak hastasından toplanan örneklerden rekombinant teknoloji ile üretilen spesifik bir anti TG2 antikorunu tarif eder.

CUB7402 (ab2386), Abcam Lai et al., 2007'den ticari olarak temin edilebilen bir antikordur; FASEB 21(14):4131-4143, insan lökositlerinde, vasküler düz kaslarda ve endotel hücrelerinde iki alternatif GTP bağımsız alternatif olarak eklenmiş doku transglutaminaz formunun tanımlanmasını tarif eder.

WO 2010/113025, transglutaminaz ailesinin proteinleri üzerinde bulunan ana çölyak epitopunu kullanan bağlanma tahlilleri ile gluten ile indüklenen oto immün
25 hastalıkların seçici olarak teşhis edilmesini tarif eder.

WO 02/068616, transglutaminaz 6'yı, oto immün hastalıkların bir teşhis göstergesi olarak tarif eder.

Di Niro et al, 2007; BMC Biotechnology 7(46): 1-10, hayvan modellerinde insan oto immün hastalıklarının in vivo çalışması için minik antikorların yapısını tarif eder.

30 WO 2010/116196, transglutaminaz ailesinin proteinleri üzerinde bulunan ana çölyak epitopunu kullanan bağlanma tahlilleri ile gluten ile indüklenen oto immün

hastalıkların seçici olarak teşhis edilmesini tarif eder. WO 2010/116196 aynı zamanda, çölyak oto antikorlarının terapötik bileşikler tarafından bağlanmasını inhibe ederek glüten kaynaklı oto immün hastalıkların tedavisini de tarif eder.

TG2'nin sayısız hastalık durumu ile ilişkilendirilmesi ve spesifik olmayan inhibitörlerin zorlayıcı verileri göz önüne alındığında, minimum seçici olmayan etkilere sahip, yüksek düzeyde seçici olan ve yüksek etkili TG2 inhibitörlerine ihtiyaç vardır.

Daha önce yayınlanmış bir belgenin bu şartnamede listelenmesi ya da tartışılması, belgenin son teknolojinin bir parçası olduğu ya da genel genel bilgi olduğu yönünde bir onay olarak alınmamalıdır.

10 BULUŞUN ÖZETİ

Mevcut buluş, transglutaminaz tip 2'nin (TG2) çekirdek bölgesi içindeki bir epitopa seçici olarak bağlanan ve insan TG2'nin lizin ve glutamin ile Nε(γ-glutamil) lizin izopeptit ile çapraz bağlanmasını önleyen bir antikor ya da bunun bir antijen bağlayıcı fragmanı sağlamakta olup, içerisinde antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının aşağıdaki amino asit sekanslarını içerir:

- (i) KASQDINSYLT (LCDR1);
 LVNRLVD (LCDR2);
 LQYDDFPYT (LCDR3);
 THAMS (HCDR1);
 TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); ve
 LISTY (HCDR3); ya da
- (ii) KASQDINSYLT (LCDR1);
 LTNRLMD (LCDR2);
 LQYVDFPYT (LCDR3);
 SSAMS (HCDR1);
 TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); ve
 LISPY (HCDR3); ya da
- (iii) KASQDINSYLT (LCDR1);
 RTNRLFD (LCDR2);
 LQYDDFPYT (LCDR3);
 SSAMS (HCDR1);
 TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2); ve

LISLY (HCDR3).

Bir yapılanmada, mevcut buluşun antikoruna ya da bunun antijen bağlayıcı parçası aşağıdakilere sahiptir:

(i) DITMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVNRL

5 VDGVPSRFSGSGSGQDYALTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTK
VEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge ve
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWSVRQAPGKGLEWV
ATISSGGRSTYYPDSSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR
LISTYWGQGTLLTVSS sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge; ya
10 da

(ii) DIKMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNR

LMDGVPSRFSGSGSGQEFLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGT
KVEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWV
15 ATISSGGRSTYYPDSSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KLISPYWGQGTLLTVSS sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge;
ya da

(iii) (iii)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRT
20 NRLFQDVPSRFSGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGG
GTKLEIK ya da
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYR
TNRLFQDVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQ
GTKVEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
25 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEW
VSTISVGGGKTYYPDSSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KLISLYWGQGTLLTVSS sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge.

Mevcut buluş aynı zamanda, transglutaminaz tip 2'nin (TG2) çekirdek bölgesi içindeki
bir epitopa seçici olarak bağlanan ve insan TG2'nin lizin ve glutamin ile Nε(γ-glutamil)
30 lizin izopeptit ile çapraz bağlanmasını önleyen bir antikor ya da bunun bir antijen
bağlayıcı fragmanı sağlamaktadır, aşağıdakilere sahiptir:

(a) DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLQKPGQSPKFLI
YKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPFTFGG

GTKLEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQGLEWIG
 YINPYNDGAKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSS
 DYWGQGTTLTVSS sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge; ya da

5 (b) DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLL
 IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVAEDLGVIYYCLQVSHVPFTFG
 SGTKLEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGF
 INPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFSSG

10 YWGQGTTLTVSS sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge; ya da

(c) DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFL
 IYKVSRLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISSEVAEDLGVIYYCFQGSHVPFTFGG
 GTKLEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYI
 15 NPYNDGARYNEKFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSD
 YWGQGTTLTVSS sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge; ya da

(d) QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVGYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSN
 LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKL
 ELK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
 20 QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLA
 HIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTA
 PFAFWGQGTLVTVSA sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge; ya da

(e) QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSN
 LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKL
 25 ELK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
 QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLA
 HIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTA
 PFAYWGQGTLVTVSA sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge; ya da

(f) QAWTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIEKPDHLFTGLIAGT
 30 NKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTK
 VTVLG sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHWVKQNLGKSLEWIGY
 INPKNGVIYYNQKFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCATALTYW
 GGQTLVTVSA sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge; ya da

(g) DWMTQTPLTSLVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLRFQRPQGQSPRRL
 IYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPYTFG
 GGTKLEIK sekansını içeren bir hafif zincir değişken bölge, ve
 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMGWI
 5 NTSSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLSKSEDTATYFCARPEVAY
 WGQGTLVTVSA sekansını içeren bir ağır zincir değişken bölge.

- Bir yapılanmada, (a) antikor veya bunun antijen bağlayıcı parçası, sağlam bir antikor içerir ya da bundan oluşur; (b) antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir antijen bağlayıcı parça içerir ya da
- 10 bunlardan oluşur: bir Fv parçası, örnek olarak bir tek zincirli Fv parçası ya da bir disülfür bağlı Fv parçası; bir Fab parçası; ve bir Fab benzeri parçası, örnek olarak bir Fab' parçası ya da bir F(ab)₂ parçası; (c) antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası bir IgG1, IgG2, IgG3 ya da IgG4'tür; ve/ veya (d) antikor ya da bunun antijen bağlayıcı fragmanı, TG1, TG3, TG13 ve/ veya TG7 aktivitesini inhibe etmez.
- 15 Mevcut buluş aynı zamanda, mevcut buluşun bir antikorunu ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçasını kodlayan bir polinükleotit sağlar.

İlave olarak, mevcut buluş, buluşa ait bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını ve bir ilave parçayı, örnek olarak kolay bir şekilde tespit edilebilir olan bir parçayı, ve/ veya doğrudan doğruya ya da dolaylı olarak sitotoksik parçayı içeren bir

20 bileşik sağlar.

Mevcut buluş aynı zamanda, bir farmasötik olarak kabul edilebilir olan ara madde, yardımcı madde, seyreltici ya da taşıyıcıya sahip olan bir karışım içerisinde mevcut buluşun bir antikorunu ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, ya da mevcut buluşun polinükleotidini, ya da mevcut buluşun bir bileşimini, isteğe bağlı olarak bir ya

25 da daha fazla ilave aktif malzeme içeren bir farmasötik bileşim/ formül sağlamakta olup, içerisinde bileşim/ formül damar içi, kas içi ya da deri altından bir hastaya verilmek için formüle edilmiştir.

Mevcut buluş aynı zamanda, mevcut buluşun bir antikorunu ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını ya da mevcut buluşa ait bir polinükleotidi ya da mevcut buluşa

30 ait bir bileşiği ve bir ilave maddeyi içeren parçaların bir kitini sağlar.

Mevcut buluş aynı zamanda, tıpta kullanım için mevcut buluşa ait bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını ya da mevcut buluşa ait bir polinükleotid ya da mevcut buluşa ait bir bileşik sunar.

- 5 İlave olarak, mevcut buluş, Çölyak hastalığı, anormal yara iyileşmesi, skarlaşma, hipertrofik skarlar, oküler skarlaşma, inflamatuvar bağırsak hastalığı, maküler dejenerasyon, sedef hastalığı, fibroz ile ilgili hastalıklar (örnek olarak, karaciğer fibrozu,, interstisyel akciğer hastalığı ve fibrotik akciğer hastalığı gibi pulmoner fibrozis, akciğer fibrozisi, miyelofibroz, glomerüloskleroz ve tübulointerstisyel fibrozis gibi böbrek fibrozu), ateroskleroz, restenoz, inflamatuvar hastalıklar, oto immün
- 10 hastalıklar, nörodejeneratif/ nörolojik hastalıklar (örnek olarak Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, poliglutamin hastalığı, spinobuler müsküler atrofi, dentatorubral pallidoluysian atrofisi, spinocerebellar ataksi 1,2, 3, 6, 7 ve 12, rubropallidal atrofi, spinocerebellar palsy) , Li-Fraumeni sendromunda glioblastom ve sporadik glioblastom gibi blastomlar, malign melanom, pankreatik duktal
- 15 adenokarsinomas, miyeloid lösemi, akut miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom, miyeloproliferatif sendrom, jinekolojik kanser, Kaposi sarkomu, Hansen hastalığı ve/ veya kollajen kolitin, tedavisi ve/ veya teşhis edilmesinde kullanım için, mevcut buluşun bir antikorunu ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, ya da mevcut buluşun bir polinükleotidini, ya da mevcut buluşun bir bileşimini sağlar.
- 20 Mevcut buluş aynı zamanda, TG2 enzim aktivitesini azaltmak ya da inhibe etmek için in vitro bir metot sağlamakta olup, metot mevcut buluşa göre bir antikorun ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının, ya da mevcut buluşun bir polinükleotidinin, ya da mevcut buluşun bir bileşiminin TG2 içeren bir numuneye, örnek olarak TG2 içeren bir doku ya da hücre numunesine verilmesini içermektedir.
- 25 Mevcut buluş aynı zamanda, mevcut buluşun bir antikorunu ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını ya da mevcut buluşa ait bir bileşimi üretmek için bir metot sağlamakta olup, metot mevcut buluşun bir polinükleotidinin eksprese edilmesini içerir.

DETAYLI AÇIKLAMA

- 30 Mevcut açıklama, transglutaminaz tip 2'nin (TG2) çekirdek bölgesi içindeki bir epitopa seçici olarak bağlanan bir antikor ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçasını sağlar.

Sıçan TG2 Amino Asit sekansı:

MAK LAKLNLKLLIIPANGSDITAGLQQXVLEFFQVPLVITGSDPKASVDEWTF-
 APTKPLPRLKAGTNAKVEWDVVERSGNSAFLDQQQNTIADQLCTPAPADVQDTKLEL-
 TPTVYQDSKPTLQHLVLPKLVGTHAVTSTLPRKRPVYVLTQQQVLMQDPAVLTQVYD-
 MFSQNTLSLDAQIMILDTKPLTIDRPTQSPFSSPTQSPVDSMAYNTDQSGALLGR-
 WDAVTSGLPMAWIRPNTDQWELHQLQETGGQNTLAAVATVLEPLVLETHDPT-
 VTHALLQNTLLNTLPTKPYDTKPTESMTANPHLQVLAATPRLTQNTYDQQAIDPT-
 TQKNTALDQDQNTVPAVLSKLTLEDAVLPANALVQLLQDQSSVLSLIDNLL-
 TQSGQLSPTSTGALPDKDITVLETPRSCPRKPTETPANIQLKVALKEVGLANDPQV

QCHSLNDFDFAHICNDTGGSPFQFLLDQFTVBYNQLQPEQDTEINDTLDPVSENG-
 DPLRIITYRNTQSLTENDLPTVPGLLVFAANLYDIARQVLENFSLIHRILQSBHQNP-
 KLVASNALENYVQGLLDQVPTTQAGITVQDPLVYQDPTFACIATPTKMLSPETDGL-
 RRLATNFDQDRIKSRPQYENILITPA*
 5

Fare TG2 Nükleotid sekansı:

Mevcut buluş sahipleri, fareleri insan TG2 çekirdeğinin 143 ila 473 arasında amino asitlerini içeren bir rekombinant protein ile immünize ederek TG2'ye karşı antikorlar geliştirmiştir. Hibridom, TG2 özgüllüğü ve klonlanan uygun herhangi bir aday ile inhibisyon için taranmıştır. Etkinliği ve hedef epitopu hesaplamak için IgG bunlardan

5 saflaştırılmıştır ve bir insan TG2 kütüphanesinin faj gösterimi ile taranması ile haritalanmıştır.

Bir rekombinant TG2 çekirdek proteini kullanılarak TG2'ye karşı antikor üretmeye yönelik mevcut yaklaşım daha önce denenmemiş ve şaşırtıcı bir şekilde TG2 için oldukça seçici olan ve güçlü inhibe edici özellikler sergileyen antikorların TG2'ye

10 izolasyonu ve karakterizasyonuna yol açmıştır. Antikorları TG2'ye yükseltmek için yapılan daha önceki girişimler, transglutaminaz ailesinin diğer üyeleri ile çapraz reaksiyona giren ve bu neden ile klinik kullanım için umut vaat eden antikorları temsil etmeyen nispeten seçici olmayan antikorların izolasyonuna yol açmıştır. Mevcut buluşun antikorları, diğer taraftan, TG2 aktivitesinin ağırlaştırdığı ya da aracılık ettiği

15 hastalıklar için klinik deneyler için umut verici adaylardır.

Mevcut uygulamadaki yaklaşımın, daha önceden üretilmiş olanlardan çok daha etkili antikorların üretilmesine yol açması şaşırtıcıdır. Çekirdek bölgeye immünize ederek, TG2'nin etkili inhibitörü olan antikorları yükseltmenin mümkün olacağının bir garantisi yoktu. Yukarıda belirtildiği gibi, etkili inhibitör olan antikorlar, TG2'nin tıpta etkin bir

20 şekilde kullanılması için yeterince spesifik olmayabilir. Farklı bölgelere (özellikle TG2'nin farklı transglutaminaz ailesi üyeleri arasında hafifçe ayrılan çekirdeğin bölgelerine) karşı antikorların TG2'nin etkili ve seçici inhibitörleri olması şaşırtıcıdır.

Herhangi bir teoriye bağlı kalmaksızın, sadece merkezi çekirdeği kapsayan daha küçük bir proteine antikorları yükseltmek sureti ile, sadece tam uzunluktaki protein

25 üzerinde mevcut olan tercih edilen immünolojik epitopların bir kısmını ortadan kaldırmakla kalmayıp, aynı zamanda çekirdek hedeflemesini zorladığımızı düşünüyoruz. Bu seçim için mevcut olan antikorların çeşitliliğini artırıyor gibi görünmektedir ve çekirdeğin daha geniş kapsamını sağlamaktadır.

Sadece TG2 çekirdeği ile immünizasyon, enzimin üçüncül yapısının çoğunu (özellikle

30 iki karboksi terminal beta varil etki alanları) çıkarılmıştır. Doğal olarak tam uzunluktaki bir TG2 molekülü içinde belki daha az elde edilebilen ya da immünojenik olabilen epitopların bazılarının, burada açıklanan formatta çekirdek ile daha çekici epitoplar olması mümkündür. Burada tarif edilen antikorlar doğrusal epitopları tanımıştır (yani

bir indirgeyici SDS PAGE jeli üzerinde TG2'ye bağlanmıştır), oysa daha önce bir immünojen olarak tam uzunlukta TG2 kullanılarak izole ettiğimiz antikorların % 80'i konformasyona bağımlıydı. Rekombinant çekirdek etki alanının enzim aktivitesini koruduğunu gösterebildik ve bu yüzden inhibitör antikorların izolasyonuna, aktif bölgede ya da yakınında bulunan daha az elverişli epitopların maruz kalmasıyla muhtemelen yardımcı olmuştur. İnsan TG2'ye karşı inhibe edici antikorların, rekombinant çekirdek proteininin tam uzunluktaki protein ile aynı katlama özelliklerini göstermediği göz önüne alındığı zaman, çekirdek ile immünize edilerek yetiştirilmesi ilginç ve şaşırtıcıdır.

- 10 TG katalitik çekirdeği, TG ailesinin üyeleri arasında ve türler arasında büyük ölçüde korunmaktadır. Bu, sadece spesifik küçük molekülü inhibitörlerin değil aynı zamanda antikor bazlı inhibitörlerin geliştirilmesinin teknik açıdan zor olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu açıklama son derece seçici olan antikorlar sağlar. Bunun mümkün olması, bazı heterojenliğin olduğu TG2 katalitik etki alanı
- 15 içerisinde bazı bölgeler olduğu gerçeğini yansıtabilir. Mevcut antikorlar bu nedenle bu küçük farklılıklardan yararlanabilir. Mevcut antikorların şaşırtıcı seçiciliği, TG2 aktivitesine etkili bir şekilde müdahale edebilen terapötiklerin geliştirilmesini mümkün kılabilir ve bu nedenle, hali hazırda tatmin edici bir terapötik seçeneğin bulunmadığı TG2 aktivitesinin kötüleştirdiği ya da neden olduğu koşullar için potansiyel olarak
- 20 etkili tedaviler sağlayabilir.

Karşılaştırma yolu ile, yüksek anti TG2 antikoruna sahip olan üç yetişkin çölyak hastasından alınan numunelerden rekombinant teknoloji ile üretilen WO 2006/100679'da açıklanan antikorların, mevcut buluş sahipleri tarafından test edildiğinde düşük etkili oldukları kanıtlanmıştır (Örnek 2).Mevcut buluşa ait antikorlar,

25 TG2 için seçicilik ve önleyici aktivite açısından WO 2006/100679'dakilere göre daha üstün olmuştur. Örnek olarak, mevcut buluş sahipleri, mevcut buluşa ait antikorlar ile aynı TG2 inhibisyon deneylerinde aynı konsantrasyonda uygulanan WO 2006/100679 antikorunun bir Fab parçasını üretmişlerdir. Testlerdeki Fab parçası miktarı, mevcut buluşa ait antikorlarınkinin molar olarak iki kat olmuştur, ancak yine

30 de herhangi bir TG2 aktivitesinin inhibisyonunu gösterememiştir. Tam boy WO 2006/100679 antikoru, standart putresin ekleme deneyimizde inhibisyon için test edildiği zaman, TG2 aktivitesinde herhangi bir inhibisyon bulunamamıştır. Bu

nedenle, mevcut buluşun metotları ve bu metotlar ile üretilen antikorlar daha önce tarif edilenlerden daha üstündür.

"Antikor" ile, esas olarak sağlam antikor moleküllerini, bunun yanı sıra kimerik antikorları, insanlaştırılmış antikorları, insan antikorlarını (içerisinde en az bir amino asit, doğal olarak oluşan insan antikorlarına göre mutasyona uğramaktadır), tek zincirli antikorları, bispesifik antikorları, antikor ağır zincirlerini, antikor hafif zincirleri, antikor ağır ve/ veya hafif zincirlerinin homodimerleri ve heterodimerleri ve antijen bağlama parçalarını ve bunların türevlerini içermektedir.

Aynı zaman "antikor" ve "bunun antijen bağlayıcı parçaları" anlamında antikorların ve bunların antijen bağlayıcı parçalarının varyantlarını, füzyonlarını ve türevlerini de dahil etmekteyiz. "Antikor" terimi aynı zamanda IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE dahil olmak üzere tüm antikor sınıflarını içerir. Bu nedenle, antikor bir IgG1, IgG2, IgG3 ya da IgG4 molekülü gibi bir IgG molekülü olabilir. Tercihen, buluşa ait antikor bir IgG molekülü ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçası ya da varyantı, füzyon ya da türevidir. Daha tercihen, antikor bir IgG2 molekülüdür.

Burada tarif edilen antikorlar, kompozisyonlar, kullanımlar ve metotlar, tanımlanmış olan antikorların varyantlarını, füzyonlarını ve türevlerini ve bunların varyantlarını, füzyonlarını ve türevlerinin, TG2 için bağlanma özelliğine sahip olması koşulu ile, tanımlanmış antikorların ve bunların antijen bağlayıcı parçalarının bahse konu varyantlarını, füzyonlarını ve türevlerini kapsar.

Antikorlar ve bunların antijen bağlayıcı parçaları, burada tanımlandığı şekli ile antikor ve bunun antijen bağlayıcı parçasının polipeptit bileşeni, varyantları, füzyonları ve türevlerinden bir ya da daha fazlasını içerdiği için, rekombinant polinükleotitlerin kullanılması sureti ile teknikte iyi bilinen protein mühendisliği ve alan hedefli mutajenez metotlarının kullanılması sureti ile yapılmış olabilir (bakınız örnek olarak, bakınız Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Bu nedenle, burada tanımlandığı şekli ile antikoron ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının varyantları, füzyonları ve türevleri, antikoron ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının polipeptit bileşenine dayanarak yapılabilir.

"Füzyon" ile diğer herhangi bir polipeptide kaynaşmış olan bahse konu polipeptidi dahil etmekteyiz. Örnek olarak, bahse konu polipeptit, bahse konu polipeptidin

saflaştırılmasını kolaylaştırmak için glutatyon-S-tranferaz (GST) ya da protein A gibi bir polipeptit ile kaynaşabilir. Bu gibi füzyonların örnekleri, teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinmektedir. Benzer şekilde, bahse konu polipeptit, His6 gibi bir oligo-histidin etiketine ya da iyi bilinen Myc etiket epitopu gibi bir antikör tarafından tanınan bir epitop ile birleştirilebilir. Bahse konu polipeptidin herhangi bir varyantına ya da türevine füzyonlar da dahil edilmiştir. TG2 için bağlanma özgüllüğü gibi arzu edilen özellikleri koruyan füzyonların (ya da bunların varyantları ya da türevlerinin) tercih edileceği takdir edilecektir.

Füzyon, bahse konu polipeptit üzerinde arzu edilen bir özelliği veren bir başka kısım içerebilir ya da bundan oluşabilir; örnek olarak, kısım, polipeptidin saptanmasında ya da izole edilmesinde ya da polipeptidin hücrel olarak alımını teşvik etmede faydalı olabilir. Kısım, teknikte uzman kişilerce iyi bilinenlerin yanı sıra, örnek olarak, bir biyotin kısmı, bir radyoaktif kısım, bir floresan kısım, örnek olarak küçük bir florofores ya da bir yeşil floresan proteini (GFP) florofores olabilir. Parça, teknikte uzman kişiler tarafından bilindiği gibi, bir Myc-etiketi gibi immünojenik bir etiket olabilir ya da teknikte uzman kişiler tarafından bilindiği gibi, polipeptidin hücrel alımını destekleyebilen bir lipofilik molekül ya da polipeptit etki alanı olabilir.

Bahse konu polipeptidin "varyantları" ile bir polipeptide atıfta bulunulmakta olup, içerisinde bir ya da daha fazla konumda, bu nevi değişikliklerin, temel özellikleri, örnek olarak bağlama özellikleri ısı kararlılık, belirli bir pH aralığında aktivite (pH kararlılığı) önemli ölçüde değişmemiş olan bir protein ile sonuçlanması kaydı ile, konservatif olan ya da konservatif olmayan, amino asit araya sokulmaları, silinmeleri, ve/veya ornatımları mevcuttur. Bu bağlamda "önemli ölçüde", teknikte uzman bir kişinin varyant özelliklerinin hala farklı olabileceğini söyleyebileceği, ancak orijinal proteinin özelliklerinden açıkça anlaşılmayacağı anlamına gelir. Bu nedenle, bu nevi değişikliklerin bahse konu polipeptidin aktivitesinin büyük ölçüde değiştirmediği durumlarda polipeptidin varyantlarını dahil etmekteyiz. Özellikle, bu tür değişikliklerin TG2 için bağlanma özelliğini önemli ölçüde değiştirmediği durumlarda polipeptit varyantlarını dahil etmekteyiz.

"Konservatif ornatımlar" ile Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; ve Phe, Tyr gibileri kast edilmektedir.

Bu nevi varyantlar, protein mühendisliği ve alan hedefli mutajenez metotları kullanılarak yapılabilir.

Poliipeptit varyantı, burada belirtilmiş olan bir ya da daha fazla amino asit sekansı ile en az % 75 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansına, örnek olarak en az % 80, en az % 90, en az % 95, en az % 96, en az % 97, en az % 98 ya da en az % 99 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansına sahip olabilir.

- 5 İki polipeptit arasındaki yüzde sekans özdeşliği, uygun bilgisayar programları kullanılarak, örnek olarak Wisconsin Üniversitesi Genetik Hesaplama Grubunun GAP programı kullanılarak belirlenebilir ve yüzde özdeşliğinin, sekansları optimal bir şekilde hizalanmış olan polipeptitler ile ilgili olarak hesaplandığı takdir edilecektir.

Hizalama alternatif olarak Clustal W programı kullanılarak da yapılabilir (Thompson et al., 1994, Nucl. Acid Res. 22:4673-4680'de tarif edildiği gibi).

Kullanılan parametreler aşağıdaki gibi olabilir:

- Hızlı çift bazlı hizalama parametreleri: K-tuple (kelime) büyüklüğü; 1, pencere boyutu; 5, boşluk cezası; 3, üst köşegenlerin sayısı; 5. Puanlama metodu: yüzde x.
- 15 - Çoklu hizalama parametreleri: boşluk açık ceza; 10, boşluk uzatma cezası; 0.05.
- Puanlama matrisi: BLOSUM.

Alternatif olarak, BESTFIT programı da yerel sekans hizalamalarını belirlemek için kullanılabilir.

- 20 Buluşun metotlarında veya kullanımlarında kullanılan antikor, antijen bağlayıcı parça, varyant, füzyon ya da türev, modifiye edilmiş ya da türevlenmiş olan bir ya da daha fazla amino asit içerebilir ya da bunlardan oluşabilir.

Bir ya da daha fazla amino asidin kimyasal türevleri, fonksiyonel bir yan grup ile reaksiyon yolu ile elde edilebilir. Bu nevi türevlenmiş olan moleküller, örnek olarak, serbest amino gruplarının, amin hidrokloridleri, p-toluen sülfonil gruplarını, 25 karboksibenzoksi gruplarını, f-bütiloksikarbonil gruplarını, kloroasetil gruplarını ya da formil gruplarını oluşturmak üzere türevlendiği molekülleri içerir. Serbest karboksil grupları, tuzları, metil ve etil esterleri ya da diğer ester ve hidrazit türlerini oluşturmak için türevlendirilebilir. Serbest hidroksil grupları, O-asil ya da O-alkil türevleri 30 oluşturmak için türevlendirilebilir. Aynı zamanda kimyasal türevler olarak dahil edilenler, yirmi standart amino asidin doğal olarak oluşan amino asit türevlerini içeren peptitlerdir. Örnek olarak: 4-hidroksiprolin, prolin ile ornatılabilir; 5-hidroksilizin, lizin

ile ornatılabilir; 3-metilhistidin, histidin ile ornatılabilir; homoserin, serin ile ornatılabilir ve ornitini lizin ile ornatılabilir. Türevler aynı zamanda, gerekli aktivite sürdürüldüğü sürece bir ya da daha fazla ekleme ya da silme içeren peptitleri de içerir. Dahil edilen diğer modifikasyonlar amidasyon, amino terminal asilasyonu (örnek olarak asetilasyon ya da tiyoglikolik asit amidasyonu), terminal karboksilamidasyon (örnek olarak, amonyak ya da metilamin ile) ve benzer terminal modifikasyonlarıdır.

Teknikte uzman kişiler tarafından ilave olarak peptidomimetik bileşiklerin de faydalı olabileceği takdir edilecektir. Bu nedenle, 'polipeptit' ile TG2 çekirdek bölgesi içindeki bir epitopa bağlanabilen peptidomimetik bileşikler içerilmektedir. 'Peptidomimetik' terimi, bir terapötik madde olarak belirli bir peptidin konformasyonunu ve arzu edilebilir olan özelliklerini taklit eden bir bileşiği ifade eder.

Örnek olarak, bahse konu polipeptit yalnızca amino asit kalıntılarının peptit (-CO-NH-) bağları ile birleştirildiği molekülleri değil, aynı zamanda peptit bağının tersine çevrildiği molekülleri içerir. Bu gibi geri ters peptidomimetikler, örnek olarak Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237'da tarif edilenler gibi teknikte bilinen metotların kullanılması sureti ile yapılabilir. Bu yaklaşım, yan zincirlerin oryantasyonunu değil, omurgayı içeren değişiklikleri içeren sahte peptitlerin yapılmasını içerir. CO-NH peptit bağları yerine NH-CO bağları içeren geri ters peptitler, proteolize karşı çok daha dirençlidir. Alternatif olarak, bahse konu polipeptit, amino asit kalıntılarının bir ya da daha fazlasının, geleneksel amid bağı yerine bir - γ (CH₂NH)- bağı ile bağlandığı bir peptidomimetik bileşik olabilir.

Başka bir alternatifte, amino asit kalıntılarının karbon atomları arasındaki boşluğu tutan uygun bir bağlayıcı kısım kullanılması şartı ile, peptit bağı tamamen dağıtılabilir; bağlayıcı kısmının büyük ölçüde aynı yük dağılımına ve büyük ölçüde bir peptit bağı ile aynı düzlemde olması avantajlı olabilir.

Bahse konu polipeptidin, ekso proteolitik sindirime karşı duyarlılığı azaltmaya yardımcı olmak için N ya da C terminalinde kolay bir şekilde bloke edilebileceği takdir edilecektir.

Memeli peptitlerini değiştirmek için D-amino asitleri ve N-metil amino asitleri gibi çeşitli kodlanmamış ya da değiştirilmiş amino asitler de aynı zamanda kullanılmıştır. İlave olarak, bir farz edilen biyoaktif konformasyon, laktam ya da köprülerin diğer türleri gibi bir kovalent modifikasyon tarafından stabilize edilebilir, örnek olarak

bakınız, Veber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2636 and Thursell et al., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111:166.

Sentetik stratejilerin çoğu arasında ortak bir tema, bazı siklik kısımların peptit bazlı bir çerçeveye sokulması olmuştur. Siklik kısım, peptit yapısının konformasyonel alanını sınırlandırır ve bu, sıklıkla belirli bir biyolojik reseptör için peptidin spesifikliğini artırması ile sonuçlanır. Bu stratejinin ilave edilmiş olan bir avantajı, bir siklik kısmın bir peptide dahil edilmesinin, peptidin, hücrel peptidazlara karşı azalan bir hassasiyete sahip olmasına yol açmasıdır.

Bu nedenle, buluşun metotlarında ve kullanımlarında yararlı olan örnek polipeptitler, terminal sistein amino asitlerini içerir ya da bunlardan oluşur. Bu tür bir polipeptit, terminal sistein amino asitlerinde merkaptid gruplarının disülfid bağ oluşumu ile ya da terminal amino asitler arasında amid peptit bağ oluşumu ile homodetik bir formda heterodetik bir siklik formda bulunabilir. Yukarıda belirtildiği gibi, küçük peptitlerin N- ve C-terminal sisteinler arasında disülfid ya da amid bağları vasıtası ile siklize edilmesi, proteolizi azaltarak ve aynı zamanda yapının sertliğini artırarak, doğrusal peptidler ile gözlemlenen belirli özgüllük ve yarı-ömür problemlerini aşabilir, bu da daha yüksek özgüllüğe sahip olan bileşikler verir. Disülfür bağları ile siklize edilmiş olan polipeptitler, serbest amino ve karboksi terminallerine sahiptir, bunlar proteolitik bozulmaya karşı hala hassas olabilirler, ancak N-terminal amin ve C-terminal karboksil arasında bir amid bağı oluşması ile siklize edilir ve artık serbest amino ya da karboksi termini içermezler. Bu nedenle, peptitler bir C-N bağı ya da bir disülfür bağı ile bağlanabilir.

Mevcut buluş, herhangi bir şekilde, peptitlerin siklizasyon metodu ile sınırlı değildir, ancak siklik yapısı, uygun herhangi bir sentez metodu ile elde edilebilen peptitleri kapsar. Bu nedenle, heterodetik bağlantılar disülfid, alkilen ya da sülfür köprüleri yolu ile oluşumları içerebilir, ancak bunlar ile sınırlı değildir. Disülfid, sülfid ve alkilen köprüleri dahil olmak üzere siklik homodetik peptidlerin ve siklik heterodetik peptitlerin sentez metotları US 5,643,872'de açıklanmaktadır. Diğer siklizasyon metotları örnekleri US 6.008.058'de tartışılmış ve açıklanmıştır.

Siklik stabilize edilmiş olan peptidomimetik bileşiklerin sentezine bir başka yaklaşım halka kapama metatezidir (ROM). Bu metot, bir peptit öncü maddesini sentezleme ve konformasyonel olarak kısıtlanmış olan bir peptit verecek şekilde bir ROM katalizörü ile temas ettirmeyi içerir. Uygun peptit öncü maddeleri iki ya da daha fazla doymamış

C-C bağı içerebilir. Metot, katı faz-peptit sentez teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bu yapılanmada, katı bir desteğe tutturulmuş olan öncü madde bir RCM katalizörü ile temas ettirilir ve ürün daha sonra konformasyonel olarak kısıtlanmış olan bir peptit elde etmek için katı destekten ayrılır.

- 5 DH Richea Proteaz İnhibitörleri, Barrett ve Selveson, ed., Elsevier (1986) tarafından açıklanan başka bir yaklaşım, geçiş durumu analoğu konseptinin enzim inhibitör tasarımıyla uygulanması ile peptit taklitleri dizayn etmek olmuştur. Örnek olarak, stalinin sekonder alkolünün, pepsin substratının kesilebilir olan amid bağının tetrahedral geçiş durumunu taklit ettiği bilinmektedir.
- 10 Özetle, terminal modifikasyonları, iyi bilindiği gibi, proteinaz sindirimi ile duyarlılığı azaltmak ve dolayısı ile çözümlerdeki, özellikle proteazların mevcut olabileceği biyolojik sıvılarda peptitlerin yarı ömrünü uzatmak için faydalıdır. Polipeptit siklizasyonu aynı zamanda siklizasyonun oluşturduğu stabil yapılar ve siklik peptidler için gözlenen biyolojik aktiviteler nedeni ile de faydalı bir modifikasyondur.
- 15 Bu nedenle, bahse konu polipeptit siklik olabilir. Bununla birlikte, alternatif olarak, bahse konu polipeptit doğrusal olabilir.

- “TG2'nin çekirdek bölgesi içindeki bir epitopa seçici olarak bağlanır” ile, TG2 çekirdek bölgesinde seçici olarak bir epitopa bağlanabilen bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçası kastedilmektedir. “Seçici olarak bağlanabilme” ile, TG2
- 20 çekirdeğine diğer proteinlere göre en az 10 kat daha güçlü örnek olarak, en az 50 kat daha güçlü ya da en az 100 kat daha güçlü bağlanan bu antikor türevli bağlanma kısımlarını dahil etmekteyiz. Bağlanma kısmı, fizyolojik koşullar altında, örnek olarak in vivo olarak TG2 çekirdeğindeki bir epitopa seçici olarak bağlanabilir.

- Bu bağlanma özgüllüğü, enzim bağlı olan immüno sorbent deneyi (ELISA), immüno
- 25 histokimya, immüno çökeltme, western blot ve TG2 ya da TG2 çekirdeğini ya da bunun bir parçasını eksprese eden transfekte edilmiş olan hücrelerin kullanıldığı akış sitometrisi gibi teknikte iyi bilinen metotlar ile belirlenebilir. Bağlı bağlanma güçlerini ölçmek için uygun olan metotlar, örnek olarak bağlanma kısmının bir antikor olduğu
- bağışıklık tahlillerini içerir (bakınız Harlow & Lane, “Antibodies: A Laboratory
- 30 Manual”, Cold Spring Habor Laboratory Press, New York). Alternatif olarak bağlanma, rekabetçi analizler kullanılarak ya da Biacore® analizi kullanılarak değerlendirilebilir (Biacore International AB, İsveç).

Buluşa ait antikorun ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının, sadece TG2'ye bağlanması tercih edilir.

Teknikte uzman kişiler tarafından, bir antikorun ya da bunun antijen bağlama parçasının bağlanma özgüllüğünün, kurucu ağır ve hafif zincirlerin değişken bölgelerinde bütünüleyicilik belirleyici bölgelerin (CDR'ler) mevcudiyeti ile sağlandığı takdir edilecektir. Aşağıda tartışıldığı gibi, açıklamanın özellikle tercih edilen bir yönünde, TG2 için bağlanma özgüllüğü, tanımlanan CDR'lerin birinin ya da daha fazlasının mevcudiyeti ile sağlanır. Örnek olarak, AB-1 VL ve VH'nin CDR sekanslarını içerebilen ya da bunlardan oluşabilen sekanslar arasında KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG ve LISLY bulunur. Başka bir örnekte, BB-7 VL ve VH'nin CDR sekanslarını içerebilen ya da bunlardan oluşabilen sekanslar arasında KASQDINSYLT, LTNRLMD, LQYVDFPYT, SSAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG ve LISPY bulunur. Örnek olarak, DC-1 VL ve VH'nin CDR sekanslarını içerebilen ya da bunlardan oluşabilen sekanslar arasında KASQDINSYLT, LVNRLVD, LQYDDFPYT, THAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG, and LISTY bulunur. Burada tarif edilen antikorların ve bunların antijen bağlayıcı parçalarının, Tablo 24A'da tanımlandığı gibi CDR sekansları ya da CDR ve yan sekansları içermesi ya da bunlardan oluşması tercih edilir. Burada tanımlanan antikorların ve bunların antijen bağlayıcı parçalarının, örnek antikor AB-1 ya da BB-7 ya da DC-1'in CDR sekanslarını ya da CDR ve yan sekanslarını içermesi ya da bunlardan oluşması tercih edilir (örnek olarak, Tablo 24A'da tarif edildiği şekilde).

Antikorun ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının, orijinal antikorun TG2'si için bağlanma özgüllüğünü koruması tercih edilir. "Bağlanma özgüllüğünü koruyarak" derken, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının TG2'ye bağlanma konusunda buluşa ait örnek antikorlar ile, örneğin AB-1, AG-1, AG-9, AH. 1, AH-3, BB-7, DC-1, EH-6, JE-12, IA-12, DF-4, DH-2, DD-6 ve/ veya DD-9 (beraberindeki Orneklere bakınız) rekabet edebilme kapasitesinde olduğu kastedilmektedir. Örnek olarak, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki sekansları içeren bir antikor olarak TG2 üzerindeki aynı epitopa bağlanabilir: KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG ve LISLY.

Burada "epitop" ile, bir antikorun bağlandığı bir molekül bölgesi, yani bir antijenin moleküler bölgesi anlamına gelir. Bir epitop, örnek olarak amino asit sekansı, yani

birincil yapı, ya da örnek olarak bir peptit zincirinin beta tabakasına ya da alfa heliseline katlanması gibi ikincil yapı tarafından tanımlanan üç boyutlu bir epitop, ya da, örnek olarak, bir antijenin üç boyutlu bir yapısını vermek için helislerin ya da tabakaların katlandığı ya da tanzim edildiği yol olan üçüncül yapı ile belirlenmiş olan

5 doğrusal bir epitop olabilir.

Bir test antikorunun ikinci antikor ile bağlanma için rekabet edip etmediğini belirlemek için metotlar teknikte iyi bilinmektedir (örnek olarak, sandviç ELISA ya da ters sandviç ELISA teknikleri gibi) ve örnek olarak, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow & Lane (1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2)'da tarif edilmiştir.

- 10 TG2 çekirdek bölgesindeki bir epitop için bağlanma özgüllüğü ile birlikte antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aynı zamanda orijinal antikor ile (Örneklere sağlanan örnek antikorlar gibi) aynı biyolojik özelliklerin birini ya da daha fazlasını da tutabilir.

- Yukarıda açıklandığı gibi, TG2, lizin ile glutamin kalıntıları arasında Nε-(γ-glutamil) lizin izopeptit bağlarının oluşumunu katalize eden kalsiyum bağımlı çok fonksiyonlu bir proteindir. TG2, bağlanma bölgeleri (örnek olarak fibronektin) ve enzim dışı aktarımı için gerekli sekansları içeren bir N terminal beta sandviç etki alanını içerir. Bu, katalitik çekirdek etki alanına bağlanır. Etki alanının merkezinde, Cys 277, Asp 358 ve His 355'ten oluşan bir katalitik triad ve ayrıca birkaç varsayılan kalsiyum
- 15 bağlama bölgesi bulunur. Bu, üçüncü etki alanına, bir GTP bağlanma sahasının enzimi GTPase aktivitesiyle iletmek için bulunduğu beta varil 1'e bağlanır. Beta varil 1 aynı zamanda hücre adezyonunda kullanılan bir integrin bağlama bölgesi içerir. Beta Varil 1 ve dördüncü TG2 etki alanı, Beta varil 2, aktivasyonu için gerekli olan TG2'deki konformasyonel değişime dahil olur. Yüksek kalsiyumlu bir düşük GTP ortamında Varil 1 ve 2, aktivasyonu sağlayan katalitik çekirdeği açan doğrusal bir
- 20 yapıya sahip TG2'yi iletmek için, aktivasyona izin verecek şekilde, kapalı ve katlanmış inaktif formdan aşağı doğru salınır (Pinkas et al (2007) PLoS Biol. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. 5(12): e327).

- 30 “Transglutaminaz tip 2'nin (TG2) çekirdek bölgesi” ile, beta sandviç etki alanı ve beta varilleri 1 ve 2 hariç olmak üzere yukarıda açıklanan katalitik triadı içeren bir TG2 bölgesini dahil etmekteyiz. Tercihen çekirdek bölgesi, insan TG2'sinin 143 ila 473 arasındaki amino asitlerini veya bunların bir parçasını içerir ya da bundan oluşur.

İnsan TG2'sinin 143 ila 473 arasındaki amino asitleri aşağıdaki sekanstan oluşur:

[illegible]

Bu nedenle, çekirdek bölgesi, insan TG2'sinin 143 ila 473 arasındaki amino asitlerinden oluşabilir. Antikoron epitopu, insan TG2'nin 143 ila 473 arasındaki amino

5 asitleri tarafından tanımlanan bölge içinde herhangi bir epitop olabilir. Bu nedenle, epitop, bu sekansın bir parçası olabilir ya da birincil amino asit yapısı içerisinde biri
diğerine bitişik olmayabilecek olan fakat teknikte uzman bir kişi tarafından
anlaşılacağı üzere, ikincil, üçüncül ya da hatta dördüncül yapıda birinin yeri
diğerinden belirlenebilecek olan bu parça içerisindeki çeşitli amino asit kalıntılarından
10 yapılmış olabilir.

Antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, tamamen ya da kısmen insan TG2'nin 304 ile 326 arasındaki amino asitlerini içeren bir bölgeye seçici olarak bağlanabilir. Bu bölge (insan TG2'nin 304 ile 326 arasındaki amino asitleri), Şekil 5'te Grup 1 olarak adlandırılır ve AHDQNSNLLIEYFRNEFGELQGD amino asit sekansını içerir.

15 Antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, tamamen ya da kısmen insan TG2'nin 351 ile 365 arasındaki amino asitlerini içeren bir bölgeye seçici olarak bağlanabilir. Bu bölge (insan TG2'nin 351 ile 365 arasındaki amino asitleri), Şekil 5'te Grup 2 olarak adlandırılır ve YEGWQALDPTPQEKs amino asit sekansını içerir.

Antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, tamamen ya da kısmen insan TG2'nin 450 ile 467 arasındaki amino asitlerini içeren bir bölgeye seçici olarak bağlanabilir. Bu bölge (insan TG2'nin 450 ile 467 arasındaki amino asitleri), Şekil 5'te Grup 2 olarak adlandırılır ve SEEREAFTRANHLNKLAE amino asit sekansını içerir.

Buluşun antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, insan TG2 aktivitesini inhibe eder.

25 Açıklamanın bir antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı fragmanı, aşağıdaki amino asit sekanslarından bir ya da daha fazlasını içerebilir:

KASQDINSYLT; ve/ veya

RTNRLFD; ve/ veya

LQYDDFPYT; ve/ veya

SSAMS; ve/ veya

- 5 TISVGGGKTYYPDSVKG; ve/ veya
LISLY.

Antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı fragmanı, aşağıdaki amino asit sekanslarından bir ya da daha fazlasını içerebilir:

TCKASQDINSYLTWF; ve/ veya

- 10 TLIYRTNRLFDGVP ya da TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; ve/ veya
YCLQYDDFPYTFG; ve/ veya

FTLSSSAMS WVR ya da CXAXXFTLSSSAMS WVR; ve/ veya

WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ya da

WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXL; ve/ veya

- 15 YCAKLISLYWG olup içerisinde X herhangi bir amino asittir.

Hemen önündeki sekansların, örnek AB-1 antikorunun hafif ve ağır değişken bölgelerinin bütünüyle belirleyici bölgelerini ve (bakınız Örnek 1) ve AB-1 antikorunun belirli insanlaştırılmış varyantlarını içerdiği kabul edilir. Açıklamanın bir antikoru

- 20 KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXLQYDDFPYT; ya da
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFX; ya da
RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXFX; ya da FXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT
amino asit sekansını içerebilir olup, içerisinde X herhangi bir amino asittir.

- 25 Antikor ya da bunun antijen bağlayıcı kısmı TCKASQDINSYLTWF ya da
TCKASQDINSYLTWY; ve/ veya LLIYRTNRLFDGVP ya da SLIYRTNRLFDGVP ya
da LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF ya da
SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; ve/ veya YCLQYDDFPYTFG; ve/ veya
FTFSSSAMS WVR ya da CXAXXFTFSSSAMS WVR; ve/ veya

WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ya da
WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXL; ve/ veya YCAKLISLYWG amino
asit sekansını içerebilir olup, içerisinde X herhangi bir amino asittir.

Buluşun bir antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki sekansları
5 içeren en az bir hafif zincir değişken bölgeye sahip olabilir: KASQDINSYLT; ve
RTNRLFD; ve LQYDDFPYT ve aşağıdaki dizileri içeren en az bir ağır zincir değişken
bölgesini içerebilir: SSAMS; ve TISVGGGKTYYPDSVKG; ve LISLY.

Buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki
10 amino asit sekanslarını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgeye sahip olabilir:
DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGGTKLEIK ya da
DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGGTKLEIK. Bu hafif
15 zincir değişken bölgeleri, örnek antikor AB-1'de bulunan ile aynıdır (Şekil 7 ve 18).

Alternatif olarak, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki amino asit
sekanslarını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgeye sahip olabilir:
EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGGTKLEIK (AB
20 1_VK) ya da
DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGGTKLEIK (AB
1_VK1).

Özellikler tercihe edilen bir yapılanmada, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı
25 parçası, aşağıdaki amino asit sekanslarını içeren en az bir hafif zincir değişken
bölgeye sahip olabilir:
EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGV
PSRFSGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGGTKLEIK (hAB-
1_RKE); ya da
30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK (hAB-

1_RKJ).Bu sekanslar yukarıda verilen AB-1 hafif zincir sekanslarının insanlaştırılmış varyantlarıdır.

Buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki amino asit sekanslarını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgeye sahip olabilir:

5 EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT
VSS ya da
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT
10 VSS.Bu ağır zincir değişken bölgeleri, örnek antikor AB-1'de bulunan ile aynıdır
(Şekil 7 ve 18).

Alternatif olarak, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki amino asit sekanslarını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgeye sahip olabilir:

15 EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT
VSS (AB-1_H)

Ozellikler tercihe edilen bir yapılanmada, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki amino asit sekanslarını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgeye sahip olabilir:

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTLVT
VSS (hAB-1_HA).Bu sekans yukarıda verilen AB-1 ağır zincir dizisinin insanlaştırılmış bir varyantıdır.

Bu nedenle, bir yapılanmada, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının
25 şunlara sahip olabileceği öngörülmektedir:

i) DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTSSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGG
TKLEIK ya da
DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYR
30 TNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTSSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFG
GGTKLEIK, ya da
EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT

- NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGG
 GTKLEIK (AB-1_VK), ya da
 DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYR
 TNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFG
 5 GGKLEIK (AB-1_VK1), ya da
 EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRT
 NRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFGTYICLQYDDFPYTFGG
 GTKLEIK (hAB-1_RKE)), ya da
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYR
 10 TNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQ
 GTKVEIK (hAB-1_RKJ) amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir
 değişken bölgesi; ve
- ii) EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATI
 SVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLI
 15 SLYWGQGTTTLTVSS ya da
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWV
 ATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCA
 KLISLYWGQGTTTLTVSS, ya da
 EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWV
 20 ATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCA
 KLISLYWGQGTTTLTVSS (AB-1_VH), ya da
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEW
 VSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
 KLISLYWGQGTLLTVSS (hAB-1_RHA) amino asit sekansını içeren en az
 25 bir ağır zincir değişken bölgesi.

Açıklamanın bir antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı fragmanı, aşağıdaki amino asit sekanslarından bir ya da daha fazlasını içerebilir:

- KASQDINSYLT; ve/ veya
 LTNRLMD; ve/ veya
 30 LQYVDFPYT; ve/ veya
 SSAMS; ve/ veya
 TISSGGRSTYYPDSVKG; ve/ veya

LISPY.

Hemen önündeki sekansların, örnek BB-7 antikorunun hafif ve ağır değişken bölgelerinin bütünleyicilik belirleyici bölgelerini içerdiği kabul edilir (bakınız Şekil 19).
Antikor

5 KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXLTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXLQYVDFPYT; ya da
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; ya da
LTNRLMDXXXXXXXXXXXXF; ya da FXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYVDFPYT
amino asit sekansını içerebilir olup, içerisinde X herhangi bir amino asittir.

10 Buluşun bir antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki sekansları içeren en az bir hafif zincir değişken bölgeye sahip olabilir: KASQDINSYLT; ve LTNRLMD; ve LQYVDFPYT ve aşağıdaki dizileri içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesini içerebilir: SSAMS; ve TISSGGRSTYYPDSVKG; ve LISPY.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki amino asit sekanslarını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgeye sahip olabilir:

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFFQKPGKSPKTLIYLTNRLMDG
VPSRFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK. Bu hafif zincir değişken bölgeleri, örnek antikor BB-7'de bulunan ile aynıdır (Şekil 19).

20 Mevcut buluşa ait bir yapılanmada, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRS EDTAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVS S amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir. Bu ağır zincir değişken bölgesi örnek antikor BB-7'de bulunan ile aynıdır (Şekil 19).

25 Bu nedenle, mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının şunlara sahip olabileceği öngörülmektedir:

i) AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFFQKPGKSPKTLIYLTNR
LMDGVPSRFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGT
KLEIK amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgesi;

30 ve

ii) AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSAMSWVRQTPEKRLEWVATIS
SGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRS EDTAIYYCAKLISP

YWGQGTTLTVSS amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesi.

İlave olarak, mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının şunlara sahip olabileceği öngörülmektedir:

5 i) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKAPKSLIYLTNR
LMDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGT
KVEIK ya da
DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWVQQKPGKAPKTLIYLT
NRLMDGVPSRFSGSGSGQEFLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQ
10 GTKVEIK amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgesi; ve/ veya

ii) EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS WVRQAPGKGLEWVST
ISSGGRSTYYPD SVKGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI
SPYWGQGTLVTVSS ya da
15 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMS WVRQAPGKGLEWV
ATISSGGRSTYYPD SVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KLISPYWGQGTLVTVSS amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesi. Bu sekanslar, insanlaştırılmış antikor BB-7 varyantlarına karşılık gelir (bakınız Tablo 23, 24 ve 24A).

20 Açıklamanın bir antikoru ya da bunun burada tarif edilen antijen bağlayıcı fragmanı, aşağıdaki amino asit sekanslarından bir ya da daha fazlasını içerebilir:

KASQDINSYLT; ve/ veya

LVNRLVD; ve/ veya

LQYDDFPYT ve/ veya

25 THAMS; ve/ veya

TISSGGRSTYYPD SVKG; ve/ veya

LISTY.

Hemen önündeki sekansların, örnek antikor DC-1'in hafif ve ağır değişken bölgelerinin bütünleyicilik belirleyici bölgelerini içerdiği kabul edilir (bakınız Şekil 20).

30 Antikor

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXLVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXLQYDDFPYT; ya da
 KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXA; ya da
 LVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXXXA; ya da AXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT
 amino asit sekansını içerebilir olup, içerisinde X herhangi bir amino asittir.

- 5 Buluşun bir antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki sekansları içeren en az bir hafif zincir değişken bölgeye sahip olabilir: KASQDINSYLT; ve LVNRLVD; ve LQYDDFPYT ve aşağıdaki dizileri içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesini içerebilir: THAMS; ve TISSGGRSTYYPDSVKG; ve LISTY.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası,
 10 DITMTQSPSSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDGV
 PSRFSGSGSGQDYALTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK amino asit
 sekanslarını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgeye sahip olabilir. Bu hafif zincir
 değişken bölgeleri, örnek antikor DC-1'de bulunan ile aynıdır (Şekil 20).

Mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası,
 15 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGG
 RSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNLTLYQLSSLRSEDATVYFCARLISTYWGQGTTLTV
 SS amino asit sekanslarını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgeye sahip olabilir.
 Bu ağır zincir değişken bölgeleri, örnek antikor DC-1'de bulunan ile aynıdır (Şekil 20).

Bu nedenle, mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen
 20 bağlayıcı parçasının şunlara sahip olabileceği öngörülmektedir:

- i) DITMTQSPSSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRL
 VDGVPSTRFSGSGSGQDYALTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGK
 LEIK amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgesi; ve
- ii) EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWVRQTPEKRLEWVATI
 25 SSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNLTLYQLSSLRSEDATVYFCARLI
 TYWGQGTTLTVS amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir
 değişken bölgesi.

İlave olarak, mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen
 bağlayıcı parçasının şunlara sahip olabileceği öngörülmektedir:

- i) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLVNR
 30 LVDGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGT
 KVEIK ya da

DITMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFFQKPGKAPKILIYLV
 NRLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQ
 GTKVEIK amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken
 bölgesi; ve/ veya

- 5 ii) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMSWEVRQAPGKGLEWVST
 ISSGGRSTYYPDSEVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI
 STYWGQGTLVTVSS ya da
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWEVRQAPGKGLEWV
 ATISSGGRSTYYPDSEVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR
 10 LISTYWGQGTLVTVSS amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir
 değişken bölgesi. Bu sekanslar, Tablo 23, 24 ve 24A'da verilen
 insanlaştırılmış DC-1 varyantları ile aynıdır.

Açıklamanın bir antikoru ya da bunun burada tarif edilen antijen bağlayıcı fragmanı,
 aşağıdaki amino asit sekanslarından bir ya da daha fazlasını içerebilir:

- 15 KASQDINSYLT; ve/ veya
 XXNRLXD; ve/ veya
 LQYXDFPYT; ve/ veya
 XXAMS; ve/ veya
 TISXGGXXTYYPDSVKG; ve/ veya

- 20 LISXY olup içerisinde X herhangi bir amino asittir.

Açıklamanın bir antikoru ya da bunun burada tarif edilen antijen bağlayıcı fragmanı,
 aşağıdaki amino asit sekanslarından bir ya da daha fazlasını içerebilir:

- (K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); ve/ veya
 (R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); ve/ veya
 25 (L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; ve/ veya
 (S/T)(S/H/Y)AMS; ve/ veya
 (T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYYP(P/A)DSVKG; ve/ veya
 (L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

Burada tarif edilen bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, QIVLTQSPAİMSASPGEKVTMTCSASSSVDMYQKPGSSPRLLIYDTSNLASG VPVRFSGSGSGTSYSLTİSRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgesine sahip olabilir. Bu hafif zincir değişken bölgeleri, örnek antikör DD-9'da bulunan ile aynıdır (Şekil 25).

Burada tarif edilen bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWD DDKRYNPSLKSRTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGT LVTVSA amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir. Bu ağır zincir değişken bölgeleri, örnek antikör DD-9'da bulunan ile aynıdır (Şekil 25).

Mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının şunlara sahip olabileceği öngörülmektedir:

i) QIVLTQSPAİMSASPGEKVTMTCSASSSVDMYQKPGSSPRLLIYDTSN LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTİSRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAG TKLELK amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgesi; ve

ii) QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLA HIYWDDDKRYNPSLKSRTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWT TAPFAFWGQGT LVTVSA amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesi.

Burada tarif edilen bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçası QIVLTQSPAİMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYQKPGSSPRLLIYDTSNLASG VPVRFSGSGSGTSYSLTİSRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgesini içerebilir. Bu hafif zincir değişken bölgeleri, örnek antikör DH-2'de bulunan ile aynıdır (Şekil 25).

Burada tarif edilen bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD DDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGT LVTVSA amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesine sahip olabilir. Bu ağır zincir değişken bölgeleri, örnek antikör DH-2'de bulunan ile aynıdır (Şekil 25).

Mevcut buluşun bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının şunlara sahip olabileceği öngörülmektedir:

i) QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSN
LASGVPVRFSGSGSGTSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGT

5 KLELK amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgesi;
ve

ii) QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLA
HIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSG
TTAPFAYWGQGTLLTVSA amino asit sekansını içeren en az bir ağır

10 zincir değişken bölgesi.

Bu nedenle, bir, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının şunlara sahip olabileceği öngörülmektedir:

i) Şekiller 18 ila 28 arasındakilerden herhangi birinde sağlanan VK dizilerinin
herhangi biri ile aynı olan bir amino asit sekansını içeren en az bir hafif
15 zincir değişken bölgesi; ve/ veya

ii) Şekiller 18 ila 28 arasındakilerden herhangi birinde sağlanan VH dizilerinin
herhangi biri ile aynı olan bir amino asit sekansını ya da bunun bir
parçasını, varyantını ya da türevini içeren en az bir ağır zincir değişken
bölgesi.

20 Yukarıda belirtildiği gibi, daha önceki açıklamanın antikorunun ya da bunun antijen
bağlayıcı parçasının yukarıda verilen amino asit sekanslarının bir ya da daha fazlası
ile en az % 75 özdeşliğine sahip olan, örnek olarak, yukarıda belirtilen amino asit
sekanslarının bir ya da daha fazlası ile en az % 80, en az % 90, en az % 95, en az %
96, en az % 97, en az % 98, ya da en az % 99 özdeşliğe sahip olan bir amino asit
25 sekansını içerebilir. Aynı zamanda, antikor ya da antijen bağlayıcı parçanın 1,2, 3, 4,
5, 6, 7, 8, 9, 10 ya da daha fazla ekleme, silme, konservatif ornatımlar ve/ veya
konservatif olmayan ornatımlar içerebileceği öngörülmektedir.

Aynı zamanda burada tarif edilen, aşağıdaki amino asit sekanslarının birini ya da
daha fazlasını içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçasıdır:

30 KASQDINSYLT; ve/ veya

XXNRLXD; ve/ veya

LQYXDFPYT; ve/ veya

XXAMS; ve/ veya

TISXGGXXTYYPDSVKG; ve/ veya

LISXY olup içerisinde X herhangi bir amino asittir.

- 5 İlave olarak burada tarif edilen, aşağıdaki amino asit sekanslarının birini ya da daha fazlasını içeren bir antikör ya da bunun antijen bağlayan bir parçasıdır:

(K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); ve/ veya

(R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); ve/ veya

(L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; ve/ veya

- 10 (S/T)(S/H/Y)AMS; ve/ veya

(T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYYP(A)DSVKG; ve/ veya

(L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

İlave olarak burada tarif edilen, aşağıdaki amino asit sekanslarının birini ya da daha fazlasını içeren bir antikör ya da bunun antijen bağlayan bir parçasıdır:

- 15 KASQDINSYLT; ve/ veya

RTNRLFD; ve/ veya

LQYDDFPYT; ve/ veya

SSAMS; ve/ veya

TISVGGGKTYYPDSVKG; ve/ veya

- 20 LISLY.

Antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı fragmanı, aşağıdaki amino asit sekanslarından bir ya da daha fazlasını içerebilir:

TCKASQDINSYLTWF; ve/ veya

TLIYRTNRLFDGVP ya da TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; ve/ veya

- 25 YCLQYDDFPYTFG; ve/ veya

FTLSSSAMS WVR ya da CXAXXFTLSSSAMS WVR; ve/ veya

WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ya da

WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXXL; ve/ veya

YCAKLISLYWG olup içerisinde X herhangi bir amino asittir.

- 5 Onündeki sekansların, örneklenmiş olan antikor AB-1'in hafif ve ağır değişken bölgelerinin bütünleyicilik belirleyici bölgelerini içerdiği kabul edilir.

Antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXXXXX XXXXXXXXLQYDDFPYT; ya da

- 10 KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFX; ya da RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXFX; ya da FXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT amino asit sekansını içerebilir olup, içerisinde X herhangi bir amino asittir.

Antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, TCKASQDINSYLTWF ya da TCKASQDINSYLTWY; ve/ veya LLIYRTNRLFDGVP ya da SLIYRTNRLFDGVP ya da LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF ya da

- 15 SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; ve/ veya YCLQYDDFPYTFG; ve/ veya FTFSSAMSWVR ya da CXAXXFTFSSAMSWVR; ve/ veya WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ya da WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXXL; ve/ veya YCAKLISLYWG amino asit sekansını içerebilir olup, içerisinde X herhangi bir amino asittir.

- 20 Buluşun bir antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdaki CDR'leri içeren en az bir hafif zincir değişken bölgeye sahip olabilir: KASQDINSYLT; ve RTNRLFD; ve LQYDDFPYT ve aşağıdaki CDR'leri içeren en az bir ağır zincir değişken bölgesini içerebilir: SSAMS; ve TISVGGGKTYYPDSVKG; ve LISLY.

- 25 İlave bir yapılanmada, ikinci yönün antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG VPSRFSGSGSGQDFFLTSSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK ya da DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG VPSRFSGSGSGQDFFLTSSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK, ya da
- 30 EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG VPSRFSGSGSGQDFFLTSSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (AB-1_VK), ya da

DIQMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDINSYLTWFFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGGTKLEIK (AB-
1_VK1), ya da

5 EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGV
PSRFSGSGSGTDFFFTISSLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGGTKLEIK (hAB-
1_RKE), ya da

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK (hAB-
1_RKJ) amino asit sekansını içeren en az bir hafif zincir değişken bölgesi içerebilir.

10 İkinci yönün yine ilave bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı
parçası,

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT
VSS ya da

15 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT
VSS, ya da

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT
20 VSS (AB-1_VH), ya da

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLT
VSS (hAB- 1RHA) amino asit sekansını içeren en az bir ağır zincir değişken
bölgesine sahip olabilir.

25 Buluş aynı zamanda, ikinci yönde yapılandırılmış olduğu şekilde, en az bir hafif zincir
değişken bölgesine ve ikinci yönde yapılandırılmış olan en az bir ağır zincir değişken
bölgesine sahip olan bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını sağlar.

Şüpheden kaçınmak için, tarifnemenin bir antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı
parçası, birinci yön ile ilgili olarak sağlanan herhangi bir amino asit sekansını

30 içerebilir. Bu nedenle, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, Şekiller18 ila 28
arasındakilerden herhangi birinde ya da Tablolar 14 ila 24 arasındakiler ve 24A'nın
herhangi birinde örneklendiği üzere herhangi bir VK ve/ veya VK alanını, ya da
bunların herhangi bir varyantını, parçasını ya da türevini içerebilir.

İlave olarak, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, burada tarif edilen herhangi bir insanlaştırılmış ya da kimerik antikor olabilir ya da bunu içerebilir, özellikle antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, Tablolar 14 ila 24 arasındaki ve 24A'da sunulan sekanslardan herhangi biri olabilir ya da bunu içerebilir.

Burada tarif edilen antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının yukarıda verilen amino asit sekanslarının bir ya da daha fazlası ile en az % 75 özdeşliğe sahip olan, örnek olarak, yukarıda belirtilen amino asit sekanslarının bir ya da daha fazlası ile en az % 80, en az % 90, en az % 95, en az % 96, en az % 97, en az % 98, ya da en az % 99 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansını içerebileceği öngörülmüştür. Aynı zamanda, antikor ya da antijen bağlayıcı parçanın 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ya da daha fazla ekleme, silme, konservatif ornatımlar ve/veya konservatif olmayan ornatımlar içerebileceği öngörülmektedir.

Buluşun herhangi bir yönünün tercih edilen bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, sağlam bir antikor içerebilir ya da bundan oluşabilir. Alternatif olarak, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası esasen sağlam bir antikordan oluşabilir. "Esasen oluşması" ile, antikor ya da bunun antijen bağlanma parçasının, TG2 için bağlanma özgülüğünü göstermeye yetecek olan sağlam bir antikoru bir kısmını içerdiği kastedilmektedir.

Buluşa ait antikor ya da antijen bağlayıcı parça, doğal olmayan bir şekilde ortaya çıkan bir antikor olabilir. Elbette, antikoru doğal olarak ortaya çıkan bir antikor olduğu durumlarda, bu, izole bir şekilde sağlanır (yani, doğada bulunduğu farklı olarak).

Buluşun herhangi bir yönünün bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir antijen bağlayıcı parçayı içerebilir ya da bundan oluşabilir: bir Fv parçası; bir Fab parçası; ve bir Fab benzeri parça. İlave başka bir yapılanmada, Fv parçası, tek zincirli bir Fv parçası ya da bir disülfür bağlı Fv parçası olabilir. Yine ilave bir başka yapılanmada, Fab benzeri parça, bir Fab' parçası ya da bir F(ab)₂ parçası olabilir.

Antikoru değişken ağır (V_H) ve değişken hafif (V_L) etki alanları, ilk olarak erken proteaz sindirim deneyleri tarafından tanınan bir gerçek olan antijen tanıma ile ilgilidir. Kemirgen antikorlarının "insanlaştırılması" ile daha fazla konfirmasyon

bulunmuştur. Kemirgen kökenli değişken etki alanları, ortaya çıkan antikorun kemirgen ebeveynli antikorun antijenik özgüllüğünü koruyabilmesi için insan menşeli sabit etki alanlarına birleştirilebilir (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA81, 6851-6855).

- 5 Antijenik özgüllük değişken etki alanları tarafından sağlanır ve tümü bir ya da daha fazla değişken etki alanı içeren antikor parçalarının bakteriyel ekspresyonunu içeren deneylerden bilindiği gibi sabit etki alanlarından bağımsızdır. Bu moleküller Fab benzeri molekülleri (Better et al (1988) Science 240, 1041); Fv molekülleri (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); V_H ve V_L etki alanlarının esnek bir oligopeptit ile
- 10 bağlandığı tek zincirli Fv (ScFv) molekülleri (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) ve izole edilmiş V etki alanlarını içeren ya da bunlardan oluşan tek etki alanlı antikorları (dAb) (Ward et al(1989) Nature 341, 544) içerir. Spesifik bağlanma yerlerini koruyan antikor parçalarının sentezinde yer alan tekniklerin genel bir incelemesi Winter & Milstein
- 15 (1991) Nature 349, 293-299'da bulunabilir.

Bu nedenle, "antijen bağlayıcı parça" ile TG2'ye bağlanabilen bir antikorun fonksiyonel bir parçası içerilmektedir.

- Ornek antijen bağlayıcı parçalar, Fv parçalarından (örnek olarak tek zincirli Fv ve disülfür bağlı Fv) ve Fab benzeri parçalardan (örnek olarak, Fab parçaları, Fab'
- 20 parçaları ve F(ab)2 parçaları) oluşan gruptan seçilebilir.

Buluşun bir yapılanmasında, antijen bağlayıcı parça bir scFv'dir.

- Tüm antikorlar yerine antikor parçalarını kullanmanın avantajları birkaç yönlüdür. Parçaların daha küçük boyutu, katı dokunun daha iyi nüfuzu gibi gelişmiş
- 25 parçaları gibi antijen bağlayıcı parçalar, E. coli'de eksprese edilebilir ve salgılanır, bu nedenle bahse konu parçaların büyük miktarlarda kolay bir şekilde üretimine izin verilir.

- Aynı zamanda dahil edilenler, antikorların ve bunların antijen bağlayıcı parçalarının, örnek olarak polietilen glikol ya da diğer uygun polimerlerin kovalent bağlanması ile
- 30 modifiye edilmiş olan versiyonlarıdır.

Antikorun ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının bir rekombinant molekül olması özellikle tercih edilir.

Antikor üretme metotları ve antikor parçaları teknikte iyi bilinmektedir. Örnek olarak, antikorlar, antikor moleküllerinin in vivo üretiminin indüklenmesini, immüno globulin kütüphanelerinin görüntülenmesini (Orlandi. et al, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter et al., 1991, Nature 349:293-299) ya da kültür içerisindeki hücre hatları tarafından monoklonal antikorların üretilmesini kullanan çok sayıdaki metodun herhangi biri aracılığı ile üretilebilir. Bunlar, bunlar ile sınırlı olmamak kaydı ile, hibridom tekniğini, insan 13 hücreli hibridom tekniğini ve Epstein Barr virüsü (EBV) -hibridom tekniğini (Kohler et al., 1975. Nature 256:495-497; Kozbor et al., 1985. J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote et al., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole et al., 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120) içerir.

Uygun olarak, buluş, antikorun bir rekombinant antikor olduğu (yani, rekombinant araçlar ile üretildiği) bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını sağlar.

Buluşun herhangi bir yönünün özellikle tercih edilen bir yapılanmasında, antikor, bir monoklonal antikor olabilir.

Seçilmiş antijenlere uygun monoklonal antikorlar, bilinen teknikler ile, örnek olarak "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) and in "MonoclonalHybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982) ile hazırlanabilir. Buluşun örnek monoklonal antikorları ve bunların üretimi için uygun metotlar aşağıdaki Örneklerde verilmektedir.

Antikor parçaları aynı zamanda teknikte iyi bilinen metotlar kullanılarak da elde edilebilir (bakınız, örnek olarak Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Örnek olarak, mevcut buluşun antikor parçaları, antikorun proteolitik hidrolizi ile ya da parça kodlayan DNA'nın E. coli ya da memeli hücrelerinde (örnek olarak Çin hamsteri yumurtalık hücre kültürü ya da diğer protein ekspresyon sistemleri) ekspresyonu ile hazırlanabilir. Alternatif olarak antikor parçaları, geleneksel metotlar ile pepsin ya da bütün antikorların papain sindirimi ile elde edilebilir.

Buluşun herhangi bir yönünün bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası, bir insan antikoru ya da bir insanlaştırılmış antikor olabilir.

Teknikte uzman kişiler tarafından insan terapisi ya da teşhisi için insanlaştırılmış antikorların kullanılabileceği takdir edilecektir. İnsan dışı (örnek olarak, murin) antikorların insanlaştırılmış formları, insan olmayan antikorlardan türetilmiş olan

minimal kısımlara sahip olan genetik olarak tasarlanmış olan kimerik antikörler ya da antikör parçalarıdır. İnsanlaştırılmış antikörler, bir insan antikörünün bütünleyici belirleyici bölgelerinin (alıcı antikör), istenen işlevselliğe sahip fare, sıçan ya da tavşan gibi insan olmayan bir türün (donör antikör) bütünleyici bir belirleyici bölgesinden kalan artıklar ile değiştirildiği antikörleri içerir. Bazı durumlarda, insan antikörünün Fv çerçeve kalıntıları karşılık gelen insan olmayan kalıntılar ile değiştirilir. İnsanlaştırılmış antikörler aynı zamanda ne alıcı antikorda ne de ithal bütünleyicilik belirleme bölgesinde ya da çerçeve sekanslarında bulunmayan artıkları içerebilir. Genel olarak, insanlaştırılmış antikörler, içerisinde bütünleyicilik belirleyici alanlarının tamamının ya da büyük ölçüde tamamının, bir ilgili insan konsensüs sekansınınkilere karşılık gelen bir insan olmayan antikörüne ya da çerçeve bölgelerinin tamamı ya da büyük ölçüde tamamınınkine karşılık geldiği, en az bir, ve tipik olarak iki değişken etki alanlarının büyük ölçüde tamamını içerecektir. İnsanlaştırılmış antikörler, aynı zamanda, optimal olarak, tipik olarak bir insan antiköründen türetilmiş olan bir Fc bölgesi gibi bir antikör sabit bölgesinin en az bir kısmını da içerir (bakınız, örnek olarak, Jones et al., 1986. Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596).

İnsan olmayan antikörler insanlaştırma metotları ile teknikte iyi bilinmektedir. Genel olarak, insanlaştırılmış antikör, insan olmayan bir kaynaktan kendisine eklenen bir ya da daha fazla amino asit kalıntısına sahiptir. Genellikle ithal edilmiş olan kalıntılar olarak adlandırılan, insan dışı amino asit kalıntıları tipik olarak ithal edilen bir değişken etki alanından alınır. İnsanlaştırma, insan bütünleyicilik belirleyici bölgelerinin karşılık gelen kemirgen bütünleyicilik belirleyici bölgeleri ile ornatılması sureti ile esasen tarif edildiği (bakınız örnek olarak, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988. Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-15361; US 4,816,567) gerçekleştirilebilir. Buna göre, bu tür insanlaştırılmış antikörler kimerik antikörler olup, içerisinde esas olarak sağlamdan daha az olan bir insan değişken etki alanı insan olmayan bir türden karşılık gelen sekans ile ornatılır. Uygulamada, insanlaştırılmış antikörler tipik olarak, bazı bütünleyicilik belirleyici bölge kalıntıları ve muhtemelen bazı çerçeve kalıntılarının, kemirgen antikörlerindeki benzer bölgelerden gelen kalıntılar ile ornatıldığı insan antikörleri olabilir.

İnsan antikorları, aynı zamanda, faj gösterim kütüphaneleri dahil olmak üzere teknikte bilinen çeşitli teknikler kullanılarak da tanımlanabilir (bakınız örnek olarak, Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole et al., 1985, In: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner et al., 1991. J. Immunol. 147:86-95, Soderlind et al., 2000, Nat Biotechnol 18:852-6 ve WO 98/32845).

Burada kullanıldığı şekli ile "amino asit" terimi, standart yirmi genetik olan kodlanmış amino asitleri ve bunların 'D' formundaki karşılık gelen stereoizomerlerini (doğal 'L' formuna kıyas ile), diğer doğal olarak oluşan amino asitleri, omega amino asitlerini geleneksel olmayan amino asitleri (örnek olarak α,α -diornatılmış amino asitler, N-alkil amino asitler ve benzerleri) ve kimyasal olarak türetilmiş olan amino asitleri içerir.

Bir amino asit "Alanin" ya da "Ala" ya da "A" gibi özel olarak numaralandırıldığı zaman, aksi açıkça belirtilmediği sürece hem L-alanin hem de D-alanin anlamına gelir. Diğer geleneksel olmayan amino asitler, aynı zamanda, arzu edilen fonksiyonel özellik polipeptit tarafından tutulduğu sürece, mevcut buluşun polipeptitleri için uygun bileşenler de olabilir. Gösterilen peptitler için, uygun olan yerlerde kodlanmış olan her bir amino asit kalıntısı, geleneksel amino asidin önemsiz adına karşılık gelen, tek bir harf belirtimi ile temsil edilir.

Bir yapılanmada, burada tanımlandığı şekli ile polipeptitler, L-amino asitleri içerir ya da bunlardan oluşur.

Uygun antikorlar elde edildikten sonra, bağlanma özgüllüğü ya da antikorun biyolojik aktivitesi gibi aktivite için, örnek olarak ELISA, immüno histokimya, akış sitometrisi, immüno çökeltme, Western lekeleri ile test edilebilirler.

Biyolojik aktivite, bahse konu özellik için okumalar ile farklı testlerde test edilebilir.

İlave bir yönde, mevcut buluş, buluşun bir antikoru ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçasını kodlayan bir polinükleotit sağlar.

Burada açıklanan, aşağıdaki nükleotid sekanslarını içeren ya da bunlardan oluşan izole edilmiş bir polinükleotiddir:

Antikorum ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının, TG2'ye özgü olması tercih edilir. Bu nedenle antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının TG1, TG3, TG13 ve/ veya TG7 aktivitesini inhibe etmemesi tercih edilir. TG2 aktivitesini etkili bir şekilde inhibe eden ancak yeterince seçici olan ve bu nedenle TG1, TG3, TG13 ve/ veya

5 TG7 aktivitesini önemli ölçüde inhibe etmeyen bir antikorun tıpta özellikle faydalı olabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle, antikorun sadece TG2 aktivitesini inhibe etmesi tercih edilir.

Aynı zamanda burada tarif edilen, önceki herhangi bir yönüne göre bir antikor TG2'ye (örnek olarak, insan TG2'ye) bağlandığı zaman, TG2'ye bağlanması (örnek olarak,

10 insan TG2'si) inhibe edilen ya da indirgenen bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasıdır.

Bu nedenle burada tarif edilen, TG2 bölgesi içindeki bir epitopa seçici bir şekilde bağlanan ve bundan önceki yönlerden herhangi bir antikorun bağlanmasını engelleyebilecek ve bozabilecek herhangi bir antikordur.

15 İlave bir yapılanmada, mevcut buluş, mevcut buluşun bir antikorunu ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçasını ve ilave bir kısmı içeren bir bileşik sağlar.

İlave kısım, doğrudan doğruya ya da dolaylı olarak sitotoksik bir kısım olabilir.

“Doğrudan doğruya sitotoksik” ile, kısmın kendi başına sitotoksik olduğu anlamına gelir. “Dolaylı olarak sitotoksik” ile, kısmın kendisinin sitotoksik olmamasına rağmen,

20 örnek olarak başka bir moleküle olan etkisi ile ya da üzerinde daha fazla hareket ederek sitotoksikiteyi indükleyebileceği anlamına gelir.

Sitotoksik kısım, bunlar ile sınırlı olmamak kaydı ile, bir doğrudan doğruya sitotoksik kemoterapötik maddeden, bir doğrudan doğruya sitotoksik polipeptit, bir göreceli toksik olmayan ön ilacı bir sitotoksik ilaca çevirme kabiliyetine sahip olan bir kısım, bir

25 radyo duyarlayıcıyı, bir doğrudan doğruya sitotoksik nükleik asidi, bir doğrudan doğruya ya da dolaylı sitotoksik polipeptidi kodlayan bir nükleik asit molekülünü, bir terapötik polipeptidi kodlayan bir nükleik asit molekülünü, ya da bir radyoaktif atomu içeren bir gruptan seçilebilir. Radyoaktif atomun fosfor-32, iyot-125, iyot-131, indiyum-111, renyum-186, renyum-188 ya da itriyum-90'dan herhangi biri olabileceği

30 öngörülmektedir.

Anti kanser maddeler gibi sitotoksik kemoterapötik maddeler arasında şunlar bulunur: mecklorethamine (HN₂), siklofosfamid, ifosfamid, melfalan (L-sarkolizin) ve

- klorambusil gibi azot hardallarını içeren alkileyici ajanlar; etilenimin ve heksametilmelamin, tiotepa gibi metilmelaminler; busülfan gibi alkil sülfonatlar; karmustin (BCNU), lomustin (CCNU), semustin (metil-CCNU) ve streptozosin (streptozotosin) gibi nitrosoureas; ve dekarbazin (DTIC; dimetiltriazenoimidazol-
- 5 karboksamit) gibi triazenler; Metotreksat (ametopterin) gibi folik asit analoglarını içeren anti metabolitler; florourasil (5-flüoroürasil; 5-FU), fluksuridin (florodeoksiüridin; FUDR) ve sitarabin (sitozin arabinosid) gibi pirimidin analogları; ve pürin analogları ve merkaptopurin (6-merkaptopürin; 6-MP), tiyoguanin (6-tiyoguanin; TG) ve pentostatin (2'-deoksikoformisin) gibi ilgili inhibitörler. Vinblastin (VLB) ve vincristine gibi vinca
- 10 alkaloitleri içeren Doğal Ürünler; etoposid ve teniposid gibi epipodofilotoksinler; daktinomisin (aktinomisin D), daunorubisin (daunomisin; rubidomisin), doksorubisin, bleomisin, plikamisin (mithramisin) ve mitomisin (mitomisin C) gibi antibiyotikler; L-asparaginaz gibi enzimler; ve interferon alfa türleri gibi biyolojik tepki değiştiricileri. Sisplatin (cis-DDP) ve karboplatin gibi platin koordinasyon kompleksleri dahil olmak
- 15 üzere çeşitli maddeler; mitoksantron ve antrasiklin gibi antrasantiyon; hidroksiüre gibi ornatılmış üre; prokarbazin (N-metilhidrazin, MIH) gibi metil hidrazin türevi; ve mitotan (o, p'-DDD) ve aminoglutetimit gibi adrenokortikal baskılayıcı; taksol ve analogları/ türevleri; ve flutamid ve tamoksifen gibi hormon agonistleri/ antagonistleri.
- Bu maddelerin pek çoğu daha önce antikörlere ve diğer hedef bölge dağıtım
- 20 maddelerine bağlanmıştır ve bu nedenle bu maddeleri içeren buluşun bileşikleri, teknikte uzman kişiler tarafından kolay bir şekilde yapılabilir. Örnek olarak, karbdiimid konjugasyonu (Bauminger & Wilchek(1980)Methods Enzymol. 70, 151-159), doksorubisin dahil olmak üzere çeşitli maddelerin antikörlere konjuge edilmesi için kullanılabilir.
- 25 Sitotoksik peptitler ya da polipeptit kısımları, hücre ölümüne yol açan herhangi bir kısmı içerir. Sitotoksik peptit ve polipeptit kısımları teknikte iyi bilinir ve örnek olarak risin, abrin, Psödomonas ekzotoksin, doku faktörü ve benzerlerini içerir. Bunları, antikörlar gibi hedef parçalara bağlamaya yönelik metotlar da teknikte bilinmektedir. Bir sitotoksik madde olarak risin kullanımı, Burrows & Thorpe (1993) Proc. Natl.
- 30 Acad. Sci. USA 90, 8996-9000'da ve bir tümörün lokalize kan pıhtılaşması ve enfarktüsüne yol açan doku faktörü kullanımı, Ran et al (1998) Cancer Res. 58, 4646-4653 ve Huang et al (1997) Science 275, 547-550 ve Huang et al (1997) Science 275, 547-550'da tarif edilmiştir. Tsai et al (1995) D/s. Colon Rectum 38,

1067-1074, bir monoklonal antikora konjuge edilmiş olan abrin A zincirini tarif eder. Diğer ribozom inaktive edici proteinler, WO 96/06641'de sitotoksik maddeler olarak tarif edilir. Psödomonas ekzotoksin, aynı zamanda, sitotoksik polipeptit kısmı olarak da kullanılabilir (bakınız örnek olarak, Aiello et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10457-10461).

TNF α ve IL-2 gibi bazı sitokinler, aynı zamanda, sitotoksik maddeler olarak da faydalı olabilir.

Belirli radyoaktif atomlar, yeterli dozlarda verildiği zaman sitotoksik olabilir. Bu nedenle, sitotoksik kısım, kullanımda, hedef bölgeye sitotoksik olmak üzere yeterli miktarda radyoaktivite sağlayan bir radyoaktif atom içerebilir. Uygun radyoaktif atomlar arasında fosfor-32, iyot-125, iyot-131, indiyum-111, renyum-186, renyum-188 veya itriyum-90 ya da komşu hücreleri, organelleri ya da nükleik asidi yok etmek için yeterli enerji yayan başka herhangi bir izotop bulunur. Tercihen, buluşun bileşiğindeki radyoaktif atomların izotopları ve yoğunluğu, 4000 cGy'den (tercihen en az 6000, 8000 ya da 10000 cGy) daha yüksek bir dozun hedef bölgeye, tercihen, hedef bölgedeki hücelere ve bunların organellerine, özellikle de çekirdeğe verilecek şekildedir. Radyoaktif atom, antikora bilinen yollar ile eklenebilir. Örnek olarak, EDTA ya da başka bir kıskaçlama maddesi antikora eklenebilir ve ^{111}In veya ^{90}Y 'yi bağlamak için kullanılabilir. Tirozin kalıntıları ^{125}I ya da ^{131}I ile etiketlenebilir.

Sitotoksik kısım uygun bir dolaylı olarak sitotoksik polipeptit olabilir. Özellikle tercih edilen bir yapılanmada, dolaylı olarak sitotoksik polipeptit, enzimatik aktiviteye sahip ve nispeten toksik olmayan bir ön ilacı sitotoksik bir ilaca dönüştürebilen bir polipeptittir. Hedefleme kısmı bir antikor olduğu zaman, bu tür bir sistem genellikle ADEPT (Antikor Yönelimli Enzim Ön İlaç Terapisi) olarak adlandırılır. Sistem, hedefleme kısmının, enzimatik kısmı, hastanın vücudundaki istenen bölgeye (yani, bir tümör ile ilişkili olan yeni vasküler doku gibi MR eksprese eden bölge) ve enzimin bölgede yerleşmesi için zamana izin verildikten sonra, enzim için bir substrat olan, katalizörün nihai ürünü bir sitotoksik bileşik olduğu bir ön ilacın uygulanmasını gerektirir. Bu yaklaşımın amacı, istenen bölgedeki ilaç konsantrasyonunu en üst düzeye çıkarmak ve normal dokulardaki ilaç konsantrasyonunu en aza indirmektir (bakınız Senter, P.D. et al (1988) "Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) Br. J. Cancer 56, 531-2; ve Bagshawe, K.D. et al (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" Br. J. Cancer. 58, 700-703.)

Sitotoksik madde, bir alkileyici madde gibi mevcut herhangi bir anti kanser ilacı; DNA'da araya giren bir madde; dihidrofolat redüktaz, timidin sentetaz, ribonükleotit redüktaz, nükleosit kinazlar ya da topoizomeraz gibi herhangi bir anahtar enzimi inhibe eden bir madde; ya da herhangi bir hücresel bileşen ile etkileşime girerek hücre ölümünü etkileyen bir madde olabilir. Etoposit, bir topoizomeraz inhibitörünün bir örneğidir.

- 10 Bildirilen ön ilaç sistemleri şunları içerir: bir E. coli 3-glukuronidaz tarafından aktive edilen bir fenol hardal ön ilacı (Wang et al, 1992 and Roffler et al, 1991); bir insan 3-glukuronidaz tarafından aktive edilen bir doksorubisin ön ilacı (Bosslet et al, 1994); kahve çekirdeği a-galaktosidaz ile aktive edilen diğer doksorubisin ön ilaçları (Azoulay et al, 1995); kahve çekirdeği a-D-galaktosidaz ile aktive edilen daunorubisin ön ilaçları (Gesson et al, 1994); bir E. coli 3-D-galaktosidaz tarafından aktive edilen bir 5-floroüridin ön ilacı (Abraham et al., 1994); ve karboksipeptidaz A ile aktive edilen metotreksat ön ilaçları (örnek olarak, metotreksat alanin) (Kuefner et al, 1990, Vitols et al, 1992 and Vitols et al, 1995). Bunlar ve diğerleri, Tablo 1'e dahil edilmiştir.

Tablo 1

Enzim	Ön İlaç
Karboksipeptidaz G2	L-glutamik asit ve benzoik asit hardalları, anilin hardalları, fenol hardalları ve fenilendiamin hardallarının türevleri; bunların florlanmış türevleri
Alkalin fosfataz	Etoposit fosfat
	Mitomisin fosfat
Beta- glukuronidaz	p-Hidroksianilin hardal-glukuronit
	Epirubicin-glukuronid
Penisilin-V-amidaz	Adriamisin-N fenoksiasetil
Penisilin -G- amidaz	N-(4'-hidroksifenil asetil) palitoksin
	Doksorubisin ve melfalan
Beta-laktamaz	Azot hardalı-sefalosporin p-fenilendiamin; doksorubisin türevleri; vinblastin türevi-sefalosporin, sefalosporin hardalı; bir taksol türevi
Beta-glukosidaz	Siyanofenilmetil-beta-D-gluko-piranosiduronik asit
Nitroredaktaz	5- (Azaridin-1-il-) - 2,4-dinitrobenzamid
Sitozin deaminaz	5-Florositozine
Karboksipeptidaz A	Metotreksat-alanin

(Bu tablo, bu çeşitli sistemler için tam referanslar elde edilebilen Bagshawe (1995) Drug Dev. Res. 34, 220-230'dan uyarlanmıştır; taksol türevi Rodrigues, M.L. et al (1995) Chemistry & Biology 2, 223)'de tarif edilmiştir.

Buluşun enzimatik bölümünün bir kısmını oluşturmak için uygun enzimler şunları içerir: karboksipeptidazlar G, G1 ve G2 (glutamil edilmiş hardal ön ilaçları için), karboksipeptidazlar A ve B (MTX-bazlı ön ilaçlar için) ve aminopeptidazlar (2- α -aminosil MTC ön ilaçları için) gibi ekopeptidazlar; örnek olarak trombolisin gibi endopeptidazlar (trombin ön ilaçları için); fosfatazlar (örnek olarak, alkalen fosfataz) veya sülfatazlar (örneğin aril sülfatazlar) gibi hidrolazlar (fosfatlanmış ya da sülfatlanmış ön ilaçlar için); penisilin amidazlar ve arilasil amidaz gibi amidazlar; β -laktamazlar gibi laktamazlar; β -glukuronidaz (β -glukuronit antrasiklinler için), a-galaktozidaz (amigdalın için) ve β -galaktozidaz (β -galaktoz antrasiklin için) gibi glikosidazlar; sitozin deaminaz (5FC için) gibi deaminazlar; ürokinaz ve timidin kinaz gibi kinazlar (gancyklovir için); nitroredüktaz (CB1954 ve analogları için), azoredüktaz (azobenzen harmanları için) ve DT-diaphoraz (CB1954 için) gibi indirgemeler; glukoz oksidaz (glikoz için), ksantin oksidaz (ksantin için) ve laktoperoksidaz gibi oksidazlar; DL-rasemazlar, katalitik antikorlar ve siklodekstrinler.

On ilaç, sitotoksik ilaca kıyas ile nispeten toksik değildir. Tipik olarak, uygun bir in vitro sitotoksikite testinde ölçülen toksisitenin % 10'undan daha az, tercihen toksisitenin % 1'inden daha az toksiktir. Bir ön ilacı bir sitotoksik ilaca dönüştürebilen parçanın, bileşiğin geri kalanından izole edilmesinde aktif olması muhtemeldir, ancak sadece (a) bileşiğin geri kalanı ile kombinasyon halinde olduğunda aktif olması için gereklidir ve (b) bileşik, hedef hücrelere bitişik ya da bitişik olarak bağlanır.

Bileşiğin her bir kısmı bir polipeptit olduğu zaman, iki bölüm, genellikle O'Sullivan et al (1979) Anal. Biochem. 100, 100-108'da genel olarak tarif edildiği şekilde polipeptitlerin çapraz bağlanmasının geleneksel yollarının herhangi biri ile birbirine bağlanabilir. Alternatif olarak, bileşik rekombinant DNA teknikleriyle bir füzyon bileşiği olarak üretilir olup, burada bir DNA uzunluğu, buluşa ait bileşiğin iki kısmını kodlayan ilgili bölgeleri, birbirine bitişik ya da bileşiğin arzu edilen özelliklerini yok etmeyen bir bağlayıcı peptit kodlayan bir bölge ile ayrılmış bölgeler içerir. Muhtemelen, bileşiğin iki kısmı tamamen ya da kısmen örtüşebilir.

Sitotoksik kısım, bir radyo duyarlılaştırıcı olabilir. Radyo duyarlılaştırıcılar arasında floropirimidinler, timidin analogları, hidroksiüre, gempitabin, fludarabin, nikotinamid,

halojenli pirimidinler, 3-aminobenzamid, 3-aminobenzodiamid, etaniksaadol, pimonidazol ve misonidazol yer alır (bakınız, örnek olarak, McGinn et al (1996) J. Natl. Cancer Inst. 88, 1193-11203; Shewach & Lawrence (1996) Invest. New Drugs 14, 257-263; Horsman (1995) Acta Oncol. 34, 571-587; Shenoy & Singh (1992) Clin. Invest. 10, 533-551; Mitchell et al (1989) Int. J. Radiat. Biol. 56, 827-836; Iliakis & Kurtzman (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 1235-1241; Brown (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 987-993; Brown (1985) Cancer 55, 2222-2228).

Aynı zamanda, genlerin hücrelere verilmesi, onları, örnek olarak p53 geninin ya da siklin D'nin, radyo duyarlaştırılmasını sağlayabilir ((Lang et al (1998) J. Neurosurg. 89, 125-132; Coco Martin et al (1999) Cancer Res. 59, 1134-1140).

Diğer kısım, ışınlama üzerine sitotoksik hale gelen ya da sitotoksik bir kısmı serbest bırakan olabilir. Örnek olarak, uygun şekilde ışınladığında, bor-10 izotopu sitotoksik olan bir parçacık salgılar (bakınız, örnek olarak, US 4,348,376 to Goldenberg; Primus et al (1996) Bioconjug. Chem. 7, 532-535).

Benzer şekilde, sitotoksik kısım, fotofrin gibi foto dinamik tedavide faydalı olan olabilir (bakınız, örnek olarak, Dougherty et al (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905).

Sitotoksik kısım, doğrudan doğruya ya da dolaylı olarak sitotoksik olan bir nükleik asit molekülü olabilir. Örnek olarak, nükleik asit molekülü, hedef bölgedeki lokalizasyonun ardından hücrelere girebilen ve ölümlerine yol açabilen bir antisens oligonükleotit olabilir. Bu nedenle, oligonükleotit, esansiyel bir genin ekspresyonunu önleyen ya da apoptoza neden olan gen ekspresyonunda bir değişikliğe yol açan olabilir.

Uygun oligonükleotitlerin örnekleri arasında bcl-2 (Ziegler et al (1997) J. Natl. Cancer Inst. 89, 1027-1036)'ya ve DNA polimeraz a ve topoizomeraz IIa (Lee et al (1996) Anticancer Res. 16, 1805-1811'e yönlendirilenleri içerir.

Peptit nükleik asitleri geleneksel nükleik asitlerin yerine faydalı olabilir (bakınız Knudsen & Nielsen (1997) Anticancer Drugs 8, 113-118).

Buluşun bileşiğinin bir yapılanmasında, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçası ve sitotoksik kısım, kaynaşmış olan polipeptitler olabilir. Bu nedenle, bu nevi bir bileşiği kodlayan bir polinükleotit burada tarif edilir.

Başka bir yapılanmada, diğer kısım kolay bir şekilde tespit edilebilir bir kısım olabilir. Kolay bir şekilde tespit edilebilen bir kısmın uygun bir miktarda iyot-123, iyot-131,

indiyum-111, florin-19, karbon-13, azot-15, oksijen-17, tekniyumu-99m, gadolinyum, manganiz ya da demiri içerebileceği öngörülmektedir.

"Kolay bir şekilde tespit edilebilir bir kısım" ile, mevcut buluşun bileşiğinin bir hastaya uygulanmasını takiben hedef bölgeye yerleştirildiği zaman, tipik olarak gövdenin ve hedefin yerleştirilmiş olduğu bölgeden tercihen müdahaleci olmayan bir şekilde tespit edilebilir olan bir kısım kastedilmektedir. Bu nedenle, buluşun bu yapılanmasının bileşikler görüntüleme ve teşhiste faydalıdır.

Tipik olarak, kolay bir şekilde tespit edilebilir kısım, görüntülemede yararlı olan bir radyoaktif atomdur ya da bunu içerir. Uygun radyoaktif atomlar, sintigrafik çalışmalar için teknesyum-99m ya da iyot-123'ü içerir. Kolay bir şekilde tespit edilebilen diğer kısımlar, örnek olarak, tekrar iyot-123, iyot-131, indiyum-111, flor-19, karbon-13, azot-15, oksijen-17, gadolinyum, manganiz ya da demir gibi manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için spin etiketlerini içerir. Açık bir şekilde, buluşun bileşiğinin molekülün kolay bir şekilde tespit edilebilmesi için uygun atomik izotoplardan yeterli olması gerekir.

Radyo ya da diğer etiketler, buluşun bileşiğine bilinen yollar ile dahil edilebilir. Örnek olarak, eğer antikör bir polipeptit ise, biyosentezlenebilir ya da örnek olarak hidrojen yerine florin-19 içeren uygun amino asit öncü maddeleri kullanılarak kimyasal amino asit sentezi ile sentezlenebilir. ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{186}Rh , ^{188}Rh ve ^{111}In gibi etiketler, örnek olarak, antikordaki sistein kalıntıları vasıtası ile eklenebilir. İtiryum-90, bir lizin kalıntısı vasıtası ile eklenebilir. IODOGEN metodu (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57), iyot-123'ü dahil etmek için kullanılabilir. Referans ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) diğer metotları detaylı olarak açıklar.

Burada tarif edilen, buluşun herhangi bir polinükleotidini içeren bir vektördür.

Tipik prokaryotik vektör plazmitleri şunlardır: Biorad Laboratories (Richmond, CA, ABD)'den temin edilebilir olan pUC18, pUC19, pBR322; Pharmacia (Piscataway, NJ, ABD)'den temin edilebilir olan p7rc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 ve pRIT5, pBS vektörleri, Phagescript vektörler, Bluescript vektörleri, Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, ABD)'den temin edilebilir olan pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A.

Tipik bir memeli hücre vektörü plazmidi, Pharmacia'dan (Piscataway, NJ, ABD) temin edilebilen pSVL'dir. Bir uyarılabilir memeli ekspresyon vektörünün bir örneği, Pharmacia'dan (Piscataway, NJ, ABD) temin edilebilen pMSG'dir.

Yararlı maya plazmit vektörleri, pRS403 ila 406 arasındakiler ve pRS413 ila 416 arasındakilerdir ve genellikle Stratagene Cloning Systems'den (La Jolla, CA 92037, ABD) temin edilebilir. PRS403, pRS404, pRS405 ve pRS406 plazmitleri, Maya Bütünleştirici plazmitlerdir (Yips) ve maya seçilebilen HIS3, TRP1, LEU2 ve URA3 işaretleyicilerini içerir. PRS413-416 plazmidleri, Maya Sentomer plazmitleridir (YCps).

Teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinen metotlar, kodlama sekansını içeren ekspresyon vektörlerini ve örnek olarak uygun transkripsiyonel ya da translasyonel kontrolleri oluşturmak için kullanılabilir.

İlave olarak, burada tarif edilen herhangi bir polinükleotid ya da vektörü içeren bir konakçı hücre tarif edilir.

Aşağıdaki sistemleri kullanan birçok ekspresyon sistemi bilinmektedir: örnek olarak rekombinant bakteriyofaj, plazmit ya da kozmit DNA ekspresyon vektörleri ile transforme edilmiş olan bakteri (örnek olarak, *E. coli* ve *Bacillus subtilis*); örnek olarak maya ekspresyon vektörleri ile transforme edilmiş olan mayalar (örnek olarak, *Saccharomyces cerevisiae*); örnek olarak viral ekspresyon vektörleri (örnek olarak, baculovirüs) ile transforme edilmiş olan böcek hücresi sistemleri; örnek olarak viral ya da bakteriyel ekspresyon vektörleri ile transfekte edilmiş olan bitki hücre sistemleri; örnek olarak adenovirüs ekspresyon vektörleri ile transfekte edilmiş olan hayvan hücre sistemleri.

Vektörler, vektör diğer prokaryotik olmayan hücre tiplerinde ekspresyon için kullanılacak olsa bile, bir prokaryotta çoğaltılması için Col E1 ori gibi prokaryotik bir replikon içerebilir. Vektörler aynı zamanda, bununla transforme edilmiş olan *E. coli* gibi bir bakteri konak hücresindeki genlerin ekspresyonunu (transkripsiyon ve translasyon) yönlendirebilen prokaryotik bir başlatıcı gibi uygun bir başlatıcı içerebilir.

Bir başlatıcı, RNA polimeraz ve transkripsiyonun bağlanmasına izin veren bir DNA sekansı tarafından oluşturulan bir ekspresyon kontrol öğesidir. Örnek bakteri konakçıları ile uyumlu olan başlatıcı sekansları tipik olarak burada tarif edilen bir DNA segmentinin yerleştirilmesi için uygun kısıtlama bölgeleri içeren plazmit vektörleri içerisinde sağlanır.

Uygun bir konakçı hücre içerisindeki polinükleotit, buluşa ait antikor ya da bileşiği üretmek üzere eksprese edilebilir. Bu nedenle, polinükleotit, burada yer alan öğretiler ışığında uygun şekilde değiştirilmiş, bilinen tekniklere uygun olarak, daha sonra buluşun antikorunun ya da bileşiğinin ekspresyonu ve üretimi için uygun bir konakçı hücreyi dönüştürmek için kullanılan bir ekspresyon vektörü oluşturmak için kullanılabilir. Bu nevi teknikler arasında US Patent No. 4,440,859; 4,530,901; 4,582,800; 4,677,063; 4,678,751; 4,704,362; 4,710,463; 4,757,006; 4,766,075; ve 4,810,648'da açıklananlar yer alır.

Polinükleotit, uygun bir konakçıya sokulması için çok çeşitli başka DNA sekanslarını birleştirilebilir. Tamamlayıcı DNA, konağın yapısına, DNA'nın konağa girme şekline ve epizomal bakım ya da entegrasyonun istenip istenmediğine bağlı olacaktır.

Genel olarak, polinükleotit, plazmit gibi bir ekspresyon vektörüne uygun oryantasyonda ve ekspresyon için doğru okuma çerçevesine yerleştirilir. Eğer gerekirse, DNA, istenen konakçı tarafından tanınan uygun transkripsiyonel ve çeviri düzenleyici kontrol nükleotit sekanslarına bağlanabilir, ancak bu kontroller genellikle ekspresyon vektöründe mevcuttur. Bu sayede, DNA eki uygun bir başlatıcıya işlevsel olarak bağlanabilir. Bakteriyel başlatıcılar arasında E. coli *lac* ve *lacZ* başlatıcıları, T3 ve T7 başlatıcıları, *gpt* başlatıcıları, *faj X* PR ve PL başlatıcıları, *phoA* başlatıcısı ve *trp* başlatıcısı bulunur. Ökaryotik başlatıcılar CMV acil erken başlatıcısı, HSV timidin kinaz başlatıcısı, erken ve geç SV40 başlatıcıları ve retroviral LTR başlatıcıları içerir. Diğer uygun başlatıcılar teknikte uzman kişiler tarafından bilinecektir. Ekspresyon yapıları arzu edilen bir şekilde transkripsiyon başlatma ve sonlandırma için ve transkripsiyon yapılan bölgede, translasyon için bir ribozom bağlanma bölgesi içerir.(Hastings et al, International Patent No. WO 98/16643, 23 Nisan 1998'de yayınlanmıştır)

Vektör daha sonra standart teknikler ile konakçıya sokulur. Genel olarak, konakçıların tümü vektör tarafından dönüştürülmeyecektir ve bu nedenle dönüştürülmüş olan konakçı hücrelerin seçilmesi gerekli olacaktır. Bir seçim tekniği, ekspresyon vektörüne, dönüştürülmüş olan hücrede seçilebilir bir özelliği kodlayan, gerekli herhangi bir kontrol ögesine sahip bir DNA sekans işaretçisini dahil etmeyi içerir. Bu işaretleyiciler, ökaryotik hücre kültürü için dihidrofolat redüktaz, G418 ya da neomisin direnci ve E. coli ve diğer bakterilerde kültürlemek için tetrasiklin, kanamisin ya da ampisilin direnç genleri içerir. Alternatif olarak, bu seçilebilir özellik için gen,

arzu edilen konakçı hücreyi birlikte dönüştürmek için kullanılan başka bir vektör üzerinde olabilir.

Rekombinant DNA tarafından transforme edilmiş olan konakçı hücreler daha sonra, polipeptidin ekspresyonuna izin vermek için burada açıklanan öğretiler ışığında teknipte uzman kişiler tarafından bilinen uygun şartlar altında yeterli bir süre boyunca kültürlenir.

Antikor ya da bileşik, amonyum sülfat ya da etanol çökeltme, asit ekstraksiyonu, anyon ya da katyon değişim kromatografisi, fosfosüloz kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, benzeşim kromatografisi, hidroksilapatit kromatografisi ve lektin kromatografisi dahil olmak üzere iyi bilinen metotlar ile rekombinant hücre kültürlerinden geri kazanılabilir ve saflaştırılabilir. En çok tercihen, saflaştırma için yüksek performanslı sıvı kromatografisi ("HPLC") kullanılır.

Yine ilave olarak burada tarif edilen, hücre hattına, burada tarif edilen bir eksojen polinükleotit ya da vektörün dahil edilmesinden kaynaklanan, buluşun herhangi bir yönüne ya da bir bileşiğine göre bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını üreten stabil bir konakçı hücre hattıdır.

Konakçı hücre prokaryotik ya da ökaryotik olabilir. Bakteriyel hücreler tercih edilen prokaryotik konakçı hücrelerdir ve tipik olarak, örnek olarak Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, ABD'den temin edilebilen DH5, ve American Type Culture Collection (ATCC) of Rockville, MD, ABD'den (No ATCC 31343) temin edilebilen RR1 E. coli sarmalları gibi, tipik olarak Escherichia coli'nin bir sarmalıdır. Tercih edilen ökaryotik konakçı hücreler maya ve memeli hücrelerini, tercihen bir fare, sıçan, maymun ya da insan fibroblastik hücre hattından olanlar gibi omurgalı hücrelerini içerir. Maya konakçı hücreleri arasında, Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, ABD'den temin edilebilen YPH499, YPH500 ve YPH501 bulunur. Tercih edilen memeli konakçı hücreleri, ATCC'den CCL61 olarak temin edilebilen Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerini, ATCC'den CRL 1658 olarak temin edilebilen NIH İsviçre fare embriyo hücreleri NIH/3T3'ü ve ATCC'den CRL 1650 olarak temin edilebilen maymun böbrek türevli COS-1 hücrelerini içerir.

Dönüştürülmüş olan konakçı hücrelerin kendilerine ek olarak, mevcut açıklama aynı zamanda bir kültür ortamında bu hücrelerin bir kültürünü, tercihen bir monoklonal

(klonal olarak homojen) bir kültürü ya da bir monoklonal kültürden türetilmiş olan bir kültürü de kapsar.

İlave bir yönde, mevcut buluş, bir farmasötik olarak kabul edilebilir olan ara maddeye, yardımcı maddeye, seyrelticiye ya da taşıyıcıya sahip olan bir karışımın içinde, buluşun herhangi bir yönüne göre bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını içeren bir farmasötik bileşim/ formül, ya da buluşa göre bir polinükleotit, ya da buluşa göre bir bileşik sağlar.

"Farmasötik olarak kabul edilebilir" ifadesi ile formülasyonun steril ve pirojensiz olduğu dahil edilmiştir. Uygun farmasötik taşıyıcılar eczacılık alanında iyi bilinmektedir. Taşıyıcı (taşıyıcılar), buluşun bileşiği ile uyumlu olması bakımından "kabul edilebilir" olmalı ve alıcılarına zarar vermemelidir. Tipik olarak, taşıyıcı maddeler steril ya da pirojen içermeyen su ya da salin olacaktır; bununla birlikte, diğer kabul edilebilir taşıyıcılar kullanılabilir.

Bir yapılanmada, buluşun farmasötik bileşimi/ formülü ilave olarak bir başka aktif bileşen, yani buluşa ait antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçası dışında terapötik olarak aktif bir madde içerebilir. Bir ya da daha fazla ilave aktif maddenin farmasötik bileşimin/ formülünün hedeflenen hastalığa karşı etkinliğini uygun şekilde arttırabileceği öngörülmektedir. Bir yapılanmada, diğer aktif bileşen, doku izlerinin azaltılmasında, nörofibrilli dolaşmaların azaltılmasında ve/ veya kemoterapiye direncin azaltılmasında yer alan bir maddeden seçilen terapötik bir madde olabilir.

Tercih edilen bir yapılanmada, farmasötik bileşim/ formül, bir hastaya intravenöz, intramüsküler ya da deri altı uygulama için formüle edilebilir.

Farmasötik bileşim/ formülün, yukarıda ve daha aşağıda tarif edilen çeşitli koşulları tedavi etmek için etkili olan buluşa ait antikör ya da antijen bağlayıcı parçasının bir miktarını içermesi tercih edilir.

Buluşun bir başka yönü, buluşun herhangi bir yönüne göre bir antikörünü ya da bunun bir antijen bağlayıcı parçasını ya da buluşa göre bir polinükleotidi ya da buluşa ait bir bileşiği; ve bir ya da daha fazla ilave madde içeren parçaların bir kitini sağlar. İlave maddelerin yukarıda tarif edilen diğer aktif bileşenlerden herhangi biri ya da başka herhangi bir uygun madde olabileceği öngörülmektedir.

İlave olarak burada açıklanan, tıpta kullanım için buluşun herhangi bir yönüne ya da bunun bir polinükleotidine ya da bunun bir bileşiğine, farmasötik bir bileşime/

formülüne ya da buluşun bir parçalarına ait kitine ait terapötik olarak etkili bir miktarda bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasıdır.

5 TG2 açık bir şekilde çok işlevli bir enzimdir ve nükleer stabilizasyon ve taşıma [28, 29], endositoz [30, 31], GTPaz sinyal verme [32 ila 34 arasındakiler], Apoptoz [35, 36], hücre yapışması [37 ila 39 arasındakiler], sitoskeletal bütünlük [28, 29] ve ECM stabilizasyonu [9] gibi çeşitli hücresel fonksiyonlara bağlanmıştır. Bir küçük molekülü inhibitör, genel olarak hücre dışı boşluğa ve hücre iç kısmına serbest erişime sahip oldukları için bu fonksiyonların tümüne engel olabilir. Bir antikör hücreye giremez ve bu nedenle TG2'nin hücre içi rolleri, in vivo olarak uygulanan TG2'ye özgü bir antikordan etkilenmez.

15 Önemli olarak, TG2'nin patolojik rollerinin çoğunun, doku yaralanması ve fibroz, çölyak hastalığı ve kanserdeki rolü gibi hücre dışı olduğu görülmektedir. Bu nedenle, tıpta TG2'yi seçici bir şekilde bağlayan bir antikör kullanılması, tedavinin arzu edilmeyen yan etkilerine dönüşebilecek arzu edilmeyen hücre içi etkileri önleyen ek bir seçicilik derecesi getirecektir.

20 Bu nedenle, buluşa ait antikörler ve bunların antijen bağlayıcı parçaları daha önceden mevcut olan ilaçlara karşı, örnek olarak TG2'nin ECM proteinlerini çapraz bağladığı fibrotik ve skarlaşma hastalıklarında, ve gliadinin hücre dışı alanda deamide edildiği çölyak hastalığında ve hücre yapışmasının koruyucu faktör olduğu kanserde kemo dirençte TG2'nin bloklanması gibi klinik avantajları sunacaktır. İlave olarak, buluşun küçük antikör parçaları, örnek olarak Fab parçaları kan beyin bariyerini geçebilir ve beyindeki TG2'yi inhibe edebilir ve potansiyel olarak TG2 tutulumlu nörolojik patolojiler için etkili tedaviler sunabilir.

25 Bu nedenle, burada daha fazla tarif edilen, buna ihtiyacı olan bir bireyde TG2 enziminin azaltılması ya da inhibe edilmesinde kullanım için, buluşun herhangi bir yönüne göre bir antikörü ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını ya da buluşun bir polinükleotidi ya da redüksiyonda kullanım için bir bileşiği, farmasötik bileşimini/ formülü ya da buluşun parçalarının kitidir.

30 İlave olarak burada açıklanan, ihtiyacı olan bir bireyde TG2 enzim aktivitesini azaltmak veya inhibe etmek için, buluşun herhangi bir yönüne göre bir antikörünün ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasının ya da buluşun bir polinükleotidinin ya da

bir bileşiminin, farmasötik bileşiminin/ formülünün ya da buluşa ait parçaların kitinin bir ilacın imalatında kullanılmasıdır.

Aynı zamanda burada tarif edilen, buna ihtiyacı olan bir bireyde TG2 enzim aktivitesinin azaltılması ya da inhibe edilmesi olup, metot, bir antikorun ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasının, ya da bir varyantının, buluşun herhangi yönüne göre bir füzyonunun ya da bunun türevinin ya da buluşun bir polinükleotidinin, ya da bir bileşiminin, farmasötik bileşiminin/ formülünün, ya da buluşun parçalarının kitinin hastaya uygulanması adımını içerir.

Burada ilave olarak açıklanan, buluşun herhangi bir yönüne göre bir antikorun ya da bunun antijen bağlayıcı kısmının, ya da buluşun bir polinükleotidinin, bir bileşiminin, farmasötik bileşiminin/ formülünün, ya da buluşun parçalarının kitinin, şunların tedavisi ve/ veya teşhis edilmesinde kullanım için farmasötik olarak etkili bir miktardır: Çölyak hastalığı, anormal yara iyileşmesi, skarlaşma, skleroderma, keloidler ve hipertrofik skarlar, oküler skar, inflamatuvar barsak hastalığı, maküler dejenerasyon, Grave optalmopatisi, ilaca bağlı ergotizm, sedef hastalığı, fibroz ile ilgili hastalıklar (örnek olarak karaciğer fibrozu, interstisyel akciğer hastalığı ve fibrotik akciğer hastalığı gibi pulmoner fibroz, kardiyak fibroz, cilt fibrozu, miyelo-fibroz, böbrek fibrozu, glomerüloskleroz ve tübulointerstisyel fibrozis), ateroskleroz, restenoz, inflamatuvar hastalıklar, oto immün hastalıklar, nörodejeneratif/ nörolojik hastalıklar (örnek olarak Huntington Hastalığı, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, poliglutamin hastalığı, spinobulbar müsküler atrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofisi, spinocerebellar ataksi 1, 2, 3, 6, 7 ve 12, rubropallidal atrofi, spinocerebellar palsy) ve/ veya kanser (Li-Fraumeni sendromu ve sporadik glukolan glikolan glikoblastoma, adenokarsinomalar, miyeloid lösemi, akut miyelojenöz lösemi, miyelodisplastik sendrom, miyeloproliferatif sendrom, jinekolojik kanser, Kaposi sarkomu, Hansen hastalığı, kollajen kolit).

Aynı zamanda burada tarif edilen, buluşun herhangi bir yönüne göre bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının, ya da buluşun bir polinükleotidinin, ya da bir bileşiminin, farmasötik bileşiminin/ formülünün, ya da buluşun parçalarının kitinin, şunların tedavisi ve/ veya teşhisi için bir ilacın üretiminde farmasötik olarak etkili bir miktarının kullanımıdır: Çölyak hastalığı, anormal yara iyileşmesi, skarlaşma, skleroderma, keloidler ve hipertrofik skarlar, oküler skar, inflamatuvar barsak hastalığı, maküler dejenerasyon, Grave optalmopatisi, ilaca bağlı ergotizm, sedef

hastalığı, fibroz ile ilgili hastalıklar (örnek olarak karaciğer fibrozu, interstisyel akciğer hastalığı ve fibrotik akciğer hastalığı gibi pulmoner fibroz, kardiyak fibroz, cilt fibrozu, miyelifibroz, böbrek fibrozu, glomerüloskleroz ve tübulointerstisyel fibrozis), ateroskleroz, restenoz, inflamatuvar hastalıklar, oto immün hastalıklar, nörodejeneratif/ nörolojik hastalıklar (örnek olarak Huntington Hastalığı, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, poliglutamin hastalığı, spinobulbar müsküler atrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofisi, spinocerebellar ataksi 1, 2, 3, 6, 7 ve 12, rubropallidal atrofi, spinocerebellar palsy) ve/ veya kanser (Li-Fraumeni sendromu ve sporadik glukolan glikolan glikolan glikoblastoma, adenokarsinomalar, miyeloid lösemi, akut miyelojenöz lösemi, miyelodisplastik sendrom, miyeloproliferatif sendrom, jinekolojik kanser, Kaposi sarkomu, Hansen hastalığı, kollajen kolit).

Burada ilave olarak açıklanan, bir hastada Çölyak hastalığı, anormal yara iyileşmesi, skarlaşma, skleroderma, keloidler ve hipertrofik skarlar, oküler skar, inflamatuvar barsak hastalığı, maküler dejenerasyon, Grave optalmopatisi, ilaca bağlı ergotizm, sedef hastalığı, fibroz ile ilgili hastalıklar (örnek olarak karaciğer fibrozu, interstisyel akciğer hastalığı ve fibrotik akciğer hastalığı gibi pulmoner fibroz, kardiyak fibroz, cilt fibrozu, miyelifibroz, böbrek fibrozu, glomerüloskleroz ve tübulointerstisyel fibrozis), ateroskleroz, restenoz, inflamatuvar hastalıklar, oto immün hastalıklar, nörodejeneratif/ nörolojik hastalıklar (örnek olarak Huntington Hastalığı, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, poliglutamin hastalığı, spinobulbar müsküler atrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofisi, spinocerebellar ataksi 1, 2, 3, 6, 7 ve 12, rubropallidal atrofi, spinocerebellar palsy) ve/ veya kanser (Li-Fraumeni sendromu ve sporadik glukolan glikolan glikolan glikoblastoma, adenokarsinomalar, miyeloid lösemi, akut miyelojenöz lösemi, miyelodisplastik sendrom, miyeloproliferatif sendrom, jinekolojik kanser, Kaposi sarkomu, Hansen hastalığı, kollajen kolit) tedavisi ve / veya teşhisi için bir metot olup, metot, buluşun herhangi bir yönünün bir antikorunun ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının, ya da buluşun bir polinükleotidinin, ya da bir bileşiğinin, farmasötik bileşiminin/ formülünün, ya da buluşun parçalarının kitinin farmasötik olarak etkili bir miktarının hastaya verilmesini içerir.

"Tedavi" ile bir deneğin/ hastanın hem terapötik hem de profilaktik tedavisi kast edilmektedir. "Profilaktik" terimi, burada açıklanan bir antikorun, ilacın, bileşiğin, bileşimin ya da kitin kullanımını kapsar; bu, bir bireyde, bir durumun ya da

bozukluğun (örnek olarak fibroz ile ilgili bir bozukluğun) oluşması ya da gelişmesi olasılığını önler ya da azaltır.

Hastanın bir insan olması tercih edilir ancak hasta tedaviden fayda sağlayabilecek başka bir memeli olabilir. Örnek olarak, hasta bir fare, bir sıçan, bir hamster, bir tavşan, bir kedi, bir köpek, bir keçi, bir koyun, bir maymun ya da bir büyük maymun olabilir.

Burada kullanıldığı şekli ile "terapötik olarak etkili miktar" ya da "etkili miktar" ya da "terapötik olarak etkili", verilen bir durum ve uygulama rejimi için terapötik bir etki sağlayan miktarı belirtir. Bu, gerekli katkı maddesi ve seyreltici, yani bir taşıyıcı ya da uygulama aracı ile bağlantılı olarak arzu edilen terapötik bir etki üretmek üzere hesaplanan daha önceden belirlenmiş olan bir aktif madde miktarıdır. İlave olarak, konakçının aktivitesi, fonksiyonu ve yanıtındaki klinik olarak önemli bir açığı azaltmak ya da önlemek için yeterli bir miktar anlamına gelmesi amaçlanmıştır. Alternatif olarak terapötik olarak etkili bir miktar, bir konakçada, örnek olarak bir memelideki klinik açıdan önemli bir durumda bir iyileşmeye neden olmak için yeterlidir.

Buluşun maddeleri (yani antikör, antijen bağlayıcı parça, varyant, füzyon ya da türevi), ilaçlar, bileşikler, farmasötik bileşimler/ formüller ve kitler, enjekte edilebilir bir sürekli salımlı ilaç verme sistemi kullanılarak verilebilir. Bunlar, enjeksiyon sıklığını azaltmak için özel olarak tasarlanmıştır. Bu nevi bir sistemin bir örneği, enjekte edildikten sonra, sürekli bir süre boyunca yavaş yavaş rhGH salgılayan biyolojik olarak parçalanabilen mikro kürelerde rekombinant insan büyüme hormonunu (rhGH) içine alan Nutropin Depodur. Tercihen, uygulama kas içi (im) ve/ veya deri altından (sc) ve/ veya damardan (iv) gerçekleştirilir.

Buluşun maddeleri, ilaçları, bileşikleri, farmasötik bileşimleri/ formülleri ve kitleri, ilacı doğrudan doğruya istenen bölgeye salıveren, cerrahi olarak yerleştirilmiş bir cihaz vasıtası ile uygulanabilir. Örnek olarak, Vitrasert, CMV retinitini tedavi etmek için gansikloviri doğrudan doğruya gözün içine bırakır. Bu toksik maddenin hastalık bölgesine doğrudan doğruya uygulanması ilacın önemli sistemik yan etkileri olmadan etkili bir tedavi sağlar.

Tercihen, mevcut buluşun ilaçları ve/ veya farmasötik bileşimleri/ formülleri, aktif bileşenin (bileşenlerin) günlük bir dozu ya da birimini, günlük alt dozu ya da uygun bir kısmını içeren bir birim dozajdır.

Buluşa ait maddeler, ilaçlar, bileşikler, farmasötik bileşimler ve kitler normal olarak, farmasötik olarak kabul edilebilir bir dozaj formunda, isteğe bağlı olarak toksik olmayan bir organik formda aktif bileşeni (bileşenleri) içeren farmasötik bir bileşim ya da inorganik, asit ya da baz, ilave tuz formunda herhangi bir parenteral yol ile uygulanabilir. Tedavi edilecek hastalığa ve hastanın yanı sıra uygulama yoluna bağlı olarak, bileşimler çeşitli dozlarda uygulanabilir.

İnsan terapisinde, buluşun maddeleri, ilaçları, bileşikleri, farmasötik bileşimleri/ formülleri ve kitleri tek başlarına uygulanabilir, ancak genel olarak amaçlanan uygulama yoluna ve standart farmasötik uygulamaya göre bir uygun farmasötik ara madde, seyreltici ya da taşıyıcıya sahip olan bir karışım içerisinde uygulanır.

Buluşun maddeleri, ilaçları, bileşikleri, farmasötik bileşimleri/ formülleri ve kitleri parenteral olarak, örnek olarak intravenöz, intraarteryel, intraperitoneal, intraekal, kas içi ya da deri altı olarak verilebilir ya da infüzyon teknikleri vasıtası ile uygulanabilir. En iyi şekilde, diğer maddeleri içerebilen steril bir sulu çözelti formunda kullanılır, örnek olarak çözeltiyi kan ile izotonik hale getirmek için yeterli olan tuzlar ya da glikoz. Sulu çözeltiler, eğer gerekirse, uygun şekilde tamponlanmalıdır (tercihen 3 ila 9 arasında bir pH'a). Steril koşullar altında uygun parenteral formülasyonların hazırlanması, teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinen standart farmasötik teknikler ile kolay bir şekilde gerçekleştirilir.

Parenteral için uygun ilaçlar ve farmasötik bileşimler arasında, antioksidanlar, tamponlar, bakteriyostatlar ve formülasyonu istenen alıcının kanı ile izotonik kılan çözücüler ihtiva edebilen sulu ve sulu olmayan steril enjeksiyon çözeltileri; ve süspanse edici maddeler ve koyulaştırıcı maddeler içerebilen sulu ve susuz steril süspansiyonlar yer alır. İlaçlar ve farmasötik bileşimler, birim dozlu ya da çok dozlu kaplarda, örnek olarak sızdırmaz ampuller ve flakonlar halinde sunulabilir ve sadece kullanımdan hemen önce steril sıvı taşıyıcının eklenmesini gerektiren, örnek olarak enjeksiyonlar için su gibi, dondurularak kurutulmuş (liyofilize) bir durumda depolanabilir. Ekstamporane enjeksiyon solüsyonları ve süspansiyonları, daha önce tarif edilen türden steril tozlar, granüller ve tabletlerden hazırlanabilir.

İnsan hastalara parenteral uygulama için, buluşun maddelerinin, ilaçlarının ve farmasötik bileşimlerinin günlük dozaj seviyesi genellikle tekli ya da bölünmüş dozlarda uygulanan yetişkin başına günde 1 µg ila 10 mg arasında olacaktır. Herhangi bir olayda doktor, herhangi bir hasta için en uygun olacak olan gerçek dozu

belirleyecektir ve bu, belirli bir hastanın yaşı, kilosu ve yanıtı ile değişecektir. Yukarıdaki dozajlar ortalama bir durum için örnek niteliğindedir. Elbette, daha yüksek ya da daha düşük dozaj aralıklarının gerekli olduğu münferit durumlar olabilir ve bunlar bu buluşun kapsamı dahilindedir.

5 Tipik olarak, buluşun ilaçları, farmasötik bileşimleri/ formülleri ve kitleri, buluşun maddesini, yaklaşık olarak 2 mg/ml ila 150 mg/ml arasında ya da yaklaşık 2 mg/ml ila 200 mg/ml arasında bir konsantrasyonda içerecektir. Tercih edilen bir yapılanmada, buluşun ilaçları, farmasötik bileşimleri/ formülleri ve kitleri, buluşun maddesini 10 mg/ml'lik bir konsantrasyonda içerecektir.

10 Genel olarak insanlarda, maddelerin, ilaçların, bileşiklerin, farmasötik bileşimlerin/ formüllerin ve kitlerin parenteral uygulaması en uygun olan tercih edilen yoldur.

Veteriner kullanımı için, buluşun maddeleri, ilaçları, bileşikleri, farmasötik bileşimleri/ formülleri ve kitleri, normal veterinerlik uygulamasına uygun olarak uygun bir formülasyon olarak uygulanır ve veteriner hekim, belirli bir hayvan için en uygun olan

15 dozaj rejimini ve uygulanacak uygulama yolunu belirleyecektir.

Mevcut buluş aynı zamanda, mevcut buluşun polipeptit bağlayıcı kısımlarının farmasötik olarak kabul edilebilir asit ya da baz ilave tuzlarını içeren farmasötik bileşimleri/ formülleri de içerir. Bu buluşta yararlı olan yukarıda bahsedilmiş olan baz bileşiklerin farmasötik olarak kabul edilebilir asit ilavesi tuzlarını hazırlamak için

20 kullanılan asitler, diğerlerinin arasından, toksik olmayan asit ilavesi tuzlarını, yani hidroklorür, hidrobromür, asetat, laktat, sitrat, tartrat, bitartrat, süksinat, maleat, fumarat, glukonat, sakarrat, benzoat, metansülfonat, etansülfonat, benzensülfonat, p-tolüensülfonat ve pamoat [yani 1,1'-metilen-bis- (2-hidroksi-3 naftoat)] tuzlar gibi farmakolojik olarak kabul edilebilir olan anyonları içeren tuzlar oluşturanlardır.

25 Farmasötik olarak kabul edilebilir baz ilave tuzları aynı zamanda mevcut buluşa göre maddelerin (yani bunların antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçaların) farmasötik olarak kabul edilebilir tuz formlarını üretmek için kullanılabilir.

Doğası gereği asidik olan mevcut maddelerin farmasötik olarak kabul edilebilir baz tuzlarını hazırlamak için reaktifler olarak kullanılabilecek kimyasal bazlar, bu tür

30 bileşiklerle toksik olmayan baz tuzları oluşturanlardır. Bu gibi toksik olmayan baz tuzları, diğerlerinin arasında, bunlar ile sınırlı olmamak kaydı ile, alkali metal katyonları (örnek olarak potasyum ve sodyum) ve alkalın toprak metal katyonları

(örnek olarak kalsiyum ve magnezyum), N-metilglukamin- (meglumin) ve düşük alkanolamonyum ve farmasötik olarak kabul edilebilir organik aminlerin diğer baz tuzlar gibi amonyum ya da suda çözünebilir amin ilave tuzları gibi bu nevi farmakolojik olarak kabul edilebilir olan katyonlardan türetilmiş olanları içerir.

- 5 Buluşa ait maddeler ve/ veya polipeptit bağlama kısımları, depolama için liyofilize edilebilir ve kullanımdan önce uygun bir taşıyıcıda sulandırılabilir. Herhangi bir uygun liyofilizasyon metodu (örnek olarak, spreyle kurutma, kekle kurutma) ve/ veya sulandırma teknikleri kullanılabilir. Teknikte uzman kişiler tarafından, liyofilizasyon ve sulandırma işleminin çeşitli derecelerde antikor aktivite kaybına yol açabileceği
- 10 (örnek olarak, geleneksel immüno globulinlerde, IgM antikorlarının IgG antikorlarından daha büyük aktivite kaybına sahip olma eğiliminde olduğu) ve telafi etmek için kullanım seviyelerinin yukarı doğru ayarlanması gerekebileceği takdir edilecektir. Bir düzenekte liyofilize edilmiş olan (dondurularak kurutulmuş) polipeptit bağlayıcı kısım yeniden sulandırıldığı zaman, aktivitesinin (liyofilizasyon öncesindeki)
- 15 yaklaşık olarak % 20'den daha fazla olmayan, ya da yaklaşık olarak % 25'ten daha fazla olmayan, ya da yaklaşık olarak % 30'dan daha fazla olmayan, ya da yaklaşık olarak % 35'ten daha fazla olmayan, ya da yaklaşık olarak % 40'tan daha fazla olmayan, ya da yaklaşık olarak % 45'ten daha fazla olmayan, ya da yaklaşık olarak % 50'den daha fazla olmayan oranını kaybeder.
- 20 Tercihen, buluş, bir antikor, bileşik, farmasötik bileşimler/ formüller, kit, kullanım ya da metot sunmakta olup, içerisinde antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının etkili miktarı, antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının yaklaşık olarak 0.0001 mg/kg ila 50 mg/kg'si arasındadır.

- 25 Teknikte uzman kişiler tarafından takdir edildiği gibi, bir bileşiğin kesin miktarı spesifik aktivitesine bağlı olarak değişebilir. Uygun dozaj miktarları, gerekli seyreltici ile bağlantılı olarak arzu edilen terapötik etkiyi üretmek üzere hesaplanan daha önceden belirlenmiş olan bir miktarda aktif bileşim içerebilir. Buluşun bileşimlerinin üretiminde metot ve kullanımda, aktif bileşenin terapötik olarak etkili bir miktarı sağlanır. Bir terapötik olarak etkili miktar, teknikte iyi bilindiği şekilde, teknikte sıradan uzmanlığa
- 30 sahip olan tıbbi ya da veteriner çalışan tarafından, yaş, ağırlık, cinsiyet, durum, komplikasyonlar, öteki hastalıklar ve benzeri gibi hasta özelliklerine dayanarak belirlenebilir.

Buluşun ilave bir yönü, TG2 enzim aktivitesinin in vitro olarak azaltılmasının ya da inhibe edilmesinin bir metodunu sağlamakta olup, metot metodun herhangi bir yönüne göre bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, ya da buluşa göre bir polinükleotidi, ya da buluşun bir bileşiğini ya da kitini TG2 içeren bir numuneye 5 vermeyi içerir.

"Numune" uygun bir kaynaktan, örnek olarak bir memeli kaynağından elde edilen herhangi bir numune olabilir. Örnek olarak, numune, TG2'yi içeren bir doku ya da hücre numunesi olabilir. Örnek dokular, bir hastanın beyninden, gastrointestinal sistemden, akciğerden, pankreastan, karaciğerden, deriden, böbrekten, gözden, 10 kalpten, kan damarlarından, lenf düğümlerinden, omurga ve iskelet ya da düz kastan elde edilen dokuları içerir.

Aynı zamanda burada tarif edilen, ihtiyacı olan bir bireyde TG2 enzim aktivitesini azaltmak ya da inhibe etmek için bir metot olup, metot, bir antikörü ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını kodlayan etkili bir miktarda polinükleotidin bireye 15 verilmesini içerir.

İlave olarak burada tarif edilen, ihtiyacı olan bir bireyde TG2 enzim aktivitesinin azaltılması ya da inhibe edilmesi için bir ilacın üretiminde, buluşun herhangi bir yönüne göre bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını kodlayan bir polinükleotidin kullanımıdır.

20 Buluş aynı zamanda, TG2 enzim aktivitesini azaltmak ya da inhibe etmek için in vitro bir metot sunmakta olup, metot, buluşun herhangi bir yönüne göre bir antikörü ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını kodlayan bir polinükleotidin TG2 içeren bir numuneye, örnek olarak TG2 içeren bir doku ya da hücre numunesine verilmesini içerir.

25 Aynı zamanda burada açıklanan, buluşa göre bir antikör ya da antijen bağlayıcı bir parçasını, ya da buluşa göre antikör ya da antijen bağlayıcı parçasını içeren buluşun bir bileşiğini üretmek için metot olup, metot buluşun bir polinükleotidinin eksprese edilmesini ya da burada tarif edilen bir kararlı konakçı hücre hattının kültürlenmesini içerir.

30 Burada tarif edilen, bir transglutaminazı seçici olarak bağlayan bir antikör ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının seçilmesinin bir metodunu olup, metot, transglutaminaz çekirdek bölgesini/ katalitik etki alanını içeren fakat bir

transglutaminaz varilini ya da sandviç etki alanını içermeyen bir polipeptidi seçici olarak bağlayan bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını seçmenin adımını içerir.

5 Burada tarif edilen bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, ya da bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını içeren bir bileşiği seçmenin bir metodu olup, metot insan TG2'si ya da bunun bir parçasının 143 ila 473 arasındaki amino asitlerinin polipeptit sekanslarından oluşan bir polipeptit sekansını seçici olarak bağlayan bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını seçmenin adımını içerir.

10 Metot, antikor faj gösterimi kullanılarak gerçekleştirilebilir. Antikoru ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının, transglutaminaz proteininin katalitik aktivitesini inhibe eden inhibe edici bir antikor olması tercih edilir.

15 İlave olarak burada tarif edilen, bir transglutaminaz proteinini seçici olarak bağlayan bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını üretmenin bir metodu olup, metot bir insan olmayan hayvana aşağıdakileri içeren bir bileşiğin verilmesini içerir:

- i) bir transglutaminaz çekirdek bölgesi/ katalitik etki alanı içeren ancak bir transglutaminaz varil ya da sandviç etki alanı ya da bunun bir parçasını içermeyen bir polipeptit; ve isteğe bağlı olarak
- ii) bir yardımcı madde.

20 Bir transglutaminaz çekirdek bölgesi/ katalitik etki alanı içeren ancak bir transglutaminaz varil ya da sandviç etki alanı içermeyen polipeptidin yukarıda açıklanan katalitik triadı ve isteğe bağlı olarak transglutaminaz proteininin GTP bağlanma bölgesini içereceği öngörülmektedir.

25 Metot ilave olarak bir transglutaminaz proteinine seçici bağlanması temelinde bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını seçme adımını içerebilir.

Burada tarif edilen, bir transglutaminaz proteinini seçici olarak bağlayan bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını, seçmenin bir metodu olup, metot insan TG2'si ya da bunun bir parçasının 143 ila 473 arasındaki amino asitlerinin polipeptit sekanslarından oluşan bir polipeptit sekansını seçici olarak bağlayan bir antikor ya da 30 bunun antijen bağlayıcı parçasını seçmenin adımını içerir.

Burada tarif edilen, bir insan olmayan hayvana aşağıdakiler içeren bir bileşiği vermeyi içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasını üretmenin bir metodudur:

- i) insan TG2'sinin 143 ila 473 arasındaki amino asitlerinin polipeptit sekansından ya da bunun bir parçasından oluşan bir polipeptit sekansı; ve isteğe bağlı olarak,
- ii) bir yardımcı madde.

Metot ilave olarak TG2 proteinine, örnek olarak insan TG2'sine seçici bağlanması temelinde bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasını seçme adımı içerebilir.

- 10 İlave olarak burada tarif edilen, bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı parçasının üretilmesi ya da seçilmesi için önceki metotlardan herhangi biri ile elde edilebilen bir antikor ya da antijen bağlayıcı parçasıdır.

"Yardımcı madde" ile, alıcının buluşun polipeptidine immün yanıtını artıran herhangi bir farmakolojik ya da immünolojik madde kastedilmektedir. Bağışıklık sisteminin hedef antijene tepkisini uyarmak için aşılara immünolojik yardımcı maddeler ilave edilir, fakat bunlar kendi başlarına bağışıklık kazandırmazlar. Yardımcı maddelerin örnekleri arasında yağ emülsiyonları, alüminyum tuzları gibi inorganik bileşikler, örnek olarak alüminyum hidroksit ya da alüminyum fosfat, Skualen gibi organik bileşikler, virozomlar ya da teknikte uzman bir kimsenin anlayabileceği herhangi bir uygun bileşik ya da bileşikler bulunur.

Burada tarif edilen, aşağıdakilerden oluşan izole edilmiş olan bir polipeptiddir:

- i) insan TG2'nin 143 ila 473 arasındaki amino asitlerinin polipeptit sekansı;
- ii) insan TG2'sinin 304 ila 326 arasındaki amino asitlerin polipeptit sekansı;
- iii) insan TG2'nin 351 ila 365 arasındaki amino asitlerinin polipeptit sekansı;
- iv) insan TG2'sinin 450 ila 467 arasındaki amino asit polipeptit sekansı; ya da bunun bir parçası, türevi ya da polipeptit taklidi.

Aynı zamanda tarif edilen, hemen önceki yönün polipeptidini kodlayan izole edilmiş olan bir polinükleotidir.

Burada tarif edilen tarifnameye ve şekillere atıfta bulunularak büyük ölçüde burada tarif edildiği gibi TG2 aktivitesi ile bağlantılı bir durumun tedavisinde kullanım için bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasıdır.

Burada tarif edilen, büyük ölçüde tarifnameye ve şekillere referans ile burada tarif edildiği gibi bir antikor ya da bunun antijen bağlayıcı bir parçasının kullanımınıdır.

Burada ve ekli istemlerde kullanıldığı şekli ile, "bir", "bir" ve "belirli bir" formları, bağlam açıkça aksini gerektirmedikçe çoğul formları da kapsamaktadır. Bu nedenle örnek olarak "bir antikor"a yapılan atıf, bu tür antikorların bir çoğunu içerir ve "doza"ya yapılan atıf, teknikte uzman kişiler tarafından bilinen bir ya da daha fazla doza ve eş değerlerine atıf içerir ve bu şekilde.

Buluş şimdi aşağıdaki sınırlayıcı olmayan Şekillere ve Örneklerle referans ile daha ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

10 **Şekil 1: Bir insan TG2 rekombinant proteinin üretilmesi**

A: TG2 katalitik çekirdek cDNA, pClineo-hTG2 vektöründen PCR ile üretilmiştir ve pET 21a plazmidine yerleştirilmiştir. E. Coli'deki yükseltimenin ardından bu, TG2 çekirdeği cDNA'sını salmak ve % 1 Agaroz jeli (hat 3) üzerinde çalıştırmak için Nhe I ve Hind III ile sindirilmiştir. Bantlar, 100 bp'lik bir merdivene (hat 1) ve bir λ DNA molekülü ağırlık işaretleyicisine (Hat 2) referans alınarak boyutlandırılmıştır.

B: E. coli suşu BL21-CodonPlus-(DE3)-RIPL'yi dönüştürmek için pET21a TG2 çekirdek vektörü kullanılmıştır. Ekspresyon, 4 saat boyunca IPTG kullanılarak indüklenmiştir. TG2 çekirdek proteini, santrifüjleme ile lizatlardan geri kazanılan çözünmeyen cisimler oluşturmuştur. Bunlar yeniden çözülmüştür ve 37 kDa His etiketli TG2 çekirdeği bir nikel kolonunda saflaştırılmıştır. 10 ng SDS-PAGE ile ayrılmıştır, batı lekeli ve bir hassas artı molekül ağırlık işaretleyicisine (hat 1) referans ile CUB7402 anti TG2 antikoruna (hat 2) ile prolanmıştır.

Şekil 2: RhTG2 çekirdek proteinine farelerde İmmünolojik Yanıt

A: Test kanamaları, birinci aşılama sonrakı 45. günde ve ikinci takviyeden 10 gün sonra 4 katalitik çekirdek ile bağışıklık kazandırılmış olan fareden alınmıştır. Serum seri olarak seyreltilmiştir ve immobilize edilmiş olan TG2 çekirdek proteinine karşı ELISA ile reaktivite kontrol edilmiştir.

B: Reaktivitesi, insan rh TG2 ve rh TG2 katalitik çekirdek etki alanına karşı taranarak da kontrol edilmiştir. 20, 40, 80 ng protein, SDS PAGE ile parçalanmıştır ve, bir PVDF membranı üzerinde batı blotlanmıştır. Bu, 1:1000 serum seyreltisi ile immüno probe edilmiştir. Antikor bağlanması, anti fare γ zinciri spesifik HRP kullanılarak

ortaya çıkmıştır. Bir kesinlik ve artı ağırlık referansı için moleküler ağırlık işaretleyicisi kullanılmıştır.

Şekil 3: TG ailesi üyelerine karşı hibridom reaktivitesi

5 A: ELISA, TG2'ye iyi reaktivite sergileyen 109 hibridom süpernatantında TG tipi özgüllüğünü belirlemek için rekombinant TG'ler ile (100 ng/kuyucuk) kaplanmış plakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Antikor bağlanması, anti fare γ zinciri spesifik HRP kullanılarak ortaya çıkmıştır. Tarananların rasgele bir seçimi, çapraz reaktivite gösteren EF4, CG9 ve FD8 dahil olmak üzere gösterilmiştir.

10 B: Seçilen dokuz hibridom çift klonlanmıştır. IgG saflaştırılmıştır ve rekombinant insan TG1, TG2, TG3, TG7 ve Faktör XIIIa'ya karşı reaktiflik açısından test edilmiştir ve her TG'nin 100 ng'si ile kaplanmış plakalı ELISA kullanılmıştır. Veriler, 3 ayrı ELISA $\pm$ SEM'den ortalama OD değerini temsil eder.

Faktör XIIIa, grafiklerde TG13 olarak belirtilmiştir.

Şekil 4: TG2'ye karşı inhibe edici aktiviteye sahip olan hibridom tanımlanması

15 TG2'ye özgü olan 32 hibridom kuyucuğundan şartlandırılmış ortam, 3H putresin ekleme deneyi kullanılarak 100 ng rhTG2 aktivitesi üzerindeki etkileri için taranmıştır. Kimyasal tava TG2 inhibitörü 1,3-Dimetil-2- [(2-okso-propil)tiyo] imidazolyum klorit, inhibisyon için pozitif bir kontrol olarak kullanılmıştır. RPMI (koşullandırılmamış olan ortam) negatif kontrol kullanılmıştır. Karşılaştırma için Quark biyoteknolojisi ile pilotluk yapan 500 ng TG2 inhibitör antikor dahil edilmiştir. Veriler, çift $\pm$ SEM'de yapılan en az üç deneyden 30 dakika içinde birleştirilen ortalama CPM'yi temsil eder. Gri renkte gösterilen çubuklar, önemli TG2 inhibisyonunu gösterir ($p < 0.05$).

Şekil 5: İnhibitör Antikor Epitoplarının Haritalanması.

25 Her inhibitör monoklonal antikor, bir ELISA plakasına bağlanmıştır ve bir insan TG2 faj kütüphanesine karşı panlanmıştır. Antikora faj bağlanması kurtarılmıştır, büyütülmüştür ve 4 tur daha panlama işlemine tabi tutulmuştur. Faj içerisindeki TG2 kütüphanesi parçaları daha sonra sekanslanmıştır ve her antikor için epitopu belirlemek için örtüşen sekanslar kullanılmıştır. Antikorlar arasındaki ortak sekanslar daha sonra belirli bir inhibitör epitopu için konsensüs sekansı ve buna göre 30 gruplanmış olan antikorlar belirlemek için kullanılmıştır. 3 inhibitör epitop tanımlanmıştır.

Şekil 6: TG2 katalitik Çekirdeği ile İnhibitör Epitopların Yapısal Yeri

TG2 amino asit sekansı Pymol'e girilmiştir ve açık, Ca^{2+} aktif halde, varsayılan kalsiyum bağlama bölgeleri (turkuaz) ve referans için gösterilen katalitik triad (gri) ile oluşturulan yapının 3B grafiksel gösterimi (sol panel) Konsensüs inhibitör epitopları daha sonra mavi (Antikor grubu 1 - AB1 bölgesi), kırmızı (antikor grubu 2 - DF4 bölgesi) ve sarı (antikor grubu 3, DD9 bölgesi) eklenmiştir.

Şekil 7: İnhibitör antikorların VL Sekansı

Her bir inhibitör hibridomdan RNA, VH genlerini büyütmek için bir dejenere FR1 primerleri, MH1 ve MH2 primerleri ve 3 sabit bölge primerleri kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları AB1 için gösterilmiştir.

Şekil 8.AB1'in bir hücre homojenatında TG2 aktivitesini inhibe etme etkinliği

A: Hep2G hücreleri çözünmüştür ve proteinin 45 ug'si 20 dakika boyunca AB1, DH2, DD9, BB7, DC1 ve EH6'dan gelen IgG'nin 750 ng'si ile karıştırılmıştır. Bu daha sonra 1 saatten fazla örnekleme ile 3H Putresin dahil TG aktivite deneyi kullanılarak test edilmiştir. Reaksiyon oranı hesaplanmıştır ve rastgele bir antikor ile (MAB002) inkübe edilen aynı lizatın bir yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Veriler, iki kopya halinde yapılan 2 ayrı deneyden elde edilen ortalama yüzde inhibisyon $\pm$ SEM'i temsil eder. * $p < 0.05$

B: HepG2 hücreleri, TG2 ekspresyonunu düzenlemek için 96 saat boyunca artan glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Hücreler toplanmıştır, çözünmüştür ve SDS-PAGE ile parçalanmış 25 ug lizat, batı lekelenmiştir ve daha sonra bir kemilüminesan uç noktası kullanılarak bir 1 ng/ml AB1 IgG çözeltisi ile immüno probelanmıştır.

Şekil 9.(Tablo 1): TG2 inhibitör antikorları için karşılaştırmalı IC50 değerleri

İnsan, sıçan ve fareye karşı her antikor için bir IC50 değerini belirlemek için 3H Putresin tahlili kullanılmıştır. 100 ng insan TG2 ya da 25 ng fare ve sıçan TG2, reaksiyon karışımının 10 ul'sinde saatte yaklaşık 3000 cpm Putresin ilave edilen bir reaksiyon oluşturmak için kullanılmıştır. Her antikorun seri seyreltmeleri daha sonra reaksiyon karışımına 500 ng (5ug/ml nihai konsantrasyon) eklenmesinden başlanarak uygulanmıştır ve reaksiyonu aktive etmeden önce 20 dakika boyunca TG2 ile inkübe edilmiştir. IC50 değerleri, enzimatik reaksiyon oranının, grafik panel

prizmasına uygun bir eğri kullanılarak % 50 oranında azaltıldığı konsantrasyonun belirlenmesi ile hesaplanmıştır. Değerler, 1 ng TG2'yi inhibe edecek olan reaksiyonda mg/ml cinsinden IgG miktarı olarak ifade edilir.

Şekil 10: TG2 inhibisyonuna yanıt olarak HK2 hücrelerinde hücre dışı TG aktivitesi.

HK2 hücreleri fibronektin üzerine kaplanmıştır ve 2 saat boyunca 0.1 M biyotin kadaverinin varlığında 4ng/μl insan anti TG2 antikoru (AB1) (kısım A), 4ng/μl insan anti TG2 antikoru (DC1) (B kısmı) ya da bölgeye özgü pan TG inhibitörü 1,3-Dimetil-2 - [(2-okso-propil)tiyo] imidazolyum klorürün 400 μM'si ile inkübe edilmiştir. Hücre dışı TG aktivitesi, biyotin kadaverinin, fibrovektin içerisine katılması ile ölçülmüş, ekstravadin HRP ve bir TMB substratı kullanılarak ortaya konmuştur. Optik yoğunluktaki değişiklikler, 96 kuyucuklu bir plaka okuyucusunda 450nm'de ölçülmüştür. Veriler, her deney grubu için n = 6 kuyucuk olan 1 mg hücre proteinine düzeltilmiş 450 nm'de ortalama OD'yi temsil eder.

Şekil 11: TG2 inhibisyonunun AB1 antikoru ile Quark'ın TG2 inhibitör antikorunun bir ³H putresin ekleme deneyi kullanılarak bir fab parçası ile karşılaştırılması

hTG2'nin 100 ng'si TG2 aktivitesi için, ³H Putresinin dimetilkazein içerisine 60 dakikalık bir periyot boyunca ya W02006/100679'da Quark tarafından tarif edilen ve Sheffield Üniversitesinde sentezlenmiş olan bir antikorun bir fab parçasının 1 μg'sinin ile ya da AB1'in 500 ng'sinin eklenmesi sureti ile dahil edilmesine dayanılarak tahlil edilmiştir. Veriler, iki kopya halinde yapılan 3 bağımsız deneyden ³H putresininin (CPM) ± SEM'in dahil edilmesi ile ortalama TG aktivitesini temsil eder.

Şekil 12: TG2 inhibisyonunun AB1 antikoru ile Quark'ın TG2 inhibitör antikorunun bir ³H putresin ekleme deneyi kullanılarak bir fab parçası ile yüzde karşılaştırılması

Şekil 11'den elde edilen veriler alternatif olarak AB1 ve Quark antikor fab parçasının uygulanması sureti ile TG2 aktivitesinin nispi karşılaştırmalı yıkımını göstermek için her bir zaman noktasında TG aktivitesinin yüzdesi olarak ifade edilir.

Şekil 13: TG2 inhibisyonunun AB1 antikorunun Quark'ın TG2 inhibitör antikorunun bir ³H putresin ekleme deneyi kullanılarak bir rekombinant sıçan IgG'si ile karşılaştırılması

hTG2'nin 100 ng'si TG2 aktivitesi için, ^3H Putresinin dimetilkazein içerisine 60 dakikalık bir periyot boyunca ya W02006/100679'da Quark tarafından tarif edilen ve Medical Research Council Technology'de sentezlenmiş olan bir TG2 inhibitör antikorun bir rekombinant sıçan versiyonun 500 ng'sinin ile ya da AB1'in 500 ng'sinin eklenmesi sureti ile dahil edilmesine dayanılarak tahlil edilmiştir. Veriler, iki kopya halinde yapılan 3 bağımsız deneyden ^3H putresininin (CPM) $\pm$ SEM'in dahil edilmesi ile ortalama TG aktivitesini temsil eder.

Şekil 14: TG2 inhibisyonunun AB1 antikorunun Quark'ın TG2 inhibitör antikorunun bir ^3H putresin ekleme deneyi kullanılarak bir rekombinant sıçan IgG'si ile yüzde karşılaştırılması

Şekil 13'ten elde edilen veriler alternatif olarak AB1 ve Quark rekombinant sıçan IgG'sinin uygulanması sureti ile TG2 aktivitesinin nispi karşılaştırmalı yıkımını göstermek için her bir zaman noktasında TG aktivitesinin yüzdesi olarak ifade edilir.

Şekil 15: AB1'in HK2 hücrelerinde ECM düzeylerine etkisi

HK-2 hücrelerinde olgun kollajen seviyeleri, ^3H prolinin ECM'ye, TG2 inhibitör antikor AB1 ilaveli ya da ilavesiz olarak 76 saatlik bir süre içerisinde dahil edilmesi ile ölçülmüştür. Veriler, işlenmemiş hücrelerde $\pm$ SEM'de ortalama seviyenin bir yüzdesi olarak ifade edilen mg hücresel protein başına ^3H prolinin dahil edilmesini temsil eder. n = 2'dir.

Şekil 16: İnsanlaştırılmış antikor versiyonlarının bağlanma ELISA'sı.

İnsanlaştırılmış hafif zincirlerin ve ağır zincir vektörlerinin farklı kombinasyonları ile birlikte transfekte edilen HEK293F hücrelerinden alınan süpernatantlar, konsantrasyonun belirlenmesi ve bir anti huTG2 ELISA'da bir anti insan IgG ELISA'sında test edilmiştir. Her süpernatant, üç kopya halinde test edilmiştir ve IC50'ler belirlenmiştir. En güçlü kombinasyon ilave çalışmalar için ve aday insanlaştırılmış antikor olarak seçilmiştir.

Şekil 17: MRC Quark CTD190'in insan Tg2'sinde ELISA ile test edilmesi.

96 kuyucuklu plakalar, gece boyunca karbonat tamponu içinde hTG2 (1 $\mu\text{g/ml}$) ile kaplanmıştır ve 100 ng/ml primer antikor kullanılarak ELISA saptama yapılmıştır. Tespit CUB için anti fare IgG (SIGMA 3673) ve Quark için anti sıçan IgG (SIGMA

A5795) (her ikisi de 1:5000) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MRC T tarafından yapılan Quark antikoru, insan TG2 ile reaksiyona girer.

Şekil 18: AB1 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG1 ile dejenere sinyal sekansı primer MHV4 kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC ile dejenere sinyal sekansı primer MKV4 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 19: BB7 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG1 ile dejenere sinyal sekansı primer MHV4 kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC ile dejenere sinyal sekansı primer MKV4 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 20: DC1 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG1 ile dejenere sinyal sekansı primer MHV4 kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC ile dejenere sinyal sekansı primer MKV4 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 21: JE12 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG1 ile bir 5' RACE PCR kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC ile sinyal sekansı primer MKV1 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 22: EH6 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG6 ile bir 5' RACE PCR kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC ile sinyal sekansı primer MKV1 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 23: AG9 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG1 ile dejenere sinyal sekansı primer MHV7 kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC ile dejenere sinyal sekansı primer MKV1 ile 11 arasındakilerin bir karışımı kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 24: AH3 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG2B ile dejenere sinyal sekansı primer MHV7 kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit

bölge primer MKC ile sinyal sekansı primer MKV1 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 25: DD9 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG2A ile bir 5' RACE PCR kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC ile dejenere sinyal sekansı primer MKV5 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 26: DH2 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG2B ile bir 5' RACE PCR kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC ile dejenere sinyal sekansı primer MKV45 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 27: DD6 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG2B ile bir 5' RACE PCR kullanılarak ya da bir lambda hafif zincir sabit bölge primer MLC ile bir 5' RACE PCR kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VL sekansları gösterilmiştir.

Şekil 28: IA12 hibridomundan RNA, ağır zincir sabit bölge primer MHCG1 ile dejenere sinyal sekansı primer MHV9 kullanılarak ya da bir kappa hafif zincir sabit bölge primer MKC dejenere sinyal sekansı primer CL14 kullanılarak PCR ile ekstre edilmiştir, ters transkripte edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Elde edilen VH ve VK sekansları gösterilmiştir.

Şekil 29: Doz yanıt eğrileri ve kimerik anti TG2 antikorları ile rekombinant insan TG2'nin enzimatik inhibisyonu için IC50 değerleri, (a) cAB003, (b) cBB001, (c) cDC001, (d) cDD9001, (e) cDH001 ve (f) TG2 antikoru CUB7402. IC50 değerleri 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır.

Şekil 30: Doz yanıt eğrileri ve kimerik anti TG2 antikorları (a) cDC001 ve (b) ticari TG2 antikoru CUB7402 tarafından rekombinant sinomogulus maymun TG2'nin enzimatik inhibisyonu için IC50 değerlerine sahiptir.

Şekil 31: Doz yanıt eğrileri ve insanlaştırılmış anti TG2 antikorları ile rekombinant insan TG2'nin enzimatik inhibisyonu için IC50 değerleri, (a) hBB001AA, (b) hBB001BB, (c) hAB005 ve (d) hAB004.

Şekil 32: Doz yanıt eğrileri ve insanlaştırılmış anti TG2 antikorları ile rekombinant sinomogulus maymun TG2'nin enzimatik inhibisyonu için IC50 değerleri, (a) hBB001AA ve (b) hAB004.

Şekil 33: Doz yanıt eğrileri ve murin monoklonal anti TG2 antikorları tarafından rekombinant insan TG2'nin enzimatik inhibisyonu için IC50 değerleri, (a) mAB003, (b) mBB001, (c) mDC001, (d) mDD9001, (e) mDH001 ve (f) mDD6001.

Şekil 34 - AB1 antikorlarının insanlaştırılmış versiyonlarının bağlanma ELISA'sı.

İnsanlaştırılmış AB1 hafif zincirlerin ve AB1 ağır zincir vektörlerinin farklı kombinasyonları ile birlikte transfekte edilen HEK293F hücrelerinden alınan süpernatantlar, konsantrasyonun belirlenmesi ve bir anti huTG2 ELISA'da bir anti insan IgG ELISA'sında test edilmiştir. Her süpernatant, üç kopya halinde test edilmiştir ve IC₅₀'ler belirlenmiştir. En güçlü kombinasyon ilave çalışmalar için ve aday insanlaştırılmış antikor olarak seçilmiştir.

Şekil 35: Doz yanıtı ELISA bağlanma eğrileri ve insan TG2 (a) kimerik antikorları CDD9001, cDH001, cDC001, ticari TG2 antikoru CUB7402 ve izotip eşleşmeli kontrol ve (b) kimerik antikor cBB001 ve izotip eşleşmeli kontrol ve (c) kimerik antikor cAB003 ve izotop uyumlu kontrole bağlanan antikorlar için EC50 verileri.

Şekil 36: Doz yanıtı ELISA bağlanma eğrileri ve sinomolgus maymun TG2 (a) kimerik antikorları CDD9001, cDH001, cDC001, ticari TG2 antikoru CUB7402 ve izotip eşleşmeli kontrol ve (b) kimerik antikor cBB001 ve izotip eşleşmeli kontrol ve (c) kimerik antikor cAB003 ve izotop uyumlu kontrole bağlanan antikorlar için EC50 verileri.

Şekil 37: Doz tepkisi ELISA bağlanma eğrileri ve insan TG2 (a) insanlaştırılmış antikorları hBB001AA, HBB001BB, ticari TG2 antikoru CUB7402 ve izotip eşleşmeli kontrol ve (b) insanlaştırılmış antikor hAB004'e bağlanan antikorlar için EC50 verileri

Şekil 38: Doz tepkisi ELISA bağlanma eğrileri ve sinomogulus maymun TG2 (a) insanlaştırılmış antikorları hBB001AA, HBB001BB, ticari TG2 antikoru CUB7402 ve izotip eşleşmeli kontrol ve (b) insanlaştırılmış antikor hAB004 ve izotop uyumlu kontrole bağlanan antikorlar için EC50 verileri.

Şekil 39: Hücre dışı TG2 ile insanlaştırılmış AB1 bağlanma aktivitesi. HK2 hücreleri tarafından üretilen Hücre Dışı TG2 aktivitesinin inhibisyonu, biyotin kadaverinin

fibronektine dahil edilmesini ölçen bir ELISA kullanılarak test edilmiştir. İnsanlaştırılmış AB1 (hAB005) ve elde edilen IC tarafından TG2 aktivitesinin inhibisyonunu gösteren örnek bir eğri gösterilmiştir.

Şekil 40: Hücre dışı TG2 ile insanlaştırılmış BB7 bağlama aktivitesi.

- 5 HK2 hücreleri tarafından üretilen Hücre Dışı TG2 aktivitesinin inhibisyonu, biyotin kadaverinin fibronektine dahil edilmesini ölçen bir ELISA kullanılarak test edilmiştir. İnsanlaştırılmış BB7'nin versiyonları (hBB001AA ve hBB001BB) tarafından TG2'nin inhibe edilmesini gösteren bir örnek eğri ve elde edilmiş olan IC'ler gösterilmiştir.

Şekil 41: Sitokalazin D, R281 ve ZDON kontrol çizik testi sonuçları ve ticari antikor CUB7402 çizik testi sonuçları.

10

Çizik yarası deneyleri WI-38 hücresi kullanılarak yapılmıştır, kaplama yapıldıktan ve gece boyunca büyütüldükten sonra, hücreler serumsuz ortamlarda yıkanmıştır ve bir Essen Yara Yapıcısı kullanılarak bir çizik yara oluşturulmuştur. Ortam uzaklaştırılmış ve kontroller ve test antikorları içeren 95 ul/kuyucuk serumsuz ortam ile

15 değiştirilmiştir. Plaka bir Essen Incucyte içine yerleştirilmiştir ve yaranın kapanması Incucyte yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Sitokalazin D, R281 ve Z -Don (panel A) ve ticari antikor CUB7402 ve sitokalazin (panel B) kontrolleri için zamana göre nispi yara yoğunluğu çizilmiştir.

20

Şekil 42: İnsanlaştırılmış BB7 çizik testi sonuçları.

- Çizik yarası deneyleri WI-38 hücresi kullanılarak yapılmıştır, kaplama yapıldıktan ve gece boyunca büyütüldükten sonra, hücreler serumsuz ortamlarda yıkanmıştır ve bir Essen Yara Yapıcısı kullanılarak bir çizik yara oluşturulmuştur. Ortam uzaklaştırılmış
- 25 ve kontroller ve test antikorları içeren 95 ul/kuyucuk serumsuz ortam ile değiştirilmiştir. Plaka bir Essen Incucyte içine yerleştirilmiştir ve yaranın kapanması Incucyte yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İnsanlaştırılmış hBB001AA ve kontrol sitokalazin D (panel A) ve hBB001BB ve kontrol kalazin D (panel B) için nispi yara yoğunluğu zamana karşı çizilmiştir.

30

Şekil 43: İnsanlaştırılmış AB1 çizik testi sonuçları.

Çizik yarası deneyleri WI-38 hücresi kullanılarak yapılmıştır, kaplama yapıldıktan ve gece boyunca büyütüldükten sonra, hücreler serumsuz ortamlarda yıkanmıştır ve bir Essen Yara Yapıcısı kullanılarak bir çizik yara oluşturulmuştur. Ortam uzaklaştırılmış ve kontroller ve test antikorları içeren 95 ul/kuyucuk serumsuz ortam ile değiştirilmiştir. Plaka bir Essen Incucyte içine yerleştirilmiştir ve yaranın kapanması Incucyte yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İnsanlaştırılmış hAB005 ve kontrol sitokalazin D için nispi yara yoğunluğu zamana karşı çizilmiştir.

Şekil 44: Kimerik DC1 çizik testi sonuçları.

Çizik yarası deneyleri WI-38 hücresi kullanılarak yapılmıştır, kaplama yapıldıktan ve gece boyunca büyütüldükten sonra, hücreler serumsuz ortamlarda yıkanmıştır ve bir Essen Yara Yapıcısı kullanılarak bir çizik yara oluşturulmuştur. Ortam uzaklaştırılmış ve kontroller ve test antikorları içeren 95 ul/kuyucuk serumsuz ortam ile değiştirilmiştir. Plaka bir Essen Incucyte içine yerleştirilmiştir ve yaranın kapanması Incucyte yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir .Kimerik antikör cDC001 ve kontrol sitokalazin D için nispi yara yoğunluğu zamana karşı çizilmiştir.

Şekil 45: Biacore tarafından CAB003 immobilize edilmiş olan antikora insan TG2 bağlanması. Solda, 25, 50, 100 ve 200 nm'de, 50 nm'deki kopya dahil olacak şekilde, cAB003-kaplı biyosensörler üzerinde insan TG2 enjeksiyonlarının birleşme fazları gösterilmiştir. Aynı deneyden, sağda gösterildiği gibi iki uzun ayrılma fazı toplanmıştır. Uyarlar kesintisiz siyah çizgiler olarak gösterilmiştir ve sonuçlar Tablo 25'te gösterilmektedir.

Şekil 46: Biacore tarafından immobilize edilmiş olan antikora sinomolgus maymun TG2 bağlanması. Solda, 25, 50, 100, 200 ve 400 nm'de, 50 nm'deki kopya dahil olacak şekilde, cAB003 kaplı biyosensörler üzerinde sinomolgus maymun TG2 enjeksiyonlarının birleşme fazları gösterilmiştir. Aynı deneyden, sağda gösterildiği gibi iki uzun ayrılma fazı toplanmıştır. Uyarlar kesintisiz siyah çizgiler olarak gösterilmiştir ve sonuçlar Tablo 26'te gösterilmektedir.

Şekil 47: Kalsiyum yokluğunda Biacore tarafından cDH001 immobilize edilmiş olan antikora insan TG2 bağlanması. Solda, 25, 50, 100 ve 200 nm'de, 50 nm'deki kopya dahil olacak şekilde, cDH001 kaplı biyosensörler üzerinde insan TG2 enjeksiyonlarının birleşme fazları gösterilmiştir. Aynı deneyden, sağda gösterildiği

gibi iki uzun ayrılma fazı toplanmıştır. Uyarlar kesintisiz siyah çizgiler olarak gösterilmiştir ve sonuçlar Tablo 25'te gösterilmektedir.

Ornek 1: 3 spesifik inhibitör epitopun tanımlanması ile birlikte insanda terapötik kullanıma uygun bir TG2 inhibitör antikor geliştirilmesi.

- 5 Transglutaminaz tip 2 (TG2), hücre dışı matris (ECM) de dahil olmak üzere bitişik peptitler ya da proteinler arasında bir ϵ -(γ -glutamil)-lizin izopeptit bağının oluşumunu katalize eder. Yükseltilmiş olan hücre dışı TG2, ECM birikiminin hızlanmasına ve doku izlerinin ve fibrozun altında yatan klirensin azalmasına yol açar. Bu, aynı zamanda çölyak hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve bazı kanserler ile
- 10 bağlantılıdır. Transglutaminazları inhibe eden çok sayıda bileşik geliştirilmiş olmasına rağmen, bunların hiçbirisi TG2'ye özgü değildir, tüm transglutaminazları bir dereceye kadar inhibe eder. Bunlar TG2'nin bu patolojilerdeki rolü için kavram çalışmalarının kanıtlanmasına izin verirken, izoform özgüllük eksikliği insandaki uygulamalarını engellemiştir. Bunu ele almak için, sadece TG2 aktivitesini inhibe edecek yüksek
- 15 benzeşimli bir TG2 spesifik antikor geliştirmeye karar verilmiştir.

- İnsan TG2 çekirdeğinin 143 ila 473 arasındaki amino asitlerini kapsayan bir rekombinant protein, Escherichia coli'de üretilmiştir, tekrar katlanmıştır ve 100 μ g'si, 2, 5, 7 ve 10 haftada destekler ile 4 fareye enjekte edilmiştir. Son desteklemeden 4 gün sonra dalaklar toplanmış ve splenositler Sp2/0-Ag-14 miyelom hücrelerine
- 20 kaynaştırılmıştır. Yetmiş beş hibridom süpernatantı TG2'ye özgüllük göstermiştir. Bu hibridom süpernatantları, 100 μ g TG2 içeren bir putresine dahil etme analizinde TG2 aktivitesini inhibe edebilme yetenekleri açısından taranmıştır. On TG2'ye özgü süpernatant inhibe edilmiştir. Bunlar daha sonra çift klonlanmıştır. Bir TG2 parça kütüphanesini taramak için faj göstergesini kullanmak sureti ile, her bir antikor, TG2
- 25 çekirdek etki alanında kesin bir epitop ile eşleştirilmiştir ve 3 farklı inhibitör epitop saptanmıştır. Aktiviteyi 100 ng TG2'den % 50 oranında azaltmak için antikor miktarı belirlenmiştir.

- En etkili 2 antikor olan AB1 ve DC1, 304 ila 327 arasındaki amino asitlerine bağlanmıştır ve bir rekombinant TG2 ng başına 1.1×10^{-5} mg/ml IgG'lik bir IC50'ye
- 30 sahip olmuştur. AB1 ve DC1'in uygulanması, kültür ortamına uygulandığında insan Hep2G hücrelerinde TG2'yi ve insan HK-2 hücrelerinde hücre dışı TG2'yi başarı ile inhibe edebilmiştir.

Bu nedenle, farelerin TG2 çekirdek etki alanı ile immünizasyonu, katalitik çekirdek içinde daha önceden bildirilmemiş olan epitoplara hedefleyen monoklonal antikorların üretilmesini şaşırtıcı bir şekilde sağlamıştır. Bu antikorlar spesifiktir, etkili bir şekilde TG2 aktivitesini inhibe eder ve in vivo uygulama için uygundur.

5 Malzemeler ve Metotlar:

Transglutaminaz 2 katalitik çekirdek alan üretimi

İnsan TG2'nin katalitik çekirdek alanı (kalıntı Cys143 - TG2'nin Met 473'ü) eksprese edilmiştir, farelerde immünizasyona izin vermek için saflaştırılmıştır. Katalitik çekirdek etki alanı (PCR duyarlı primer GCG CGC GCT AGC TGC CCA GCG GAT GCT GTG TAC CTG GAC, anti sens GCG CGC AAG CTT CAT CCC TGT CTC CTC CTT CTC GGC CAG) ekspresyon vektörü pET2a(+)'ya klonlanmıştır ve E. coli suşu BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL'de (Agilent Technologies) çözünmeyen inklüzyon cisimleri olarak ifade edilmiştir. Kısaca, kompetent BL21 (DE3) pLysS hücrelerinin 50 µl'si ekspresyon plazmidinin (30 ng/µl) 1 µl'si ile transforme edilir ve seçici antibiyotiklerini (100 µg/ml ampicillin, 34 µg/ml kloramfenikol) ve % 1 glikoz içeren LB agar plakaları üzerine kaplanmıştır ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Tek bir koloni, 100 µg/ml ampicillin, 34 µg/ml kloramfenikol ve % 1 glikoz içeren taze LB ortamının 10 ml'sini çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de ve 200 rpm 'de tohumlamak için seçilmiştir. Bir gecede büyümeden sonra, kültürler % 1 glikoz ile 100 ml 2xYT ortamına aktarılmıştır ve OD_{600nm} 0.8'e yükseltilmiştir ve daha sonra OD_{600nm} tekrar 0.8'e ulaşana kadar 1L 2xYT ortamına aktarılmıştır. Ekspresyonu uyarmak için 1 mM IPTG altında 4 saat indüksiyondan sonra, topaklanmıştır ve bakteriler, tampon A (10 mM Tris; 1 mM EDTA; 10 mM DTT; 1 mM PMSF; 0.5 mg/ml lizozim proteaz inhibitör tabletleri (Roche) pH 8.0) içerisinde sonikasyon ile çözünmüştür. Inklüzyon cisimleri, 40,000 x g'de santrifüjlenerek toplanmıştır ve deiyonize suda son bir yıkamadan önce üç kez yıkama tamponu B'de (50 mM Tris; 1 mM EDTA; 10 mM DTT; % 2 sodyum deoksikolat, pH 8.0) yıkanmıştır.

Inklüzyon cisimleri, 3.5 mL yeniden çözme tamponu (40 mM Tris-HCl, 8 M üre ve 10 mM DTT pH 12) içinde çözündürülmüştür ve yeniden katlama tamponu (40 mM Tris HCl; 150 mM NaCl; % 20 gliserol; 5 mM sistein; karanlıkta 4 °C'de 0.5 mM sistin pH 8) içinde 16 saatlik bir süre boyunca tekrar katlanmıştır.

Çözünürlleştirilmiş inklüzyon cisimleri, 1 ml'lik bir Nikel kolonuna yüklenmiştir. Kısaca, kolon, bağlama tamponu (40 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) ile daha önceden dengelenmiştir ve inklüzyon cisimleri uygulanmıştır. Kolon geniş ölçüde yıkanmıştır (40 mM Tris; 300 mM NaCl; 30 mM imidazol). Rekombinant protein, yüksek konsantrasyonlu imidazol tamponu (40 mM Tris; 300 mM NaCl; 300 mM imidazol) ile ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılmış olan protein içeren parçalar bir araya getirilmiş ve uygun bir tampona (40 mM Tris; 300 mM NaCl pH 8) karşı gece boyunca diyaliz edilmiştir. Protein Bradford protein tahlili kullanılarak değerlendirilmiştir.

10 **HepG2 hücre kültürü ve lizatları**

HepG2 hücreleri nazikçe Richard Ross (Sheffield Üniversitesi) tarafından sağlanmıştır. Hücreler, % 10 fetal dana serumu (FCS), 100 IU penisilin ve 100 µg/ml streptomisin, 2 mM l-glutamin (tümü GIBCO) ile desteklenmiş litre glikoz başına DMEM/4.5 g % 95 nemlendirilmiş % 5 CO₂ atmosferinde 37 °C'de rutin olarak büyütülmüştür. 10 cm'lik bir tabağa iki milyon hücre ekilmiştir ve 48 saat boyunca büyütülmüştür. Hücreler 250 µl STE tamponunda (0.32 M sukroz, 5 mM Tris, proteaz inhibitörleri içeren 1 mM EDTA, Fenilmetil sülfonil florür (1 mM), benzamidin (5 mM) ve löpeptin (10 µg/ml) içinde çözünmüştür ve buz üzerinde TG2 aktivite deneyinde kullanılabilen bir hücre lizatı üretmek için selenlenmiştir.

20 **İnsan Böbrek 2 (HK2) hücreleri:**

HK-2 hücreleri (böbrek proksimal tübüler epitel) pasaj 3'te Avrupa hücre kültürü koleksiyonundan satın alınmıştır. Hücreler rutin olarak 37 °C'de % 95 nemlendirilmiş % 5 CO₂ atmosferinde keratinosit serumsuz bir ortamda (KSFM, Gibco 17005-042) rekombinant EGF (0.1 ila 0.2 ng/ml arasında) ve sığır hipofizi ile desteklenmiş L-glutamin özü (20 ila 30 µg/ml arasında) ile büyütülmüştür. Geçiş için ortam çıkarılmıştır ve 37 °C'de 1 dakika boyunca 1 ml % 0.25 tripsin/ EDTA (T75 şişesi) ile tripsinlenmeden önce bir kez 1 x PBS ile yıkanmıştır Hücreler, KSFM'nin 10 ml'si içinde yeniden süspanse edilmiştir ve 1 dakika boyunca 400 g'de santrifüjlenmiştir. Ortam uzaklaştırılmıştır ve hücreler KSFM'ye kaplanmıştır (1:3 ila 1:5 ayrılma normal arasında). Hücreler deneysel olarak 5 ila 14 arasındaki geçitlerde kullanılmıştır. Hücreler tipik olarak % 95 birleşme noktasına kadar iyi bir şekilde büyümüştür.

Koomassie boyama ve western blotlama

Rekombinant proteinlerin saflığı, % 10 (ağırlık/ hacim) poliakrilamit denatüre edici bir jel üzerinde 5 µg geri kazanılmış proteinin çalıştırılması ve Koomassie Parlak Mavi R boyama çözeltisi (Sigma) ile lekelenerek kontrol edilmiştir.

- 5 TG2 çekirdek protein sentezinin ve bunun yanı sıra immünizasyondan sonra TG2 ve TG2 çekirdek reaktivite seviyelerinin doğrulanması, western blotlama ile ölçülmüştür. Rekombinant proteinler (10 ila 80 ng arasında), gerektiği gibi % 10 (ağırlık/ hacim) poliakrilamit deniştirici ya da deniştirici olmayan bir jele yüklenmiştir ve 100 V'de bir saat boyunca PVDF membranlarına (Transblot SD, Biorad, UK) aktarılmıştır. Membranlar TBS/% 0.1 (hacim/ hacim) Tween 20 içinde % 3 (ağırlık/ hacim) BSA ile 10 4 °C'de gece boyunca bloke edilmiştir. Ardından membranlar yıkanmıştır ve % 1 BSA içeren TBS/ Tween içerisinde monoklonal fare anti transglutaminaz antikorları ile proplanmıştır.

- 15 Rekombinant TG2 çekirdek proteininin kanıtlanması ve antikor taraması için pozitif bir kontrol olarak ticari antikor Cub7402 (neomarker), 1:1000'lük bir seyreltmede kullanılmıştır. Birincil antikorun bağlanması, anti fare gama zinciri HRP bağlantılı ikincil antikor (Sigma, Poole, UK) ile tespit edilmiştir. Bantlar ECL kimyasal parlaklık tespit etme sistemi (Amersham, UK) kullanılarak görüntülenmiştir.

Fare immünizasyonu ve füzyon

- 20 Her bir fare, 50 µg antijen (steril PBS ile 50 µl hacmine kadar yapılmıştır) ve 50 µl tam Freund yardımcı maddesinin bir karışımı ile immünize edilmiştir. Dört (8 ila 12 haftalık arası) BALB/C fareye enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlar için tamamlanmamış olan Freund yardımcı maddesinin kullanılması haricinde aynı prosedür kullanılarak iki destek immünizasyon gerçekleştirilmiştir (14. gün ve 35. gün).45. günde, bütün hayvanlardan test kanı alınmıştır ve ELISA ile TG2'ye 25 reaktivite açısından değerlendirilmiştir.

- En iyi iki yanıtlayıcı, yine 10 haftada tamamlanmamış olan Freuds Yardımcı Madde ile karıştırılmış 100 µg çekirdek proteininin (PBS içinde) enjeksiyonu ile daha da artırılmıştır ve 4 gün sonra hayvanlar, splenosit toplanması ve füzyon için Sp2/0-Ag-14 miyelom hücreleri ile öldürülmüştür. Bu füzyondan, yaklaşık 1000 kuyucuk, ELISA 30 ile TG2 proteinine reaktivite açısından taranmıştır.

TG2 özgüllüğü için tarama

Koşullu ortam ya da saflaştırılmış olan IgG, transglutaminaz ailesi üyelerine reaktivite açısından test edilmiştir. Her birinin her bir transglutaminaza (TG1, TG2, TG3, TG5, TG7 ve Faktör XIIIa; tümü Zedira) bağlanma kabiliyeti bir plaka bağlama deneyi kullanılarak belirlenmiştir. Mikrotitre plakaları (Costar, Cambridge, UK), 4 °C'de gece
 5 boyunca 50 µl 0.1 M bikarbonat/ karbonat tamponu (pH 9.6) içinde rekombinant TG (Zedira, Darmstadt, Almanya) ile kaplanmıştır. Plakalar 2 saat 37 °C'de % 3 ağırlık/ hacim BSA içeren 200 µl PBS ile bloke edilmiştir. Plakalar, üç kez % 0.05 Tween 20 (yıkama tamponu) ve 100 µl seyreltilmiş koşullu ortam (seyreltme 1:5 ila 1:20 arasında) içeren PBS ile yıkanmıştır ya da saflaştırılmış anti TG2 katalitik çekirdek
 10 mAb'ler ilave edilmiştir. Plakalar ilave olarak 1 saat daha oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yıkama aşaması tekrarlanmıştır ve % 0.05 Tween 20 (hacim: hacim) ve % 1 BSA (ağırlık: hacim) (Sigma, Poole UK) içeren PBS içerisinde anti fare gama zinciri yaban turpu peroksidazı (1: 5000), 1 saat boyunca eklenmiştir. Sekiz yıkamadan sonra, 50 µl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin substrat ile bağlanma ortaya
 15 çıkmıştır. Reaksiyon, 25 µl 0.1 M H₂SO₄ ilave edilerek durdurulmuştur ve 450 nm'de absorbans belirlenmiştir.

TG2 inhibisyonu için tarama

TG aktivitesi, ³H-putresinin, N',N'-dimetilkazaine Ca²⁺ bağımlı dahil edilmesi ile ölçülür. Rekombinant insan TG2 (100 ng) reaksiyona başlamadan daha önce yirmi
 20 dakika oda sıcaklığında test numunesi (şartlandırılmış ortam ya da saflaştırılmış IgG) ile önceden inkübe edilmiştir. Yirmi beş µl reaksiyon karışımı (5 µl 25 mM CaCl₂, 5 µl 40 mM ditiyotretol, 5 µl ³H-putresin karışımı ve 10 µl 25 mg/ml N, N'-dimetilkazain (100 mM ile yerine 25 mM CaCl₂) reaksiyonu başlatmak için enzimatik olmayan bir kontrol için EDTA) ilave edilmiştir ve örnekler 37 °C'de 1 saate kadar inkübe
 25 edilmiştir. 10 µl'lik alikotlar, 3 mm Whatman filtre kağıdının bir şeridi üzerine lekelenmiştir ve çapraz bağlanmış olan proteinleri reaksiyonda tipik olarak 0, 10, 30 ve 60. dakikalarda çökeltmek için hemen buz gibi % 10 trikloroasetik asit (TCA) içine daldırılmıştır. Buz gibi soğuk % 5 TCA içinde üç yoğun yıkamadan ve ardından gibi soğuk % 95 etanol ile 3 durulamadan sonra, havada kurutulan filtre 2 ml sintilasyon
 30 sıvısında (Ultima Gold Packard, Perkin Elmer) sayılmıştır. Tepkime oranı hesaplanmıştır. 1 TG birimi, 37 °C'de saatte 1 nmol putresinini n eklenmesine eş değerdir.

Aynı protokol, 25 µl rekombinant protein yerine 25 µl hücre lizatı ile değiştirilerek hücre lizatlarındaki TG inhibisyonunu değerlendirmek için kullanılmıştır.

Hibridom klonlaması ve antikorların şartlandırılmış ortamdan saflaştırılması

Klonlanmış inhibitör hibridomlardan monoklonal antikor izolasyonu yapılmıştır.

- 5 Başlangıçta tanımlanan hibridom kuyucukları, ELISA ve aktivite taramaları tarafından tarif edildiği gibi test edilen alt klonlar ile geleneksel metotlara (Loirat MJ et al., 1992) göre sınırlı bir seyreltme işlemi (stabilite ve klonalite sağlamak için) ile iki kez klonlanmıştır. Seçilen antikor üreten klonlar, 25 ve 75 cm²'lik şişelerde genişletilmiş ve serumsuz ortam (Hyclone, Fisher Scientific, Loughborough, UK) ile beslenmiştir.
- 10 Hücreler genişledikçe, protein G kolonunda (Amersham Life Sciences) benzeşim kromatografisi kullanılarak koşullu ortam IgG saflaştırması için toplanmıştır. Koşullu ortam, eşit hacimlerde 10 mM sodyum fosfat, pH 7.25'te seyreltilmiştir ve 1.0 ila 2.0 ml/dakika arasında bir akış hızında protein G kolonuna uygulanmıştır. Kolon, aynı tampondan 10 kolon hacmi ile yoğun bir şekilde yıkanmıştır. Bağlanan antikor, glisin
- 15 çözeltisinde (0.1 M; pH 2.7) ayrıştırılmıştır ve 1M Tris/HCl pH 9'un % 0.15 hacmi ile nötralize edilmiştir. Numuneler, 2 tampon değişimi ile 24 saat boyunca fosfat tamponlu tuz çözeltisinin 1000 hacmine karşı diyaliz edilmiştir.

Antikor epitoplarının faj gösterim haritalaması

- İnsan TG2'nin tam uzunluktaki kodlama sekansı, aşağıdaki primerler kullanılarak
- 20 polimeraz zincir reaksiyonu ile büyütülmüştür; TG2-FL-1 5
'ATGGCCGAGGAGCTGGT CTTAGAGA3' ve TG2-FL-2 5
'GGCGGGGGGCCAATGATGACATTCCGGA 3'.Yaklaşık olarak 2 kb yükseltme ürünü Qiagen PCR temizleme kiti (Qiagen) kullanılarak saflaştırılmıştır ve RQ DNAz I (Promega) kullanılarak rastgele parçalara sindirilmiştir. RQ DNAz reaksiyonu, kör
- 25 uçlu parçalar üretmek için Klenow DNA polimeraz I ve T4 DNA polimeraz parçası ile işleme tabi tutulmuştur. Bunlar jel elektro forezi ile saflaştırılmış ve 50 ila 150 bp aralığındaki parçalar Qiagen jel geri kazanım kiti (Qiagen, Crawley UK) kullanılarak ekstrakt edilmiştir.

- Bir faj gösterim vektörü EcoRV ile sindirilmiştir, alkalın fosfataz ile işleme tabi
- 30 tutulmuştur ve jel elektro forezi ve Qiagen jel geri kazanım kiti ile saflaştırılmıştır. 100 ng saflaştırılmış vektör, insan TG2 cDNA'sının hazırlanan 15 ng kör parçalara bağlanmıştır. Elde edilen ligasyon XLI-Blue elektro kompetent hücrelere (Agilent

Technologies) elektropore edilmiştir ve parça kütüphanesi VCSM13 yardımcı fajı (Agilent) ile kurtarılmıştır. Faj parçacıkları, % 2 glikoz ve % 4 PEG 6000 ile çöktürülmüştür ve % 0.1 Tween 20 (hacim: hacim) % 1 BSA (ağırlık: hacim) içerisinde PBS içerisinde yeniden süspansiyon edilmiştir.

- 5 Epitop haritalaması aşağıdaki prosedür kullanılarak yapılmıştır. ELISA kuyucukları, gece boyunca 4 °C'de 100 µg kaplama tamponu içerisinde 30 µg monoklonal antikor ile kaplanmıştır. Kaplanan kuyucuk, PBS/ Tween ile yıkanmıştır ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca PBS içerisinde 400 µl % 3 BSA (ağırlık: hacim) ile bloke edilmiştir. Bloke edilmiş olan kuyucuğa yaklaşık olarak 10^{10} faj parçacığı (100 µl) eklenmiştir ve
- 10 oda sıcaklığında 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Kuyucuk, 8 kez 400 µl PBS/% 0.5 Tween (hacim: hacim) ile yıkanmıştır ve yapışkan faj, 0.2 M glisin pH 2.2 ile yıkanmıştır. Elde edilen faj, 1 ml XLI-Blue konakçı enfekte etmek için kullanılmıştır ve LB agar (60 µg/ml ampisilin, 15 µg/ml tetrasiklin) üzerine kaplanmış olan numuneler ilave edilmiştir, kalan numuneler 100 ml LB ortamına (60 µg/ml ampisilin, 15 µg/ml
- 15 tetrasiklin) eklenmiştir ve seçilmiş olan parçaların kütüphanesini zenginleştirmek için bir çalkalama inkübatörü içerisinde 37 °C'de gece boyunca büyütülmüştür. Bu zenginleştirme işlemi 5 kez tekrarlanmıştır ve son turdaki rastgele koloniler sekanslama için seçilmiştir.

Antikor VL bölgesinin sekansının belirlenmesi

20 Primerler

Ağır zincir sens primerleri - Bir çift yüksek oranda dejenere FR1 primer olan MH1 ve MH2 (Wang et al. 2000), VH genlerini büyütme için 3 sabit bölge primeri ile birleştirilmiştir.

MH1 5'CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGTC 3'

25 MH2 5'CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3'

Fare G1 5' AGGCGCAGTACTACAATCCCTGGGCACAATTTTCTTGTCCACC 3'

Fare G2a 5' AGGCGCAGTACTACAGGGCTTGATTGTGGGCCCTCTGGG 3'

Fare G2b 5'AGGCGCAGTACTACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGGCCCCG 3'

30 Kappa primerleri

VK1 5' CGCTGCGAGCTCGATATTGTGATGACBCAGDC 3'

VK2 5' CGCTGCGAGCTCGAGRTTKTGATGACCCARAC 3'

VK3 5' CGCTGCGAGCTCGAAAATGTGCTCACCCAGTC 3'

VK4 5' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAGTC 3'

VK5 5' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACACAGAC 3'

5 VK6 5' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGCTSACYCARTC 3'

VK7 5' CGCTGCGAGCT CGACAT CCAGAT GACYCART C 3'

VK8 5 'CGCTGCGAGCTCCAAATTGTTCTCACCCAGTC 3'

K-CONST 5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA 3'

Toplam RNA, üreticinin protokolüne göre Trizol (GIBCO) kullanılarak monoklonal
10 hibridom hücrelerinden (yaklaşık olarak 10^5 hücre) ekstrakte edilmiştir ve A_{260nm} ile
ölçülmüştür. cDNA, ImProm II ters transkriptaz (Promega) ve rasgele heksamer
primerleri kullanılarak sentezlenmiştir. Reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi olmuştur; 1
 μg toplam RNA, 0.1 μg oligo (dN)6, 12 μl ImProm II tampon, 1 μl 10 mM dNTP
(Promega), 8 μl 25 mM $MgCl_2$, 4 μl ImProm II ters transkriptaz (Promega) 60 μl
15 toplam reaksiyon hacmi. RNA ve rasgele primer karışımı, 10 dakika boyunca 70
°C'ye kadar ısıtılmıştır ve daha sonra buza yerleştirilmiştir. Kalan reaksiyon
bileşenleri eklenmiştir ve sonra 20 °C'de 10 dakika, daha sonra 40 °C'd e 40 dakika
daha inkübe edilmiştir.

VH ve VK genlerinin yükseltilmesi GoTaq polimeraz (Promega) ile yapılmıştır. Her bir
20 50 μl reaksiyon aşağıdakileri içermiştir; cDNA 2 μl , 20 pmol sens ve antisens
primerleri, 10 μl GoTaq reaksiyon tamponu, 1 μl 10 mM dNTP'ler, 5 μl 25 mM $MgCl_2$,
2.5 u GoTaq polimeraz, H₂O, 50 μl nihai hacme kadar. Reaksiyonlar, aşağıdaki
koşullar kullanılarak 35 kez çevrilmiştir: ilk denştirilmiş 95 °C 2 dakika; denştirilmiş
94 °C 1 dakika, tavlama 56 °C 1 dakika, uzatma 72 °C 1 dakika. PCR ürünleri jel
25 elektro forezi ile analiz edilmiştir ve TOPO TA klonlama kiti (Invitrogen) kullanılarak
klonlanmıştır. Sekanslama için ağır ve hafif zincir PCR ürünlerinin rastgele
miniprepleri seçilmiştir.

Hücre dışı TG aktivitesinin ölçülmesi

Hücre dışı TG aktivitesi, modifiye edilmiş hücre ELISA ile ölçülmüştür. HK-2 epitel
30 hücreleri, 0.1 M EDTA veya % 0.25 tripsin/ EDTA kullanılarak toplanmıştır ve gece

boyunca fibronektinin 100 µl/kuyucuk oranı ile (50 mM Tris-HCl içerisinde 5 µg/ml, pH 7.4) (Sigma, Poole UK) kaplanmış olan 96 kuyucuklu bir plaka üzerine serumsuz ortamda 8×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda kaplanmıştır.

- 0.1 mM biyotin kadaverin [N- (5 amino pentil biyotinamid) trifloroasetik asit] (Molecular Probes, Eugene OR, ABD) varlığında hücrelerin 37 °C'de 2.5 saat boyunca bağlanmasına izin verilmiştir. Plakalar iki kez 3 mM EDTA/ PBS ile yıkanmıştır ve hücreler, 5 mM EDTA/ PBS içerisinde % 0.1 (ağırlık/ hacim) deoksikolat ile çıkarılmıştır. Süpernatant toplanmıştır ve protein belirlemesi için kullanılmıştır. Plakalar, 50 mM Tris-HCl ile yıkanmıştır ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca 1:5000 ekstravidin HRP (Sigma, Poole, UK) ve ardından bir TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin) substratı kullanılarak ortaya çıkan biyotin kadaverin ilave edilmiştir. Reaksiyon, 50 µl 2.5 M H₂SO₄ ile durdurulmuştur ve absorbans, 450 nm'de okunmuştur.

Radyo etiketleme ile kollajen seviyelerinin ölçülmesi

- Hücreler, $3.75 \times 10^6/10$ cm² Petri kabı ya da 6 kuyucuklu bir plakanın 1×10^6 /kuyucuk yoğunluğunda ekilmiştir. ECM kollajen 20 iCi ^{3,4}H prolin (1.0 mCi/ml, ICN) ile etiketleyerek değerlendirilmiştir. Etiketleme, standart hücre kültürü koşulları altında 72 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Etiketlemenin ardından ortam çıkarılmıştır, hücreler PBS ile yıkanmıştır ve 10 dakika boyunca 37 °C'de 50 mM Tris pH 7.4 içinde 2 ml 0.25 M amonyum hidroksit ile çıkarılmıştır. Çözünabilir kısım toplanmıştır ve protein konsantrasyonu, biskinonik asit (BCA) deneyi kullanılarak belirlenmiştir. Tabaklar, ECM, 50 mM Tris pH 6.8 içinde 2 ml % 2.5 (ağırlık/ hacim) SDS ile çözündürülmeden önce artan hacimlerde PBS ile iyice yıkanmıştır. ECM'nin tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için tabak kazınmıştır ve bir beta sintilasyon sayacında radyoaktivite için 200 ll ölçülmüştür. Sayılar, çözündürülmüş hücre proteininin mg'si başına düzeltilmiştir ve ortalama kontrol değerinin bir yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

Rekombinant onaylı Quark IgG'nin üretilmesi

- Deneyisel amaçlar için, insan tip II transglutaminaza karşı bir antikorun bir 'insan' tek zincirli Fv sekansından bir insan sıçan kimerik antikoru üretilmiştir. Antikor QPCDTGII olarak adlandırılır (QCT olarak kısaltılmıştır) ve değişken bölgelerin sekansları WO 2006/100679A2'de bulunur.

Ağır zincir sabit bölgeler için bir sıçan γ 2a alt sınıfı seçilmiştir ve sıçan test hayvanlarında bir ADCC reaksiyonu olasılığını azaltmak için glikosilasyon bölgesini uzaklaştırmıştır. Ağır zincir için seçilen sıçan sabit bölgesi Kabat veri tabanından (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH National Technical Information Service, 1991)) 013593 idi (Bruggemann, M. Gene 74: 473-482 (1988); Bruggemann, M., Free, J., Diamond, A., Howard, J., Cobbold, S. and Waldmann, H. Proc. Natl. Acad. Sci USA 83: 6075-6079 (1986)). Kappa hafif zinciri için bu Kabat'tan 013718 idi (Sheppard, H. W. and Gutman, G. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7064-7068 (1981)).

Kısaca, ağır zincir ve kappa zincir kodlama sekansları DNA sentezi ile üretilmiştir (kodon kullanımı bir memeli kodonu yanlılığına uyarlanmıştır).

Ağır zincir gen sentezi ürünü, QCT_HindIII ve QCT_H_rev primerleri kullanılarak PCR ile büyütülmüştür. PCR ürünü, HindIII ve NgoMIV ile kesilmiştir ve MRCT ekspresyon vektörüne bağlanmıştır. Ligasyon ürünü tarafından kimyasal olarak transforme edilmiş olan DH5 α bakterilerinin kompetent klonları, primer HCMVi ve rat_gamma1 kullanılarak PCR taraması yapılmıştır. Öngörülen boyutta bir PCR ürünü üreten üç klon sekanslanmıştır.

Kappa zincir gen sentezi ürünü, QCT_HindIII ve QCT_L_rev primerleri kullanılarak PCR ile büyütülmüştür. PCR ürünü, HindIII ve PpuMI ile kesilmiştir ve pKN100 ekspresyon vektörüne bağlanmıştır. Ligasyon ürünü tarafından kimyasal olarak transforme edilmiş DH5 α bakterilerinin kompetent klonları, primer HCMVi ve rat_kappa kullanılarak PCR taraması yapılmıştır. Öngörülen boyutta bir PCR ürünü üreten üç klon sekanslanmıştır.

Hem Ağır hem de kappa zincirlerini kodlayan çift uçlu ekspresyon vektörü üretilmiştir ve HEK293T hücrelerine transfeke edilmiştir. İki büyük ölçekli HEK293T transfeksiyonundan hücre kültürü süpernatantı bir araya toplanmıştır ve imalatçının protokollerine uygun bir AKTA Explorer kromatografi sistemi kullanılarak 1 ml'lik bir Protein L-agaroz kolonunda benzeşim saflaştırılmıştır. Tek bir OD 280 nm pik IgG Elüsyon Tamponu ile ayrıştırılmıştır ve iki PBS değişikliğine karşı diyaliz edilmiştir. Bu, hem 280 nm'de UV absorpsiyonu hem de sıçan IgG2a ELISA ile test edilmiştir. Toplam ürün yaklaşık 700 μ g (OD_{280nm} ile); 303.5 μ g (ELISA ile) olmuştur.

AB1 Antikorumun İnsanlaştırılması

İnsan VH ve VK cDNA Veri tabanları

Uluslararası İmmünojenetik Veri Tabanı (International Immunogenetics Database) 2009¹⁰¹'dan insan ve fare immüno globülinlerinin protein sekansları ve İmmünolojik İlgi Proteinlerinin Sekanslarının Kabat Veri Tabanı Yayın 5'i (son güncelleme 17-Kas-1999)¹⁰² bir Kabat hizalaması içindeki insan immüno globülin sekanslarının bir veri tabanının derlenmesi için kullanılmıştır. Veri tabanı 10,606 VH ve 2,910 VK sekansını içermektedir.

AB1'in Moleküler Modeli

- 10 Fare antikor AB1 değişken bölgelerinin bir homoloji modeli, otomatik modda çalışan Modeller programı¹⁰³ kullanılarak hesaplanmıştır. 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb ve IMQK.pdb'nin atomik koordinatları, Accelrys antikor pdb yapıları veri tabanının Blast analizi ile belirlendiği gibi, Arabirim, VL ve VH için en yüksek özdeşlik sekansı şablonları olmuşlardır. Bu şablonlar, her biri en iyi 3 döngü şablonu ile her bir CDR
- 15 döngüsünü modelleyerek rafine edilmiş 20 başlangıç modeli üretmek için kullanılmıştır.

hAB1 Çerçeve Seçimi

- Sekans analiz programı, gibsSR, çeşitli VHc, VKc ve VKc₁ protein sekansları ile çeşitli seçim kriterleri kullanılarak insan VH ve VK veri tabanlarını sorgulamak için
- 20 kullanılmıştır. AB1 fare antikorumun homoloji modelinde bir CDR kalıntısının 5Å içindeki FW kalıntıları (Kabat tanımı) tanımlanmıştır ve "5Å Yakınlık" kalıntıları olarak adlandırılmıştır.

- AF06220, başlangıçtaki insanlaştırılmış AB1 VHc yapısının dayanacağı FW olarak seçilmiştir. Tablo 1, AF06220'nin murin Ab1 ile hizalanmasını ve kalıntı kimliğini
- 25 göstermektedir. Tablo 2, sekansların 5Å yakınlık zarfını göstermektedir. AF062260, germ hattı VH geni Z12347'den sadece 1 somatik mutasyona sahiptir (Tablo 3).

- AY247656, başlangıçtaki insanlaştırılmış AB1 VKc yapısının dayanacağı FW olarak seçilmiştir. Murin AB1 ile hizalanma ve kalıntı kimliği Tablo 4'te gösterilmektedir; Tablo 5, sekansların 5Å yakınlık zarfını göstermektedir. Sekans, germ hattı VK geni
- 30 X93620'den 5 somatik mutasyon gösterir (Tablo 6).

AF193851, başlangıçtaki insanlaştırılmış AB1 VK_{c1} yapısının dayanacağı FW olarak seçilmiştir. Murin AB1 ile hizalanma ve kalıntı kimliği Tablo 7'de gösterilmektedir. Tablo 8, sekansların 5A yakınlık zarfını göstermektedir. Sekans, germ hattı VK geni J00248'den hiçbir somatik mutasyonu göstermez (Tablo 6).

5 ELISA Bağlanması

HEK 293F hücreleri, farklı insanlaştırılmış ağır zincir vektörleri ile birlikte farklı insanlaştırılmış hafif zincir vektörlerinin kombinasyonları ile birlikte transfekte edilmiştir. ELISA ile antikor bağlanmasını ölçmek için rekombinant insan TG2 kullanılmıştır. Sonuçlar, Ağır Zincir versiyonunun RHA'nın (Tablo 10) her iki Hafif Zincir versiyonu ile birlikte kullanıldığını göstermiştir.

RKE ve RKJ (Tablo 11) (insanlaştırılmış farklı Hafif Zincir versiyonlarını temsil etmektedir) optimal bağlanma göstermiştir (Şekil 16).

Ağır Zincir versiyon RHA, AB1 antikorunun fare CDR bölgelerinin İnsan donör sekansı üzerine değiştirilmemiş bir greftidir. Bununla birlikte, her iki Hafif Zincir versiyonları RKE ve RKJ, F72 (Kabat numaralandırması - yeşil renkle gösterilmiştir) ile aynı tek 5A yakınlığa sahiptir. Bu geri mutasyon, Vernier¹⁰⁴, Canonical¹⁰⁵ ya da Interface¹⁰⁶ kalıntılarının dışında kalır (bakınız Tablo 11).

101. Lefranc, M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). Nucleic Acids Res. 31, 307-310 (2003).

102. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).

103. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinformatics. Chapter 5: Unit 5.6., Unit (2006).

104. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J. Mol. Biol. 224, 487-499.

105. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Antibody modeling: implications for engineering and design. Methods 20, 267-279.

106. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J. Mol. Biol. 186, 651-663.

TABLolar

Tablo 1

Kapat Numaraları	
Vernier	
Canonical interface	
5Å Yakınlık	
AB Vhc	
AF062260	

Tablo 2

	5Å Yakınlık Kalıntıları
AB Vhc	E VCH TAP L GSW K WVA K L T BP N L YCA K W G
AF062260	E.....G.....

5

Tablo 3

	20	20	20	20	20	20	20	20	20
0013471584	E	V	C	H	T	A	P	L	G
AF062260	E.....G.....								

Tablo 7

Kabat Numaraları	
Vernier	
Canonical Interface	
5Å Yakınlık	
AB VKc	
AF193851	

Tablo 8:

	5Å Yakınlık Kalıntılar
AB VKc	K.....L.....L.....V.....P.....D.....H.....E.....J.....J.....N.....Q.....W.....
AF193851	L.....S.....

5 Tablo 9:

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
.....									
.....									

TABLO 10

Kabat Numaraları	
Vermier	
Canonical	
Interface	
5A Yakınlık	
AB VKc	EEVGLQSESSMYASQSERVTDKASQ-----DINSTYLTWQWPNKPKILLYRTNLLPDVMPERPSGCGGGQGFELDISCELEEDWIIYYLQYDDFF-----YTFGGGTVALSIF
AB RHA	

TABLO 11

Kabat Numaraları	
Vermier	
Canonical	
Interface	
5A Yakınlık	
AB VKc	EEVGLQSESSMYASQSERVTDKASQ-----DINSTYLTWQWPNKPKILLYRTNLLPDVMPERPSGCGGGQGFELDISCELEEDWIIYYLQYDDFF-----YTFGGGTVALSIF
AB RKE	
AB BKJ	

SONUÇLAR

Rh TG2 çekirdek proteininin üretilmesi.

TG2 aktivitesi için tercih edilen bölgeler yerine, TG2 aktivitesi için kritik olan epitopları hedeflemesi daha olası olan antikorların üretilmesini zorlamak için fareler, tam uzunluktaki TG2 molekülü yerine, TG2 katalitik çekirdeği ile immünize edilmiştir. Rekombinant TG2 etki alanını üretmek için, 329 ila 1419 arasındaki bazlardan bir PCR yapısı oluşturulmuştur ve Pet21+(a) vektörüne yerleştirilmiştir (Şekil 1A). Bu vektörün BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL bakterilerine eklenmesi ve ekspresyonu, tüm katalitik çekirdeği kapsayan 143 ila 473 arasındaki amino asitleri kapsayan çözünmeyen bir proteinin üretilmesine neden olmuştur. Bu protein çözündürülmüştür ve 40 mM Tris HCl; 150 mM NaCl; % 20 gliserol; 5 mM sistein; Bunun 0.5 mM sistin pH 8.10 ng, indirgeyici olmayan bir poliakrilamid jel üzerinde yapılmıştır, western blotlanmış ve CUB7402 ile immüno probe edilmiştir. TG2 çekirdeğinin öngörülen boyutu ile tutarlı olan 37 kDa'da net bir bant görülmüştür (Şekil 1B). Daha büyük bantlar aynı zamanda bir indirgeme jeli çalıştırıldığında mevcut olmadığı için çekirdek proteininin agregalarını temsil eden CUB7402'ye karşı immüno reaktif olmuştur (veriler gösterilmemiştir).

İmmünizasyon ve füzyon.

Dört fare, rhTG2 çekirdeğinin 50 µg'si ile immünize edilmiştir. İmmünizasyondan yaklaşık olarak beş ve dokuz hafta sonra, her bir fareden bir serum numunesi alınmıştır ve serumun seri seyreltilmesi kullanılarak rh TG2'ye karşı ELISA ile reaktivite testi yapılmıştır. Bütün fareler, kullanılan en yüksek seyreltmede bile (1:51 000) rhTG2 çekirdeğine güçlü bir immüne reaksiyonu göstermiştir (Şekil 2A). Antikorların aynı zamanda tam uzunluktaki TG2'yi tanıyacağını doğrulamak için, rhTG2 ve rhTG2 çekirdek proteini deniştirici olmayan bir jel üzerinde yapılmıştır, western blotlanmış ve 1000'de 1 fare serumu seyreltisi ile immüno probe edilmiştir (Şekil 2B). Her iki proteine karşı en güçlü reaktiviteye sahip fare (fare C) güçlendirilmiştir ve Sheffield Üniversitesi'nin Hybridom servisi Bioserv'i kullanarak füzyon için splenositler geri kazanılmıştır.

Pozitif hibridom seçimi ve klonlama.

Bioserv tarafından en yüksek pozitif olarak seçilen 400 hibridom kuyucuğundan 109'unun süpernatantları TG2'ye kalıcı reaktivite göstermiştir, ancak sadece 34'ü

ELISA'da test edildiği zaman diğer önemli TG ailesi üyeleri ile reaksiyona girmemiştir (Şekil 3A'da gösterilen temsili örnekler).TG2'ye özgü olanlar, 100 ng TG2'den kaynaklanan TG2 aktivitesini inhibe etme kabiliyeti için ^3H -putresin birleştirme tahlili ile süpernatantı taratmışlardır (Şekil 4).Bu ilk tarama, 10 hibridom süpernatantının

5 TG2 aktivitesini inhibe edebildiğini göstermiştir (AB1; DC1; BB7; EH6; DH2; DD9; JE12; AG9; AH3; DF4). Onda dokuzu sınırlı seyreltme ile başarı ile klonlanmıştır.DF4 klonu için, klonlar klonlama sonrası izole edilmiş olmasına rağmen, bunlar inhibe edici görünmemiştir. Klonlama sonrası, her bir klonlanmış hibridomdan IgG saflaştırılmıştır ve TG2'ye seçici reaktivite açısından tekrar test edilmiştir (Şekil 3B).

10 **TG2 inhibe edici potansiyel.**

Her bir klonlanmış hibridom, IgG'sini, insan, sıçan ve fare TG2'ye karşı TG2 inhibe edici aktivite için test etmiş ve IC_{50} , 1 ng TG2'yi inhibe etmek için gereken IgG miktarına dayanarak hesaplanmıştır. IC_{50} değerlerinde, insan TG2'sine karşı, 1.1×10^{-5} mg/ml IgG'de en etkili AB-1'den 12.3×10^{-5} mg/ml IgG'de en az etkili JE12'ye

15 kadar yaklaşık 12 kat aralığı ortaya çıkmıştır (Şekil 9; Tablo 1).İlginç bir şekilde, sıçan TG2'ye karşı en iyisi olan 4 antikor (DH2, DD9, EH6 ve BB7) için en iyisi, insan TG2'sine karşı 6 kat daha az olan ve mukayeseli olarak TG2'ye karşı en iyi AB-1 inhibitöründen 38 kat daha az aktif olan, 2.23×10^{-4} mg/ml'lik bir IC_{50} 'ye sahip olan, DH2 olan bir IC_{50} değeri belirlenebilmiştir. İnhibitör antikorların hiçbirisi, muhtemelen

20 immün tolerans nedeni ile fare TG2'yi inhibe edememiştir.

İnhibitör antikorların epitoplarının haritalanması

İnhibe edici olurken, TG2'de hangi epitopların immünolojik olarak benzersiz olduğunu ve bunun yanı sıra bu 10 antikorun aynı ya da farklı bölgeleri hedef alıp almadığını tespit etmek için her bir antikor, faj gösterimi kullanılarak haritalanmıştır. Her bir

25 mAb'ye karşı bir TG2 faj kütüphanesi oluşturulmuştur ve panlanmıştır. Epitop daha sonra bağlayıcı fajların konsensüs sekanslanması ile belirlenmiştir.

AB1, AG1, AH1, BB7, DC1, EH6 ve JE12'nin hepsi, 304 ila 326 arasındaki amino asitleri kapsayan ve bir substrat bağlama cebi (Şekil 6) içerisindeki aktif bölgenin önünde oturma izlenimi veren bir tek epitopa (Şekil 5) bağlanacak izlenimi

30 vermektedir. Bu bölgeye AB-1 bölgesini denmiştir ve bu bölgeyi hedef alan antikorlar Grup 1 antikorları olarak adlandırılmıştır.

DF4, katalitik triadda Asp 358'i kapsayan çekirdeğin önünden arkaya doğru uzanan amino asit 351 ile 365 arasındakilerden (Şekil 5) oluşan bir sekansı benzersiz şekilde hedeflemiştir (Şekil 6). Buna Grup 2 adı verilmiştir.

- 5 DH2 ve DD9, 450 ile 467 arasındaki amino asitleri kapsayan bir sekansa bağlanmıştır (Şekil 5). Bu Grup 3 antikorları, çekirdeğin arkasındaki DH2 bölgesi olarak adlandırılmış olan β varil-1 ile birleşme noktasının yakınındaki bir bölgeye bağlanır. Epitop, varsayılan bir kalsiyum bağlanma bölgesini kapsar (Şekil 6).

Antikor Sekanslama

- 10 Her bir antikor için değişken hafif zincir sekansının oluşturulması için, her inhibitör hibridomdan gelen RNA, ekstre edilmiştir, ters transkripsiyona tabi tutulmuştur ve çoğaltılmıştır, bir çift yüksek oranda dejenere FR1 primeri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır, MH1 ve MH2 primerleri, VH genlerini büyütmek için 3 sabit bölge primeri ile birleştirilmiştir

Elde edilen VH ve VK sekansları AB1 için Şekil 7'de gösterilmiştir.

- 15 **AB1'in in vitro bir protein karışımındaki TG2 aktivitesini inhibe edebilme yeteneği**

- Rekombinant TG2'ye karşı en güçlü inhibe edici antikor AB1'dir. Terapötik olarak değerli olması için, sadece saf bir çözeltide TG2 aktivitesini inhibe etmemesi, aynı zamanda karmaşık bir protein çözeltisinde inhibe edebilmesi ve başka proteinler ile 20 herhangi bir şekilde birleşmemesi gerekir. Bunu test etmek için, insan hepatosit hücre hattı HepG2'nin bir homojenatı hazırlanmıştır. 0.5 μ g AB1'in uygulanması TG2 aktivitesinin % 70'ini inhibe edebilmiştir (Şekil 8A). Bununla birlikte, BB7, TG2 aktivitesinin % 90'ını düşüren daha iyi bir inhibisyon üretmiştir. Bu lizatin 25 μ g'sinin AB1 ile immüno problanması, TG2'ye karşılık gelen bir boyutta tek bir immüno reaktif 25 bant ile hedef dışı ilişki göstermemiştir (Şekil 8B).

AB1 ve DC1'in hücre dışı TG2 aktivitesini inhibe etme kabiliyeti.

- Bu antikorların bir hücre sisteminde TG2 aktivitesini inhibe edip edemediğini değerlendirmek için. AB1 (Şekil 10a) ve DC1 (Şekil 10b), biyotin kadaverin deneyi kullanılarak tahlil edilmiş kültür ve hücre dışı TG aktivitesindeki insan böbrek 2 (HK-2) 30 tübüler epitel hücrelerine uygulanmıştır. 400 uM'de uygulanmış olan kimyasal pan TG inhibitörü 1,3-Dimethyl-2-[(2-okso-propil)tiyo]imidazolyum klorür ile karşılaştırılabilir

olan kültür ortamı içerisinde 400 ng/ul'de uygulandığı zaman, AB1 % 60'lık bir inhibisyon ve DC1 aktivitenin % 55'lik bir inhibisyonunu sağlayabilmiştir.

AB1 antikorunun bilinen diğer inhibitör antikorlar ile karşılaştırılması

AB1'in bilinen diğer TG2 inhibe edici antikorlara kıyas ile etkinliğini test etmek için, WO2006/100679 sayılı patent başvurusunda Quark biyoteknolojisi tarafından tarif edilen bir antikorun hem fab parçaları (Şekil 11,12) hem de tam IgG'si (Şekil 13, 14); ³H Putresin ekleme analizinde TG2 aktivitesini inhibe etmek için test edilmiştir. 100 ng insan TG2'den gelen aktivite, 500 ng AB1 ile % 60 ila 80 arasında bir oranda inhibe edilebilir. Karşılaştırmada, ne Quark antikorunun fab parçası ne de tam IgG'si, bu analizde TG2'yi önemli ölçüde inhibe edememiştir.

Değerlendirme

Deneyssel çalışmaların katılımını önerdiği bir dizi hastalıkta insanda terapötik bir hedef olarak TG2'yi doğrulamaya açık bir ihtiyaç mevcuttur. Bunlar arasında doku skarlaşması, çölyak hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve bazı kanserlerde kemo direnç yer alır. Bunun sınırlandırılması, insanda TG2 aktivitesini seçici olarak engelleyebilen gerçekten TG2'ye spesifik bileşiklerin eksikliği olmuştur.

Bu çalışmada, inhibitör epitop arayışında enzimin katalitik çekirdeğine karşı daha geniş bir yelpazede anti TG2 antikoru izole edebilmek amacı ile TG2 parçasına sahip ilk kez immünize edilmiş olan fareler mevcuttur. Bu, hem rhTG2 çekirdeğini hem de doğal TG2'yi tanıyan, ancak başka bir TG'yi tanımayan, antikorlar ile iyi bir bağışıklık yanıtı ortaya çıkarmıştır.

İzole edilen antikorların 10'u inhibe edici aktivite göstermiştir. Bunlar daha sonra 3 TG2 spesifik, fakat inhibe edici epitop ile eşleştirilmiştir. Bu antikorlar klonlanmıştır, sekanslanmıştır ve ICG değerleri hesaplanarak IgG izole edilmiştir. Bir substrat cebini hedef alan üç antikorun (AB1, DC1 ve BB7) özellikle etkili inhibitörleri olduğu kanıtlanmıştır. En önemlisi, bu antikorlar aynı zamanda, hem bir hücre lizatında hem de hücre kültüründe, bu antikorların in vivo uygulama için kritik olan protein açısından zengin bir ortamda işlev görme potansiyeline sahip olduğunu gösterir şekilde, iyi bir şekilde çalışmıştır.

Bu inhibitör antikorların başarılı bir şekilde üretilmesinde kilit bir unsurun sadece çekirdek protein ile bağışıklık kazandırma kararı olduğuna inanılmaktadır. Bilindiği kadarı ile, ticari TG2 antikorlarının hiçbirisi, herhangi bir önemi olan inhibe edici

potansiyele sahip değildir. Tam uzunluktaki TG2'yi kullanma konusundaki girişimlerimiz, bir kısmı TG2'ye özgü olan ve hiçbir engelleyici olmayan çok sayıda antikor ile sonuçlanmıştır.

Bunun, çoğu, en yaygın kullanılan anti TG2 antikorları olan CUB7402'ye (aa447-aa478) benzer pozisyonlarda katalitik çekirdeğin arkasına düşen, tam uzunlukta TG2 içindeki protein halkaları için açık bir immünojenik tercihten kaynaklandığı görülmektedir.

Yaklaşımımızın çok daha etkili antikorların üretimine yol açması şaşırtıcıdır. Herhangi bir teoriye bağlı kalmaksızın, sadece merkezi çekirdeği kapsayan daha küçük bir proteine antikorları yükseltmek sureti ile, sadece mevcut olan tercih edilen immünojenik epitopların bir kısmını ortadan kaldırmakla kalmayıp, aynı zamanda çekirdek hedeflemesini zorladığımızı düşünüyoruz. Bu tek başına seçim için uygun olan antikorların çeşitliliğini artırır ve bu nedenle çekirdeğin daha geniş kapsama alanını sağlar. Bununla birlikte, sadece çekirdek ile immünize etmek, çekirdeğin katlanmasının çoğunun kaybolduğu ve dolayısı ile bütün bir TG2 molekülü içinde belki de daha az bulunabilen epitopların bir kısmı, bu formatta çekirdek ile daha çekici epitoplar olabileceği anlamına gelir. Antikorların 10'unun hepsinin, doğrusal epitopları tanıdığı (yani, bir indirgeme jeli üzerinde TG2'ye bağlı) verildiği göz önüne alındığında, daha önce bir immünojen olarak tam uzunluk TG2 kullanılarak izole edilmiş olan antikorların % 80'i, konformasyona bağlı olduğu, bunun önemli bir faktör olabileceğini önermiştir.

İnsan uygulaması için TG2 inhibe edici antikor fikrini öne süren başka çalışmalar daha önce yapılmıştır. Esposito ve arkadaşları, Çölyak hastalığı olan hastalardan, TG2 antikorlarının inhibe edici rol oynayabileceği öne sürülen rekombinant antikorlar geliştirmiştir [19]. Bu antikordardan biri, Quark Biotechnology tarafından ticari uygulama ve yapılmış olan bir patent başvurusu için geliştirilmiştir (W02006/100679). Bu antikor sıçan UUO modelinde böbrek fibrozunun önlenmesinde bazı heyecan verici erken veriler göstermiştir. Bununla birlikte, bu antikoru rekombinant bir versiyonu üretilmiştir ve ELISA'da (Şekil 17) ve western blotta TG2 ile reaksiyona girerken, tüm antikorların geliştirildiği bu antikor için bu çalışmada üretilen antikorların temel olarak tüm TG2 aktivitesini engellediği ng başına 500 ng IgG'ye kadar az inhibisyon elde edilmiştir. İlave olarak W02006/100679, bu insan

antikorunun bir fare versiyonunun üretilmesini tarif eder ve bu şekilde, tanınan sıçan böbrek hastalığı modellerinde uzun süre uygulanması zor olabilir.

Bu çalışmada dikkat edilmesi gereken, TG2 çekirdeğindeki 3 inhibitör epitopun haritalanmasıdır. AB1 epitopu, epitopun konumu göz önüne alındığında şaşırtıcı olan, hedeflenecek en güçlü olanıdır.

Ongörülen TG2 aktif yapısı [20] içindeki konumunun incelenmesi, giriş portundaki bir substrat cebi olabileceği için katalitik triada bağlandığını göstermektedir. Tarama testimizde kullandığımız substratlar nispeten küçük olduğu için (putresin ve dimetil kazein), bu bölgenin bu kadar etkili olması şaşırtıcı olabilir. Bununla birlikte, epitopun konumu, büyük IgG'nin (150 kDa), katalitik bölgeye sıkıca yerleştirileceği şekilde olmalıdır. Epitop verilerinden, DD9 sahasının varsayılan bir kalsiyum bağlama bölgesi ile ilişkili olduğu için daha etkili olabileceği tahmin edilebilir [21]. Bununla birlikte, literatürün incelenmesi 5 ya da daha fazla farazi Ca^{2+} bağlanma bölgesi olduğunu göstermektedir [21] ve açıkça çarpıcı bir etkiye sahip olmasına rağmen, tüm TG2 aktiviteleri için kritik değildir.

DF4 bölgesi, antikor katalitik triaddaki esansiyel amino asitlerin 1'ine bağlandığı için varsayımlı olarak en etkili epitop olacaktır. Bununla birlikte, bu inhibitör antikoru üreten DF4'ü başarı ile klonlamak mümkün olmamıştır ve bu şekilde IC50 testlerini uygun şekilde yapmak için yeterli IgG'nin üretimi mümkün olmamıştır. Lenfositlerin çoğalmak için TG2 aktivitesine ihtiyaç duyduğunu ve bu nedenle daha iyi inhibe edici potansiyele sahip olan antikorların sadece rekombinant yaklaşımların ya da bir sürekli IgG ekstrasyon sistemin kullanılması ile mümkün olabileceğini öneren Gunzler et al (1982) FEBS Lett. 150(2): 390-6'nın çalışmaları dikkate alındığında, çok yüksek etkinliğe sahip olan antikorların klonlanması aslında çok zor olabilir.

Bu çalışmayı üstlenmede en sinir bozucu sorunlardan biri, preklinik testler için kritik olan, insan dışı TG2 aktivitesini etkin bir şekilde bloke etmek için geliştirilen tüm antikorların belirgin şekilde yetersizliği olmuştur. Tüm antikorlar, hem western blot hem de ELISA'da sıçan ve fare TG2 ile reaksiyona girmiştir, bazı durumlarda yoğunlukta çok az fark olmuştur. Bununla birlikte, IgG'yi ürettiğimiz 9 antikordan sıçan için sadece 4'ünde bir IC50 belirlemek mümkün olmuştur ve farede hiç olmamıştır. Sıçan TG2'sine karşılık bir IC50'nin hesaplandığı 4'ü, insan TG2'sine karşı AB1'den sıçan TG2'sine karşılık 30 kat ya da daha düşük IC₅₀ olduğunu göstermiştir, bu da herhangi bir in vivo dozun yasaklayıcı bir şekilde büyük olacağı

anlamına gelir. İlave olarak, hiçbir, bir sıçan hücresi lizatında hiçbir şekilde inhibe etmez. ELISA ve western blotlardaki reaktivite göz önüne alındığında, ELISA ve western blotlardaki reaktivite göz önüne alındığında, artı türler arasında AB1 için sadece 5 ve DD9 için 3 için uyumsuzluk mevcuttur, inhibisyon için belirgin tür özgüllüğü şaşırtıcı olmuştur ve etkili inhibisyon için benzeşimin kritik önemini açıkça göstermektedir. Bu nedenle, insan TG2 için bu inhibitör epitopları tanımladıktan sonra, eğer değerleri hastalığın in vivo klinik öncesi modellerinde ortaya konacaksa, sıçan TG2'de bu bölgeler için analog antikörlerin geliştirilmesi kritik öneme sahiptir.

Çok çeşitli TG inhibitörleri bulunmaktadır. Orijinal olarak Merke Sharpe Dome [22] tarafından geliştirilmiş olan tiyomidazol tabanlı bileşikler, deneysel böbrek skarlaşmasını [16] tedavi etmek için çok başarılı bir şekilde kullanmış olduğumuz Griffin ve meslektaşları [23] tarafından geliştirilmiş olan CBZ-glutamil analogları ve Khosla ve meslektaşları [24 ila 27 arasındakiler] tarafından geliştirilmiş olan dihidroizoksazole tipi inhibitörler çeşitli kanser modellerinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu bileşiklerin sürekli olarak iyileştirilmesinin uygulanabilir bir insan TG2 inhibitörü verebileceğine dair bir umut mevcuttu, ancak TG aile reaktivitesinin çapraz olması ya da bileşiklerin potansiyel toksik doğasının bunu önlediği görülmektedir. Daha yakın zamanlarda, Acylideneoxoindoles, TG2 inhibitörlerinin yeni bir geri dönüşümlü sınıfı olarak tanımlanmıştır [24], ancak diğer TG ailesi üyelerine çapraz reaktiviteleri ile ilgili veriler bulunmamaktadır. İnsan hastalığında TG2, 2010 Gordon konferansında, Pasternack ve Zedira'dan gelen meslektaşlar, yan zincir Michael alıcılarını in vivo uygulama için uygun olma iddiaları ve TG2 seçiciliği için TG2 inhibitörü olarak kullanan bir dizi bileşiğin ayrıntılarını sunmuştur, fakat bu konu hakkında tam bir makale bugüne kadar gerçekleşmemiştir. Aynı toplantıda Macdonald ve arkadaşlarının erken çalışması Huntington hastalığı tedavisi için bir TG2 inhibitörü tasarlamada bazı ilginç gelişmeler göstermiştir, ancak yine tam bir yayın hala beklenmektedir. Kuşkusuz, TG2'nin küçük bir molekülü inhibitörü, başarılılabılır olması halinde oldukça arzu edilir olacaktır. Doku penetrasyonu, kan beyin bariyerini geçme yeteneği, üretim, maliyet ve kolay dozlama, faydalardan sadece birkaçıdır. Bununla birlikte, burada geliştirilen bir antikör inhibitörü bir şekilde tercih edilebilir.

TG2 açık bir şekilde çok işlevli bir enzimdir ve nükleer stabilizasyon ve taşıma [28, 29], endositoz [30, 31], GTPaz sinyal verme [32 ila 34 arasındakiler], Apoptoz [35,

36], hücre yapışması [37 ila 39 arasındakiler], sitoskeletal bütünlük [28, 29] ve ECM stabilizasyonu [9] gibi çeşitli hücre fonksiyonlarına bağlanmıştır. Açık bir şekilde, bir küçük molekül inhibitor, genel olarak hücre dışı boşluğa ve hücre iç kısmına serbest erişime sahip oldukları için bu fonksiyonların tümüne engel olabilir. Bir antikor hücreye girmek ve bu şekilde TG2'nin hücre içi rolleri etkilenmez. Önemli olarak, TG2'nin patolojik rollerinin çoğunun, doku yaralanması ve fibroz, çölyak hastalığı ve kanserdeki rolü gibi hücre dışı olduğu görülmektedir. Bu nedenle bir antikor kullanılması, arzu edilmeyen hücre içi etkileri önleyen ilave bir seçicilik derecesi getirecektir. Bu nedenle, bir antikor, TG2'nin ECM proteinlerini çapraz bağladığı fibrotik ve skarlaşma hastalıklarında, gliyadinin hücre dışı alanda deamide edildiği çölyak hastalığında ve hücre yapışmasının koruma faktörü gibi görüldüğü kanser içerisinde kemo dirençte TG2'nin bloke edilmesi konusunda avantajlar sunabilir. Bununla birlikte, kan beyin bariyerini geçebilecek küçük bir Fab parçası tasarlanmadığı sürece, bir TG2 inhibe edici antikor, nörolojik patolojilerin tedavisinde çok az kullanılabilir.

Sonuç olarak, ilk kez, TG2'yi seçici olarak hedef alan TG2 inhibe edici antikorlar geliştirebildik. Aynı zamanda TG2'nin çekirdek alanı içinde 3 yeni inhibitör epitop tanımladık. Antikor AB1'in insanlaştırılması, insanda ilk defa hedeflenen TG2 terapisinin olasılığını açacaktır.

Referanslar:

1. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. Verderio, E.A., T. Johnson, and M. Griffin, Amino Acids, 2004. 26(4): p.387-404.
2. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. Grenard, P., S. Bresson-Hadni, S. El Alaoui, M. Chevallier, D.A. Vuitton, and S. Ricard-Blum, J Hepatol, 2001. 35(3): p.367- 75.
3. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. Griffin, M., L.L. Smith, and J. Wynne, Br J Exp Pathol, 1979. 60(6): p.653-61.
4. Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C

- activation. Small, K., J.F. Feng, J. Lorenz, E.T. Donnelly, A. Yu, M.J. Im, G.W. Dorn, 2nd, and S.B. Liggett, *J Biol Chem*, 1999. 274(30): p.21291-6.
5. Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. Johnson, T.S., A.F. El-Koraie, N.J. Skill, N.M. Baddour, A.M. El Nahas, M. Njloma, A.G. Adam, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(8): p.2052-62.
 6. Thrombin upregulates tissue transglutaminase in endothelial cells: a potential role for tissue transglutaminase in stability of atherosclerotic plaque. Auld, G.C., H. Ritchie, L.A. Robbie, and N.A. Booth, *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2001.21(10): p.1689-1694.
 7. Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. Mosher, D.F., *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p.63-8.
 8. Transglutaminases. Lorand, L. and S.M. Conrad, *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p.9-35.
 9. Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels: a potential mechanism of tissue scarring. Fisher, M., R.A. Jones, L. Huang, J.L. Haylor, M. El Nahas, M. Griffin, and T.S. Johnson, *Matrix Biol*, 2009. 28(1): p.20-31.
 10. Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. Johnson, T.S., N.J. Skill, A.M. El Nahas, S.D. Oldroyd, G.L. Thomas, J.A. Douthwaite, J.L. Haylor, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(10): p.2146- 57.
 11. Do changes in transglutaminase activity alter latent transforming growth factor beta activation in experimental diabetic nephropathy? Huang, L., J.L. Haylor, M. Fisher, Z. Hau, A.M. El Nahas, M. Griffin, and T.S. Johnson, *Nephrol Dial Transplant*, 2010. 25(12): p.3897-910.
 12. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. Suto, N., K. Ikura, and R. Sasaki, *J Biol Chem*, 1993. 268(10): p.7469-73.
 13. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. Kuncio, G.S., M. Tsyganskaya, J. Zhu, S.L. Liu, L. Nagy, V. Thomazy, P.J. Davies, and M.A. Zern, *Am J Physiol*, 1998.274(2 Pt 1): p.G240-5.
 14. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. Skill, N.J., T.S. Johnson, I.G. Coutts, R.E. Saint, M. Fisher, L. Huang,

A.M. El Nahas, R.J. Collighan, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2004. 279(46): p.47754-62.

15. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. Johnson, T.S., M. Fisher, J.L. Haylor, Z. Hau, N.J. Skill, R. Jones, R. Saint, I. Coutts, M.E. Vickers, A.M. El Nahas, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(12): p.3078-88.

16. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. Huang, L., J.L. Haylor, Z. Hau, R.A. Jones, M.E. Vickers, B. Wagner, M. Griffin, R.E. Saint, I.G. Coutts, A.M. El Nahas, and T.S. Johnson, *Kidney Int*, 2009. 76(4): p.383-94.

17. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. Shweke, N., N. Boulos, C. Jouanneau, S. Vandermeersch, G. Melino, J.C. Dussaule, C. Chatziantoniou, P. Ronco, and J.J. Boffa, *Am J Pathol*, 2008. 173(3): p.631-42.

18. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. Xu, L, S. Begum, J.D. Hearn, and R.O. Hynes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006. 103(24): p.9023-8.

19. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. Esposito, C., F. Paparo, I. Caputo, M. Rossi, M. Maglio, D. Sblattero, T. Not, R. Porta, S. Auricchio, R. Marzari, and R. Troncone, *Gut*, 2002. 51(2): p.177-81.

20. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. Pinkas, D.M., P. Strop, A.T. Brunger, and C. Khosla, *PLoS Biol*, 2007. 5(12): p. e327.

21. Functional significance of five noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. Kiraly, R., E. Csosz, T. Kurtan, S. Antus, K. Szigeti, Z. Simon-Vecsei, I.R. Korponay-Szabo, Z. Keresztessy, and L. Fesus, *Febs J*, 2009. 276(23): p.7083-96.

22. 3,5 substituted 4,5-dihydroisoxazoles as transglutaminase inhibitors. Syntex, US Patent 4, 912, 120, 1990. March.

23. Griffin M, Coutts I G, and S. R, Novel Compounds and Methods of Using The Same., in International Publication Number WO 2004/113363,.2004:GB patent PCT/GB2004/002569.
24. Acylideneoxindoles: a new class of reversible inhibitors of human
5 transglutaminase 2. Klock, C., X. Jin, K. Choi, C. Khosla, P.B. Madrid, A. Spencer, B.C. Raimundo, P. Boardman, G. Lanza, and J.H. Griffin, *Bioorg Med Chem Lett.* 21(9): p.2692-6.
25. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. Siegel, M. and C. Khosla, *Pharmacol Ther*, 2007. 115(2): p.232-45.
- 10 26. Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. Siegel, M., J. Xia, and C. Khosla, *Bioorg Med Chem*, 2007. 15(18): p.6253-61.
27. Novel therapies for celiac disease. Sollid, L.M. and C. Khosla, *J Intern Med.* 269(6): p.604-13.
- 15 28. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Fesus, L. and M. Piacentini, *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(10): p.534-9.
29. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Lorand, L. and R.M. Graham, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(2): p.140-56.
30. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte
20 portal in macrophages engulfing apoptotic cells. Toth, B., E. Garabuczi, Z. Sarang, G. Vereb, G. Vamosi, D. Aeschlimann, B. Blasko, B. Becsi, F. Erdodi, A. Lacy-Hulbert, A. Zhang, L. Falasca, R.B. Birge, Z. Balajthy, G. Melino, L. Fesus, and Z. Szondy, *J Immunol*, 2009. 182(4): p.2084-92.
- 25 31. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. Davies, P.J., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, and I.H. Pastan, *Nature*, 1980. 283(5743): p.162-7.
32. GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues
30 in a unique GTP-binding pocket, Iismaa, S.E., M.J. Wu, N. Nanda, W.B. Church, and R.M. Graham, *J Biol Chem*, 2000. 275(24): p.18259-65.
33. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP. Iismaa, S.E., L. Chung, M.J. Wu, D.C. Teller, V.C. Yee, and R.M. Graham, *Biochemistry*, 1997. 36(39): p.11655-64.

34. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. Nakaoka, H., D.M. Perez, K.J. Baek, T. Das, A. Husain, K. Misono, M.J. Im, and R.M. Graham, Science, 1994. 264(5165): p.1593-6.
35. Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. Fesus, L. and V. Thomazy, Adv Exp Med Biol, 1988. 231: p.119-34.
36. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. Fesus, L., V. Thomazy, and A. Falus, FEBS Lett, 1987. 224(1): p.104-8.
37. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and betal integrin co-signaling. Telci, D., Z. Wang, X. Li, E.A. Verderio, M.J. Humphries, M. Baccarini, H. Basaga, and M. Griffin, J Biol Chem, 2008. 283(30): p.20937-47.
38. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. Verderio, E., B. Nicholas, S. Gross, and M. Griffin, Exp Cell Res, 1998. 239(1): p.119-38.
39. A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. Verderio, E.A., D. Telci, A. Okoye, G. Melino, and M. Griffin, J Biol Chem, 2003. 278(43): p.42604-14.

Ornek 2: Buluşa ait yeni TG2 inhibe edici antikorların sekanslanması.

Antikor Sekanslama

- Buluşa ait her antikorun değişken bölgelerinin sekanslarını oluşturmak için, üretici protokollerini takip eden RNA'yı çıkarmak için Qiagen RNeasy Mini Kit kullanılarak bir hibridom hücreleri peleti işlenmiştir. Ekstre edilen RNA, üreticinin protokollerine uygun olarak bir Not1-dTis primer kullanılarak bir 1. sarmal cDNA Sentez Kiti (GE Healthcare) kullanılarak bir cDNA üretmek için ters kopyalanmıştır. CDNA preparatı, üreticinin protokollerine uygun olarak Qiagen PCR Saflaştırma Kiti kullanılarak temizlenmiştir.
- Ağır zincir sekansını belirlemek için, fare cDNA, Tablo 12'de gösterildiği gibi sabit bölge primerli (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3 ya da dördünün bir karışımı) bir dizi dejenere primer (MHV1-12) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Benzer şekilde,

hafif zincir sekansını belirlemek için, fare cDNA, Tablo 13'te gösterildiği gibi sabit bölge primer MKC ile bir dizi dejenere primer (MVK1-11) kullanılarak çoğaltılmıştır.

Eğer ilk Ağır Zincir PCR seti kullanılarak çoğaltma ürünleri görülmediyse, cDNA üretmek için Not1-dTis primer kullanılarak bir 5' RACE PCR (Invitrogen) gerçekleştirilmiştir; ve sabit bölge primerleri (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3 ya da dördünün bir karışımı) ve 5' RACE Çapa Primeri, GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIG (burada I, deoksiinozin için bazdır) gerçekleştirilmiştir.

Ortaya çıkan çoğaltma bantları, üretici protokolünü kullanarak TOPO-TA Cloning® kiti (Invitrogen) kullanılarak pCR2.1®-TOPO® vektörüne bağlanmıştır ve sekanslama için GATC Biotech AG'ye gönderilmiştir.

Tablo 12: Fare Ağır Zincir Değişken Bölgelerini Klonlamak için PCR Primerleri

İsim	Sekans
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATCTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRACCTTTGGGYTCAGCTTGRTTT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT
MHV6	ATGGCTGTCTYTRGSGCTRCTCTTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTG TG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG

MHCG2A	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

Belirsizlik kodları: R = A ya da G; Y = C ya da T; M = A ya da C; K = G ya da T; S = G ya da C; W = A ya da T

MHV, fare ağır zincir değişken bölge genlerinin lider sekanslarına hibritlenen primerleri belirtir, MHCG, fare sabit bölge genlerine hibritlenen primerleri belirtir.

5 Tablo 13: Fare Kappa Hafif Zincir Değişken Bölgelerini Klonlamak için PCR Primerleri

İsim	Boyut	Sekans
MKV1	30-mer	ATGAAGTTGWTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	29-mer	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	30-mer	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG
MKV4	33-mer	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	30-mer	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	27-mer	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	31-mer	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	31-mer	ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAATTG
MKV9	25-mer	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	27-mer	ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTCT
MKV11	28-mer	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
CL12A		ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT

CL12B		ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT
CL13		ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTAT
CL14		ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT
CL15		ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT
CL16		ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT
CL17A		ATGAGGTGCCTARCTSAGTTCCTGRG
CL17B		ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG
CL17C		ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG
MKC	20-mer	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

Belirsizlik kodları: R = A ya da G; Y = C ya da T; M = A ya da C; K = G ya da T; S = G ya da C; W = A ya da T

MKV, fare kappa hafif zincir değişken bölge genlerinin lider sekanslarına hibritlenen primerleri belirtir, MKC, fare kappa sabit bölge genine hibritlenen primeri belirtir.

5 Sekans verileri

Antikor AB1, BB7, DC1, JE12, EH6, AG9, AH3, DD9, DH2, DD6 ve IA12 Antikorlarına ek olarak sekanslanmıştır. Sekanslar, Şekil 18 ila 28 arasında verilmiştir.

Örnek 3: Buluşun kimerik ve insanlaştırılmış yeni anti TG2 antikorlarının yapımı ve karakterizasyonu.

Buluşa ait antikorları daha fazla karakterize etmek ve insanlaştırma için antikorların derecelendirilmesini ve önceliklendirilmesini sağlamak için, kimerik TG2 antikorlarının bir paneli yapılmıştır (fare değişken bölgeleri ve insan IgG1 ve insan kappa). Kimerik antikorları üretmek için kullanılan metodoloji aşağıda verilmektedir.

Metotlar

İnsan VH ve VK cDNA Veritabanları

Uluslararası İmmünojenetik Veri Tabanı (International Immunogenetics Database) 2009¹'dan insan ve fare immüno globülinlerinin protein sekansları ve İmmünolojik İlgili Proteinlerinin Sekanslarının Kabat Veri Tabanı Yayın 5'i (son güncelleme 17-Kas-1999)² bir Kabat hizalaması içindeki insan immüno globülin sekanslarının bir veri tabanının derlenmesi için kullanılmıştır. Veritabanı 10,606 VH ve 2,910 VK sekansını içermektedir.

AB1'in Moleküler Modeli

- 10 Grup 1 antikorlarının (yani, insan TG2'sinin 304 ila 326 arasındaki amino asitlerini kapsayan epitopu bağlayan antikorlar) bir temsilcisi olarak, otomatik modda çalışan Modeller programı³ kullanılarak fare antikoru AB1 değişken bölgelerinin bir homoloji modeli hesaplanmıştır.1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb ve IMQK.pdb'nin atomik koordinatları, Accelrys antikor pdb yapıları veri tabanının Blast analizi ile belirlendiği gibi, Arabirim, VL ve VH için en yüksek özdeşlik sekansı şablonları olmuşlardır. Bu şablonlar, her biri en iyi 3 döngü şablonu ile her bir CDR döngüsünü modelleyerek rafine edilmiş 20 başlangıç modeli üretmek için kullanılmıştır.

hAB1 Çerçeve Seçimi

- 20 Sekans analiz programı, gibsSR, insan VH ve VK veri tabanlarını AB1, VHC, VKC ve VKC₁ ile sorgulamak için kullanılmış olup, BB7 VHC ve VKC ve DC1 VHC ve VKC çeşitli seçim kriteri kullanan protein sekanslarıdır. AB1 fare antikorunun homoloji modelinde bir CDR kalıntısının 5A içindeki FW kalıntıları (Kabat tanımı) tanımlanmıştır ve "5A Yakınlık" kalıntıları olarak adlandırılmıştır.

- 25 İlk insanlaştırılmış ağır zincir versiyonlarının dayanacağı FW olarak AF06220 seçilmiştir. Tablo 14, AF06220'nin murin antikorları ile hizalanmasını ve kalıntı kimliğini göstermektedir. Tablo 15, sekansların 5A yakınlık zarfını göstermektedir. AF062260, germ hattı VH geni Z12347'den sadece 1 somatik mutasyona sahiptir (Tablo 16).

- 30 İlk AB1 insanlaştırılmış kappa hafif zincir versiyonlarının dayanacağı FW olarak AY247656 seçilmiştir. Murin AB1 antikor kappa hafif zincir ile hizalanma ve kalıntı kimliği Tablo 17'de gösterilmektedir; Tablo 18, sekansların 5A yakınlık zarfını

göstermektedir. Sekans, germ hattı VK geni X93620'den 5 somatik mutasyon gösterir (Tablo 19).

Oteki insanlaştırılmış kappa hafif zincir yapılarının dayanacağı FW olarak AF193851 seçilmiştir. Murin antikorları ile hizalanma ve kalıntı kimliği Tablo 20'de gösterilmektedir. Tablo 21, sekansların 5A yakınlık zarfını göstermektedir. Sekans, germ hattı VK geni J00248'den hiçbir somatik mutasyonu göstermez (Tablo 22).

Ekspresyon Vektörlerinin Üretimi

Kimerik ekspresyon vektörlerinin oluşturulması, bir Hind III sınırlama bölgesi ve bir Kozak sekansından önce VH ve VL'ye uygun bir lider sekansın eklenmesini gerektirir. Kozak sekansı, değişken bölge sekansının verimli bir şekilde translasyonunu sağlar. Bir ribozomun translasyona başlayabileceği doğru AUG kodonunu tanımlar ve en kritik baz AUG başlangıcının üst akışındaki -3 konumunda olan adenindir.

Ağır zincir için kimerik ekspresyon vektörlerinin yapımı, değişken bölgenin J bölgesinin 3' ucuna bitişik olan bir doğal Apal kısıtlama bölgesine kadar insan γ 1 sabit bölgesinin 5' bir parçasının eklenmesini gerektirir. CH, eklenen VH sekansının aşağı akışındaki ekspresyon vektöründe kodlanır, ancak VC intronundan yoksundur.

Hafif zincir için, doğal birleşme yeri donör bölgesi ve bir BamHI bölgesi V bölgesinin alt akışına eklenir. Birleşme yeri donör sekansı, VL'nin sabit bölgeye çerçeve içinde tutulması için gerekli olan kappa V:C intronunun eklenmesini kolaylaştırır.

Değişken bölgelerin DNA sekansları optimize edilmiştir ve GeneArt® tarafından sentezlenmiştir. Lider sekans, kültürlenmiş olan memeli hücrelerinde antikorun iyi ekspresyonunu veren sekans olarak seçilmiştir.

Ağır Zincir değişken bölge yapıları, HindIII + Apal sindirim kullanılarak klonlama vektöründen çıkarılmıştır, saflaştırılmıştır ve benzer şekilde kesilmiş ve fosfataz ile işlenmiş olan MRCT ağır zincir ekspresyon vektörüne bağlanmıştır ve TOP10 bakterilerini transforme etmek için kullanılmıştır.

Kappa zincir değişken bölge yapıları, HindIII + BamHI sindirim kullanılarak eksize edilmiştir, saflaştırılmıştır, benzer şekilde kesilmiş ve fosfataz ile işleme tabi tutulmuş olan MRCT kappa hafif zincir ekspresyon vektörüne bağlanmıştır ve TOP10 bakterilerini transforme etmek için kullanılmıştır.

Antikor Ekspresyonu

Hem Ağır hem de kappa zincirlerini kodlayan çift uçlu ekspresyon vektörü üretilmiştir ve HEK293T hücrelerine transfeke edilmiştir. Hücre kültürü süpernatantı, üretici protokollerine uygun olarak Protein G-agaroz üzerinde benzeşim kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

ELISA Bağlanması

HEK 293F hücreleri, farklı insanlaştırılmış ağır zincir vektörleri ile birlikte farklı insanlaştırılmış hafif zincir vektörlerinin kombinasyonları ile birlikte transfeke edilmiştir. ELISA ile antikor bağlanmasını ölçmek için rekombinant insan TG2 kullanılmıştır. Sonuçlar, Ağır Zincir versiyonu RHA'nın (Tablo 23), Hafif Zincir versiyonları RKE ve RKJ ile kombinasyon halinde (Tablo 24) (insanlaştırılmış olan farklı Hafif Zincir versiyonlarını temsil eden) optimum bağlanma (Şekil 34) gösterdiğini, ve bu nedenle ilave karakterizasyon için seçildiğini göstermiştir. İnsanlaştırılmış BB7 ağır ve hafif zincirlerinin ve insanlaştırılmış DC1 ağır ve hafif zincirlerinin optimal çiftlerini tanımlamak için benzer bir yaklaşım kullanılmıştır.

Ağır Zincir versiyon RHA, AB1 antikorunun fare CDR bölgelerinin İnsan donör sekansı üzerine değiştirilmemiş bir greftidir. Bununla birlikte, her iki Hafif Zincir versiyonları RKE ve RKJ, F72 (Tablo 24) ile aynı tek 5A yakınlığa sahiptir. Bu geri mutasyon, Vernier⁴, Canonical⁵ ya da Interface⁶ kalıntılarının dışında kalır.

Referanslar:

1. Lefranc, M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). Nucleic Acids Res. 31, 307-310 (2003).
2. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).
3. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinformatics. Chapter 5: Unit 5.6., Unit (2006).
4. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J. Mol. Biol. 224, 487-499.
5. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Antibody modeling: implications for engineering and design. Methods 20, 267-279.

6. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J. Mol. Biol. 186, 651-663.

5 Aşağıdaki tablo A, şekillerde kullanılan tanımlayıcılara çapraz referans ile üretilen kimerik ve insanlaştırılmış antikorları özetlemektedir.

Murin Antikoru	Kimerik Antikor	İnsanlaştırılmış Antikor
AB1	cAB001 CAB003	hAB004 (hAB001AE) hAB005 (hAB001AJ)
BB7	cBB001	hBB001AA hBB001BB
DC1	cDC001	hDC001AA hDC001BB
DD6	CDD6001	
DD9	CDD9001	
DH2	cDH001	

Tablo 14:

Kabat Numaraları	
Vernier ⁴	
Canonical ⁵	
Interface ⁶	
5Å Yakınlık	
CDR	
AB VHc (nAB001VH)	
BB7 VHc (mBB7001VH)	
DC1 VHc (mDC001VH)	
AF062260	

Tablo 14, AF06260'ın murin antikorları ile hizalanmasını ve kalıntı kimliğini göstermektedir. Kalıntı kimlikleri bir nokta (.) karakteri ile gösterilmektedir. Kalıntı farklılıkları uygun olan yerde gösterilmiştir. Boşluklar (-) Kabat numaralandırmasını korumak ve uygulanabilir olduğunda kalıntı ekleme ya da silme göstermek için kullanılır.

Tablo 15:

	5Å Yakınlık Kalıntıları
AB VHc (mAB001VH)	
BB7 VHc (mBB7001VH)	
DC1 VHc (mDC001VH)	
AF062260	

Antikor ağır zincir çerçeve kalıntılarını gösteren Tablo 15, CDR'lerin 5Å zarfında yer almaktadır. Kalıntı kimlikleri bir nokta (.) karakteri ile gösterilmektedir. Kalıntı farklılıkları uygun olan yerde gösterilmiştir.

Tablo 16:[illegible]

Tablo 16, AF062260'ın VH germ hattı Z12347 geninden 1 somatik mutasyona sahip olduğunu göstermektedir. Kalıntı kimlikleri bir nokta (.) karakteri ile gösterilmektedir. Kalıntı farklılıkları uygun olan yerde gösterilmiştir.

5 **Tablo 17:**

[illegible]

Tablo 17, AY247656'nın murin AB1 antikoru ile hizalanmasını ve kalıntı kimliğini göstermektedir. Kalıntı kimlikleri bir nokta (.) karakteri ile gösterilmektedir. Kalıntı farklılıkları uygun olan yerde gösterilmiştir. Boşluklar (-) Kabat numaralandırmasını korumak ve uygulanabilir olduğunda kalıntı ekleme ya da silme göstermek için kullanılır.

10 **Tablo 18:**

	5Å Yakınlık Kalıntıları
AB VKc (mAB001VK)	100.00%
AY247656	98.00%

AB1 antikor kappa hafif zincir çerçeve kalıntılarını gösteren Tablo 18, CDR'lerin 5A zarfında yer almaktadır. Kalıntı kimlikleri bir nokta (.) karakteri ile gösterilmektedir. Kalıntı farklılıkları uygun olan yerde gösterilmiştir.

Tablo 19:

	18	19	20	21	22	23	24	25	26
AY247656									
AY247656									

- 5 Tablo 19 AY247656'nın germ hattı VK gen X93620'den 5 somatik mutasyona sahip olduğunu gösterir. Kalıntı kimlikleri bir nokta (.= karakteri ile gösterilmektedir. Kalıntı farklılıkları uygun olan yerde gösterilmiştir.

Tablo 20:

Kabat Numaraları	
Vernier	
Canonica	
Interface	
5A Yazarlık	
CDR	
AB VKC (nAB002VK)	
AB VKC (nAB003VK)	
BB7 VKC (nBB001VK)	
DC7 VKC (nDC001VK)	
AF193851	

- 10 Tablo 20, AF06260'ın murin antikorları ile hizalanmasını ve kalıntı kimliğini göstermektedir. Kalıntı kimlikleri bir nokta (.) karakteri ile gösterilmektedir. Kalıntı farklılıkları uygun olan yerde gösterilmiştir. Boşluklar (-) Kabat numaralandırmasını korumak ve uygulanabilir olduğunda kalıntı ekleme ya da silme göstermek için kullanılır.

erin 5A zarfında yer almaktadır. Kalıntı kimlikleri bir
erilmiştir.

NO	NO	NO	NO
01	02	03	04
05	06	07	08
09	10	11	12
13	14	15	16
17	18	19	20
21	22	23	24
25	26	27	28
29	30	31	32
33	34	35	36
37	38	39	40
41	42	43	44
45	46	47	48
49	50	51	52
53	54	55	56
57	58	59	60
61	62	63	64
65	66	67	68
69	70	71	72
73	74	75	76
77	78	79	80
81	82	83	84
85	86	87	88
89	90	91	92
93	94	95	96
97	98	99	100

sahip olmadığını göstermektedir. Kalıntı kimlikleri bir
erilmiştir.

Tablo 23:

Kabat Numaraları	
Vernier ³	
Canonical ⁴	
Interface ⁵	
5A Yakınlık	
CDR	
AB RHA ihAB001HA	
BB7 RHA ihBB001HA	
BB7 RHB ihBB001HB	
DC1 RHA ihDC001HA	
DC1 RHB ihDC001HB	

Tablo 23, AB1, BB7 ve DC1 ağır zincirlerinin nihai insanlaştırılmış versiyonlarının sekans hizalamasını göstermektedir. Boşluklar (-) Kabat numaralandırmasını korumak ve uygulanabilir olduğunda kalıntı ekleme ya da silme göstermek için kullanılır.

5 Tablo 24:

Kabat Numaraları	
Vernier ⁴	
Canonical ⁵	
Interface ⁶	
5A Yakınlık	
CDR	
AB RKE ihAB001RKEi	
AB RKJ ihAB001RKJi	
BB7 RKA ihBB001RKAi	
BB7 RKB ihBB001RKBi	
DC1 RKA ihDC001RKAi	
DC1 RKB ihDC001RKBi	

Tablo 24, AB1, BB7 ve DC1 kappa hafif zincirlerinin nihai insanlaştırılmış versiyonlarının sekans hizalamasını göstermektedir. Boşluklar (-) Kabat numaralandırmasını korumak ve uygulanabilir olduğunda kalıntı ekleme ya da silme göstermek için kullanılır.

TABLO 24A:

401.3001-0051

[illegible]801-366-5052

AB	BB7 RHB	BB7 RHA	CC7 RHA	CC7 RHB
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
0.41	0.41	0.41	0.41	0.41
0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
0.49	0.49	0.49	0.49	0.49
0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
0.51	0.51	0.51	0.51	0.51
0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
0.54	0.54	0.54	0.54	0.54
0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
0.57	0.57	0.57	0.57	0.57
0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
0.59	0.59	0.59	0.59	0.59
0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
0.61	0.61	0.61	0.61	0.61
0.62	0.62	0.62	0.62	0.62
0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
0.66	0.66	0.66	0.66	0.66
0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
0.68	0.68	0.68	0.68	0.68
0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
0.71	0.71	0.71	0.71	0.71
0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
0.73	0.73	0.73	0.73	0.73
0.74	0.74	0.74	0.74	0.74
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
0.76	0.76	0.76	0.76	0.76
0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
0.79	0.79	0.79	0.79	0.79
0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
0.82	0.82	0.82	0.82	0.82
0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
0.87	0.87	0.87	0.87	0.87
0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
0.89	0.89	0.89	0.89	0.89
0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
0.93	0.93	0.93	0.93	0.93
0.94	0.94	0.94	0.94	0.94
0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
0.96	0.96	0.96	0.96	0.96
0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

601 ZOOLOGICAL

AB
B87 RH6
B87 RHA
C0' RHA
C0' RH6

Hafif Zincir (CDR1)

AB RKE	Y a d a
AB RKJ	Y a d a
BB7 RKB	Y a d a
BB7 RKA	Y a d a
DC1 RKA	Y a d a
DC1 RKB	Y a d a

Hafif Zincir (CDR2)

AB RKE	Y a d a	Y a d a
AB RKJ	Y a d a	Y a d a
BB7 RKB	Y a d a	Y a d a
BB7 RKA	Y a d a	Y a d a
DC1 RKA	Y a d a	Y a d a
DC1 RKB	Y a d a	Y a d a

Hafif Zincir (CDR3)

AB RKE	Y a d a
AB RKJ	Y a d a
BB7 RKB	Y a d a
BB7 RKA	Y a d a
DC1 RKA	Y a d a
DC1 RKB	Y a d a

Tablo 24a, AB, BB-7 ve DC-1 antikorlarının ağır ve hafif zincirlerinde, özellikle CDR'lerin ve yan bölgelere sahip olan CDR'lerin sekansını gösteren Tablo 23 ve 24'te sunulan sekans bilgilerini özetlemektedir.

Kimerik ve insanlaştırılmış antikorların karakterizasyonu

Kimerik ve insanlaştırılmış Abs, insan ve sinomolgus maymunu TG2'ye bağlanma ve bu enzimlerin enzimatik inhibisyonu için aşağıda tarif edilen metodolojiye göre test edilmiştir.

5 METOTLAR

TG2 bağlanması için ELISA tahlili

İnsan ve sinomolgus maymunu TG2'ye antikor bağlanması bir ELISA deneyinde belirlenmiştir. Berrak polistiren "Maxisorp" 96 kuyucuklu plakalar (Nunc), gece boyunca 4 °C'de 50 µl 10.05 M karbonat-bikarbonat tamponu pH 9.6 içinde 50 ng saflaştırılmış insan veya sinomogulus maymun TG2 ile kaplanmıştır. Kontrol kuyucukları, 50 µl 100 µg/ml sıgır serum albümini (BSA) ile kaplanmıştır. Plakalar, 3 kez % 0.1 Tween 20 (PBST) içeren 300 µl fosfat tamponlu tuzlu su pH 7.4 (PBS) ile yıkanmıştır ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca PBS içinde ağırlık olarak 300 µl % 3 ağırlık/ hacim Marvel yağsız süt ile bloke edilmiştir. PBST ile 3 kez yıkandıktan sonra, 50 µl protein-A saflaştırılmış kimerik ya da insanlaştırılmış anti TG2 antikorları ya da insan IgG1 kappa izotop kontrol antikorları ya da CUB7402 (Abcam) seri olarak 4 kat seyreltilmiştir ve PBS'deki 50 nM'lik bir üst konsantrasyondan 4 kat seyreltilmiştir ve iki kopya halinde plakaya ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat sonra plakalar, 3 kez PBST içerisinde yıkanmıştır ve 50 µl peroksidaz ile konjuge keçi anti insan IgG (Fc) (Serotec) ile inkübe edilmiştir, PBS içinde % 3 ağırlık/ hacim Marvel yağsız süt içerisinde ya da CUB7402 peroksidaz konjuge 1 / 5.000 keçi anti-fare IgG (Fc) (Sigma) ihtiva eden kuyucuklar için oda sıcaklığında 1 saat boyunca seyreltilmiştir. 3 kez PBST ile yıkandıktan sonra, plakalar 25 µl 0.5M H₂SO₄ ile reaksiyonu durdurmadan ve bir mikrotitre plaka okuyucusunda (BioTek EL808) 450 nM'de absorbanı okumadan önce, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 50 µl TMB substratı (Sigma) ile geliştirilmiştir. Doz yanıt eğrileri analiz edilmiştir ve verilere 4 parametrelili bir lojistik uygunluk (GraphPad Prism) kullanılarak EC₅₀ değerleri ve diğer istatistiksel parametreler belirlenmiştir.

Buluşa ait antikorlar ile TG2 inhibisyonunun floresan bazlı transglutaminaz analizi.

Saflaştırılmış insan (Zedira) ya da sinomogulus maymunu TG2 enzimlerinin (Trenzyme) transglutaminaz aktiviteleri, N,N-dimetile edilmiş kazein (DMC, Sigma) içerisinde dansile edilmiş olan lizin KxD'nin (Zedira) dahil edilmesi ile ölçülmüştür.

- İnsan ya da sinomogulus maymun TG2, sırası ile 1 nM ve 10 nM'lik bir transamidasyon tamponu (250 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 0.2 mM DTT ve % 0.05 hacim/ hacim Pluronik F-1 içeren 25 mM HEPES pH 7.4) ile seyreltilmiştir ve protein-A saflaştırılmış, murin, kimerik ya da insanlaştırılmış TG2 antikorlarının çeşitli konsantrasyonları ile 384 kuyucuklu siyah mikro titer plakaları (Corning) içerisinde 180 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyonlar, sırasıyla 10 uM ve 20 uM'lik bir nihai konsantrasyona ve 30 uL'lik bir nihai reaksiyon hacmine DMC ve KxD ilave edilerek başlatılmıştır ve 180 dakika boyunca oda sıcaklığında devam etmesine izin verilmiştir ve floresandaki artışa (RFU) (280 nm'de eksitasyon , emisyon 550nm) bir Tecan Safire2 plaka okuyucu kullanılarak izlenmiştir. Veriler, % aktivite = (RFU test antikor - RFU düşük kontroller) / RFU yüksek kontroller - RFU düşük kontroller) x 100 olan düşük aktivite yüzdelere normalize edilmiştir, burada düşük kontroller enzim hariç tüm bileşenleri içerir ve yüksek kontroller antikor dışındaki tüm bileşenleri içerir.
- Antikor doz yanıt eğrileri, GraphPad prizma yazılımı kullanılarak çizilmiştir ve IC₅₀ ve diğer istatistiksel parametreleri döndürmek için 4 parametrelili bir lojistik model kullanılarak yerleştirilmiştir. Sonuçlar, Şekiller 29 ila 33 arasındakilerde gösterilmektedir.

İnsanlaştırılmış ve murin anti TG2 antikorlarının enzim inhibisyonu ve ELISA bağlama deneylerinin sonuçları ve tartışılması

- Kimerik ve insanlaştırılmış TG2 antikorlarının, insan TG2'sinin transamidasyonunu inhibe etme kabiliyeti, dansillenmiş olan lizinin N, N-dimetillenmiş kazeine doza bağlı inhibisyonu ile belirlenmiştir (Şekiller 29 ve 31'de örneklendirilmiştir). Grup 1'den hem kimerik hem de insanlaştırılmış antikorlar (örnek olarak cAB003, cBB001, cDC001, hBB001AA, hAB001BB, hAB005 ve hAB004), aynı aralıkta immobilize edilmiş insan TG2'sine bağlanma gösteren ELISA verileri ile tutarlı olarak düşük nanomolar aralığında güçlü TG2 aktivitesinin inhibe edildiğini gösterir (Şekiller 35 ve 37). Buna karşılık, ticari antikor CUB7402, ELISA deneylerinde grup 1 antikorlarına karşılaştırılabilir bağlanmaya rağmen (Şekiller 35A, 36A, 37A ve 38A), enzimin transamidasyon fonksiyonunu etkilemeyen bir epitopun CUB7402 tarafından tanınmasıyla tutarlı olarak insan ya da sinomogulus maymunu TG2 enzimatik aktivitelerini (Şekil 29F ve 30B) inhibe edememiştir. Bu nedenle, grup 1 antikorları, enzim fonksiyonunu inhibe etme kabiliyetleri ile, enzimatik aktivite üzerinde hiçbir

etkisi olmayan fakat bağlanan CUB7402 gibi diğer antikorlardan ayırt edilebilirler. Benzer şekilde, grup 3'ü temsil eden murin ve kimerik antikorlar (örnek olarak, mDD9001, mDH001, cDD9001 ve cDH001), insan TG2 transamidasyonunu tutarlı bir şekilde inhibe etmiştir, ancak grup 1 antikorlarından daha düşük bir potansiyele sahip olmuştur (Şekil 29 ve 33). Grup 1 ve grup 3'ten örneklenen ana murin monoklonal antikorları tarafından insan TG2'nin inhibisyonu (Şekil 33), murin antikorlarının fonksiyonel potansiyelinin insanlaştırılmış versiyonlarda tutulduğunu gösteren, kimerik ve insanlaştırılmış versiyonları ile karşılaştırılabilir potansiyeller gösterir. Benzer şekilde, örneklenen insanlaştırılmış antikorlar hBB001AA, hBB001BB ve hAB004 (Şekil 37) için insan TG2 ELISA bağlanma verileri, cBB001 ve cAB003 kimerik versiyonları için elde edilenler ile karşılaştırılabilir EC50 değerleri gösterir; bu da aynı zamanda insanlaştırılmış versiyonlarda bağlanma benzeşiminin de korunduğunu gösterir. Kimerik ve insanlaştırılmış antikorlar aynı zamanda, sinomogulus maymunlarda toplam % 99 sekans özdeşliğine sahip olan aynı türden olan epitopların korunması ile tutarlı olarak, sinomogulus maymun TG2'sinin etkili inhibe edilmesini (Şekiller 30 ve 32) ve türler arasında karşılaştırılabilir ELISA EC50'leri (Şekiller 36 ve 38) sergilemiştir. Aksine, CUB7402, grup 1 antikorları olarak her iki türün TG2'sine karşılaştırılabilir bağlanmayı gösterir, ancak her iki enzim aktivitesini de inhibe etmez (Şekiller 35 ile 38 arasındakiler ve 29 ile 30 arasındakiler).

Hücre bazlı analizler

Buluşa ait antikorların, HK-2 epitelyal hücrelerinden hücre dışı TG2'ye bağlanması, aşağıdaki protokol kullanılarak test edilmiştir.

Hücre dışı TG aktivitesinin ölçülmesi

Hücre dışı TG aktivitesi, modifiye edilmiş hücre ELISA ile ölçülmüştür. HK-2 epitel hücreleri, Accutase kullanılarak toplanmıştır ve gece boyunca fibronektinin 100 µl/kuyucuk oranı ile (50 mM Tris-HCl içerisinde 5 µg/ml, pH 7.4) (Sigma, Poole UK) kaplanmış olan 96 kuyucuklu bir plaka üzerine serumsuz ortamda 2×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda kaplanmıştır. Hücrelerin 37 °C'de O/N için bağlanmasına izin verilmiştir. Ortam, DMEM (Life Technologies) ile değiştirilmiştir ve bileşikler, antikorlar ya da kontroller ilave edilmiştir ve 37 °C'de bağlanmasına izin verilmiştir. 0.1 mM biyotin kadaverin [N- (5 amino pentil biyotinamit) trifloroasetik asit] (Zedira) kuyucuklara eklenmiştir ve plaka 2 saat boyunca 37 °C'ye geri

döndürülmüştür. Plakalar iki kez 3 mM EDTA/ PBS ile yıkanmıştır ve hücreler, 5 mM EDTA/ PBS içerisinde % 0.1 (ağırlık/ hacim) deoksikolat ile çıkarılmıştır. Süpernatant toplanmıştır ve protein belirlemesi için kullanılmıştır. Plakalar, PBS/ Tween ile yıkanmıştır ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca 1:5000 ekstrevidin HRP (Sigma, Poole, UK) ve ardından K Blue (SkyBio) substratı kullanılarak ortaya çıkan biyotin kadaverin ilave edilmiştir. Reaksiyon, Red Stop (SkyBio) ile durdurulmuştur ve absorbans, 4 650 nm'de okunmuştur. Her antikor en az üç ayrı durumda test edilmiştir.

Sonuçlar Şekiller 39 ve 40'ta verilmiştir ve örnek bir eğri ve test edilen antikorlar için elde edilen IC50 değerleri tablosunu göstermektedir. Şekil 39, İnsanlaştırılmış AB1 ile sonuçları gösterir ve Şekil 40, İnsanlaştırılmış BB7 ile sonuçları gösterir.

hAB005, HK2 hücrelerinin hücre dışı TG2'sini, 71.85 nM bir IC50 ve yaklaşık olarak % 30 kontrol aktivitesinin maksimum bir inhibisyonu ile inhibe etmiştir. hBB001AA, aktiviteyi 19.8 nM IC50 ve maksimum % 40 kontrol aktivitesi inhibisyonu ile inhibe etmiştir. hBB001BB 4.9 nM'lik daha iyi bir IC50'ye sahiptir, ancak yaklaşık olarak maksimum % 55 kontrol inhibisyonuna sahiptir.

Çizik Analizleri

Buluşun insanlaştırılmış ve kimerik anti TG2 antikorlarının bağlanma aktivitesini değerlendirmek için aynı zamanda çizik yara deneyleri de yapılmıştır.

TG2'nin akciğer fibrozunda önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir ve TG2 nakavt farelerinin, bleomisin modelinde yara izinde azalma ve fibroz gösterdiği görülmektedir.(Keith C. Olsen, Ramil E. Sapinoro, R. M. Kottmann, Ajit A. Kulkarni, Şiiri E. Iismaa, Gail V. W. Johnson, Thomas H. Thatcher, Richard P. Phipps, and Patricia J. Sime. (2011) Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis. Am.J of Respiratory & Critical Care Med. 184 0699-707). Yaraların üzerindeki hücrelerin TG2 nakavt farelerden göçü, vahşi tipe kıyas ile azalmıştır. Buluşun insanlaştırılmış ve/ veya kimerik anti TG2 antikorlarının, normal akciğer fibroblastları (WI-38 hücreleri) tabakasında yaranın kapanma hızı üzerindeki etkisini değerlendirmek için çizik yara analizi yapılmıştır.

Çizik analizi protokolü:

WI-38 hücreleri (normal insan akciğer fibroblastları ATCC kategori #CCL-75), bir 96 kuyucuk Image Lock plakasında (Essen kategori #4379) 2×10^4 /kuyucukta % 10

FBS ile α MEM ortamındaki (Life Technologies kategori #32561) kaplanmıştır ve O/N > % 97 konflüansta büyütülmüştür. Hücreler, serumsuz olarak α MEM ortamı ile 2 kez yıkanmıştır ve bir Essen Yara Oluşturucusu ve üretici protokolü kullanılarak bir çizik yara oluşturulmuştur. Ortam uzaklaştırılmış ve 95 μ l/oyuk serumsuz ortam ile değiştirilmiştir. Kuyucuklara kontroller ve test antikoru eklenmiştir. Plaka bir Essen Incucyte içine yerleştirilmiştir ve yaranın kapanması çizik yara protokolü kullanılarak analiz edilmiştir.

Sitokalazin D, 0.1 μ M'de bir analiz kontrolü olarak kullanılmıştır. Spesifik olmayan bir transglutaminaz inhibitörü olan küçük bir molekül olan R281, 100 μ M'de test edilmiştir. Z DON, tersinir olmayan bir transglutaminaz inhibitörü olan bir peptit, 10 μ M ve 100 μ M'de test edilmiştir. Ticari olarak temin edilebilen TG2 antikoru Cub7402 (ABcam kategori #ab2386) 5 μ g/ml'de test edilmiştir. Buluşa ait antikolar, belirtildiği gibi çeşitli konsantrasyonlarda en az üç kez test edilmiştir. Tüm deneylerde kontrol olarak, doza bağlı bir etki göstermek için 0.1 μ M'de Sitokalazin D ve iki konsantrasyonda ZDON kullanılmıştır.

Çizik analizinin örnek sonuçları, Şekil 41 ila 44 arasındakilerde gösterilmektedir. Şekil 41'de görülebileceği gibi, Sitokalazin D, R281 ve ZDON'un tümünün yara kapanmasını inhibe ettiği (ZDON'un doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir) ancak Cub7402 antikorusunun yara kapanmasını inhibe etmediği gösterilmiştir. İnsanlaştırılmış BB7, İnsanlaştırılmış AB1 ve Kimerik DC1'in tümü yaranın kapanmasını inhibe etmiştir.

Kimerik ve insanlaştırılmış anti TG2 Abs'in benzeşimleri

Buluşun insan TG2 ve siyano TG2'ye karşı kimerik ve insanlaştırılmış Abs paneli için bağlanma benzeşimleri (Kds ve off oranları) Biacore teknikleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Protokoller ve sonuçlar aşağıda tarif edilmiştir ve Şekiller 45 ila 47 arasındakilerde gösterilmektedir.

Biacore metotları

Rekombinant insan TG2, Zedira GmbH'den elde edilmiştir (kategori no.: T002). Rekombinant sinomolgus maymun TG2, Trenzyme'den elde edilmiştir. Yüzey plazmon rezonansı (SPR) bir Biacore T200 cihazında (GE Healthcare) ölçülmüştür. CM5 çipleri (GE Healthcare kategori no.: BR-1006-68), üreticinin talimatları doğrultusunda, monoklonal fare anti insan IgG1 (Fc) (MAH) antikoru (GE

Healthcare kategori no .: BR-1008-39) ile kaplanmıştır. HBS-EP+ tamponu (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, % 0.05 hacim / hacim Yüzey aktif madde P20) ve HBS-P+ tamponu (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, % 0.05 Yüzey aktif madde P20) 10x stoklar halinde (kat. no: BR-1006-69 ve BR-1006-71) GE Healthcare'den satın alınmıştır. Kalsiyum Klorür çözeltisi Sigma Aldrich'ten (kategori no. 211115) elde edilmiştir.

Anti TG2 antikorlarının benzeşimini belirlemek için kullanılan metot, kimerik ya da insanlaştırılmış antikorların bir MAH kaplı CM5 çipinin yakalanmasını ve ardından bir dizi TG2 numunesinin çalışma tamponuna enjekte edilmesini içerir. Çalışan tampon, kalsiyumsuz deneyler için 1 mM CaCl_2 ya da 1 x HBS-EP+ içeren 1x HBS-P+ idi. Antikor yakalama, yaklaşık 40 ila 80 arasında RU yakalanması ile sonuçlanan 10 μl /dakika akış hızında 120 saniyelik bir temas süresi boyunca gerçekleştirilmiştir. TG2, immobilize edilmiş antikor üzerine, 25 nM ila 400 nM arasında değişen konsantrasyonlarda, 30 μl / dakikalık bir akış hızında 600 saniyeye kadar bir temas süresi ile enjekte edilmiştir. TG2'nin ayrışması tipik olarak 5400 saniyeye kadar (1.5 saat) ölçülmüştür. Daha sonra çipin yenilenmesi, 30 μl / ml akış hızında 60 saniyelik bir temas süresi boyunca 3 M MgCl_2 kullanılarak, ardından bir sonraki numuneden önce 300 saniyelik bir stabilizasyon süresi ile yapılmıştır. İnsan ve sinomolgus maymun TG2'nin her biri için, en az iki ayrı deneyde, çeşitli konsantrasyonlarda en az 5 enjeksiyon yapılmıştır.

Kinetik veriler Biacore T200 Değerlendirme Yazılımından dışa aktarılmıştır ve birleşme fazları ve ayrışma fazlarının sırası ile bir fazlı birleştirme modeli ve bir fazlı üstel bozunma modeli kullanılarak ayrı ayrı analiz edildiği GraphPad Prism kullanılarak analiz edilmiştir. Birleşme oranları (k_{on}) her eğri için ayrı ayrı hesaplanmıştır ve toplanan uzun ayrılma faz verilerinden ayrılma oranları (k_{off}) değerleri hesaplanmıştır. k_{off} değerlerinin $<1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplandığı yerlerde, analiz için bu değerler daha yavaş tahmin edilemediğinden, değerler 1×10^{-5} olarak belirlenmiştir. k_{on} ve k_{off} değerleri, aşağıdaki tablolarda, her bir TG2 türü için her antikor için ayrı ayrı hesaplanan değerlerin ortalaması olarak birden fazla konsantrasyonda ± 1 standart sapma olarak sunulmuştur. k_D değerleri ortalama k_{off} / ortalama k_{on} olarak hesaplanır.

Biacore deneylerinin sonuçları

Tablo 25:

Antikor		İnsan TG2				
		$k_{off} (s^{-1})$	St. Sapma	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	St. Sapma	$K_D (M)$
cAB003	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	1.7×10^5	3.2×10^4	$< 6 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	8.6×10^4	2.1×10^4	$< 1 \times 10^{-10}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	2.1×10^5	6.9×10^4	$< 5 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	1.5×10^5	1.8×10^4	$< 7 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		2.4×10^{-5}	1.0×10^{-5}	2.0×10^5	1.4×10^5	1.2×10^{-10}
HAB005 (hAB001AJ)		$< 10^{-5}$	-	1.9×10^5	6.8×10^4	$< 5 \times 10^{-11}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	2.7×10^5	1.1×10^5	$< 4 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$< 10^{-5}$	-	2.4×10^5	1.2×10^5	$< 4 \times 10^{-11}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	3.2×10^5	5.7×10^4	$< 3 \times 10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	1.8×10^{-5}	4.9×10^{-6}	2.8×10^4	1.3×10^4	6.4×10^{-10}
	- Ca^{2+}	4.9×10^{-4}	1.6×10^{-5}	2.1×10^4	1.2×10^4	2.3×10^{-8}
CDD9001	+ Ca^{2+}	1.3×10^{-5}	1.8×10^{-6}	3.0×10^4	2.3×10^4	4.3×10^{-10}
	- Ca^{2+}	7.1×10^{-5}	1.6×10^{-5}	2.3×10^4	7.6×10^3	3.1×10^{-9}

Tablo 25, insan TG2'sine karşı elde edilen kinetik verileri göstermektedir. k_{off} değerlerinin $< 1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 'den daha düşük olarak hesaplandığı yerlerde, analiz için bu değerler daha yavaş belirlenemediğinden, değerler 1×10^{-5} olarak ayarlanmıştır.

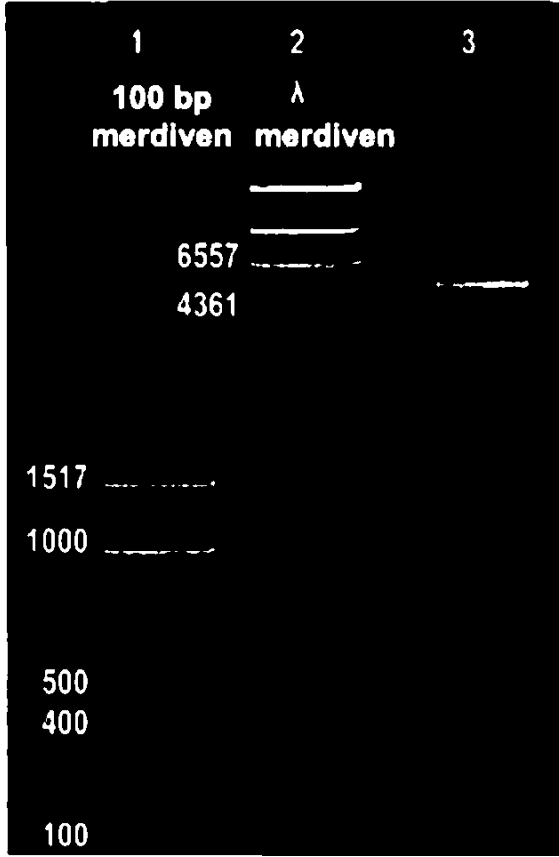
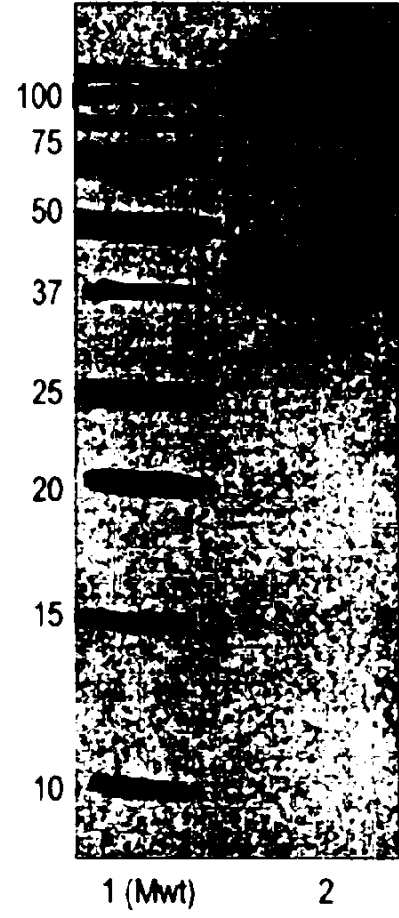
Tablo 26:

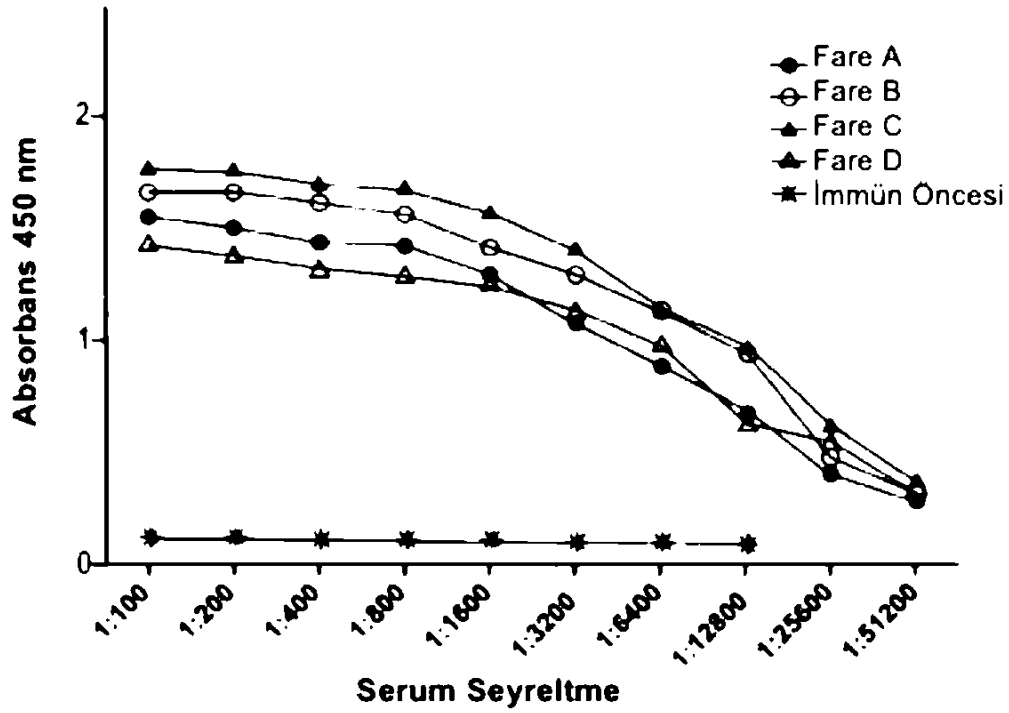
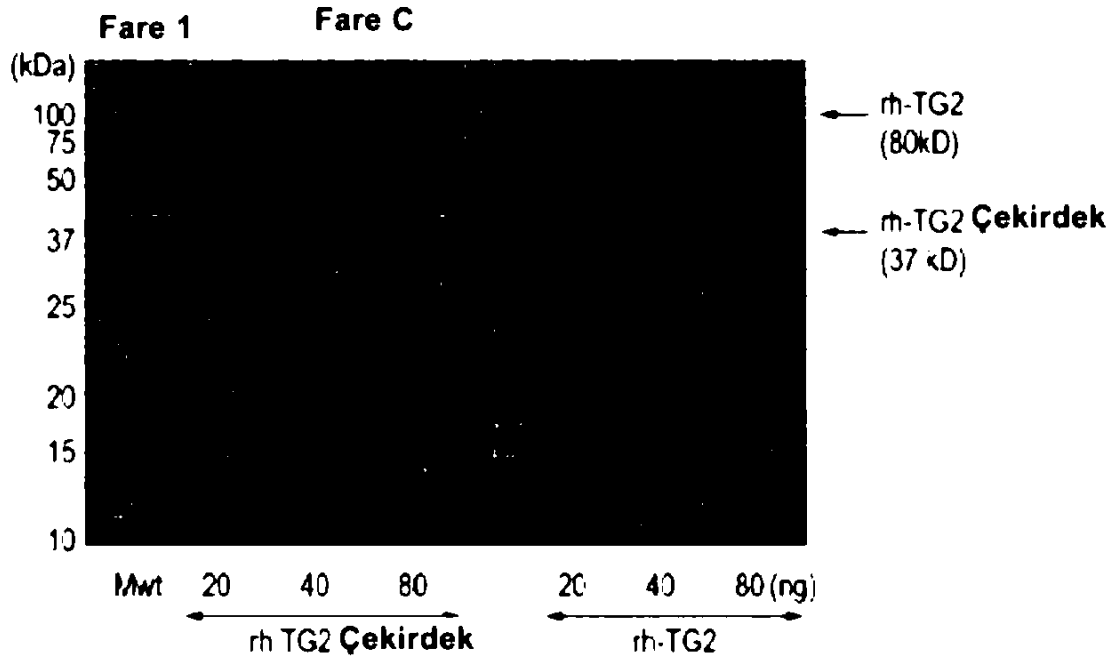
Antikor		Sinomolgus TG2				
		$k_{off} (s^{-1})$	St. Sapma	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	St. Sapma	$K_D (M)$
cAB003	+ Ca^{2+}	1.2×10^{-5}	8.6×10^{-6}	2.4×10^5	1.1×10^5	$< 5.0 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	1.3×10^{-5}	1.5×10^{-5}	1.4×10^5	1.9×10^4	$< 9.3 \times 10^{-10}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	2.9×10^5	9.0×10^4	$< 3 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	1.9×10^5	2.1×10^4	$< 5 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		1.8×10^{-5}	2.3×10^{-6}	1.6×10^5	7.3×10^4	1.1×10^{-11}
HAB005 (hAB001AJ)		3.4×10^{-5}	4.6×10^{-6}	1.4×10^5	4.1×10^4	2.4×10^{-10}
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	3.0×10^5	1.4×10^5	$< 3 \times 10^{-11}$
hBB001BB		3.7×10^{-5}	3.4×10^{-6}	2.7×10^5	1.3×10^5	1.4×10^{-10}

cDC001		$< 10^{-5}$	-	4.2×10^5	3.3×10^4	2.4×10^{-11}
cDH001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	1.5×10^4	9.5×10^3	$< 7 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	6.3×10^{-4}	1.2×10^{-5}	2.6×10^4	1.0×10^4	2.4×10^{-9}
CDD9001	+ Ca^{2+}	1.6×10^{-5}	1.4×10^{-5}	3.1×10^4	1.6×10^4	5.2×10^{-10}
	- Ca^{2+}	4.1×10^{-5}	1.6×10^{-5}	4.6×10^4	1.3×10^4	8.9×10^{-10}

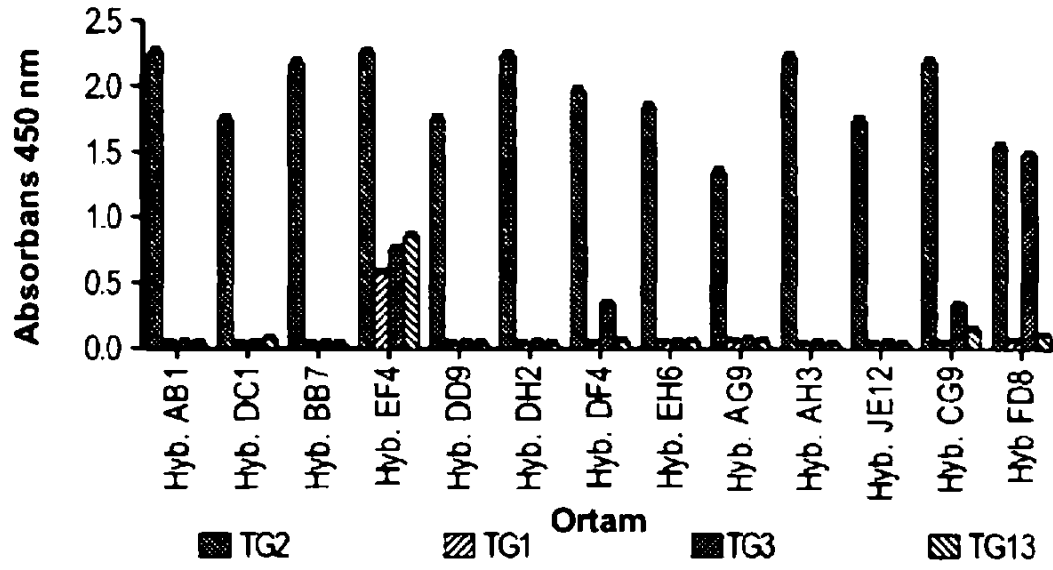
Tablo 26, sinomolgus TG2'sine karşı elde edilen kinetik verileri göstermektedir. k_{off} değerlerinin $< 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 'den daha düşük olarak hesaplandığı yerlerde, analiz için bu değerler daha yavaş belirlenemediğinden, değerler 1×10^{-5} olarak ayarlanmıştır.

- 5 Şekiller 45 ila 47 arasındakiler, örnek Biacore veri kümelerini sağlar. Görülebileceği gibi, insanlaştırılmış ve kimerik antikorlar cAB003, cBB001, hAB004, hAB005, hBB001AA, hBB001BB, TG2 için cDC001, insan ve sinomolgus TG2 için 120 pM ya da daha iyi K_d değerleri ile mükemmel yakınlığa sahiptir. Kimerik antikorlar cDH001 ve CDD9001, insan ve sinomolgus TG2 ile daha düşük birleşme oranları ve daha
- 10 zayıf genel benzeşim sergiler. Kalsiyum yokluğunda bir antikor seçiminin incelenmesi, cDH001 ve CDD9001 hariç, bağlanmanın daha hızlı ayrışma oranlarından (k_{off}) dolayı daha zayıf olduğu durumlarda etkisinin çok az ya da hiç olmadığını gösterir.

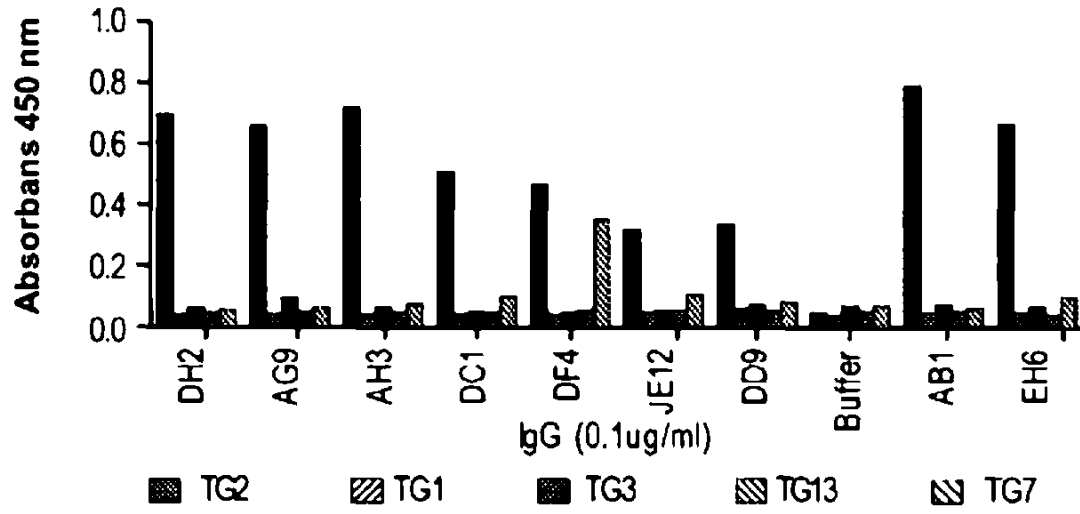
A: PCR ürünü**B: Rekombinant protein****Şekil 1**

A: SERUM ELISA**B: SERUM WESTERN BLOT****Şekil 2**

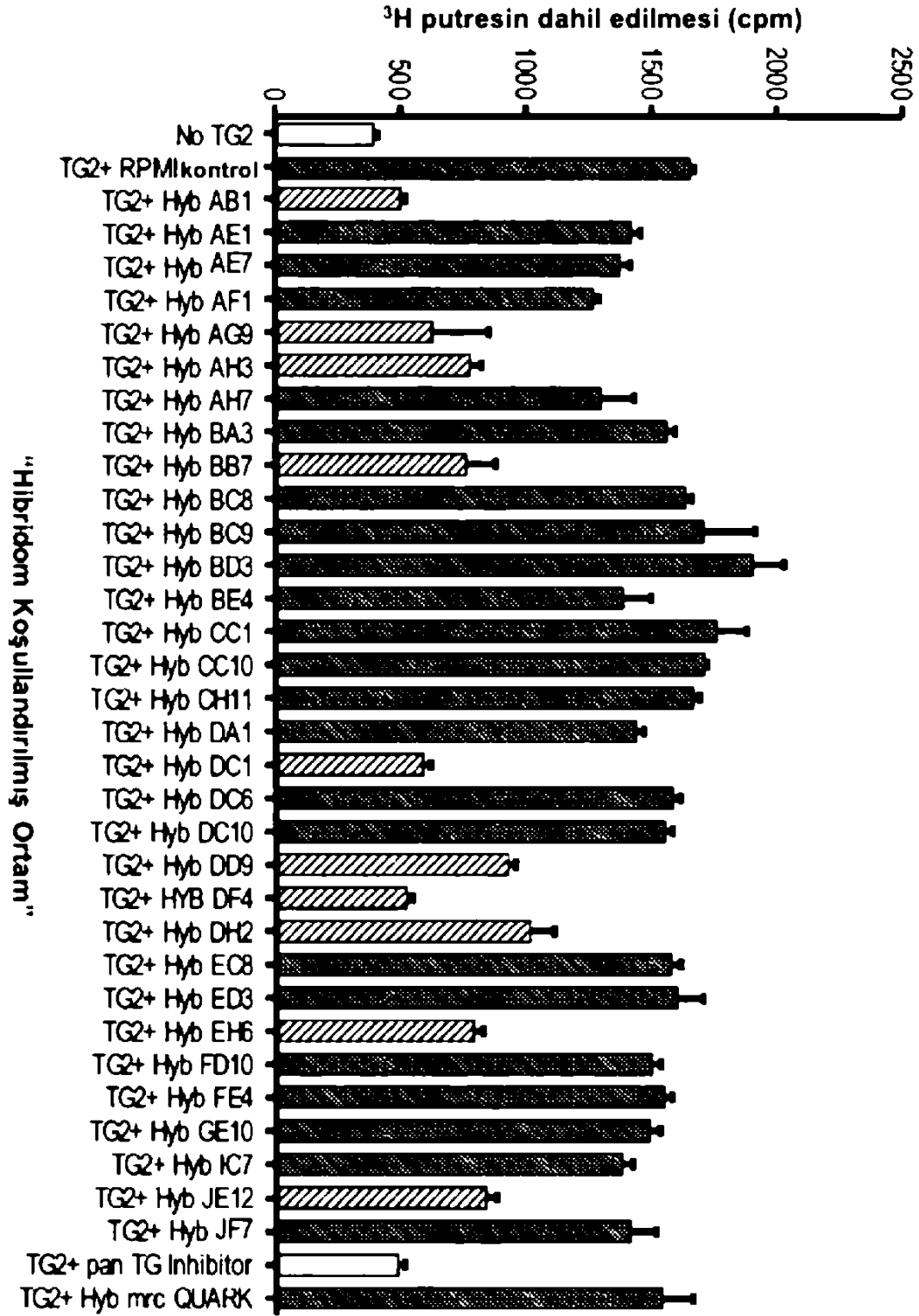
A: Koşullandırılmış ortamın ilk izlenmesi



B: Saflaştırılmış mAB'lerin klonal reaktivitesi



ŞEKİL 3



ŞEKİL 4

Grup 1: Konum - Aktif bölgenin ön tarafı – substrat bağlama cebi

AB-1, AG-1, AH-1, BB-7, DC-1, EH-6, JE-12
 Fare TG2 YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEM-
 Sıçan YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFYGELESNKSEMT
 İnsan YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDKSEM-
 *****:***:*****

Grup 2: Konum - Aktif bölgenin arka tarafındaki çekirdeğin arkası

DF-4 SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQATDPTPQEKSEGTGCCGFS
 Fare TG2 SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQATDPTPQEKSEGTGCCGFS
 Sıçan SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQATDPTPQEKSEGTGCCGFS
 İnsan SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQATDPTPQEKSEUTYCCGFP
 *****:*****.

Grup 3: Konum – Çekirdeğin kalsiyum bağlama bölgesinin kuşatan beta varil-1 ile kesiştiği yerin arka tarafı

DD 9 and DH-2 TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
 Fare TG2 TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
 Sıçan TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
 İnsan TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
 *****:*****:*****.

ŞEKİL 5



ŞEKİL 6

Antikor AB-1**AB1 VH**

GAAGTACAGCTGGAAGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGGTCCCTGAAA
 CTCTCCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCTCTGCCATCTCTTGGGTTGSC
 CAGACTCUGGACAGTAGCCTGAGTGGTTCGGCAATCAITAGTCTTGGTGGTSETAAA
 ACGCACTATCCANATAGTGTGAGGCTTGGTTCACTATCTCCAGAGATAATGCGAAG
 AACAAGCTCTATCTGCAATTAAGCACTTGAAGCTGAGGAGACCTGGATCTATTAC
 TGTGCAAAACTAATCAGTCTCTACTGGGGCAAGGCACCACTCTCAGAGTCTCTCA

AB1 VH

EVQLLEHSGGGLVFPGGSLKLSCAAEFTLSSSAMFWVRQTPDRBLEWVATISVGSF
 THYFDGVKGRFTISPDAAKNTLYLMMNLEKELTAMYYCAKLISLYWGQGTLETVDS

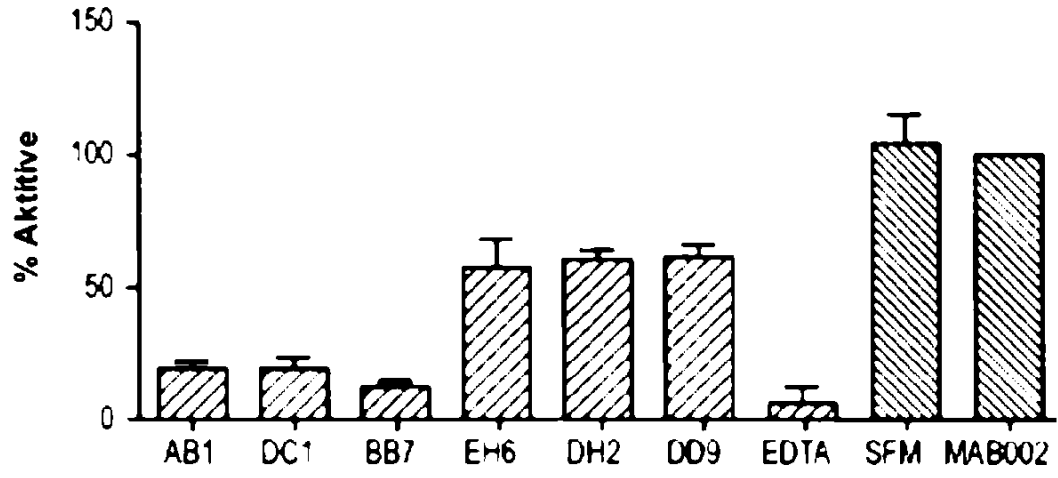
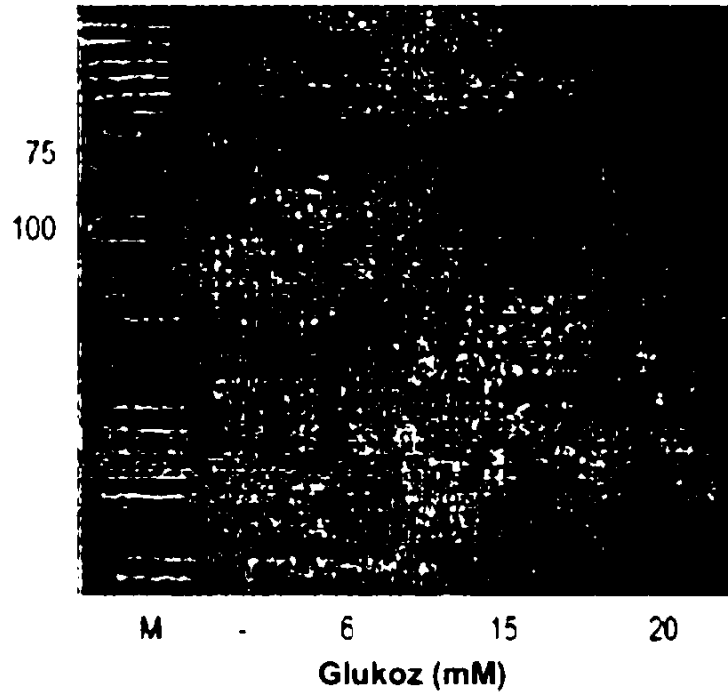
AB1 VK

QAAATGAGATGAGACAGAACTCCATCTTCCTATCTATCCATCTCTATGAGACAGAACT
 ACTATCACTTCCAAAGGAGAGTCAGGACATTAAIAGCTATTTAACCTGCTTCCAGCAG
 AAAGCAAGGAAATGCTCTAAGCAAGCTGATCTA.CCTACAAATAGATCTCTTCATGCG
 GTCCCATCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTTTCTACCATCAGC
 AGCCTGCAATATGAGCATATGCGAATTTATTATTTCTCTACAGTATGATGACTTTCTG
 TACATCTTCGAGGCTGGAGCCAAACTGCAAAATPAAA

AB1 VK

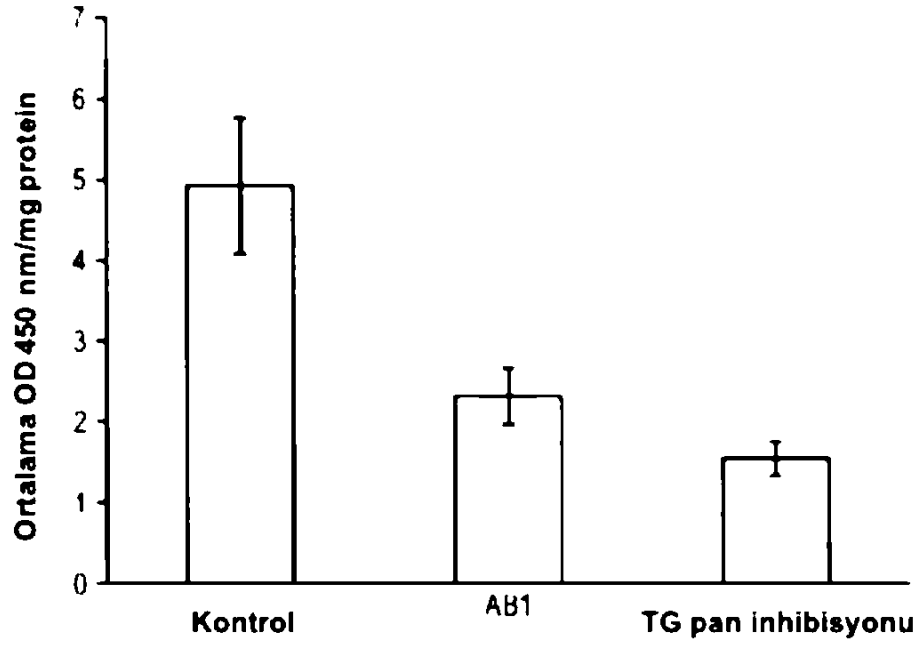
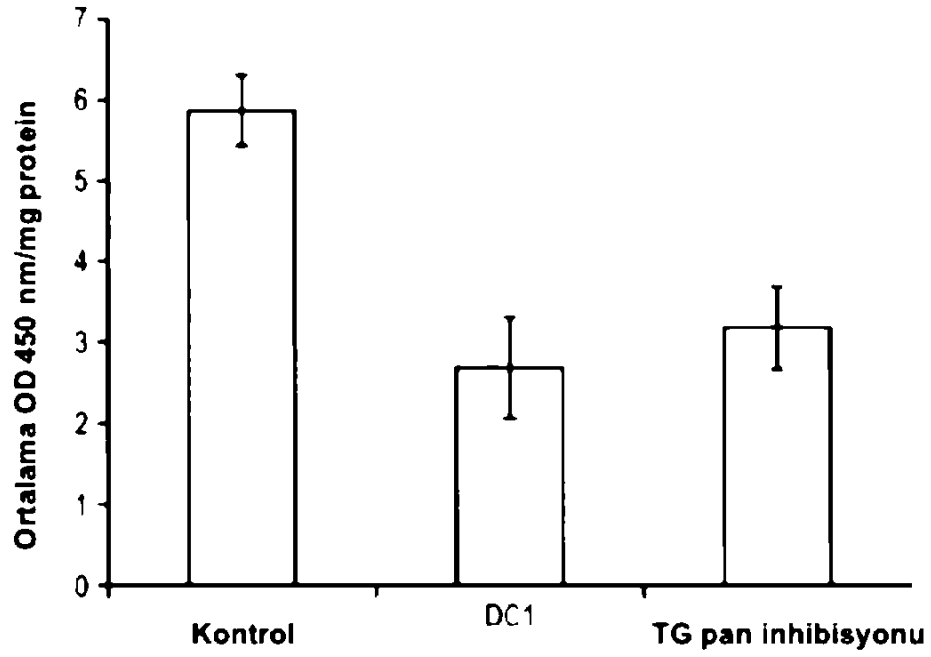
DIQMTQTFPSSMYASLGEEVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
 VPSRFSGSGSGQDFFLTISLSLEYEDMGIIYYCLQYDIFPPTFGGGTKLEIK

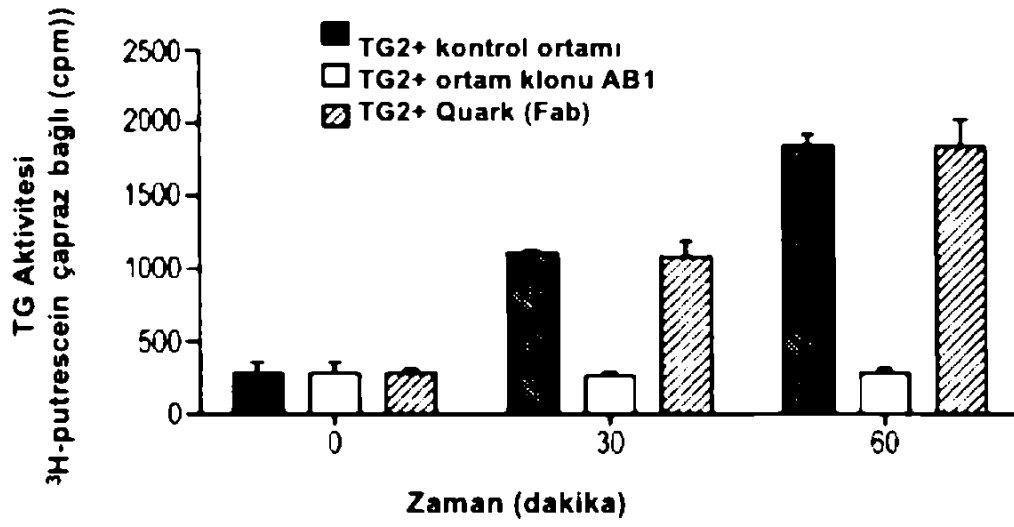
ŞEKİL 7

A: TG İnhibisyonu**B: Western blot****ŞEKİL 8**

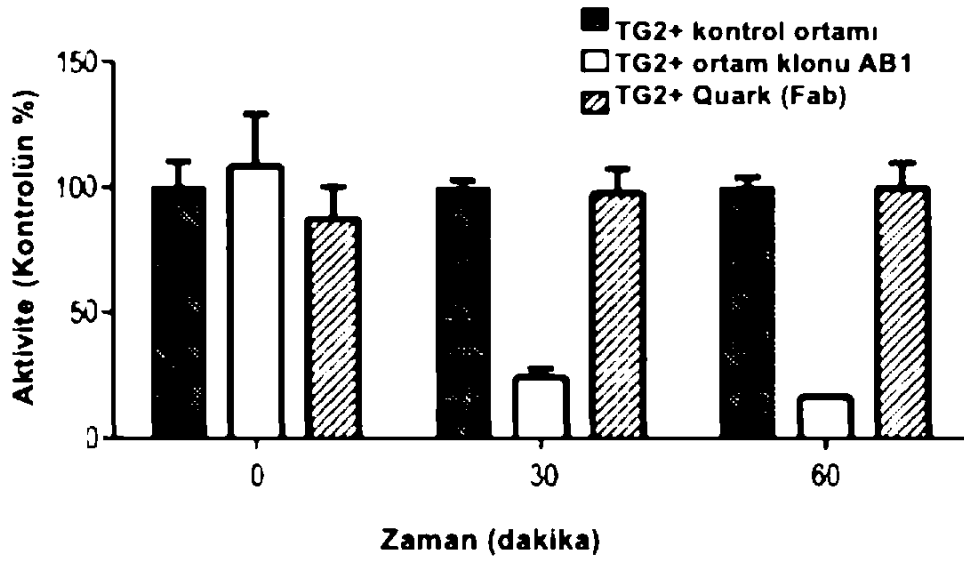
	IC50 hTG2 (ng TG2 başına IgG mg/ml)	IC50 rTG2 (ng TG2 başına IgG mg/ml)	IC50 mTG2 (ng TG2 başına IgG mg/ml)	Oran İnsan/siçan	En iyi insan inhibitörüne hTG2 IC50 oranı	En iyi insan inhibitörüne rTG2 IC50 oranı
AB1	1.09×10^{-5}	NI	NI	-	1	-
DC1	1.23×10^{-5}	NI	NI	-	1.1	-
BB7	1.59×10^{-5}	3.2×10^{-4}	NI	20	1.47	29.4
AG9	4.87×10^{-5}	NI	NI	-	4.47	-
DD9	5.24×10^{-5}	3.03×10^{-4}	NI	6	4.87	29.22
DH2	6.7×10^{-5}	2.23×10^{-4}	NI	-	6.2	38.13
EH6	6.9×10^{-5}	4.03×10^{-4}	NI	5.8	6.33	36.714
AH3	7.8×10^{-5}	NI	NI	-	7.1	-
JE12	12.3×10^{-6}	NI	NI	-	11.3	-

ŞEKİL 9

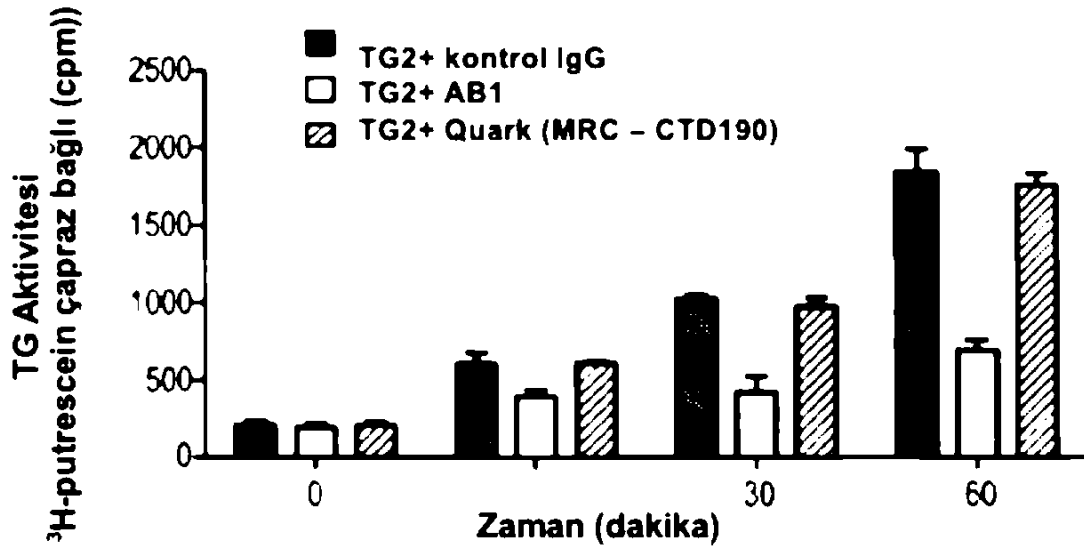
A: Antikor AB1 ile inhibisyon**B: Antikor DC1 ile inhibisyon****ŞEKİL 10**



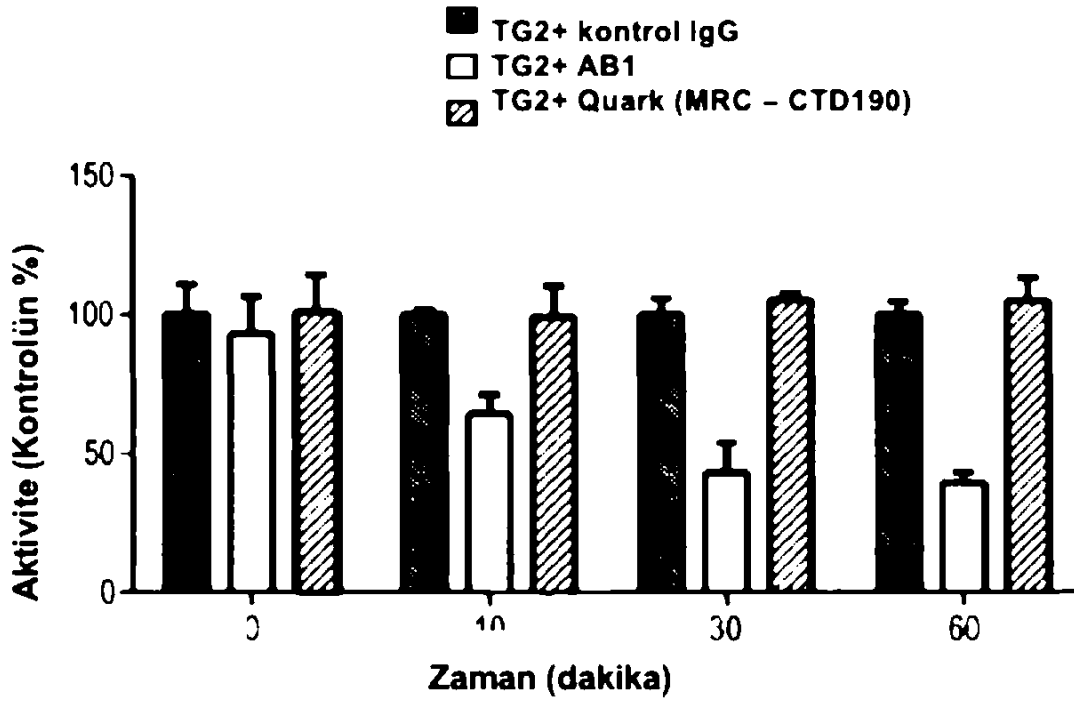
ŞEKİL 11



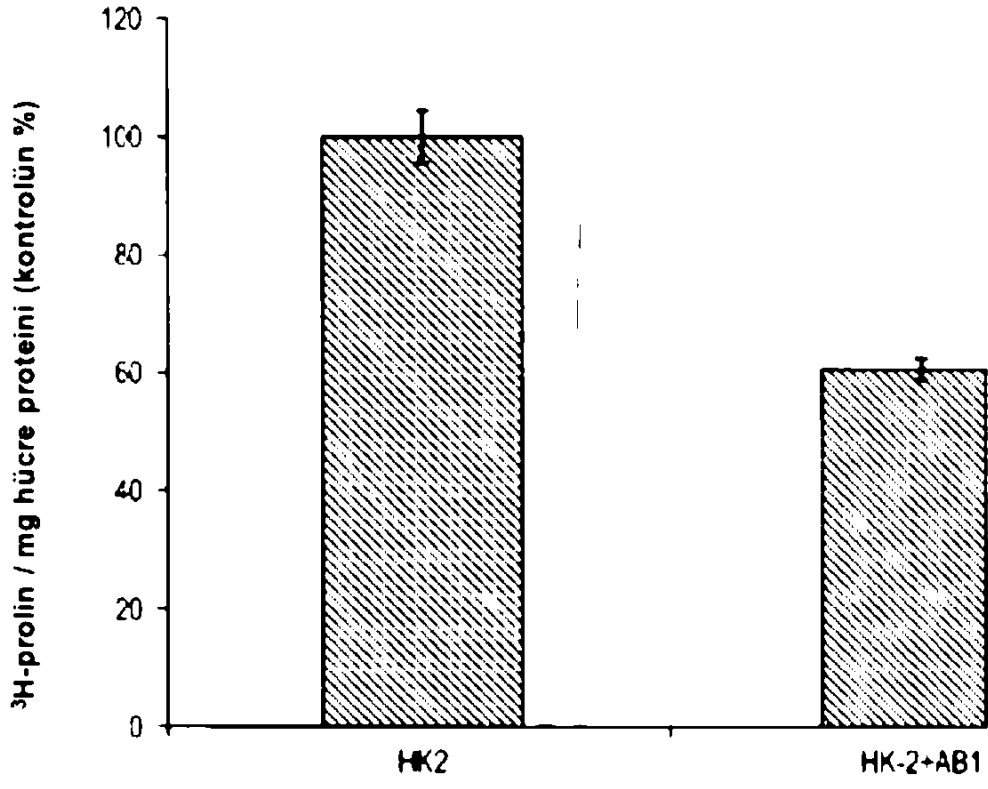
ŞEKİL 12



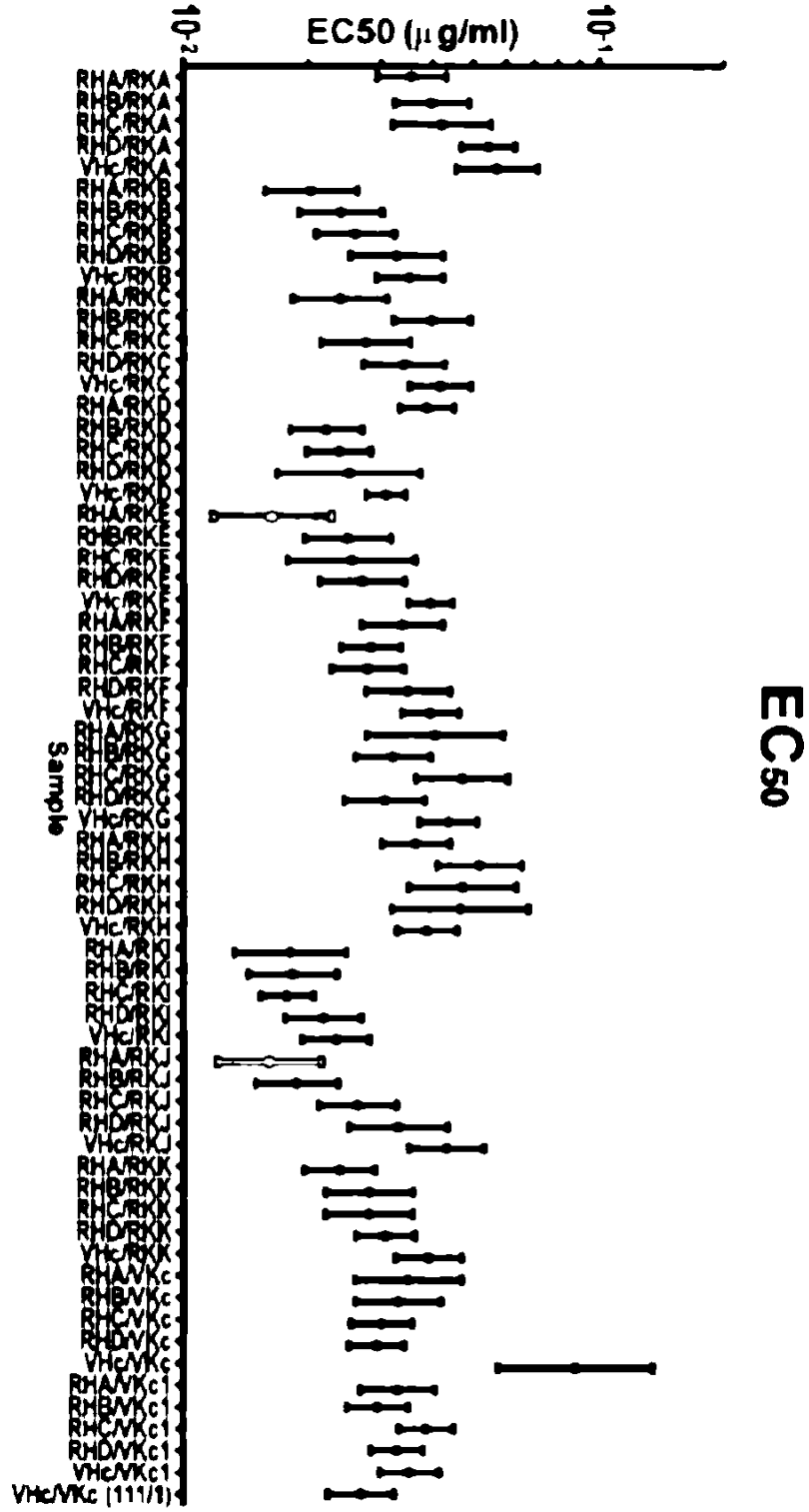
ŞEKİL 13



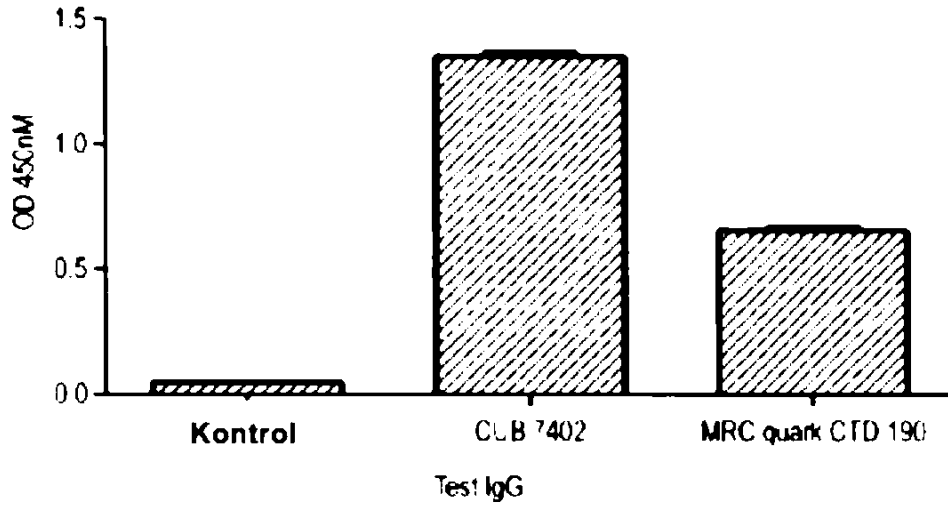
ŞEKİL 14



ŞEKİL 15



ŞEKİL 16



ŞEKİL 17

Antikor AB-1**AB1_VH**

GAAGTCTAGCTTCTTGGAGCTTGGGCTGGCTTAATGGAACCTGGAGGCTGGCTTAAAGTCTT
 CTGTGGAGCTTCTGCAATTCATCTGCATCTGGCTGGCATATCTTGGCTTGGCAGACTCTTGG
 ATACGAGGCTTGGAGTGGTGGTAACTATTAGCTTTGGTCTATGGTAAAACTACTATTCAGAT
 AGTGTGAAAGGCTGGCTTCAAGCATCTTCAGAGAGCAATGCTAAGAACTAAGCTGTATCTTGA
 GAATAGCTTGGAGGCTCTTATGAAATGGCTATGTATTAATCTGAAAAATAATTAAGCTGTAT
 CTGGTGAAGGCAACACTCTTACATCTCTCTCA

AB1_VH

TTTGTGCTGGCTTGGAGCTTGGGCTGGCTTAATGGAACCTGGAGGCTGGCTTAAAGTCTT
 SVKQRTTCTGTAACTCTTCTGAGTCTTGGCTGGCATATCTTGGCTTGGCAGACTCTTGG

AB1_VK

CAATTAAGCATGAGTCACTCTTCACTCTTCACTATCAATCTTCAAGAGAGAGATCACTA
 CAATTCAGAAAGCTGAGTTAAGCATTTAATAAGCATTTAAGCTGCTTCTAGCTAGAACTAGGGA
 AATCTCTTACAGAGCTTATCTATCTTACAAATACATTTGTTGATGGGTGGCATGGAGGTT
 ACTGAGCACTGCATCTGGCAAGATCTTTCTCTCAGCATCAGCAGCTCTCAATATGAAATAT
 GGAATCTATTATGCTTACAGATATGATGATTTCTCTACAGCTTCTGAGCTGAGAGCAAA
 TCAAAATAAAA

AB1_VK

CTKMPCTCTCTTACAGCTTCTTCAAGAGAGAGATCTTCAAGAGAGAGATCTTCAAGAGAG
 CTGAGCTTCT

ŞEKİL 18

Antikor BB-7**BB7_VH**

GCAGTGGAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGGCTGGAAGGCTGCTTGAAAATGCTG
 CTCTGAAAGCTCTGGAATLATTCTTCACTCTCTCTGCAATGCTCTGCTGCTTGGCAAGATGCTG
 AAAAGAGAGCTTGAGTGGGTCGGAATATTATTAGTGGTGGTGGTTGACCTAATTATCTAGAG
 AGCTTGAAAGGCTGCACTGAGCTCTCTGAGAGAGAGCTGGTAAGAGAGATTAATAGCTTGAAAAT
 GGAGAGCTCTGAGGCTCTGAGGAGAGAGGCAATTATTACTCTGGAAAAATTAATCAGTCTCTATT
 GGGGCTAAGGTAAGCACTCTCAGAGCTCTCTCTGA

BB7_VH

ANQDUESGGGGLVPRGGRLKLSQAVGGTIFSSSAMSFWPCTPEKPLFWVATIESGGRSTYYPR
 SVKGEFTLSRSKAKNTLYLQMLSLRSEDTALYICAKLISPTWGQGITLDTVSS

BB7_VK

GGCATTAAGATGAGCCAGTCTCCATCTCTCATATATGCACTCTCTACGAGAGAGAGCTCATCAT
 CACTTGGAGGGGAGCTTAGGAGATAAATACTTATTATACTGGTTCTAACAAGAGCCAGGAA
 AGCTCTGCTAAGAGCTCTCATCTATTCTAGAAATAGATTGATGGATCCCTCTCTATCAAGCTCTC
 AGTGGGAGTGGATCTGGGCAAGCAATCTTCACTCAGCAATAGGGGCTTGGAAATGCAAGATAT
 GGGCACTTATTATTGTCTCCAGTATCTTGAGTTTCTCTACAGCTTGGGAGGGGGAATAACTC
 CTGAAATAAAA

BB7_VK

ALFMTQSISSMYASLGGRVLIITCPASQDINSYLTWSPQKPKKSPKILIIYLTRLMDEVFEPRF
 GUGRGGQFLLTISLLEHEDMSIYYCLLYTQSIYKNGSTALEIK

ŞEKİL 19

Antikor DC-1**DC1_VH**

GAAGTGCAGTACCTGGAGTCTTGGGGAAGCTTAGTGAAACCTGGAGGCTACCTGAAATCTCTC
 CTCTGGAGGCTCTTGGATTACTCTCAGTATCCATGCAATGCTTGGGTTGGTCAGATCCGCG
 ACAAAGAGCTGCAATGGGCTGAAATATTAATAGTGGTGGTTCAGCTAGTATTAAGAG
 AGTCTGAAGGGTTGATTCATATCTCGAGAGACAATGCTAAGAGCACTCTATATCTTGAATC
 GAACATTTCCAGGCTTAAGGATAGGGGCTGATTTCTCTGAAGATTAATTAATATCTATCT
 GGGGCGAAGGCACTACTCTCAGAGCTCTCTCA

DC1_VH

EVDNESGGGLVFPGGGLFLGGAAGGFTLETHAMSNVPCTTEKKELEWVATTCGGGCTYYSD
 STKGFFTISRQNTNTLYLQESIRSEPTAVYFCAPLSTHWGIGTITVSE

DC1_VK

GAATATACGATGATCCAGCTCTCAGCTCTGATATATGCAATCTCTGGGAGAGAGATTACTAT
 TACTTTCGAAGGTCAGTTAGGATATTAATAGTTATTTAACTTGGCTCTAGTATAGAACTAGGGA
 AATCTCTAAGATCTTATCTATCTTTGTAATAGATTGCTAGATGGGCTCTCATTAAGTTTC
 AGTGGCACTGGCATCTGGGCAACATTATGCTCTCAGCATCAGCATCTCTGGAATATGAAATAT
 GGAATTTCATTATCTCTAAGATATGAAGATTTCTCTACAGCTTCTGAGGAGGATTAAGAT
 TGGAGATAAAA

DC1_VK

DTNMTQSPSSLYASLGSRVCTTCHASQDINSFELTWFOCKPKSKILLIYLVNRLVDSVESRI
 GQWLRQYALCLSSVEYDMGIYYCIQYDEPYTVGGSTCLRK

ŞEKİL 20

Antikor JE-12**JE12_VH**

NAGCTGAAAGTTGGAAGCAATCTGAACTTGAAGCTGGTAAAGCTTTGGGCTTTCAATGAAATATGCTG
 TTCTAAATGCTTTGATATAGAACTGCACTAGTTATTTATGTAATGGCTGAAAACAGAAAGTCTG
 TGGACGCTTTCTTAACTGTAATCTGAATATATTAATGCTTTGAAATGCACTGTTCTTAACTATGATGAG
 AAGTTCAAAAGGGAAGGGGAGAGCTGATTTGAGACAAATGCTTCCAGGACAGGCTATATGGAGCT
 TAGGAGGCTGAGCTTTGAGGAGCTTTGGGCTGTATTATGTTGCAAGGACTATGTATGAGTATT
 AGGAGCAAGGAAAGCAATCTTCAAGATTCTCTCA

JE12_VH

EVQLQGGFRIVKPGASVKMSCKASGYRFTAYVHWYKFKSGDGLWIGYINPNDRAKYNF
 KFKGKATLTSLKSSSTAYMELSSLTSEECSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTSS

JE12_VK

CATTTTTCATGATGAAAATGACGCTGCTGCTGCTTTCAATTTGGAGATGAAGCTTCAT
 CTCTTCAATATTTATTAAGATTCAACATTAAGCAAAATGCTTACAACTGCTACAT
 TGGAGAAAACAGGCTAGTCTGCAAACTTCTGATGTACAAAGTTTCCAGCGATTCTCTGG
 GTCCCAGACAGTTTAACTGGTAGTGGATCAAGGACALATTCACTCTAGCATAGGALAGT
 GGAGGCTCAAGATCTGAGAAATTATATCTCTTTCAAGTTTCAGATGCTCTCTCACTTTG
 GAGGGGGAGCGAAGCTGGAATAAAA

JE12_VK

QVLTQINFLSIPEVLSLQASISRRSSQTEHINQNTYLEWYLDKPGQSPKFLYKVENFESG
 VPIRPSGSSGGTDITLPISEVEAEILGIYYCFQGSHPPTFGKTKLEIK

ŞEKİL 21

Antikor EH-6**EH6_VH**

GAGTTCTAGCTTCAAGCACTCTGCACTCAAGCTGTAAGGCTTGGGCTTCACTGAAGGATCTC
 CTGAAAGGCTTCTGGATACACATTCACCTAGTTATCTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAAGCTG
 TGGAGGGCTCTTACTGGATTGGATTATTAATCTTACCAATGATCTTACTAAGTACAATGAG
 AAGTTCAAAAGGAAAGGCCACACTGACCTCAGACAAAAGCTTGGGACACAGGCTACATGGAAGT
 CAGAGGCTGAGCTCTGAGGACTCTGGGGCTATTACTGTCGAAGATTCTCTCTGGGTACT
 GGGGCAAGGCAAGCACTCTCAGCACTCTCTCA

EH6_VH

EVLGGSGFELVXPGASVKMSCHASGYTHFSVYVHWYKLFPGGLENI GFINPYNDGTFYNE
 KFKGKATLTSEKASTTAYMELSSLTSEL SAVYYLAKFSSGYWQQETLLVSS

EH6_VK

GATGTCTGGATGATCGAAAGCTCCACTCTCCCTGGCTGTGCAAGCTTGGAGATTAAAGCTCTAT
 CTCTTGGAGATCTAGTCAGAGTATTGTACATAGTAATGGAAAACCTATTTAGCAATGGTACC
 TCGACAAAGCAAGGCAAGTCTTCAAAAGCTCTTCACTATACAAAGTTTCAATCGATTTCTGGG
 CTCCAGAGAGGTTTCACTGGCACTGGATCAGCGAAGCAATTTCACCACTCAAGATCAGCAGAT
 GAGGCTTGAAGCACTGGGAGTTTATTACTGCTTCAAGTTCACATCTCTCTTCAAGCTTGG
 CCTCTGGGATAAAGTTTGAAATAAAA

EH6_VK

LVLMCTPTPLDLPVGLGLQANISLRSSQCTVHNNANTYLEHTLYLKFGQLPKLLYKVNFFSG
 VPLFFDSGSCCTDFTLEISPVGAELLVVYYCLOVSHVPPTPLGGTLELEK

ŞEKİL 22

Antikor AG-9**AG9_VH**

SAGSTCTAGCTTGGACCACTGTGGACCTGASTTGGTAAAGGCTGGGCTTCAGTGAAGATCTC
 TTGAGAGGTTTGGATATAATTCACTAATATATTATTCACTGGTTGAAAGAGAGCTT
 GGTAGGCTTTGAGTGGATTGGATATATTAAATGCTTACCAATGATGCTTTAGGGACCAATGAG
 AAGTTGAAAAGGAAAGGACACTGAGTTCAGACAAATGCTCCAGCAGACATGATATGGAAGT
 CAGCAGGCTGAGCTTTGAGGACTCTGGGTCTACTACTGTGCAAGACTTCTTAGTGAAGTACT
 GGGGCAAGGCAAGCTTTACACTTTCTCA

AG9_VH

EVLDQSGPELVKEFASVVMBCRASGYTFTTYVTHWVKLFPGQGLEWIGYINPYNDQASVNE
 KFFKATDTSLFSSPTATYMESSLTSELNAVYHAKLSSLYWQQTTEVSS

AG9_VK

GATTTTTCAGTACCTGAAAATCAGTCTTGGTGGCTTTGATTTTGGGAGTCAAGCTTCAT
 CTCTTGAGATTTAATGGGAGCATTCGAATATAGTAATGAAAAAGCTTATTTGGAATGGTACG
 TGCAGAAAGCAGGGCACTCTCAAAAGTTCTTATCTACAAAGTTTCCACCGATTCTCTGGG
 CTTCAGACAGCTTCAGTGGCACTGGATCAGGACATATTCACATTCAGCATCAGCACTGT
 TGAAGCTGAGGATCTGAGATTTATTATTCTTTTAAATTCAGATGTTCTTCAAGTTCTG
 CAGGGGCAAGCTTCGAATAAAA

AG9_VK

EVINTQNSISLVKQDASLIRDRCTPEHNGNTYLAWYLQKPSQPKFLIYKVNRFSSG
 VPEREFGGSGTSTLPISSVAREDLGVYYSQSHLPEPSGKTKLLEK

ŞEKİL 23

Antikor AH-3**AH3_VH**

AAATTCAGATGCAAGCAATCTGAGCTTCAAGCTTCTGAAAGCTGAGGCTTCAGCTGAAAGATCTC
 CTGCAAGGCTTTCTGATACAGCAATCTCACTAGCTATCTTATTCACTGCTTCAAGGCAAGAGCTTG
 GGTACGGGCTTTAGTCTGATGGCATATATTAACTGCTTACCAATCAATCTGCTAGGCTACAATGAG
 AATTTCAAGAGGCAAGGCTCAGACTGAACTTCAGACAAATCCCTGCACTCAGAGGCTTACATCGAAGCT
 CAGCAGGCTGAGCTCTCAGGAGCTCTGGGTCTATTATGTGTGCAAGAGCTATCTAGTGGACTACT
 GGGGCAAGGCAAGCAATCTTCAGAGCTTCTTCA

AH3_VH

FWCTQISGFEIVKESASVKMSOPASRYTFTTYVIRHWYQHPGGGIFWICYINFENDGAPFNS
 KFFCKALLSLKSSITAYMELSSLTEELSAVYYCARLSSDYAGGUTTLVSS

AH3_VK

CATGTTTTATGATGACAAAATCTACTCTCTCTGCTCTCTCTAGTCTTGGAGATCAGGCTCTCAT
 CTCTTGCAATATTAATCTGCAKXATCTCAACATACTAATGGGAAGAGCTTATTGGCAATGGTACCT
 TGTAGAAAATCAAGCTAATCTGCAAAATCTCTGATCTACAAAGCTTTCAACGGATTTCTCTGGT
 CTCTCAGALALCTTAACTGGCACTGALCAGGUALALATTTGALATTAAGGATCAGCAGTGT
 GCAAGCTCAGCATCTGGCAGCTTATTAATCTCTCTCAAGCTTCAATGTTCTCTCTCAAGCTCTG
 CATGGGGGATCAAGCTCTCAANTAAA

AH3_VK

DVLYTUNILSLPVVLGGQATLGRDREGLERDNGNTALEWYIQKESQDPKFMVYKVONFESS
 VHLREDSGLSDTETLHLSQWEAELEGVYVYFQGHLPSTAYGCTKLEIK

ŞEKİL 24

Antikor DH-2**DH2_VH**

TAAGTTACTGTTAAGAAATCTTGGGCTTGGATATTGTAAGGCTTCTTAAAGAGGTAAGTCTGAT
 TTGTTCTTCTCTTGGGTTTCAACTCAGCACTTCTGGCTATGGGTTTCAAGTCAATTCCTAAG
 CTTCAGGAAAPGCTTTGGAGTGCTGGACACATTTACTGGGATGATACAAAGTCTATATAT
 TCATCTCTAAGAGGCTGGTTATAAATCTTCAAGGATACCTCCAGGAAATGATGATTCTCAA
 GATCAAGCACTGTGGACATGGAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGTGGGAATACGG
 TCTGGTTTCTTATTTGSSGCAAGGJAATCTGCTAATCTCTTCTA

DH2_VH

DVTLMKSGPGILQPGQTLQLTGFESGFSLSSTGCMGVFWISQFSGYGLEWLAHIYWPDDRYN
 PSLKSPLLISKUTSEN_VFLKITSVLTAQTATYTCAPSCTTAPFAYWGDGLVTVSA

DH2_VK

TAAATGTCCTCACTCACTCTCCAGCAAGCATGCTTCATCTTAAAGGAGAGAACTTACCAT
 AAGCTGCAATCTCAAGCTCAATCTTAAGTTACATCTATCTGTAACAGCAGAACTCAGGATCT
 TCCGAGAGCTCTTGATTTATGATACATCTCAAGCTGGTTCTGGAGTCTCTGTTGGCTCCAGT
 GCGAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCTGGAATGGAAGGTGAAGATGCTGC
 CAATTTTCACTCCAGCACTGCACTAGTTCCCGGCTCACTTGGTCTTGGACCAAGCTGG
 AGCTGAAA

DH2_VK

QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSYMYWYQIKFGSSPELLIYDTSNLAGVPPVRS
 SSSTSTSYSLTISAMEAELAAFTYQWSSPFLTPGAGIKLELF

ŞEKİL 26

Antikor DD-6**DD6_VH**

TAGGTGAGGCTGCAACAGTCTTGGGCTTCAACTGCTGAAAGCTGGAGGCTTAACTGAAGATGTC
 TTGGAAAGCTTTCTGATACAGATTCACTGAATACAAAGATGGAACTGGGTCAATCAGAAAGCTTG
 GATACAGTCTTCACTGCAATTGCATATATTAAAGCTAAGAAATGCTTTATTATTATTAAGACAG
 AAGTTTAAAGGGCAAGGGTCACATGACATGCAATGCAAGGTCCTTCCAAACAGAGGCTACATGACAGT
 GGGTAGGCTGGAGATGGGAGGATGCTGGAGTGTATTACTGTGCAACAGGCTGTGAGCTTACTGGG
 GACAAAGGAGCTCTGCTCACTGTCTCTGCA

DD6_VH

EVLLQNSSENLVKEPRASVKNSSKASCYRFTDYIMHNWKQNLTKSLEWIGYINPKNTVITYNQ
 KFKGKATIEVNRSENTAYMEIFSLTSEPSAUYIACALTYWGGPLATVSA

DD6_VL

TAGGCTGCTGCAATCAGGAATCTGCACTAACACATGAGCACTGAAAGATGCAATATGAC
 TTGCTGGCTCAACTACTGGGGCTTTGGCAGCTAATAAGCTAGGGCAACTGGATGCAAGAAAAAC
 CAGATGATTTATTTACTGGCTTGATAGCTCTGATGCAAGCAAGGCACTGCAAGCTGCTTGCT
 AGATTCTGAGCTTGGCTGATAGCAAGCAATGCTGGCTGATGCAATGCAAGGCTCAGAGACTTA
 GGATGAGGGCAATATATTTCTGTGCTGTATGCTACAGCAACTAATTGGGTGTTGGGTGGAGGAA
 CGAAATGCACTTCTGTAGGG

DD6_VL

DAVVTQESALTTSPGETVILTCRSSSTGAVHANNYANWIGKPFHLEFGTAGTNERAPQVPA
 RFSGSLIGGKALTIIGACTELEATYFCALWYSNYWFGGGTKTVLG

ŞEKİL 27

Antikor IA-12**IA12_YH**

CAGATCGAATTGGTACAGTCTCGAGCTTAGCTGAAGAAAGGCTGGAGAAGCAGTCAAGATCTG
 CAGCAAGGCTTTCTGGGTATAGCTTGAAGCTTACCGAATGAGCTGCTGAAACAGCTTGAAG
 GAAAGCTTTTAAAGTGGATGCTTGTATAAAGCAGCTCTCTGGAGTGTCAACATATCTCGAT
 GACTTGAAGGGAAGGCTTCTCTCTCTTTGGAAAGCTCTGGCAGCACTGCTTATTTTCAGGT
 CAAAGAACTCAAAAGTGAAGACAGCACTACATATCTCTTGGCAAGACGGGAAGTGGTTACT
 GGGGCTAAAGGACTCTCTTCACTCTTTCTGGA

IA12_YH

QIDENVSGPRLEKPGETVKISCKASGYTPTTYGNTWYKCAPKCKLKWMGWINTSSGVPTYAI
 DEKGFAPFLETSASTAYLQILNLKSRCTATYFCAPFENVAYWGGGTLETVSA

IA12_YK

CATGTTGTATGAGCGAGATCTCACTCGCTTTCTGCTTACCTTGGACAGCAGCTCTTAT
 CTCTTGGCAGGTCAAGTACAGCCTCTCTCATGATAATGGAAAGACTTATCTGCATTGGTAT
 CTGAGAGGCGAGGCTAGTCTCCAAGGCGCGCTAATCTATCTGTGTCTAAACTGGACTCTGA
 CTCTCTGACAGGTTCACTGGCACTGGATCAGGAAGCAGATTTACAGCTGAAGATCAGCAGAT
 CGAGCTTCACTAATTCAGAGTTTATTAAGCTCTGCAAGCTACAGATTTCTCTTAAGATCTCG
 GAGGGGGAGTCAACTGGAAATAAAA

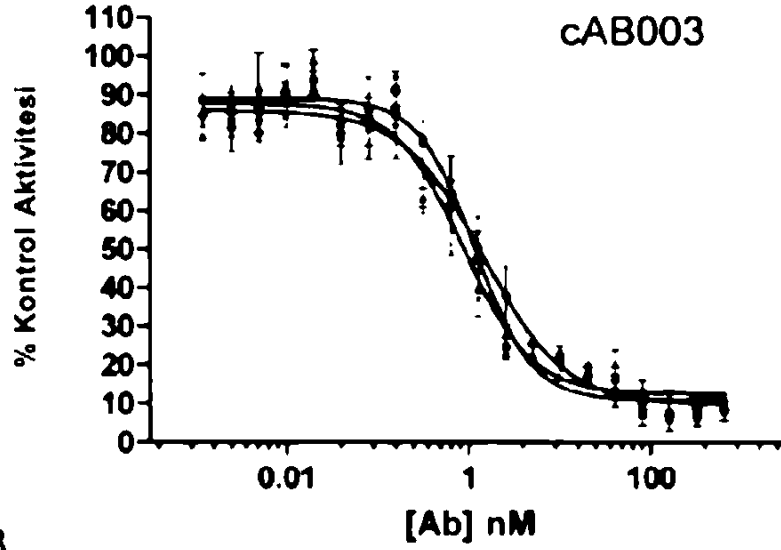
IA12_YK

DVVMTPTPLTLSTFGQPASISCKSSQELLEENKTYLHWLFQKPGQEPERLTYLVERLQSG
 VLSRFTNENSTDTLELIRVLAELLGYYGVQSTEFPTYTQKTKLETF

ŞEKİL 28

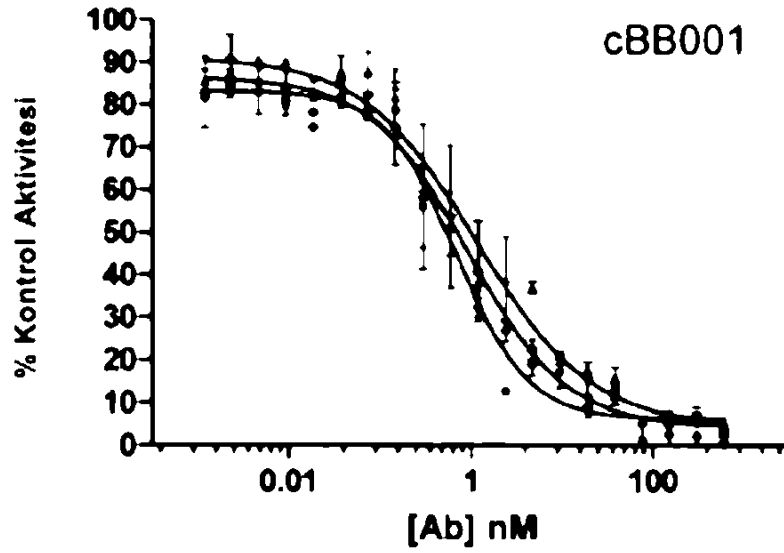
A

	IC50 nM (SD)
cAB003	1.172 (0.297)



B

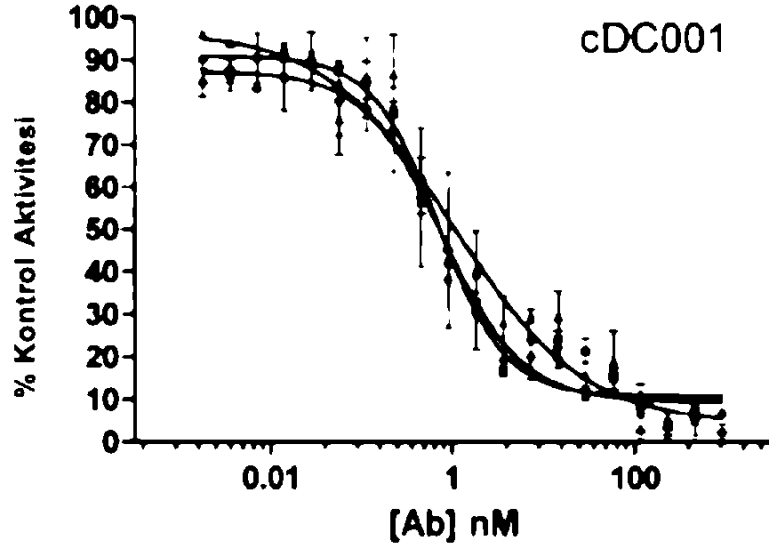
	IC50 nM (SD)
cBB001	0.925 (0.228)



ŞEKİL 29

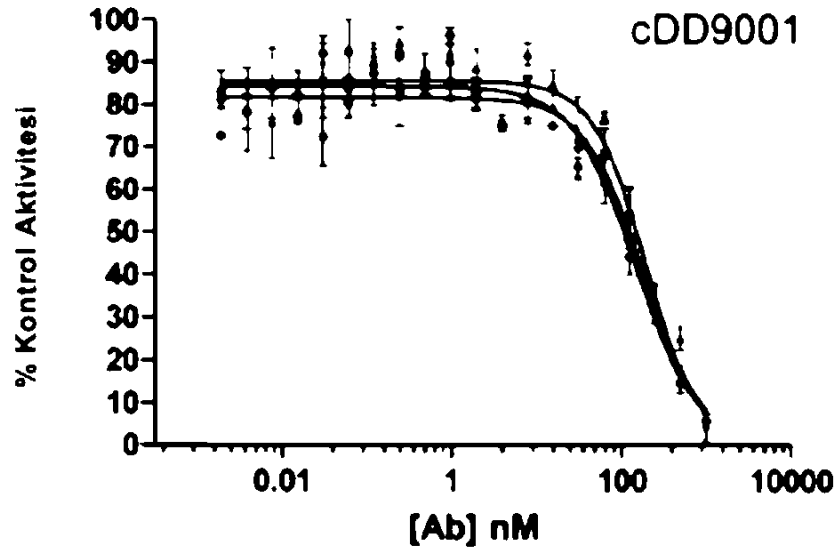
C

	IC ₅₀ nM (SD)
cDC001	0.851 (0.177)



D

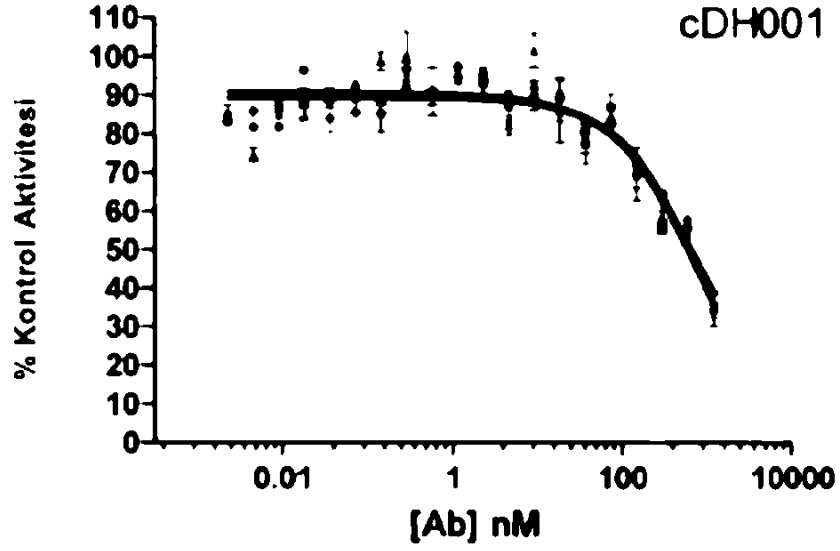
	IC ₅₀ nM (SD)
cDD9001	172.033 (23.353)



ŞEKİL 29 (devam)

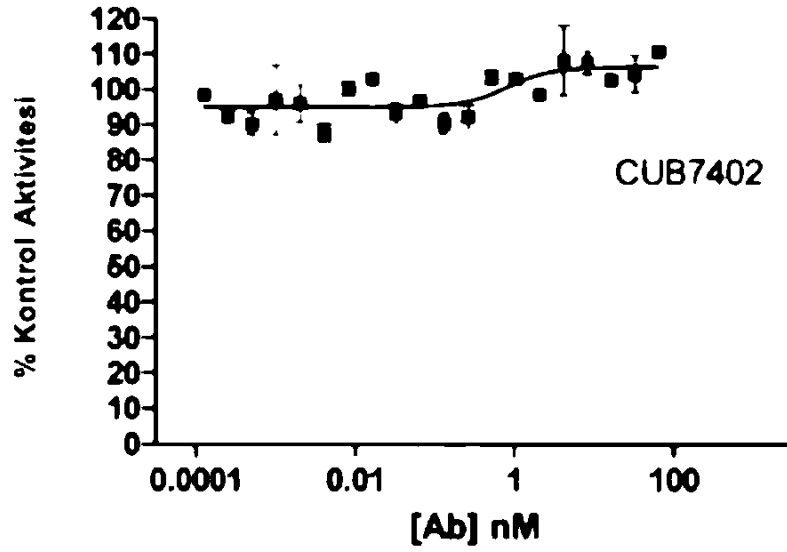
E

	IC50 nM (SD)
cDH001	829 233 (59.923)



F

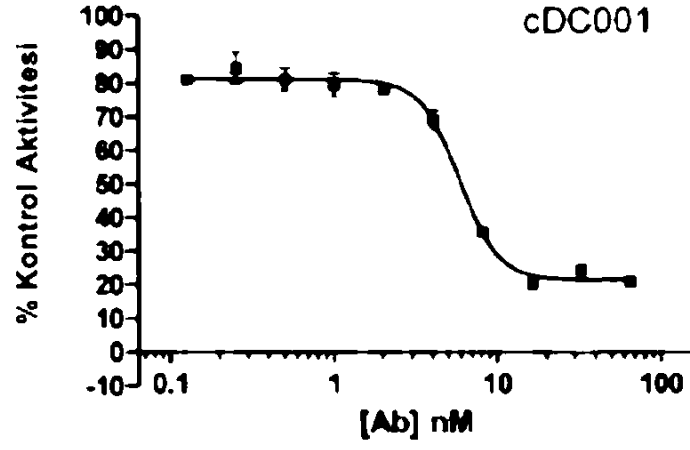
	IC50 nM
CUB7402	>100



ŞEKİL 29 (devam)

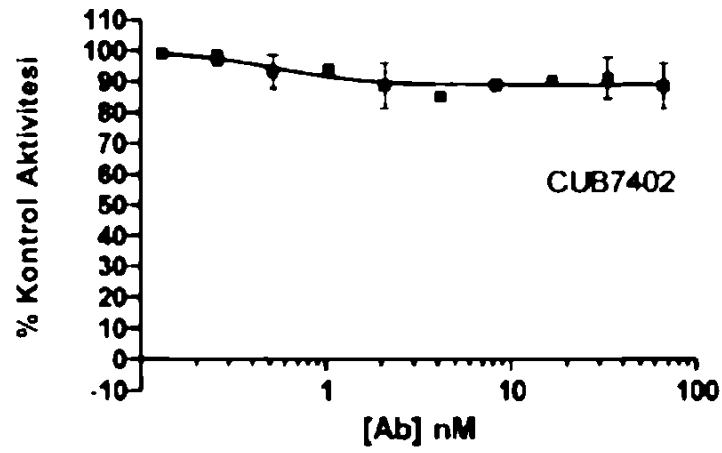
A

	IC50 nM
cDC001	5.862

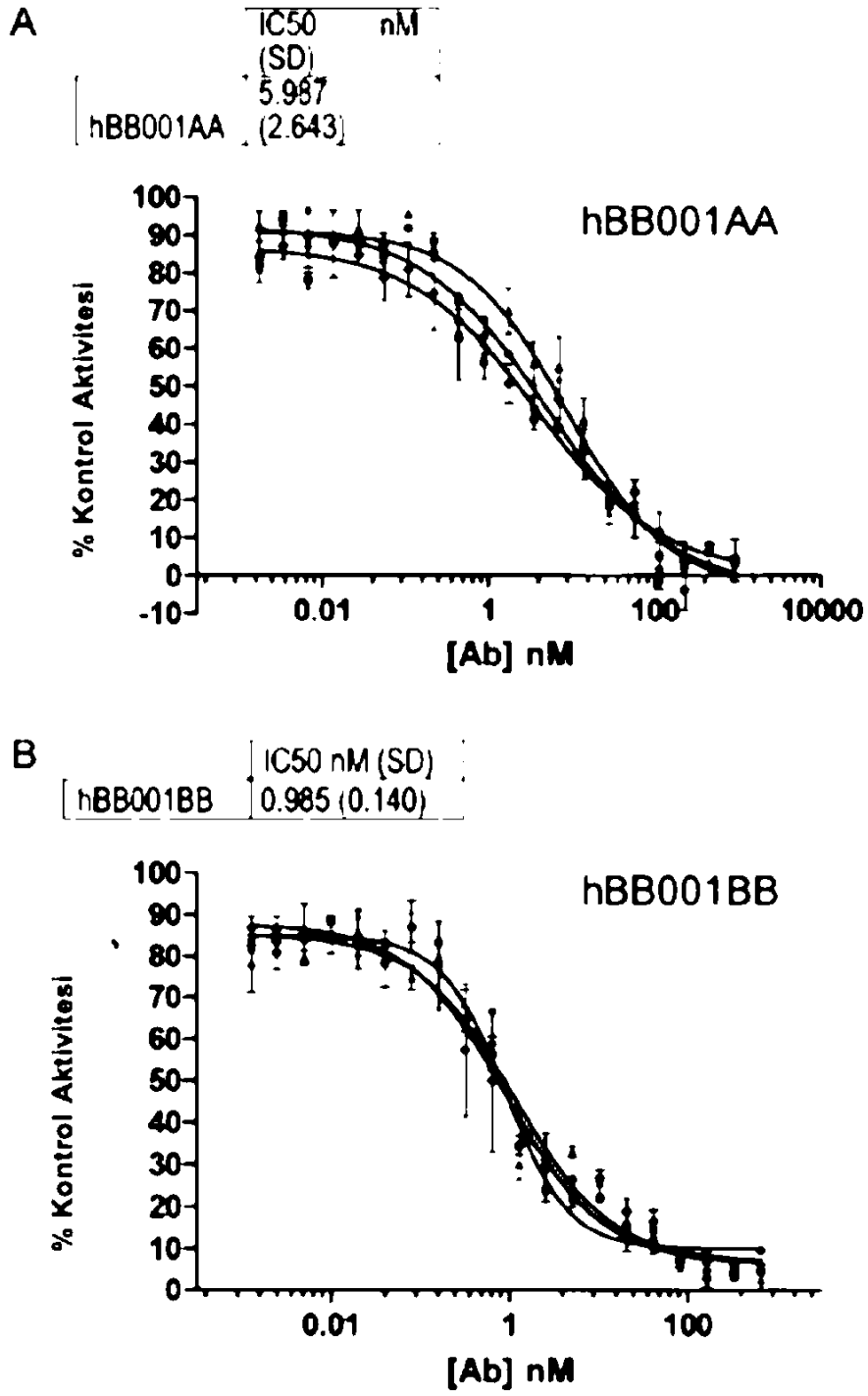


B

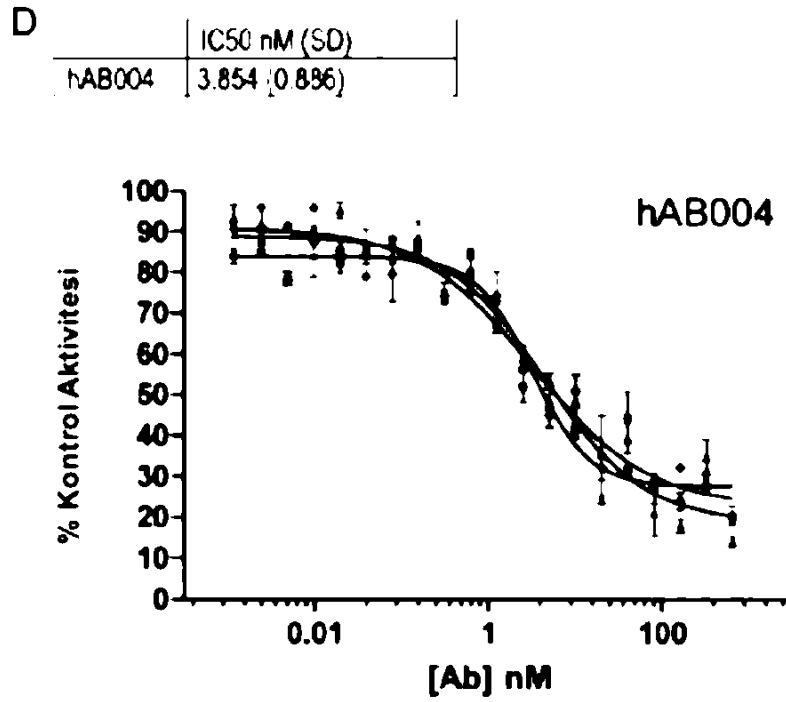
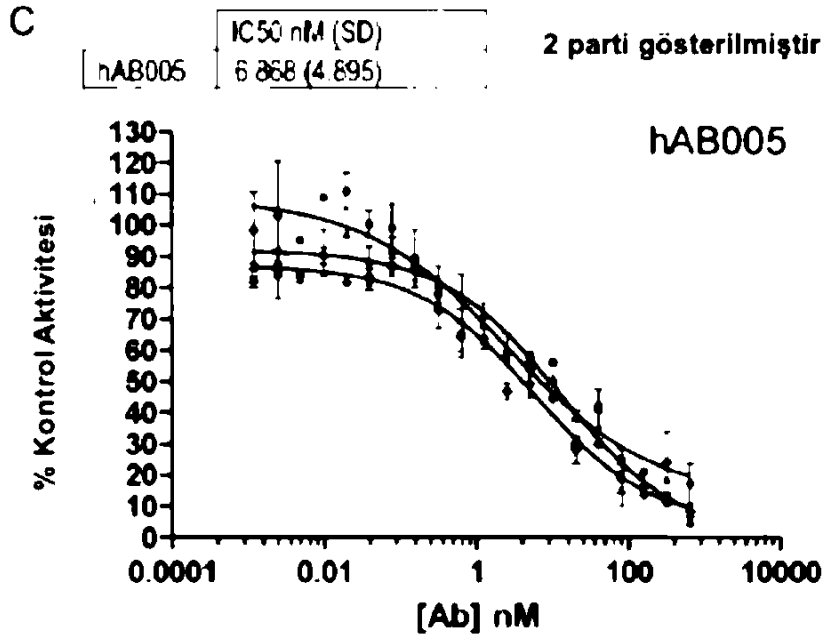
	IC50 nM
CUB7402	>100



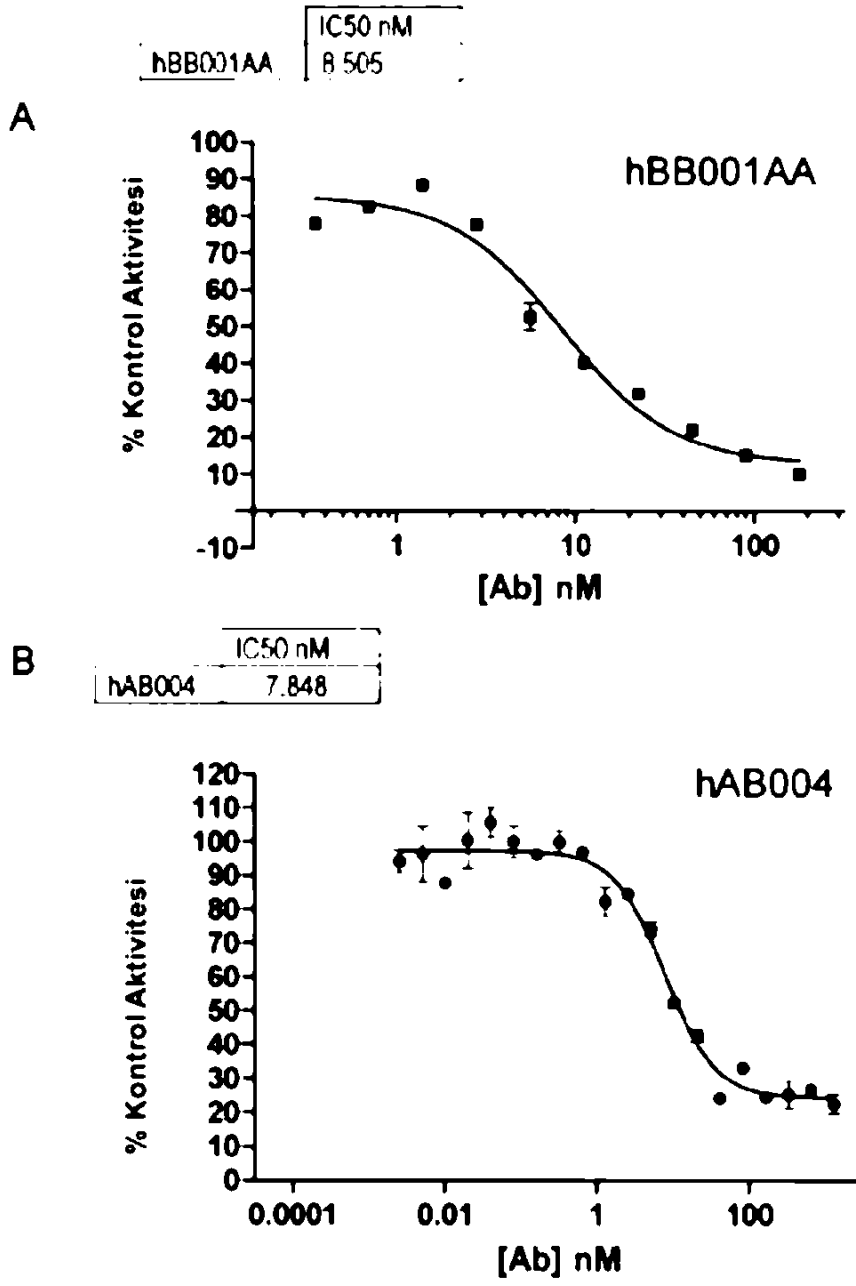
ŞEKİL 30



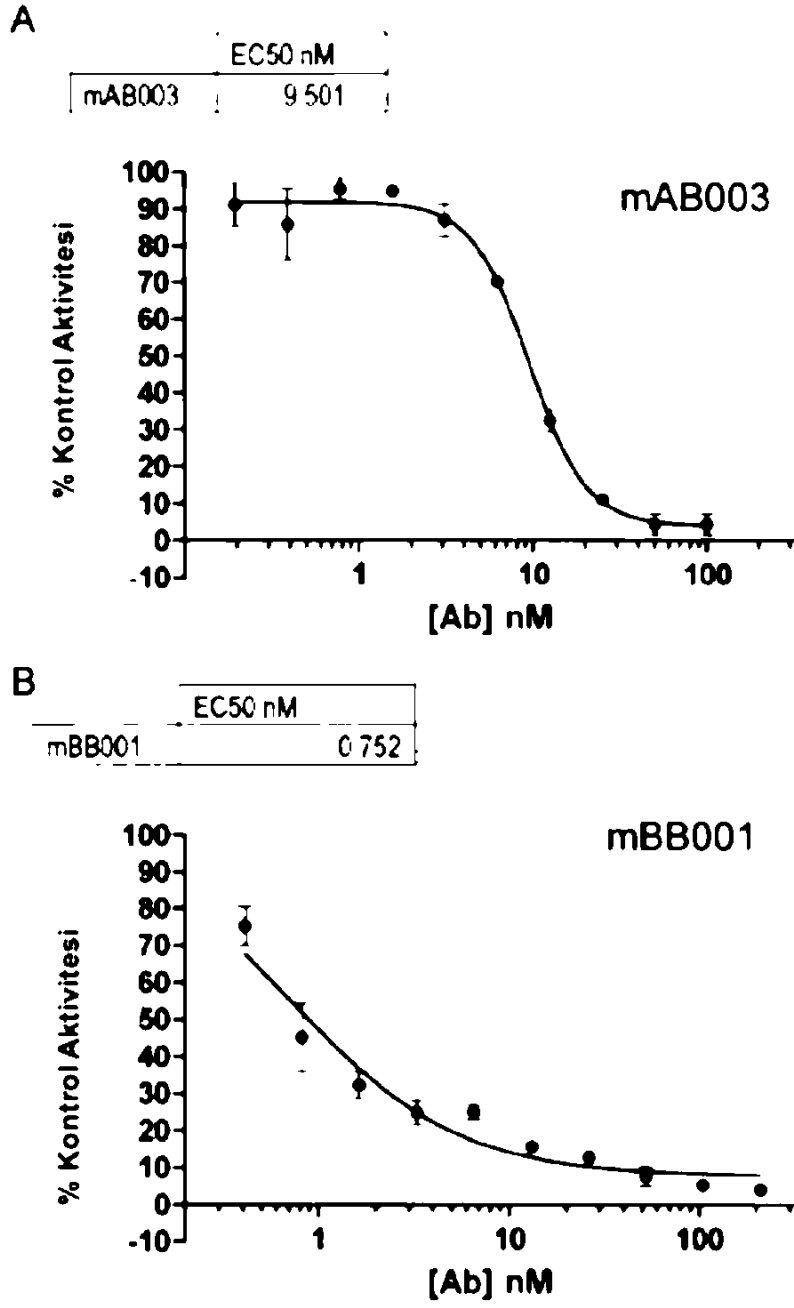
ŞEKİL 31



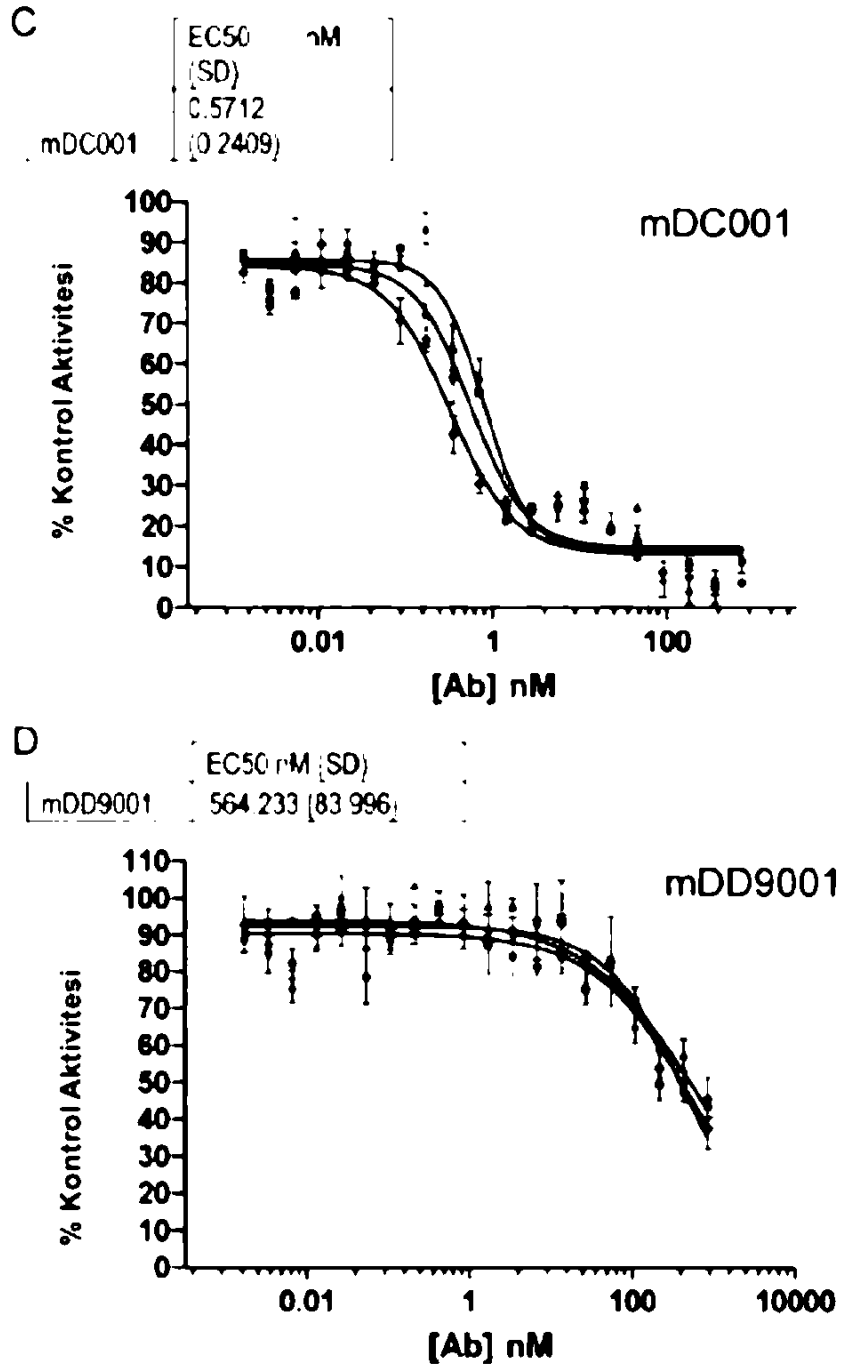
ŞEKİL 31 (devam)



ŞEKİL 32



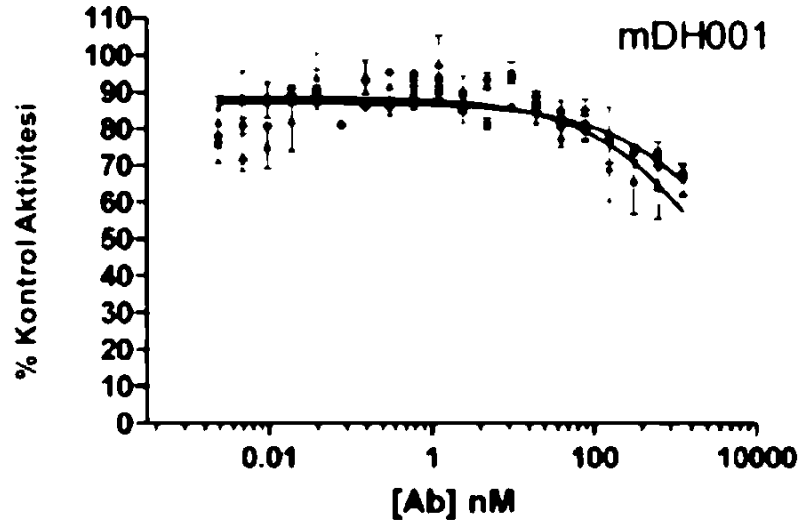
ŞEKİL 33



ŞEKİL 33 (devam)

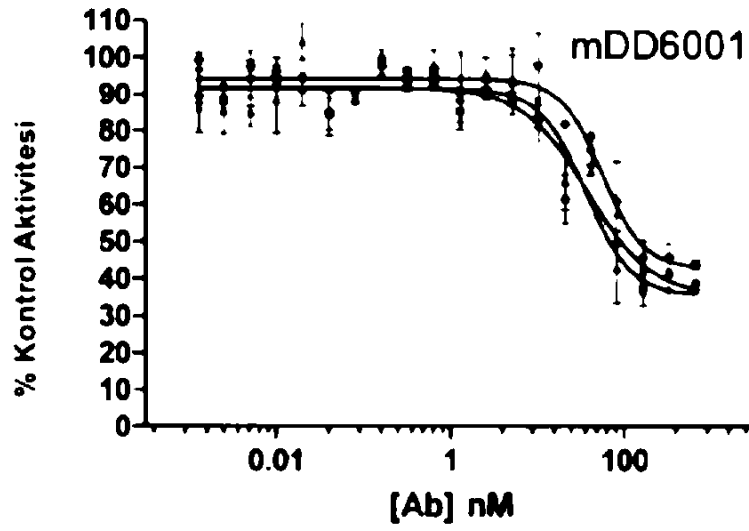
E

	EC50	nM
	(SD)	
mDH001	-7000	

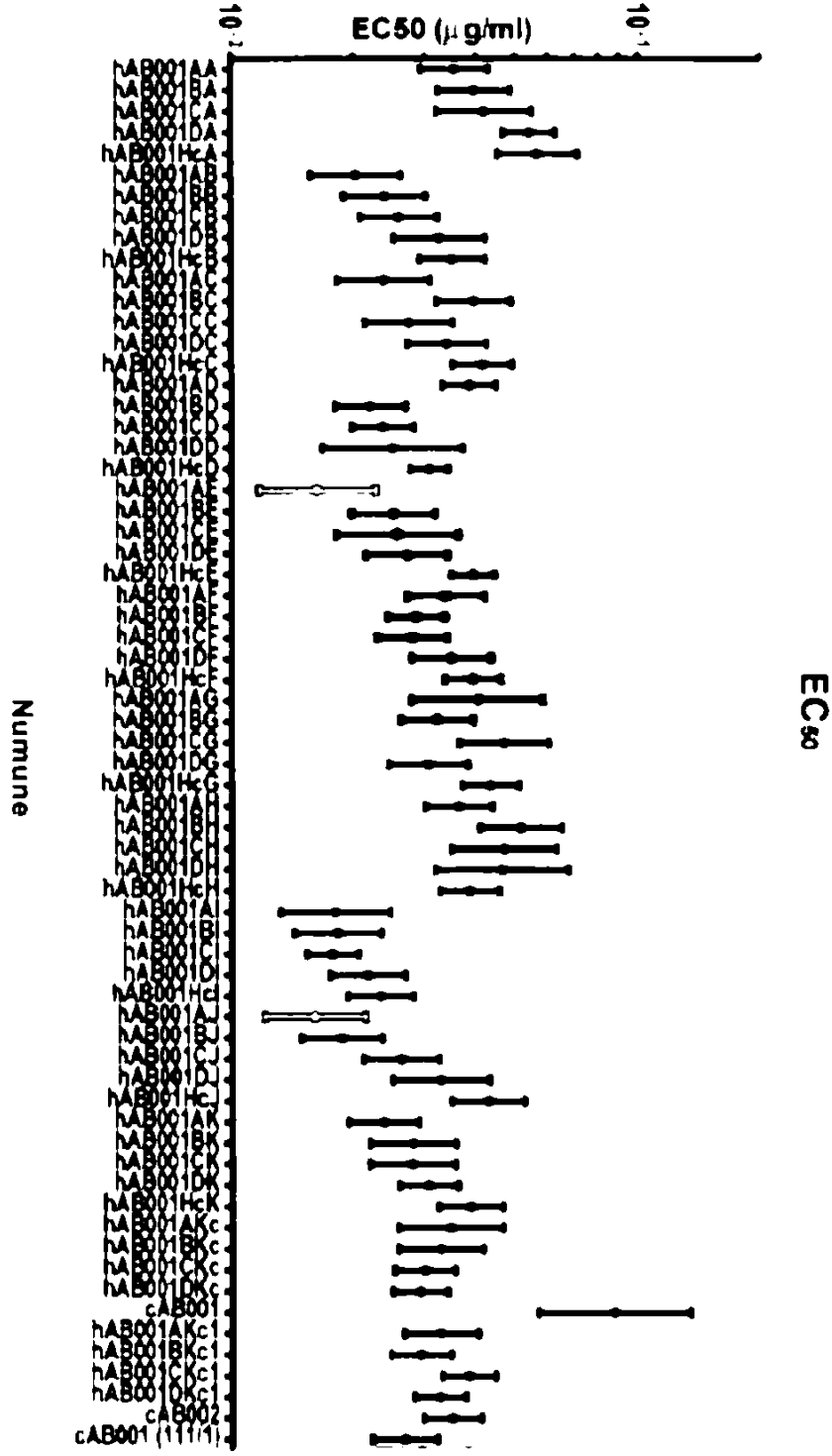


F

	EC50 nM (SD)
mDD6001	43.196 (10.948)



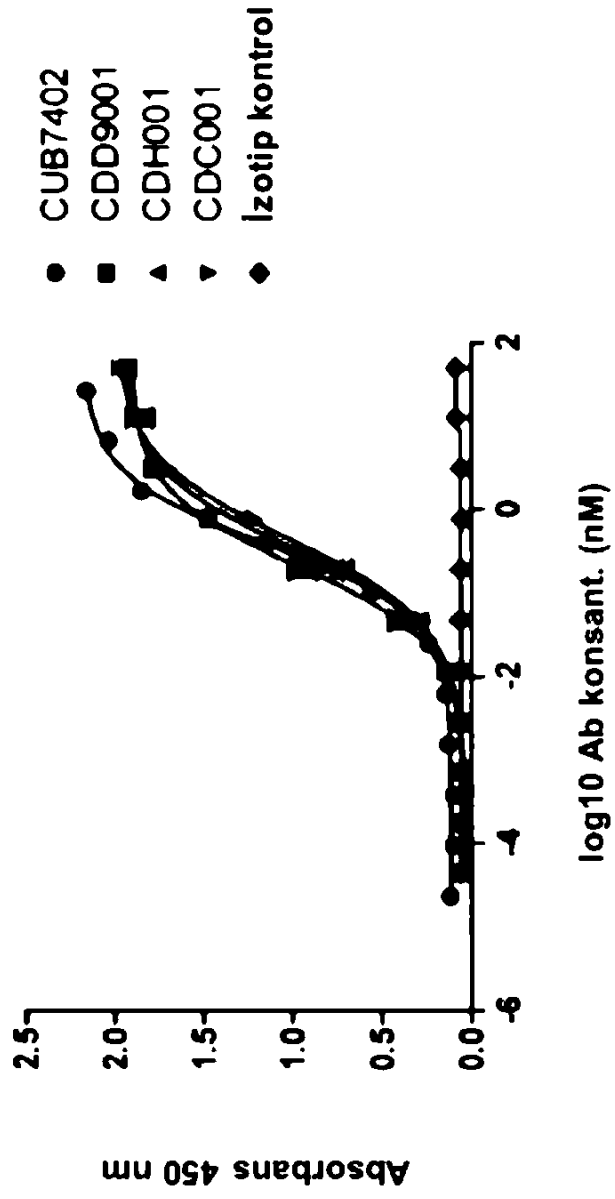
ŞEKİL 33 (devam)



ŞEKİL 34

A

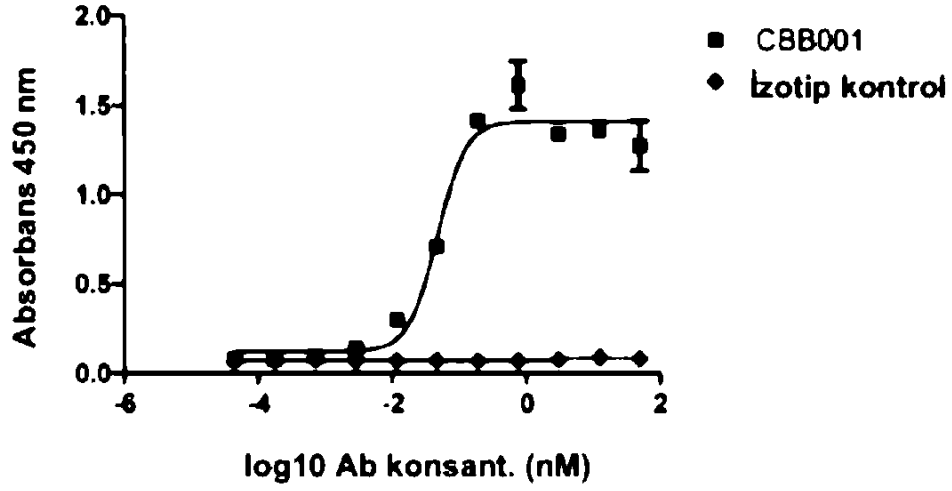
	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0.3804	0.2099	0.3401	0.4418
r2	0.9991	0.998	0.9968	0.9985
EC50 (%95 güven aralığı)	0.3291 ila 0.4396 arası	0.1860 ila 0.2368 arası	0.2890 ila 0.4002 arası	0.3927 ila 0.4971 arası



ŞEKİL 35

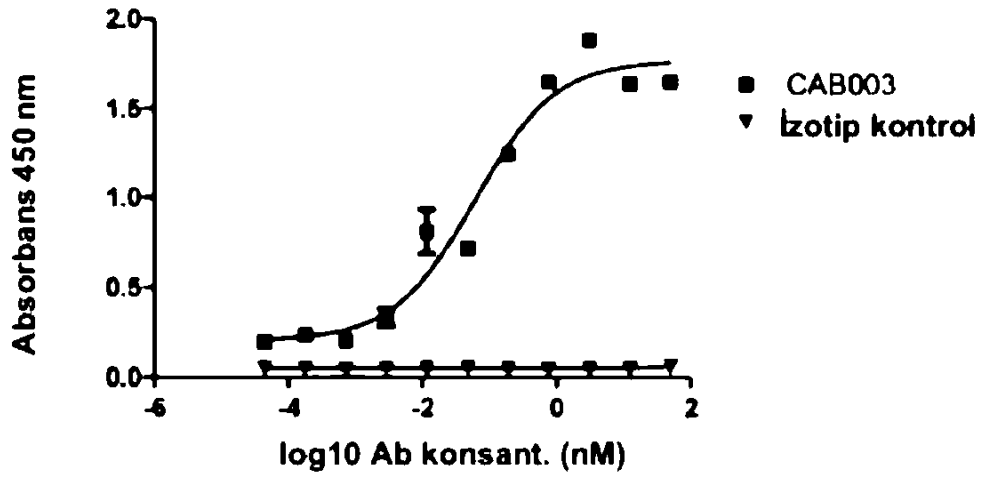
B

	CBB001
EC50 (nM)	0.04811
r ²	0.9682
EC50 (%95 güven aralığı)	0.03611 ile 0.06410 arası



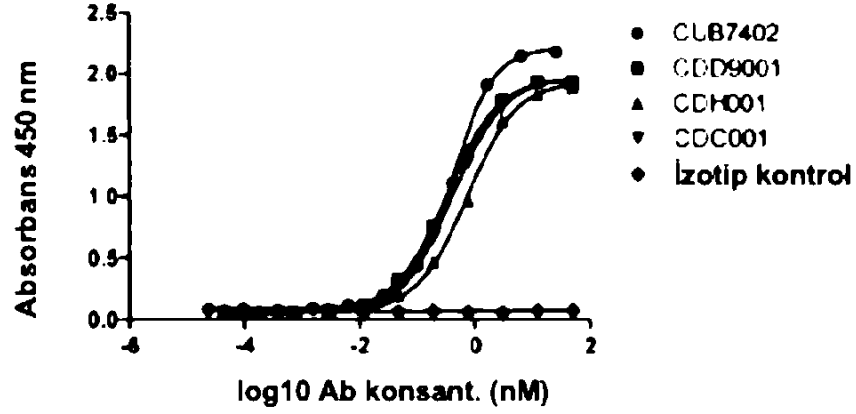
C

	CAB003
EC50 (nM)	0.06141
r ²	0.9568
EC50 (%95 güven aralığı)	0.03066 ile 0.1230 arası

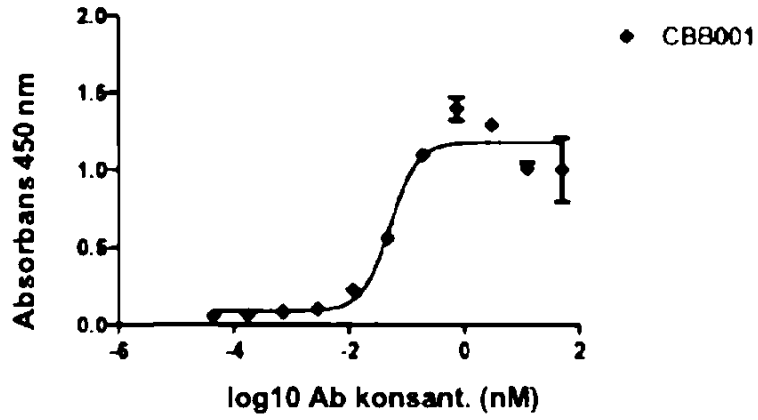


ŞEKİL 35 (devam)

A	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0.4161	0.3279	0.7385	0.4177
r2	0.9994	0.9992	0.9986	0.9993
EC50 (%95 guven aralığı)	0.3762 ila 0.4603 arası	0.3040 ila 0.3536 arası	0.6682 ila 0.8162 arası	0.3887 ila 0.4489 arası



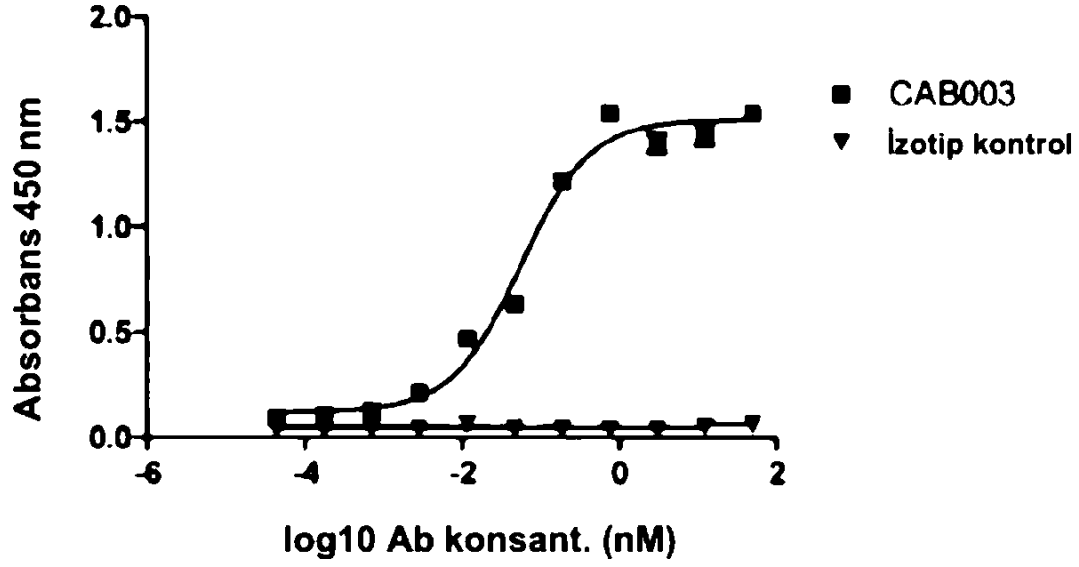
B	CBB001
EC50 (nM)	0.05166
r2	0.9383
EC50 (%95 guven aralığı)	0.03303 ila 0.08079 arası



ŞEKİL 36

C

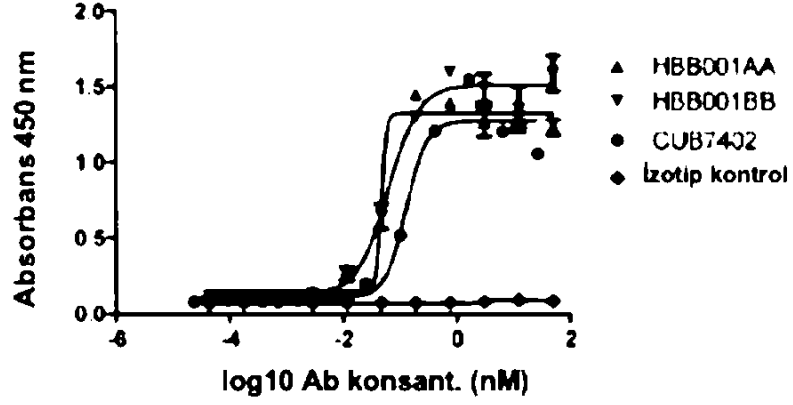
	CAB003
EC50 (nM)	0.05682
r ²	0.9837
EC50 (%95 güven aralığı)	0.04054 ila 0.07966 arası



ŞEKİL 36 (devam)

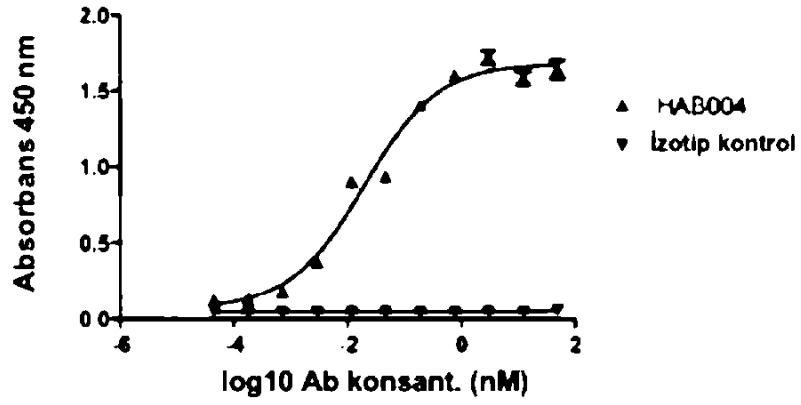
A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (nM)	0.1277	~0.04739	0.06274
r2	0.9588	0.9792	0.9771
EC50 (%95 guven aralıǵı)	0.06801 ila 0.2396 arası	ND	0.04636 ila 0.08491 arası



B

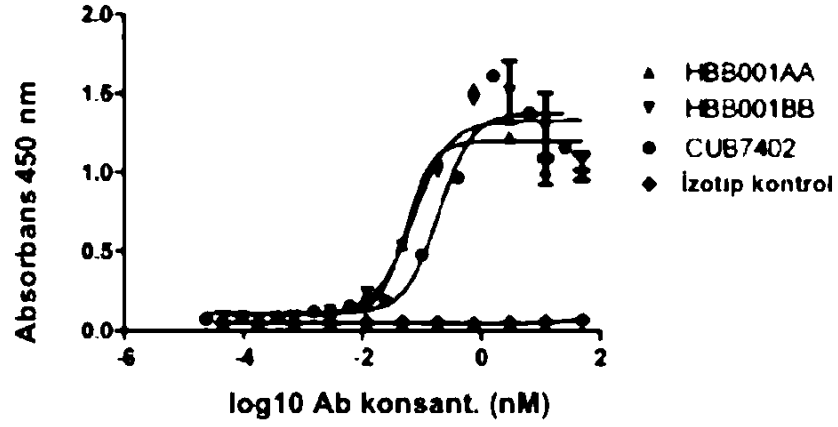
	HAB004
EC50 (nM)	0.0200*
r2	0.9794
EC50 (%95 guven aralıǵı)	0.01199 ila 0.03342 arası



ŞEKİL 37

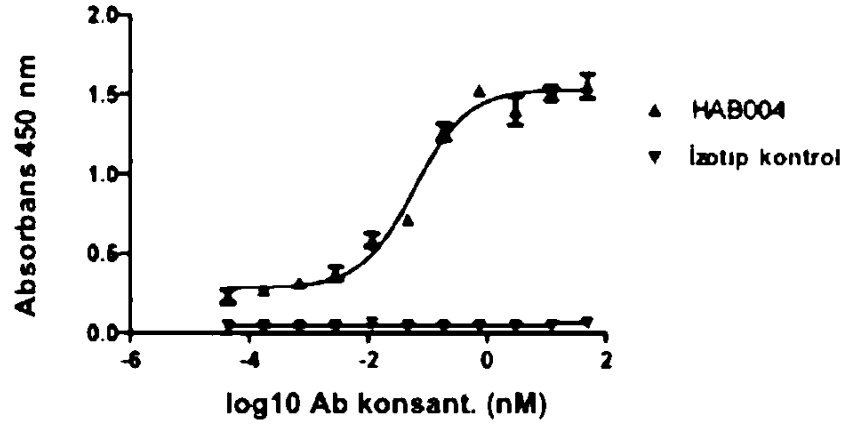
A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (nM)	0.1382	0.0561	0.07377
r2	0.9586	0.9329	0.9361
EC50 (%95 güven aralığı)	0.09303 ila 0.4223 arası	0.03522 ila 0.089934 arası	0.04198 ila 0.1296 arası

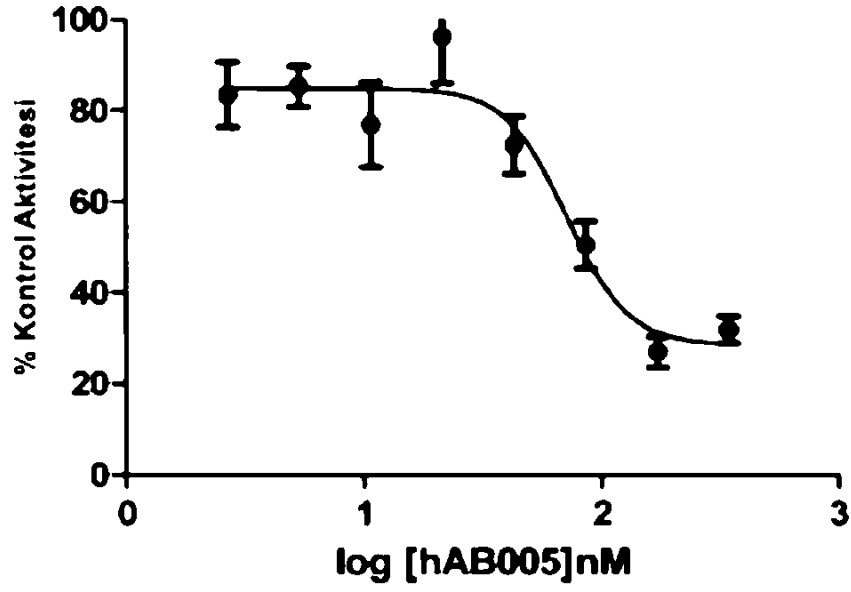


B

	HAB004
EC50 (nM)	0.06117
r2	0.9766
EC50 (%95 güven aralığı)	0.04047 ila 0.09246 arası

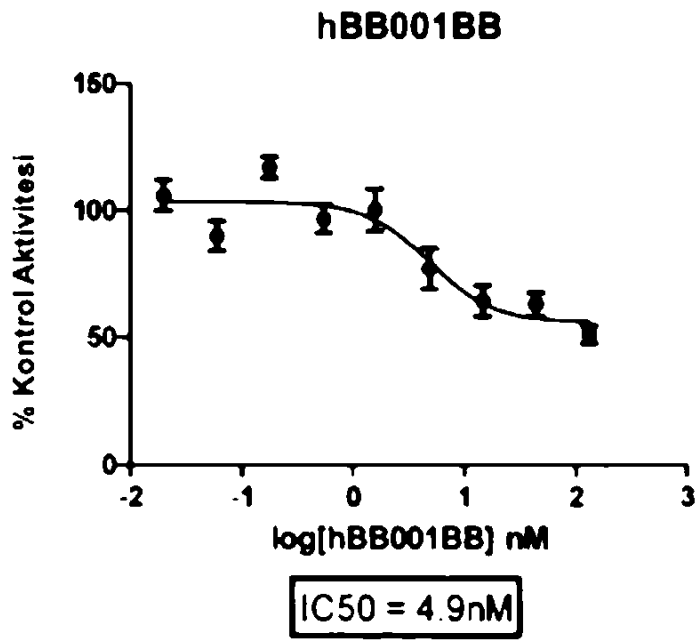
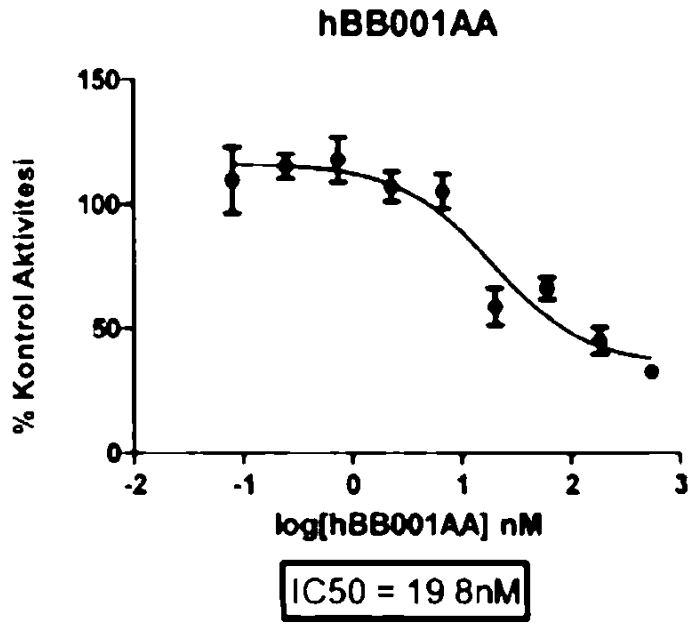


ŞEKİL 38

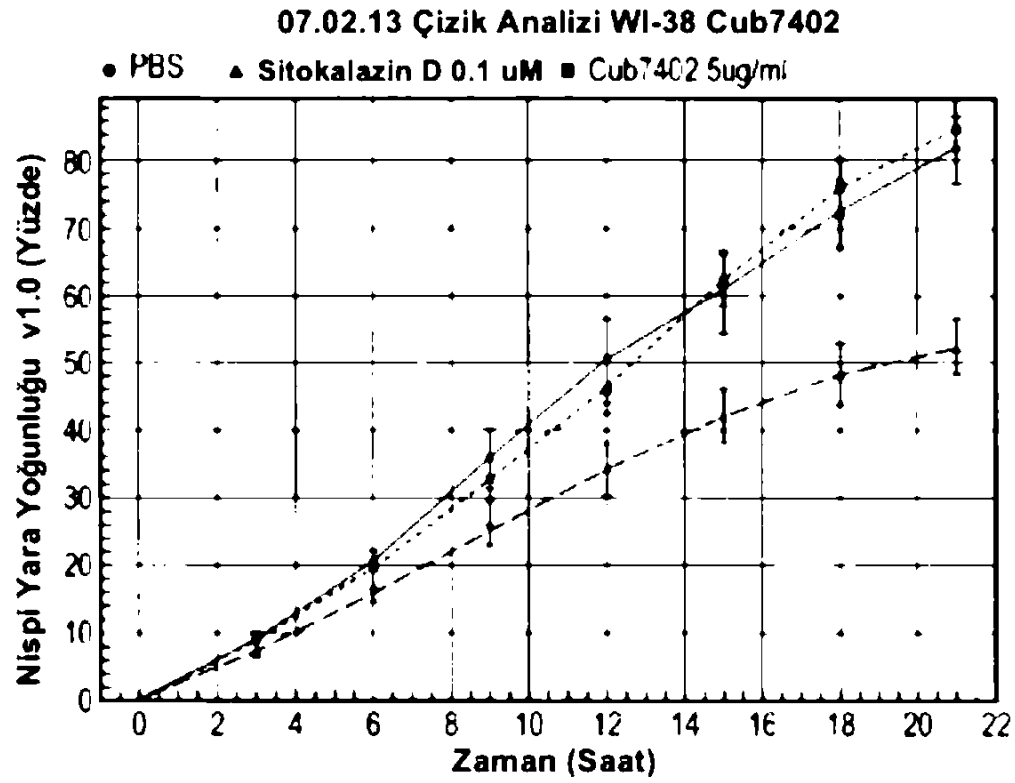
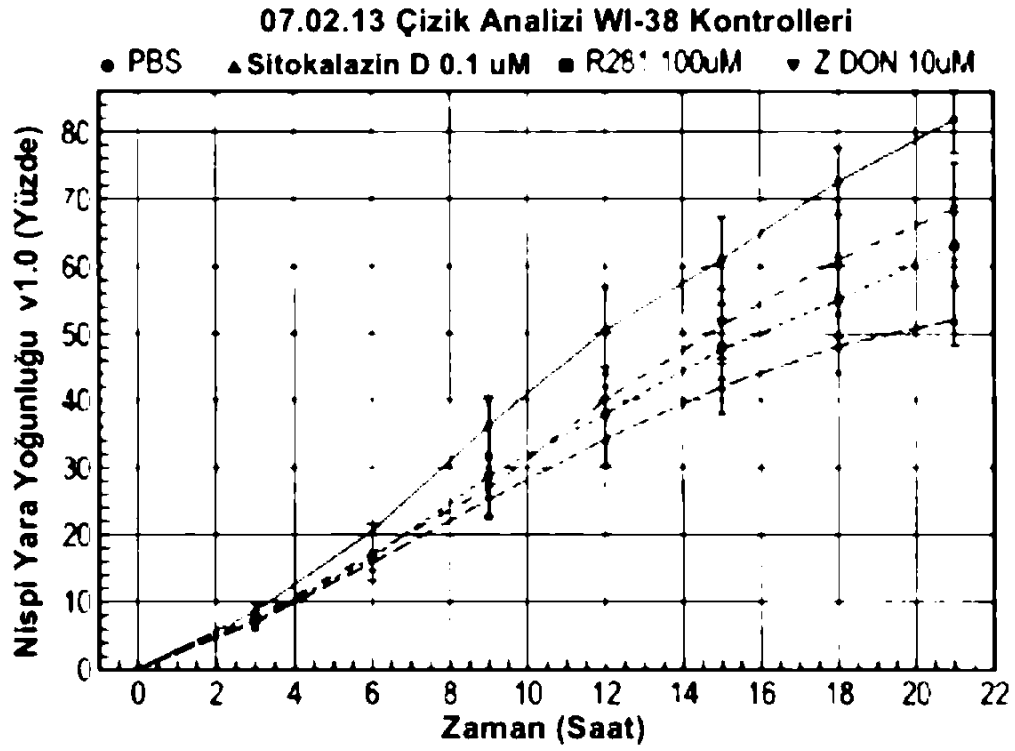
hAB005

IC₅₀ = 71.85nM

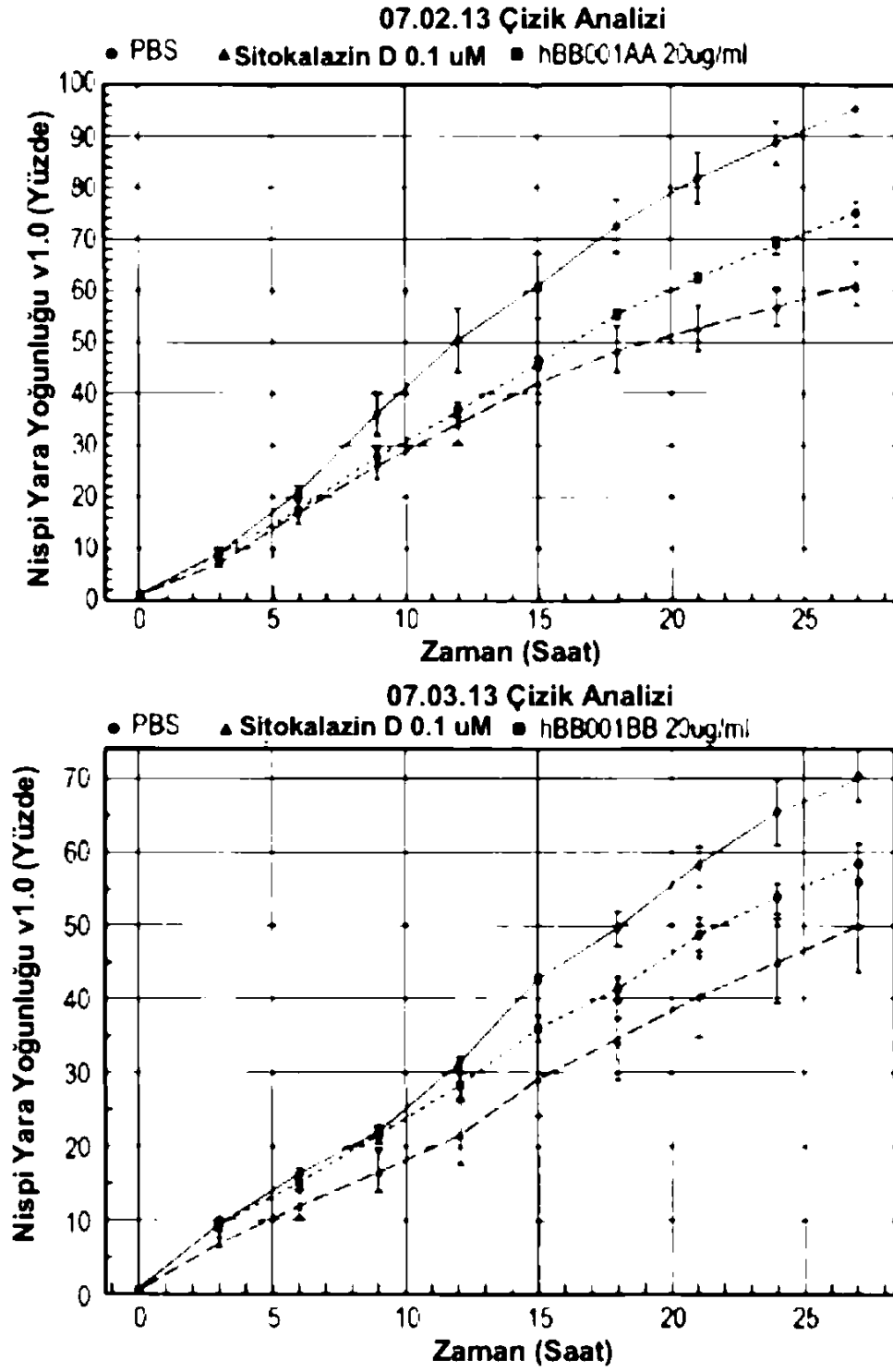
ŞEKİL 39



ŞEKİL 40

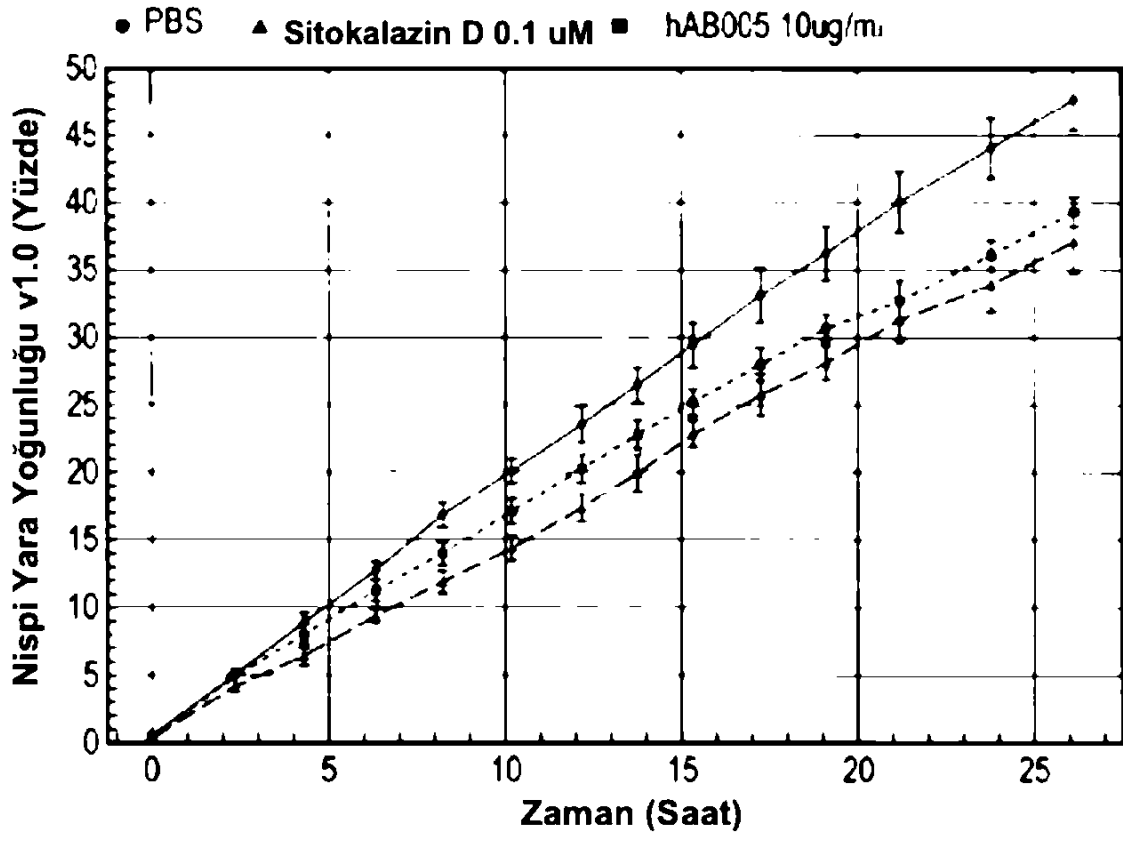


ŞEKİL 41



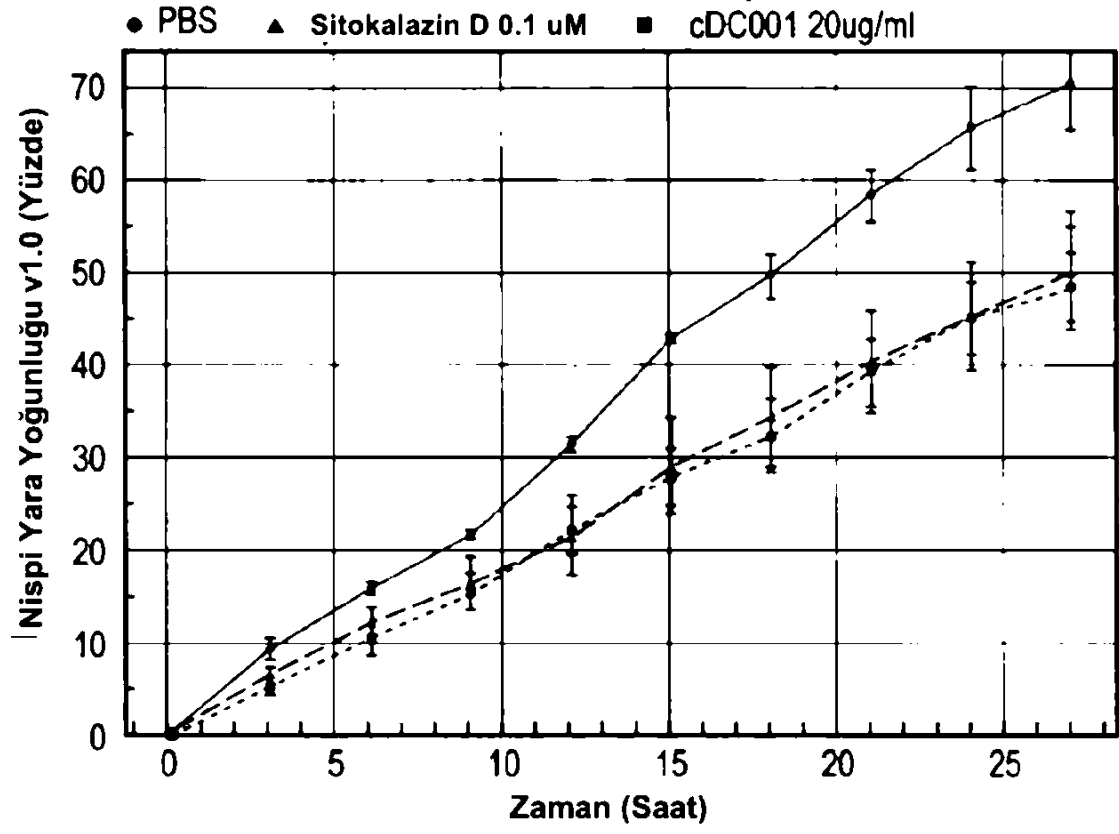
ŞEKİL 42

24.04.13 Çizik Analizi



ŞEKİL 43

07.03.13 Çizik Analizi



ŞEKİL 44

