

ÖZET

ANTI-FOLAT RESEPTÖR ALFA ANTİKORLAR VE BUNLARIN KULLANIMI

5 Mevcut buluş, folat reseptör alfa ($FR\alpha$) için spesifik, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 26 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 27 içeren bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 28 içeren bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 30 içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 31 içeren bir ağır zincir CDR2 ve amino asit dizilimi SEQ ID NO: 32 içeren bir ağır zincir CDR3 içeren izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçasını sunar.

İSTEMLER

1. Folat reseptör alfa ($FR\alpha$) için spesifik izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası olup, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 26 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 27 içeren bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 28 içeren
5 bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 30 içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 31 içeren bir ağır zincir CDR2 ve amino asit dizilimi SEQ ID NO: 32 içerir.
2. İstem 1'deki izole antikor ya da antijen bağlayan parçası olup, burada antikor bir murin antikoru, bir kimerik antikor ya da insanlaştırılmış bir antikordur.
3. İstem 1'deki izole antikor ya da antijen bağlayan parçası olup, amino asit dizilimi SEQ
10 ID No: 29 içeren bir hafif zincir değişken bölgesine ve/veya amino asit dizilimi SEQ ID NO: 33 içeren bir ağır zincir değişken bölgesine sahiptir.
4. Folat reseptör alfa için spesifik bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçasını kodlayan izole bir polinükleotid olup, burada kodlanan antikorun hafif zincir CDR1'i amino asit dizilimi SEQ ID NO: 26, kodlanan antikorun hafif zincir CDR2'si amino asit dizilimi SEQ ID
15 NO: 27, kodlanan antikorun hafif zincir CDR3'ü amino asit dizilimi SEQ ID NO: 28, kodlanan antikorun ağır zincir CDR1'i amino asit dizilimi SEQ ID NO: 30, kodlanan antikorun ağır zincir CDR2'si amino asit dizilimi SEQ ID NO: 31, kodlanan antikorun ağır zincir CDR3'ü amino asit dizilimi SEQ ID NO: 32 içerir.
5. İstem 4'e göre polinükleotid olup nükleotid dizilimleri SEQ ID NO: 61 ve 65'i içerir.
- 20 6. İstem 4'teki izole polinükleotid olup, nükleik asit dizilimleri SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 ve SEQ ID NO: 64'ü içerir.
7. İstem 5 - 6 arasındaki istemlerden herhangi birindeki izole polinükleotidi içeren bir vektördür.
8. Bir rekombinant hücre olup istem 7'deki vektörü içerir.
- 25 9. İstem 8'deki rekombinant hücre olup burada hücre bir ökaryotik hücre, bir bitki hücresi ya da bir bakteridir.

10. ATCC'de katılım numarası PTA-11885 ile depolanan bir hücre hattı tarafından üretilen folat reseptör alfa (FR α) için spesifik bir izole antikordur.

11. Bir biyolojik örnekte, numuneyi 1 - 10 arasındaki istemlerde yer alan antikora ya da bunun antijen bağlayan bir parçasına maruz bırakmak ve folat reseptör alfa (FR α)'yı belirlemekten oluşan folat reseptör alfa (FR α) ya da FR α ekspres eden bir kanseri saptama yöntemidir.

12. İstem 11'deki yöntem olup, burada biyolojik örnek bir insan, kemirgen, insan olmayan primat, tavşan ya da köpekten türetilir.

13. Bir denekte folat reseptör alfa ekspres eden bir kanserin tanısına yönelik bir yöntem olup şunları içerir:

- a. denekten alınan bir biyolojik örneği istem 1 ya da istem 10'daki antikora; ya da bunun antijen bağlayan bir parçasına maruz bırakmak;
- b. örnekte mevcut folat reseptör alfa (FR α) miktarını belirlemek;
- c. örnekte mevcut folat reseptör alfa (FR α) miktarı ile bilinen bir standardı karşılaştırmak; ve
- d. deneğin folat reseptör alfa (FR α) seviyelerindeki düşüşü, kanser ile ilişkilendirilen folat reseptör alfa (FR α) seviyeleri dahilinde belirlemek.

14. İstem 13'teki yöntem olup, burada deneğin adenokarsinom hücrelerinin folat reseptör alfa ekspres ettiğini belirlemek deneğin, adenokarsinom hücrelerinin folat reseptör alfa ekspres etmediği duruma göre daha yüksek 5 yıllık hayatta kalma oranına sahip olacağını göstermektedir.

15. Bir denekte folat reseptör alfa ekspres eden bir kanserin izlenmesine yönelik bir yöntem olup şunları içerir:

- a. denekten alınan bir biyolojik örneği istem 1 ya da istem 10'daki antikora; ya da bunun antijen bağlayan bir parçasına maruz bırakmak;

- b. örnekte, antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası tarafında bağlanan mevcut folat reseptör alfa ($FR\alpha$) miktarını belirlemek;
- c. örnekte mevcut folat reseptör alfa ($FR\alpha$) miktarı ile
- i. bilinen bir standardı karşılaştırmak ya da
- 5 ii. daha önceki bir zaman noktasında yer alan bir denekten alınan bir biyolojik örnekle karşılaştırmak; ve
- d. deneğin folat reseptör alfa ($FR\alpha$) seviyelerinin kanserin ilerlemesi, gerilemesi ya da stabil olmasına yönelik bir gösterge olup olmadığını belirlemek.
16. 11 - 15 arasındaki istemlerden herhangi birindeki yöntem olup, burada biyolojik
- 10 örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreleri, dokularla ilişkili olmayan hücreler, dokular, cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu ya da histolojik hazırlıklardan türetilir.
17. İstem 13'teki yöntem olup, burada kanser göğüs kanseri, tiroid kanseri, kalın bağırsak kanseri, endometriyal kanser, fallop tüpü kanseri ya da yumurtalık kanseridir.
- 15 18. İstem 17'deki yöntem olup, burada kanser akciğer kanseridir.
19. İstem 18'deki yöntem olup, burada akciğer kanseri adenokarsinomdur.
20. İstem 13'teki yöntem olup, burada bilinen standart,
- a. kansersiz olarak tanımlanan deneklerden türetilen folat reseptör alfa ($FR\alpha$) seviyelerini ya da bilinen bir konsantrasyondaki preparat folat reseptör alfa
- 20 proteinini;
- b. erken evre folat reseptör alfa ekspres eden kanserli olarak tanımlanan deneklerden türetilen $FR\alpha$ seviyelerini;
- c. orta evre folat reseptör alfa ekspres eden kanserli olarak tanımlanan deneklerden türetilen $FR\alpha$ seviyelerini;

d. geç evre folat reseptör alfa ekspres eden kanserli olarak tanımlanan deneklerden türetilen FR α seviyelerini içerir.

21. İstem 20'deki yöntem olup, burada kanser göğüs kanseri, tiroid kanseri, kalın bağırsak kanseri, endometriyal kanser, fallop tüpü kanseri, yumurtalık kanseri ya da akciğer kanseridir.

22. 13 - 21 arasındaki istemlerden herhangi birindeki yöntem olup, ayrıca, aşağıdaki bahsedilen maruz bırakma adımı, deneğin biyolojik örneğinin şunlardan seçilen bir ikinci antikora ya da bunun antijen bağlayan parçasına maruz bırakılmasını içerir:

i. istem 1'in antikor;

ii. istem 10'un antikor;

iii. şunları içeren, folat reseptör alfa (FR α) için spesifik izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası: amino asit dizilimi SEQ ID NO: 10 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 11 içeren bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 12 içeren bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 14 içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 15 içeren bir ağır zincir CDR2 ve amino asit dizilimi SEQ ID NO: 16 içeren bir ağır zincir CDR3;

vi. ATCC'de katılım numarası PTA-11884 ile depolanan bir hücre hattı tarafından üretilen folat reseptör alfa (FR α) için spesifik bir izole antikor;

v. folat reseptör alfa (FR α) için spesifik izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası olup, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 18 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 19 içeren bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 20 içeren bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 22 içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 23 içeren bir ağır zincir CDR2 ve amino asit dizilimi SEQ ID NO: 24 içeren bir ağır zincir CDR3 içerir;

vi. ATCC'de katılım numarası PTA-11886 ile depolanan bir hücre hattı tarafından üretilen folat reseptör alfa (FR α) için spesifik bir izole antikor;

vii. folat reseptör alfa (FR α) için spesifik izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası olup, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 2 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 3 içeren bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 4 içeren bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 6 içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 7 içeren bir ağır zincir CDR2 ve amino asit dizilimi SEQ ID NO: 8 içeren bir ağır zincir CDR3; ve

viii. ATCC'de katılım numarası PTA-11887 ile depolanan bir hücre hattı tarafından üretilen folat reseptör alfa (FR α) için spesifik bir izole antikor içerir; burada ikinci antikor birinci antikordan farklıdır.

23. İstem 22'deki yöntem olup, burada deneğin biyolojik örneği istem 1 ya da istem 10'daki antikora ya da bunun antijen bağlayan parçasına maruz bırakılır ve sonra şunlara maruz bırakılır:

a. folat reseptör alfa (FR α) için spesifik izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası olup, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 10 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 11 içeren bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 12 içeren bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 14 içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 15 içeren bir ağır zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 16 içeren bir ağır zincir CDR3 içerir;

b. ATCC'de katılım numarası PTA-11884 ile depolanan bir hücre hattı tarafından üretilen folat reseptör alfa (FR α) için spesifik bir izole antikor içerir;

c. folat reseptör alfa (FR α) için spesifik izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası olup, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 18 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 19 içeren bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 20 içeren bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 22

içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 23 içeren bir ağır zincir CDR2 ve amino asit dizilimi SEQ ID NO: 24 içeren bir ağır zincir CDR3 içerir;

d. ATCC'de katılım numarası PTA-11886 ile depolanan bir hücre hattı tarafından üretilen folat reseptör alfa (FR α) için spesifik bir izole antikor;

5 e. folat reseptör alfa (FR α) için spesifik izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası olup, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 2 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 3 içeren bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 4 içeren bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 6 içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 7 içeren bir ağır zincir CDR2 ve amino asit dizilimi SEQ ID NO: 8 içeren bir ağır zincir CDR3 içerir;

10

f. ATCC'de katılım numarası PTA-11887 ile depolanan bir hücre hattı tarafından üretilen folat reseptör alfa (FR α) için spesifik bir izole antikor içerir.

24. 15 - 21 arasındaki istemlerden herhangi birindeki yöntem olup, burada yöntem, denengin kanser için tedavi edilmesinden sonra yürütülür.

15 25. 11 - 24 arasındaki istemlerden herhangi birindeki yöntem olup, burada antikor ya da antikor parçası etiketlenir.

26. İstem 25'teki yöntem olup, burada etiket bir radyo etiket, bir flüoresan etiket, bir epitop etiket, biyotin, bir kromofor etiket, bir ECL etiket ya da bir enzimdir.

27. 11 - 24 arasındaki istemlerden herhangi birindeki yöntem olup, burada maruz bırakılan folat reseptör alfa (FR α) bir hücreye bağlıdır ya da değildir.

20

28. 11 - 24 arasındaki istemlerden herhangi birindeki yöntem olup, burada folat reseptör alfanın (FR α) örnekteki varlığı, western blot, immünohistokimya, akış sitometrisi, radyoimmünoassay, immüno çökelim, elektrokemilüminesans immünoassay (ECLIA), ya da ELISA kullanılarak belirlenir.

29. Bir biyolojik örnekte folat reseptör alfanın ($FR\alpha$) varlığını saptamaya yönelik ve istem 1 ya da istem 10'daki antikorlardan en az birini ya da bunların antijen bağlayan bir parçasını içeren bir kittir.

30. Bir biyolojik örnekte folat reseptör alfanın ($FR\alpha$) varlığını saptamaya yönelik bir kit olup şunları içerir:

istem 1 ya da istem 10'daki antikorlardan en az biri ya da bunların antijen bağlayan bir parçası

burada dahil edilen antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası katı bir desteğe sabitlenmiştir.

31. Bir biyolojik örnekte folat reseptör alfanın ($FR\alpha$) varlığını saptamaya yönelik bir kit olup şunları içerir;

istem 1 ya da istem 10'daki antikorlardan en az biri ya da bunların antijen bağlayan bir parçası

burada dahil edilen antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası saptanabilir şekilde etiketlenir.

32. İstem 13 ya da istem 14'teki yöntem olup, burada deneğin folat reseptör alfa ($FR\alpha$) seviyeleri deneğin yakalandığı kanser türü için göstergedir.

33. İstem 32'deki yöntem olup, burada kanser akciğer adenokarsinom ya da sküamöz hücre akciğer karsinomudur.

34. 1 - 3 arasındaki istem ya da istem 10'daki izole antikorlardan herhangi biri olup, burada antikor saptanabilir şekilde etiketlenir.

35. İstem 34'teki antikor olup, burada saptanabilir etiket bir radyo etiket, bir flüoresan etiket, bir epitop etiket, biyotin, bir kromofor etiket, bir ECL etiket ya da bir enzimdir.

36. İstem 35'teki antikor olup, burada etiket rutenyum, ^{111}In -DOTA, ^{111}In Indietilenetriaminpentaasetik asit (DTPA), yaban turpu peroksidaz, alkalın fosfataz ve beta-galaktosidaz, ya da poli-histidindir.

37. 11 - 21 arasındaki istemlerden herhangi birindeki yöntem olup, burada antikor ya da antijen bağlayan parçası katı bir desteğe sabitlenir.

38. 13 - 14 arasındaki istemlerden herhangi birindeki yöntem olup, ayrıca folat reseptör alfa ($\text{FR}\alpha$) ekspres eden adenokarsinomu olan bir denek için tercih edilen bir sonuç ön görmeyi de içerir, burada tercih edilen bir sonuç daha yüksek 5 yıllık hayatta kalma oranına sahip olmak olarak tanımlanmıştır.

TARİFNAME

ANTI-FOLAT RESEPTÖR ALFA ANTİKORLAR VE BUNLARIN KULLANIMI

BULUŞUN ALANI

Burada belirtilen konu folat reseptör alfa (FR α)-spesifik antikorları ile ilgilidir

5 ARKAPLAN

İnsanlarda, folat için yüksek çekimli reseptör dört izoform olarak gelir: alfa, beta, gamma ve delta. Alfa, beta ve delta formları tipik olarak hücre membranlarına bir glikosil fosfatidilinositol (GPI) bağlayıcısı ile bağlıdır. Bunlar hücre dışı ve endositik bölmeler arasında geri dönüşür ve folatı hücreye taşıyabilirler. Folat reseptörlerinin çözünebilir formları, 10 membrana bağlı folat reseptörlerindeki proteaz ya da fosfolipaz eylemi tarafından türetilir.

Folat reseptörü alfa (ayrıca FR α , FR-alfa, FOLR-1 ya da FOLR1 olarak da bilinir) çeşitli epitel dokularda ifade edilir, bunlara koroid pleksus, akciğer, tiroid, böbrek, rahim, göğüs, Fallop tüpü, epididim ve tükürük bezleri dahildir. Weitman, SD ve diğerleri., Cancer Res 52: 15 3396-3401 (1992); Weitman SD ve diğerleri, Cancer Res 52: 6708-6711 (1992). FR α 'nın aşırı okunması, akciğer kanseri (örn, karsinoid tümörler ve adenokarsinoma gibi küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri); mezotelyoma; yumurtalık kanseri; böbrek kanseri; beyin kanseri (örn, anaplastik epandimom, serebellar juvenil pilositik astrositom ve beyin metastazları); servikal kanser; nazofarengeyal kanser; mezodermal olarak türeyen tümör; baş ve boyunda 20 skuamöz hücre karsinomu; endometriyal kanser; papiller seröz ve endometrioid yumurtalık adenokarsinomları, yumurtalık seröz kistadenokarsinomları, göğüs kanseri; mesane kanseri; pankreas kanseri; kemik kanseri (örn., yüksek gradeli osteosarkoma); hipofiz kanseri (örn, hipofiz adenomları); kalın bağırsak kanseri ve meduller tiroid kanseri gibi çeşitli kanserlerde gözlenmiştir. Bkz. örn, ABD Patent No. 7.754.698; ABD. Patent Publication No. 25 2005/0232919; Intl. Publ. No. WO 2009/132081; Bueno R ve diğerleri, J of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 121(2); 225-233 (2001); Elkanat H & Ratnam M. Frontiers in Bioscience, 11, 506-519 (2006); Basal ve diğerleri, PLoS ONE, 4(7):6292 (2009); Fisher RE J Nucl Med, 49: 899-906 (2008); Franklin, WA ve diğerleri, Int J Cancer, Suppl 8: 89-95 (1994);

- Hartmann LC ve diğerleri, Int J Cancer 121: 938-942 (2007); Iwakiri S ve diğerleri, Annals of Surgical Oncology, 15(3): 889-899 (2008); European patent publication EP 2199796, Parker N. ve diğerleri, Analytical Biochemistry, 338: 284-293 (2005); Weitman, SD ve diğerleri, Cancer Res 52: 3396-3401 (1992); Saba NF ve diğerleri, Head Neck, 31(4): 475-481 (2009);
- 5 Yang R ve diğerleri, Clin Cancer Res 13: 2557-2567 (2007). Bazı kanser türlerinde (örn., baş ve boyunda skuamöz hücre karsinomu), yüksek seviyeli FR α okuması yetersiz prognoz ile ilişkilendirilir, oysa diğer kanser türlerinde (örn., küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri), yüksek seviyeli FR α okuması daha olumlu bir prognoz ile ilişkilendirilir. Bkz., örn, Iwakiri S ve diğerleri, Annals of Surgical Oncology, 15(3): 889-899; Saba NF ve diğerleri, Head Neck,
- 10 31(4): 475-481 (2009).
- Smith ve diğerleri tarafından yayınlanan, Hybridoma, vol 26, no. 5, 2007-10 pg 281-288'de folat reseptör alfa'yı saptayabilecek bir monoklonal antikor açıklanmaktadır.

- Kanserin daha erken evrede saptanması, hayatta kalma oranlarını ve yaşam kalitesini artırmaktadır. Erken teşhis ve tedavi olasılığını artırmak için, FR α -okunan
- 15 kanserlerin tanısında ve mevcut FR α -okunan kanserlerin izlenmesinde invazif olmayan yöntemler zorunlu ihtiyaçtır.

ÖZET

- Burada, FR α 'ya özellikle bağlanan antikorlar sunulmuştur. Ayrıca verilen antikorları kodlayabilen ilgili nükleotidler, verilen antikorları ekspres eden hücreler, yanı sıra
- 20 ilişkili vektörler ve saptanabilir antikor etiketleri de açıklanmıştır. Ek olarak verilen antikorların kullanım yöntemleri açıklanmıştır. Örneğin, verilen antikorlar kanser tanısında; ilerleyen, gerileyen ya da stabil kanser takibinde; söz konusu kanser için bir prognoz geliştirmede; bir hastanın kanser tedavisi alması gerekip gerekmediğini belirlemede, ya da bir deneğin FR α -okunan bir
- 25 kansere yakalanıp yakalanmadığını, bu yüzden de FR α -spesifik kanser önleyici terapötiklere uygun olup olmadığını belirlemede kullanılabilir.

Mevcut buluşun bir yönünde, izole bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası sunulmaktadır, folat reseptör alfa (FR α) için spesifik olan bu antikor amino asit dizilimi SEQ ID NO: 26 içeren bir hafif zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 27 içeren

bir hafif zincir CDR2, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 28 içeren bir hafif zincir CDR3, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 30 içeren bir ağır zincir CDR1, amino asit dizilimi SEQ ID NO: 31 içeren bir ağır zincir CDR2 ve amino asit dizilimi SEQ ID NO: 32 içeren bir ağır zincir CDR3 içerir.

5 Mevcut buluşun ikinci bir yönünde, bir antikor kodlayan, folat reseptör alfa (FR α) için spesifik, izole bir polinükleotid ya da bunun antijen bağlayan bir parçası sunulmaktadır, burada kodlanan antikorun hafif zincir CDR1'i amino asit dizilimi SEQ ID NO: 26, kodlanan antikorun hafif zincir CDR2'si amino asit dizilimi SEQ ID NO: 27, kodlanan antikorun hafif zincir CDR3'ü amino asit dizilimi SEQ ID NO: 28, kodlanan antikorun ağır zincir CDR1'i amino asit dizilimi SEQ ID NO: 30, kodlanan antikorun ağır zincir CDR2'si amino asit dizilimi SEQ ID
10 NO: 31, kodlanan antikorun ağır zincir CDR3'ü amino asit dizilimi SEQ ID NO: 32'yi içerir.

Mevcut buluşun üçüncü bir yönünde, istem 5 - 6 arasındaki istemlerden herhangi birindeki izole polinükleotidi içeren bir vektör sunulur.

Mevcut buluşun dördüncü bir yönünde, istem 7'deki vektörü içeren bir rekombinant hücre sunulur.

15 Mevcut buluşun beşinci bir yönünde, katılım numarası PTA-11885 olan bir ATCC ile bırakılan hücre hattı tarafından üretilen folat reseptör alfa (FR α) için spesifik bir izole antikor sunulmaktadır.

Mevcut buluşun bir altıncı yönünde, bir biyolojik örnekte, numuneyi 1 - 10 arasındaki istemlerde yer alan antikora ya da bunun antijen bağlayan bir parçasına maruz bırakmak ve
20 folat reseptör alfa (FR α)'yı belirlemekten oluşan folat reseptör alfa (FR α) ya da FR α -okunan bir kanseri saptama yöntemi sunulmaktadır.

Mevcut buluşun bir yedinci yönünde, bir denekte folat reseptör alfa-okunan bir kanserin tanısına yönelik olan ve şunları içeren bir yöntem sunulmaktadır:

- a. denekten alınan bir biyolojik örneği istem 1 ya da istem 10'daki antikora ya da
25 bunun antijen bağlayan bir parçasına maruz bırakmak;
- b. örnekte mevcut folat reseptör alfa (FR α) miktarını belirlemek;

c. örnekte mevcut folat reseptör alfa ($FR\alpha$) miktarı ile bilinen bir standardı karşılaştırmak; ve

d. denegin folat reseptör alfa ($FR\alpha$) seviyelerindeki düşüşü, kanser ile ilişkilendirilen folat reseptör alfa ($FR\alpha$) seviyeleri dahilinde belirlemek.

5 Mevcut buluşun bir sekizinci yönünde, bir denekte folat reseptör alfa-okunan bir kanserin takibine yönelik olan ve şunları içeren bir yöntem sunulmaktadır:

a. denekten alınan bir biyolojik örneği istem 1 ya da istem 10'daki antikora ya da bunun antijen bağlayan bir parçasına maruz bırakmak;

10 b. örnekte, antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası tarafından bağlanan mevcut folat reseptör alfa ($FR\alpha$) miktarını belirlemek;

c. örnekte mevcut folat reseptör alfa ($FR\alpha$) miktarı ile

i. bilinen bir standardı ya da

ii. daha önceki bir zaman noktasında yer alan bir denekten alınan bir biyolojik örnekle karşılaştırmak; ve

15 d. denegin folat reseptör alfa ($FR\alpha$) seviyelerinin kanserin ilerlemesi, gerilemesi ya da stabil olmasına yönelik bir gösterge olup olmadığını belirlemek.

Mevcut buluşun bir dokuzuncu yönünde, bir biyolojik örnekte folat reseptör alfanın ($FR\alpha$) varlığını saptamaya yönelik ve istem 1 ya da istem 10'daki antikorlardan en az birini ya da bunların antijen bağlayan bir parçasını içeren bir kit sunulmaktadır.

20 Mevcut buluşun bir onuncu yönünde, bir biyolojik örnekte folat reseptör alfanın ($FR\alpha$) varlığını saptamaya yönelik ve şunları içeren bir kit sunulmaktadır:

istem 1 ya da istem 10'daki antikordan en az biri ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

burada dahil edilen antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası katı bir desteğe

sabitlenmiştir.

Mevcut buluşun bir on birinci yönünde, bir biyolojik örnekte folat reseptör alfanın (FR α) varlığını saptamaya yönelik ve şunları içeren bir kit sunulmaktadır:

- 5 istem 1 ya da istem 10'daki antikordan en az biri ya da bunun antijen bağlayan bir parçası; burada dahil edilen antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası saptanabilecek şekilde etiketlenmiştir.

Folat Reseptör Alfa (FR α)-Spesifik Antikorlar

- 10 Burada, özellikle FR α 'ya bağlanan izole antikorlar ve antijen bağlayan parçalar açıklanmıştır. Bazı düzeneklerde antikorlar ve antijen bağlayan parçalar murin IgG ya da bunun türevleridir.

- 15 Burada, özellikle FR α 'ya yerleşik, indirgenmemiş ya da kimyasal olarak korunan bir formda bağlanan izole antikorlar ve antijen bağlayan parçalar açıklanmaktadır. Bazı düzeneklerde antikorlar ve antijen bağlayan parçalar murin IgG ya da bunun türevleridir. Antikorlar ve antijen bağlayan parçalar insan, insanlaştırılmış ya da kimerik olabilir, ancak burada örneklendirilen antikorlar ve antijen bağlayan parçalar murindir.

- 20 Açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan amino asit dizilimini içeren bir hafif zincir değişken ortamı olabilir: 29. Bazı düzeneklerde, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan bir dizilim içeren bir izole polinükleotid: 61, bu hafif zincir değişken ortam amino asit dizilimini kodlayabilir.
- 25 Açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan amino asit dizilimini içeren bir ağır zincir değişken ortamı olabilir: 33. Bazı düzeneklerde, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan bir dizilim içeren bir izole polinükleotid: 65, bu ağır zincir değişken ortam amino asit dizilimini kodlayabilir.
- Açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar, bir hafif ve bir ağır zincir değişken ortamı içerebilir, burada hafif zincir değişken ortamı, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan amino asit dizilimini: 29, ve ağır zincir değişken ortamı, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan amino asit dizilimini içerir: 33. Bazı düzeneklerde 26B3.F2

(26B3) antikoru ya da bunun antijen bağlayan parçaları verilmiştir, bu antikor yerleşik, indirgenmemiş ya da kimyasal olarak korunan FR α formlarını bağlayabilir.

Bazı düzeneklerde 26B3 antikoru, American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) tarafından 19 Mayıs 2011'de Katılım

- 5 Numarası PTA-11885 ile depolanan antikor üreten hücreler tarafından üretilmiştir. Bazı düzeneklerde antikorlar ya da bunların antijen bağlayan parçaları, depolanan antikor üreten hücreler tarafından üretilen antikorların FR α 'sı için bir bağlama çekimine sahiptir. Bazı düzeneklerde açıklanan antikorlar ya da bunların antijen bağlayan parçaları, depolanan antikor üreten hücreler tarafından üretilen antikorların hafif ve ağır zincir CDR'lerini içerir.
- 10 Bazı düzeneklerde antikorlar ya da bunların antijen bağlayan parçaları, depolanan antikor üreten hücreler tarafından üretilen antikorların hafif ve ağır zincir değişken bölgelerini içerir.

Ayrıca, FR α 'nın özellikle yerleşik, indirgenmemiş ya da kimyasal olarak korunan formlarına bağlanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar kodlayan polinükleotidler açıklanmıştır. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük

15 oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR1 dizilimine sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 26, örneğin EQ ID NO: 58. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR2'ye sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 27, örneğin SEQ ID NO: 59 Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir

20 hafif zincir CDR3'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını SEQ ID NO: 28, örneğin SEQ ID NO: 60. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 30, örneğin SEQ ID NO: 62. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR2'ye sahip bir antikor ya da bunun

25 antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 31, örneğin SEQ ID NO: 63. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR3'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 32, örneğin SEQ ID NO: 64. Polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 26, örneğin EQ ID NO: 58; bir

30 CDR2'ye sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 27, örneğin SEQ

ID NO: 59; ve bir CDR3'e sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 28, örneğin SEQ ID NO: 60. Polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 30, örneğin SEQ ID NO: 62; CDR2'ye sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 31, örneğin SEQ ID NO: 63; CDR3'e sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 32, örneğin SEQ ID NO: 64. Polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 26, örneğin SEQ ID NO: 58; bir nükleotid dizilimi ile kodlanan CDR2'ye sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 27, örneğin SEQ ID NO: 59; ve bir nükleotid dizilimi ile kodlanan CDR3'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçasını: SEQ ID NO: 28, örneğin SEQ ID NO: 60; bir ağır zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 30, örneğin SEQ ID NO: 62; CDR2'ye sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 31, örneğin SEQ ID NO: 63; CDR3'e sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 32, örneğin SEQ ID NO: 64. CDR'lerin antijen bağlayan düzenlemeleri ayrıca CDR iskelesi olarak antikor benzeri proteinler kullanılarak tasarlanabilir. Bu gibi tasarlanan antijen bağlayan proteinler açıklamanın kapsamı dahilindedir.

Burada açıklanan polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir amino asit dizilimi içeren bir hafif zincir değişken ortam segmentine sahip antikorları ya da bunların antijen bağlayan parçalarını kodlayabilir: SEQ ID NO: 29, örneğin SEQ ED NO: 61. Bazı düzeneklerde açıklanan polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir amino asit dizilimi içeren bir ağır zincir değişken ortam segmentine sahip antikorları ya da bunların antijen bağlayan parçalarını kodlayabilir: SEQ ID NO: 33, örneğin SEQ ID NO: 65. Bazı düzeneklerde açıklanan polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir amino asit dizilimi içeren bir hafif zincir değişken ortam segmentine sahip antikorları ya da bunların antijen bağlayan parçalarını kodlayabilir: SEQ ID NO: 29, örneğin SEQ ID NO: 61, ve ağır zincir değişken ortam segmenti, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan amino asit dizilimini içerir: 33, örneğin SEQ ID NO: 65. Burada açıklanan değişken ortam segmentleri kodlayabilen polinükleotidler, bir antikor ya da antijen bağlayan parçalar üretmek için aynı ya da farklı vektörleri içerebilir. Burada açıklanan polinükleotidler, yerleşik,

indirgenmemiş ya da kimyasal olarak korunan FR α formlarını bağlayabilen 26B3 antikorunu ya da antijen bağlayan parçalarını kodlayabilir.

Antikor ve antijen bağlayan parçalarını kodlayan polinükleotidler içeren vektörler, özellikle FR α 'ya bağlanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar ekspres eden hücreler olarak sunulmuştur. Ayrıca açıklanan vektörleri ekspres edebilen hücreler de sunulmuştur. Bu hücreler memeli hücreler (CHO-K1 hücreleri gibi), böcek hücreleri (Sf7 hücreleri gibi), maya hücreleri, bitki hücreleri ya da bakteri hücreleri (E. coli gibi) olabilir. Açıklanan antikorlar ayrıca burada açıklandığı üzere hibridom hücreleri ile üretilir.

Kanser Tanı Yöntemleri

Burada, bir denekte, epitel kökenli göğüs, tiroid, kalın bağırsak, endometriyal, fallop tüpü, yumurtalık ya da akciğer kanseri tanı yöntemleri sunulmuştur. Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler, denekten alınan bir örnekte mevcut FR α seviyesini belirleyerek; ve gözlenen FR α seviyesini bir kontrol örneğindeki FR α seviyesi ile karşılaştırarak bir deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanıp yakalanmadığını belirlemeyi de içerir, burada denekten alınan örnekteki FR α seviyesi ile kontrol örneğindeki FR α seviyesi arasındaki fark, deneğin FR α -ekspres eden bir kansere yakalanıp yakalanmadığına dair bir göstergedir.

Bazı düzeneklerde kontrol örneği FR α -ekspres eden kansere yakalanmamış bir denekten elde edilebilir. Bazı düzeneklerde kontrol örneği FR α -ekspres eden kansere yakalanmış bir denekten elde edilebilir. Kontrol örneğinin FR α -ekspres eden bir kansere yakalanmayan bir denekten alındığı bazı düzeneklerde, örnek içinde mevcut FR α miktarında, kontrol örneği için gözlenen miktara bağlı gözlenen bir artış, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalandığına ilişkin bir göstergedir. Kontrol örneğinin FR α -ekspres eden bir kansere yakalanmayan denekten alındığı bazı düzeneklerde, test örneği içinde mevcut FR α miktarında, kontrol örneği için gözlenen miktara bağlı gözlenen bir azalma ya da benzerlik, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanmadığına ilişkin bir göstergedir. Kontrol örneğinin FR α -ekspres eden bir kansere yakalanan denekten alındığı bazı düzeneklerde, test örneği içinde mevcut FR α miktarında, kontrol örneği için gözlenen miktara bağlı gözlenen bir benzerlik, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalandığına ilişkin bir göstergedir. Kontrol örneğinin FR α -ekspres eden bir kansere yakalanan denekten alındığı bazı düzeneklerde, test

örneği içinde mevcut FR α miktarında, kontrol örneği için gözlenen miktara bağlı gözlenen bir azalma, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanmadığına ilişkin bir göstergedir.

Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α seviyesi, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. Benzer yöntemler, bir deneğin, artan FR α üretimi ile ilişkilendirilmeyen kansere yakalanıp yakalanmadığını belirlemek için kullanılabilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreleri, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn., serbest hücreler), dokular (örn., cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklardan vb. türetilebilir.

Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler arasında, denekten alınan bir örnekte mevcut bir hücre ya da doku ile ilişkilendirilen FR α seviyesini belirleyerek; ve gözlenen FR α seviyesi ile bir kontrol örneğindeki FR α seviyesini karşılaştırarak bir deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanıp yakalanmadığını değerlendirmek de yer alır, burada denekten alınan örnekteki FR α seviyesi ile kontrol örneğindeki FR α seviyesi arasındaki fark, deneğin FR α -ekspres eden bir kansere yakalanıp yakalanmadığına dair bir göstergedir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α seviyesi, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreler, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn., serbest hücreler), dokular (örn., cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklar olabilir.

Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler, denekten alınan bir örnekte mevcut ve bir hücre ya da bir doku ile ilişkilendirilmeyen FR α seviyesini belirleyerek ve gözlenen FR α seviyesini bir kontrol örneğindeki FR α seviyesi ile karşılaştırarak bir deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanıp yakalanmadığını belirlemeyi de içerir, burada denekten alınan örnekteki FR α seviyesi ile kontrol örneğindeki FR α seviyesi arasındaki fark, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanıp yakalanmadığına ilişkin bir göstergedir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α seviyesi, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, histolojik hazırlıklar vb. olabilir.

Açıklanan yöntemlerin çeşitli düzeneklerinde kanser, FR α -ekspres eden bir kanser olabilir. Belirli bir düzenekte FR α -ekspres eden kanser yumurtalık kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser endometriyal kanser olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser kolon kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser göğüs kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser tiroid kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser fallop tüpü kanseri olabilir. Başka bir düzenekte, FR α -ekspres eden kanser, adenokarsinom gibi küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir. Alternatif olarak, açıklanan yöntemler, skuamöz hücre karsinomu gibi FR α ekspres etmeyen kanseri tanımlamak için kullanılabilir. Örneğin, açıklanan yöntemler, adenokarsinom gibi FR α -ekspres eden akciğer kanserini, skuamöz hücre karsinomu gibi FR α ekspres etmeyen bir akciğer kanserinden ayırt etmek için kullanılabilir. Açıklanan yöntemler, fibroadenom gibi FR α ekspres eden bir göğüs kanserini, sistosarkom gibi FR α ekspres etmeyen bir göğüs kanserinden ayırt etmek için kullanılabilir. Ayrıca, açıklanan yöntemler, papiller karsinom gibi FR α ekspres eden bir tiroid kanserini, meduller karsinom gibi FR α ekspres etmeyen bir tiroid kanserinden ayırt etmek için kullanılabilir. Burada açıklanan bazı düzeneklerde, bir denekte FR α -ekspres eden kanser hücrelerinin saptanması deneğin, FR α 'ya karşı yönlendirilen bir terapötik madde ile tedavi edilebileceğini belirlemek için kullanılabilir. Bazı düzeneklerde, FR α 'ya karşı yönlendirilen terapötik madde Farletuzumab gibi bir antikor olabilir.

Çeşitli yönlerde, FR α seviyesi, FR α bağlayan antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını içeren örneğin temas ettirilmesi ile belirlenir. Bazı düzeneklerde, örnek, FR α bağlayan birden fazla antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. Bazı düzeneklerde, örnek, FR α 'ya bağlanan bir birinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ve ardından FR α 'ya bağlanan bir ikinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. İki antikor kullanıldığında antikorlardan biri 1 - 3 arasındaki istemlerden herhangi birinde tanımlandığı gibidir ve ikinci antikor şunları içeren bir gruptan seçilir:

(a) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri olarak aynı epitopa bağlanan herhangi bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

(b) antikor;9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3arasından herhangi biri ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

(c) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasında herhangi birinin ağır ve hafif zincir CDR'lerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan
5 bir parçası

(d) Tablo 1'de açıklandığı üzere, antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi birinin ağır zincir değişken ortam segmentini ve hafif zincir değişken ortam segmentini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası; ya da

(e) ATCC katılım numarası PTA-11887, PTA-11884, PTA-, 11886, ya da FFA-
10 11885ile depolanan hücre dizilerinden herhangi biri tarafından üretilen antikorun amino asit dizilimine sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası.

Belirli düzeneklerde, FR α seviyesi western blot analizi, radyoimmünoassay, immünoflüorimetri, immünopresipitasyon, denge diyalizi, immunodifüzyon, elektrokemilüminesans (ECL) immünoassay, immünohistokimya, flüoresans ile etkinleştirilen
15 hücre sınıflandırma (FACS) ya da ELISA assay ile belirlenir.

Buluşun daha önce bahsedilen yönlerinin çeşitli düzeneklerinde, kontrol örneği, sağlıklı bir deneğin standartlaştırılmış FR α kontrol seviyesidir. Diğer düzeneklerde kontrol örneği, bilinen bir konsantrasyondaki at (örn. rekombinant ya da saflaştırılmış bir FR α protein örneği) FR α proteini olabilir. Bazı düzeneklerde, test edilen deneğin gözlenen FR α -
20 seviyeleri, FR α -ekspres eden kansere yakalanmış ya da bilinen FR α konsantrasyonlarına sahip deneklerden alınan örneklerde gözlenen FR α seviyeleri ile karşılaştırılabilir.

Kanser Takip Yöntemleri

Burada, bir denekte FR α -ekspres eden kanseri izlemeye yönelik yöntemler sunulmuştur. Açıklanan yöntemler kanser tedavisinden önce, kanser tedavisinden sonra, ya
25 da kanser tedavisinden hem önce hem de sonra kullanılabilir. Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler arasında, denekten alınan test örneğinde mevcut FR α seviyesini belirleyerek; ve gözlenen FR α seviyesini denekten daha önce alınan bir örnekteki FR α seviyesi ile

karşılaştırarak FR α -ekspres eden kanserin ilerlemesini, gerilemesini ya da stabil kalmasını değerlendirme de yer alır, burada test örneği ile daha önceki örneğin FR α seviyesi arasındaki fark kanserin ilerlemesi, gerilemesi ya da stabil kalmasına ilişkin bir göstergedir. Bu açıdan, önceki örnek için gözlenen seviyelere göre yüksek FR α seviyesine sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir ilerleme göstergesi olabilir. Tersine, önceki örnek için gözlenen seviyelere göre düşük FR α seviyesine sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir gerileme göstergesi olabilir. Bu doğrultuda, önceki örnek için gözlenen seviyelerle test örneğindeki FR α seviyesi arasındaki önemsiz bir fark, FR α -ekspres eden bir kanser için bir stabil durum göstergesi olabilir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α seviyesi, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreler, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn. serbest hücreler), dokular (örn., cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklardan vb. türetilir.

Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler arasında, denekten alınan test örneğinde mevcut, bir hücre ya da doku ile ilişkilendirilen FR α seviyesini belirleyerek; ve gözlenen FR α seviyesini denekten daha önce benzer şekilde alınan bir örnekteki FR α seviyesi ile karşılaştırarak FR α -ekspres eden kanserin ilerlemesini, gerilemesini ya da stabil kalmasını değerlendirme de yer alır, burada test örneği ile daha önceki örneğin FR α seviyesi arasındaki fark kanserin ilerlemesi, gerilemesi ya da stabil kalmasına ilişkin bir göstergedir. Bu açıdan, önceki örnek için gözlenen seviyelere göre yüksek FR α seviyesine sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir ilerleme göstergesi olabilir. Tersine, önceki örnek için gözlenen seviyelere göre düşük FR α seviyesine sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir gerileme göstergesi olabilir. Bu doğrultuda, önceki örnek için gözlenen seviyelerle test örneğindeki FR α seviyesi arasındaki önemsiz bir fark, FR α -ekspres eden bir kanser için bir stabil durum göstergesi olabilir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α seviyesi, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek dolaşım hücreleri, dolaşımdaki tümör hücreleri, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn., serbest hücreler), dokular (örn., cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklar olabilir.

Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler arasında, denekten alınan test örneğinde mevcut, bir hücre ya da doku ile ilişkilendirilmeyen FR α seviyesini belirleyerek; ve gözlenen FR α seviyesini denekten daha önce benzer şekilde alınan bir örnekteki FR α seviyesi ile karşılaştırarak FR α -ekspres eden kanserin ilerlemesini, gerilemesini ya da stabil kalmasını değerlendirme de yer alır, burada test örneği ile daha önceki örneğin FR α seviyesi arasındaki fark kanserin ilerlemesi, gerilemesi ya da stabil kalmasına ilişkin bir göstergedir. Bu açıdan, önceki örnek için gözlenen seviyelere göre yüksek FR α seviyesine sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir ilerleme göstergesi olabilir. Tersine, önceki örnek için gözlenen seviyelere göre düşük FR α seviyesine sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir gerileme göstergesi olabilir. Bu doğrultuda, önceki örnek için gözlenen seviyelerle test örneğindeki FR α seviyesi arasındaki önemsiz bir fark, FR α -ekspres eden bir kanser için bir stabil durum göstergesi olabilir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α seviyesi, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, histolojik hazırlıklar vb. olabilir.

Açıklanan yöntemlerin çeşitli düzeneklerinde kanser, FR α -ekspres eden bir kanser olabilir. Belirli bir düzenekte FR α -ekspres eden kanser yumurtalık kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser endometriyal kanser olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser kolon kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser göğüs kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser tiroid kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser fallop tüpü kanseri olabilir. Başka bir düzenekte, FR α -ekspres eden kanser, adenokarsinom gibi küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir.

Çeşitli yönlerde, FR α seviyesi, FR α bağlayan antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını içeren örneğin temas ettirilmesi ile belirlenir. Bazı düzeneklerde, örnek, FR α bağlayan birden fazla antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. Bazı düzeneklerde, örnek, FR α 'ya bağlanan bir birinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ve ardından FR α 'ya bağlanan bir ikinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. İki antikor kullanıldığında, antikorlardan biri, 1 - 3 arasındaki istemlerden herhangi birindeki gibi tanımlanır, ve ikinci antikor şunları içeren gruptan seçilir:

(a) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri olarak aynı epitopa bağlanan herhangi bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

(b) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

(c) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi birinin ağır ya da hafif zincir CDR'lerini içeren herhangi bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası.

Belirli düzeneklerde, FR α seviyesi western blot analizi, radyoimmünoassay, immünoflüorimetri, immünopresipitasyon, denge diyalizi, immunodifüzyon, elektrokemilüminesans (ECL) immünoassay, immünohistokimya, flüoresans ile etkinleştirilen hücre sınıflandırma (FACS) ya da ELISA assay ile belirlenir.

Özetlenen konunun ek yönleri ayrıntılı açıklamada, verilen örneklerde ve ilişkilendirilen şekillerde daha fazla ayrıntı ile verilmiştir.

15 ÇİZİMLERİN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş istemlerde tanımlanmıştır. İstemlerin kapsamı dışında kalan tüm rakamlar yalnızca referans olarak verilmiştir ve buluşun bir parçası değildir.

Şekil 1'de FR α 'nın SDS-PAGE ile indirgenmeyen koşullar altındaki geçiş modelleri resmedilmiştir, FR α yerleşik (şerit 2) ya da indirgenmiş ve alkilatlı (şerit 3) formda değerlendirilmiştir.

Şekil 2'de FR α 'nın amino asit artıkları resmedilmiştir (SEQ ID NO: 1) bu artıklar, hidrojen/döteryum değişim kütle spektrometrisi ve yanalıtma yöntemleri ile ön görüldüğü üzere monoklonal antikorlar 9F3, 24F12 ve 26B3 için epitopları (gölgeli bölgeler) içerir.

Şekil 3'te saflaştırılmış rekombinant (A) ve tam hücre lizatlarının (B), SDS-PAGE jelleri üzerinde çalışan FR α ya da FR homologları FR β , FR γ ya da FR δ ekspres eden CHO hücrelerinin dört western blot'u gösterilmiştir. Proteinler örnek tamponunda, indirgeme

maddesi ile ya da olmadan hazırlanmıştır. Sırasıyla, panel A, şerit 1, moleküler ağırlık işaretçileri, şerit 2-5. 0,5 µg indirgenmiş FRα, FRβ, FRII, ve FRA; şerit 6, boş; sırasıyla şeritler 7-10, 0,5 µg indirgenmemiş FRα, FRβ, FRII ve FRA. Pozitif bant yalnızca her şeritteki reaktif türleri temsil eder ve -38kDa'lık bir moleküler ağırlığa karşılık gelir, Panel B, şerit 1 moleküler ağırlık işaretçileri, şerit 2 CHO- FRα, şerit 3, CHO-FRβ, şerit 4 CHO- FRA, bir SDS-PAGE jelinde indirgeme maddeleri olmadan ve bölümlendirilmiş örnek tamponunda hazırlanan tam hücre lizatları. Her panel sağda etiketli belirtilen anti-FRα mAb ile proplanmıştır. FR moleküler ağırlıkları: FRα ~38kDa;FRβ -30kDa;FRII ~28kDa; FRA ~26kDa. Denatüre ve indirgenmemiş ya indirgenmiş koşullar altında FRα tanıyan LK26 ve BN3.2 antikorları, sırasıyla, pozitif kontroller olarak kullanılmıştır.

Şekil 4'te, monoklonal antikor 26B3 ile FRα varlığı için proplanan, formalin ile sabitlenen, parafine-gömülü papiller seröz yumurtalık kanseri doku örneği gösterilmiştir.

Şekil 5'te normal dokulardaki FRα ekspresyonu gösterilmiştir. Antikor 26B3 ile boyanan normal akciğer (A) ve böbrek (B) örnekleri, FRα ekspresyonunun büyük oranda epitelyal hücrelerle sınırlı olduğunu ve ağırlıklı olarak apikal dağılıma sahip olduğunu göstermektedir (görseller 20 kat büyütülmüştür).

Şekil 6'da antikor 26B3 ya da antikor BN3.2 kullanılarak üretilen akciğer adenokarsinomunun M-skorlarını karşılaştıran bir grafik sunum verilmiştir.

Şekil 7'de küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunun histolojik alt türlerinin FRα boyaması gösterilmiştir: (A) akciğer adenokarsinomu 20x, (B) akciğer adenokarsinomu 40x, (C) akciğer adenoskuamöz 20x ve (D) akciğer skuamöz hücre karsinomu 40x'tir.

Şekil 8'de antikor 26B3 ile boyanan kopya akciğer adenokarsinom örnekleri (çekirdekler) için M-skorlarını karşılaştıran bir grafik sunum verilmiştir.

Şekil 9'da akciğer adenokarsinom ve skuamöz hücre karsinomun FRα dağılımı için M-skoru tesmedilmiştir. Ortalama M-Skorları sırasıyla 19,84 (±18,64) ve 1,39 (±5,54) olarak belirlenmiştir (p<0,0001).

Şekil 10'da üç akciğer adenokarsinomu ince iğne aspirasyon (FNA) örneği (A), (B) ve (C)'nin FR α ekspresyonu gösterilmiştir. Hücre bloğu materyalinin antikor 26B3 ile lenf düğümü FNA'lardan boyanması, başarılı FR α boyamada, bir apikal dağılım ile epitelyal hücrelerle sınırlı ekspreson gösterilmiştir.

5 **Şekil 11'**de antikor 26B3 kullanılarak doku örneklerinde yapılan immünohistokimyasal analize göre FR α pozitif ve FR α negatif olduğu varsayılan akciğer adenokarsinomu olan denekler için hayatta kalma işlevleri (ölüm ya da sensor) resmedilmiştir.

10 **Şekil 12'**de, (A) duktal karsinom in situ, (B)-(D) invazif duktal karsinom için antikor 26B3 ile boyanan temsili dokunun mikro dizilim (TMA) görselleri 20x ya da 40x büyütme ile gösterilmiştir.

Şekil 13'te 26B3 ile boyanarak belirlenen M-skorunun, göğüs kanseri örneğinin moleküler alt tür (her-2 (+) ve her-2'ye (-)) bağlı dağılımının bir grafik temsili verilmiştir.

15 **Şekil 14'**te (A-D), IV. evre, her2 negatif göğüs kanserlerinin, antikor 26B3 ile boyanan temsili histoloji örneklerinin 20x ya da 40x büyütmesi gösterilmiştir.

Şekil 15'te ince iğne aspirasyonu ile elde edilen motastaz göğüs kanseri örneklerinin antikor 26B3 ile boyanan temsili görselleri gösterilmiştir.

20 **Şekil 16'**da yumurtalık seröz karsinomda FR α ekspresyonu gösterilmiştir. (A) 3+ güçlü (sağ alan) ve 2+ orta membran boyaması (sol üst alan) 10x büyütme ile görülmektedir. (B), (A) ile aynı alanı 20x büyütmeyle göstermekte ve 3+ güçlü, kalın çevresel bir membran boyamasını (sağ alan) doğrulamaktadır. 2+ orta membran boyaması (sol üst alan), 3+'ya göre daha zayıf, ince bir boyamaya sahiptir ve çevresel ya da luminal sınırlarda lokalizedir. (C), 1+ zayıf membran boyamasının luminal sınırlarla sınırlı olduğunu göstermekte ve görünür olması için 40x büyütme gerektirmektedir. (D) Yumurtalık yüzey epitelyal hücreleri ve altındaki kortikal stromal hücreler tümüyle negatiftir (20x büyütme).

Şekil 17'de FR α ekspresyonunun luminal sınırlar ile sınırlandırıldığını göstermektedir, normal endometrium, zayıf 1+ ve orta 2+ yoğunlukta 40x büyütmedir (A). Güçlü (+3)

membran boyama, atipik kompleks hiperplazinin luminal sınırlarında, 20x büyütme (B) ile gözlemlenebilir.

Şekil 18'de derece 1 endometriyum adenokarsinomunun (A) luminal sınırlarında güçlü (+3) FR α membran boyaması gösterilmektedir. Ek olarak birçok tümör hücresinin 2+ ya da 3+ sitoplazmik boyaması (20x büyütme) vardır. FR α membran boyama (2+ ve 3+) derece 2 endometriyum adenokarsinomunun luminal sınırlarında mevcuttur; sitoplazmik boyama zayıftır (20x büyütme (B)). Derece 3 endometriyum adenokarsinomunun tümör hücrelerinin %50'si, 40x büyütmede zayıf sitoplazmik boyamaya sahip 3+ güçlü, çevresel boyama göstermektedir (C).

Şekil 19'da 80 metaplastik skuamöz hücre içeren ve 2+ ve 3+ FR α membran boyamaya ve 1+ ve 2+ FR α sitoplazmik boyamaya sahip skuamöz metaplazinin adenokarsinomu 20x büyütme (A) ile gösterilmektedir. Endometriyum tümör hücrelerinin şeffaf hücre karsinomu büyük düzensiz çekirdekler, belirgin çekirdekler ve bol şeffaf sitoplazmaya sahiptir. Bu tümör hücrelerinin çoğu, 40x büyütmede (B) 2+ ya da 3+ FR α membran boyamasına sahiptir.

Şekil 20'de siliyate ve siliyate olmayan normal fallop tüpü hücrelerinin, luminal ve lateral hücre sınırlarında (A) 3+ FR α membran boyamasına sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca sitoplazmik boyama da belirgindir (20x büyütme). (B) Stromada bol lenfosit ve plazma hücreli kronik salpenjit. Mukoza hücreleri, luminal sınırlarda 3+ FR α boyamayı korumaktadır (20x büyütme). (C) Derece 2 tübal seröz adenokarsinom tümör hücreleri kompleks papiller projeksiyonlar oluşturur ve luminal ve lateral hücre sınırlarında 3+ FR α membran boyaması gösterir, ayrıca sitoplazmik boyama da belirgindir (20x büyütme).

Şekil 21'de yumurtalık kortikal seröz/tübal kistleri resmedilmiştir. Astar hücreler 3+, güçlü membran ve sitoplazmik boyama göstermektedir (20x büyütme).

ÇİZİMLERDEKİ ÖRNEKLERİN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Aşağıdaki açıklama özellikle FR α 'ya bağlanan antikoları ve bunların antijen bağlayan parçalarını karakterize etmektedir. Ayrıca verilen antikoları ve antijen bağlayan parçaları kodlayabilen ilgili nükleotidler, verilen antikoları ve antijen bağlayan parçaları ekspres eden

hücreler, yanı sıra ilişkili vektörler ve saptanabilir antikor etiketleri de açıklanmıştır. Ek olarak verilen antikorların ve antijen bağlayan parçaların kullanım yöntemleri açıklanmıştır.

Örneğin, verilen antikorlar ve antijen bağlayan parçalar yumurtalık, göğüs, tiroid, kalın bağırsak, endometrial, fallop tüpü ya da akciğer kanseri tanısında; ilerleye, gerileyen ya da stabil yumurtalık, göğüs, tiroid, kalın bağırsak, endometrial, fallop tüpü ya da akciğer kanseri takibinde; bir hastanın kanser tedavisi alması gerekip gerekmediğini belirlemede, ya da bir deneğin FR α -okunan bir kansere yakalanıp yakalanmadığını, bu yüzden de FR α -spesifik kanser önleyici terapötiklere tabi olup olmadığını belirlemede kullanılabilir.

Tanımlar

- 10 Açıklamanın yönlerine ilişkin çeşitli terimler, teknik özellikler ve istemlerde kullanılmıştır. Bu gibi terimler, aksi belirtilmedikçe teknikte kullanılan kendi normal anlamlarında verilmiştir. Diğer özel olarak tanımlanmış terimler, burada verilen tanımlara tutarlı bir şekilde anlaşılacaktır.

- 15 Bu teknik özellikte ve eklenen istemlerde kullanıldığı şekilde, tekil belirtilimlerde kullanılan "bir" artikeli, içerik bunun tersini açık biçimde belirtmedikçe çoğul referansları da kapsar. Bu yüzden, örneğin "bir hücre" referansı iki ya da daha fazla hücrenin kombinasyonu vb. içerir.

- 20 Burada, bir miktar, geçici bir süre vb. ölçülebilir değerleri belirtmek için kullanıldığı şekliyle "yaklaşık" teriminden, belirtilen değer $\pm 10\%$ 'una kadar varyasyonlarını içerdiği anlaşılmalıdır, zira bu varyasyonlar açıklanan yöntemlerin gerçekleştirilmesi için uygundur. Aksi belirtilmedikçe, teknik özellikler ve istemlerde içeriğin miktarı, moleküler ağırlık gibi özellikler, reaksiyon koşulları vb. ifade etmek için kullanılan tüm rakamlar her durumda "yaklaşık" terimi ile değiştirilmiş olarak anlaşılacaktır. Buna göre, aksi belirtilmedikçe, aşağıdaki teknik özelliklerde ve ekteki istemlerde belirtilen sayısal parametreler, mevcut 25 buluş ile elde edilmek istenen özelliklere göre değişebilecek yaklaşık değerlerdir. En azından, ve eş değer doktrinin, istemlerin kapsamına uygulanmasına bir sınır teşkil etmemek üzere, her bir sayısal parametre en azından, rapor edilen önemli rakamlar ışığında ve sıradan yuvarlama teknikleri uygulanarak yorumlanacaktır.

Buluşun geniş kapsamını belirleyen sayısal aralıklar ve parametrelerin yaklaşık değerler olması ile birlikte, spesifik örneklerde belirtilen sayısal değerler olabildiğince hassas şekilde rapor edilmiştir. Ancak, tüm değerler, bunların ilgili test ölçümlerinde mevcut standart sapmalardan dolayı doğası gereği belirli hatalar içerecektir.

- 5 "İzole edilmiş" terimi, bir biyolojik bileşenin (örneğin bir nükleik asit ya da protein) içinde bileşenin doğal olarak oluştuğu organizmanın hücresinde, diğer kromozom ve ekstrakromozom DNA ve RNA ve proteinler gibi diğer biyolojik bileşenlerden belirgin şekilde ayrıldığı ya da saflaştırıldığı anlamına gelir. Bu yüzden "izole edilmiş" nükleik asitler, peptitler ve proteinler, standart saflaştırma yöntemleri ile saflaştırılan nükleik asitler ve proteinleri
- 10 içerir. "İzole edilmiş" nükleik asitler, peptitler ve proteinler bir kompozisyonun parçası olabilir ve bu gibi kompozisyonlar, yerleşik nükleik asit, peptit ya da protein ortamının bir parçası olmasa bile yine de izole olacaktır. Terim ayrıca, bir konak hücrede rekombinant ekspresyonla hazırlanan asitleri ve proteinleri, yanı sıra kimyasal olarak sentezlenen nükleik asitleri de kapsar.
- 15 "Polinükleotid" ya da eş anlamlısı "nükleik asit molekülü" ya da "nükleik asitler", değiştirilmemiş RNA ya da DNA veya değiştirilmiş RNA ya da DNA olabilecek herhangi bir poliribonükleotid ya da polideoksiribonükleotidi ifade eder. "Polinükleotidler", sınırlandırma olmaksızın tek ve çift sarmallı DNA, tek ve çift sarmallı bölümlerin bir karışımı olan DNA, tek ve çift sarmallı RNA, ve tek ve çift sarmallı bölgelerin bir karışımı olan RNA, tek sarmallı ya da
- 20 daha tipik olarak çift sarmallı veya tek ve çift sarmallı bölgelerin bir karışımı olabilecek DNA ve RNA'dan oluşan hibrit molekülleri içerir. Ek olarak, "polinükleotid" RNA ya da DNA veya hem RNA hem de DNA'dan oluşan üç sarmallı bölgeleri ifade eder. Polinükleotid terimi ayrıca bir ya da daha fazla değiştirilmiş taban içeren DNA'ları ya da RNA'ları ve stabilite veya diğer nedenlerle değiştirilmiş omurgaya sahip DNA'ları ya da RNA'ları da içerir.
- 25 "Değiştirilmiş" tabanlar, örneğin, tritilatlı tabanları ve inozin gibi sıra dışı tabanları içerir. DNA ve RNA'da çeşitli modifikasyonlar yapılabilir; böylece, "polinükleotid", polinükleotidlerin doğada tipik olarak bulunan kimyasal, enzimatik ya da metabolik olarak değiştirilmiş formlarını, yanı sıra virüslerin ve hücrelerin DNA ve RNA karakteristiklerinin kimyasal formlarını da içerir. "Polinükleotid" ayrıca, genellikle oligonükleotidler olarak anılan görece
- 30 kısa nükleik asit zincirlerini de sarar.

"Büyük oranda aynı" terimi terimin kullanıldığı bağlama göre farklılık gösterebilir.

Ağır ve hafif zincirler ve bunları kodlayan genler arasında doğal dizilim varyasyonları olabileceğinden, burada açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçaları kodlayan amino asit dizilimleri ya da genleri içinde, benzersiz bağlama özellikleri (örn, özgünlük ve çekim) üzerinde çok az ya da sıfır etkisi olan belli düzeyde varyasyon belirlenmesi beklenebilir. Bu gibi beklentiler kısmen genetik kodun dejenerasyonun yanı sıra geleneksel amino asit dizilim varyasyonlarının evrimsel başarısından kaynaklanmaktadır, ki bunlar, kodlanan proteinin doğasını gözle görülür derecede değiştirmez. Buna göre, nükleik asit dizilimleri bağlamında, "büyük oranda aynı" terimi iki ya da daha fazla dizilim arasında en az 65'lik bir benzerlik anlamına gelmektedir. Tercihen, terim, iki ya da daha fazla dizilim arasında en azından %70 benzerlik, daha tercihen en az %75 benzerlik, daha tercihen en az 80 benzerlik, daha tercihen en az 85 benzerlik, daha tercihen en az 90 benzerlik, daha tercihen en az 91 benzerlik, daha tercihen en az 92 benzerlik, daha tercihen en az 93 benzerlik, daha tercihen en az 94 benzerlik, daha tercihen en az 95 benzerlik, daha tercihen en az 96 benzerlik, daha tercihen en az 97 benzerlik, daha tercihen en az 98 benzerlik, daha tercihen en az %99 ya da daha fazla benzerliği ifade eder. Böyle bir benzerlik nBLAST algoritması (Altschul ve diğerleri, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-8; Karlin ve Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7) kullanılarak belirlenebilir.

Bir proteinin amino asit dizilimi içinde, proteinin işlevi üzerinde önemli bir etkisi olmadan oluşabilecek varyasyon derecesi, nükleik asit diziliminde olası varyasyondan çok daha düşüktür, zira amino asit dizilimleri için aynı dejenerasyon ilkeleri geçerli değildir. Buna göre, bir antikor ya da antijen bağlayan parça bağlamında, "büyük oranda aynı" terimi, açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar ile %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, 97, 98 ya da 99 benzerliğe sahip antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar anlamına gelir. Diğer düzenekler, burada açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar ile belirgin bir benzerlik paylaşmayan ama burada açıklanan bu gibi dizilimlere %90, %91, %92, %93, 94, 95, 96, %97, %98 ya da %99 benzer bağlar sunmak için gerekli bir ya da daha fazla CDR ya da diğer dizilimleri kullanan çerçeve, iskele ya da diğer bağlayıcı olmayan bölgelere sahip FR α spesifik antikorları ya da antijen bağlayan parçaları içerir.

Bir "vektör", içinde bir başka nükleik asit segmentinin, segmentin tekrarını ya da ekspresyonunu ortaya çıkaracak şekilde uygulanabilir olarak eklenebildiği plazmid, faj, kozmid ya da virüs gibi bir replikondur.

5 Bir hücre, ekzojen ya da heterolog nükleik asitler, örneğin DNA hücreye dahil edildiği zaman "dönüştürülmüştür". Dönüştürücü DNA, hücrenin genomuna entegre edilebilir (kovalent olarak bağlanabilir) ya da edilmeyebilir. Örneğin prokaryot, maya ve memeli hücrelerinde dönüştürücü DNA plazmit gibi epizomal bir bileşen üzerinde korunur. Ökaryotik hücrelerle ilgili olarak, stabil olarak dönüştürülmüş bir hücre, ya da "kararlı hücre" ökaryotik hücrenin, dönüştürücü DNA'yı içeren bir yavru hücreler popülasyonu içeren hücre dizileri ya 10 da klonları oluşturabilme kabiliyeti ile gösterilir. Bir "klon", tek bir hücreden ya da ortak atadan mitoz ile türetilen bir hücreler popülasyonudur. Bir "hücre dizisi", birçok nesil boyunca in vitro kararlı büyüme kabiliyeti olan bir birincil hücrenin bir klonudur. Burada sunulan bazı örneklerde, hücreler, hücrelere DNA verilmesi ile dönüştürülmüştür.

15 "Ekspres" ve "üretim" terimleri burada eş anlamlı kullanılmıştır ve bir gen ürününün biyosentezini ifade eder. Bu terimler bir genin RNA'ya transkripsiyonunu kapsar. Bu terimler ayrıca RNA'nın bir ya da daha fazla polipeptite translasyonunu ve ayrıca tüm doğal olarak oluşan post-transkripsiyonel ve post-translasyonel modifikasyonları da kapsar. Bir antikorun ya da bunun antijen bağlayan parçasının ekspresyonu ya da üretimi hücrenin sitoplasması içinde ya da bir hücre kültürünün büyüme ortamı gibi hücre dışı ortamına doğru olabilir.

20 "Tedavi etme" ya da "tedavi", bir yaralanma, patoloji ya da koşulun hafifletilmesi ya da iyileştirilmesinde herhangi bir başarı ya da başarı indisini ifade eder, bunlara herhangi bir nesnel ya da öznel parametre dahildir hafifleme; azalma; belirtilerin gerilemesi ya da koşulun hasta için daha tolere edilebilir hale getirilmesi, dejenerasyon ya da bozulma hızında yavaşlama, dejenerasyonun son noktasını daha hafif hale getirme, bir deneğin fiziksel ya da 25 zihinsel sağlığını iyileştirme ya da hayatta kalma süresini uzatma da dahildir. Tedavi nesnel ya da öznel parametrelere göre değerlendirilebilir; bunlara fiziksel muayene, nörolojik muayene ya da psikiyatrik değerlendirmeler dahildir.

"Antikor", aksi belirtilmedikçe, her bir izotipin çeşitli monomerik ve polimerik formları da dahil tüm immüno globülin izotiplerini (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD ve IgY) ifade eder.

Antijen bağlayan parçalar, belirli bir antijen için bağlama çekimi sergileyen herhangi bir proteinli yapı olabilir. Bazı antijen bağlayan parçalar, ana antikor molekülünün antijen bağlama özgülüğünü koruyan intakt antikor kısımlarından oluşur. Örneğin, antijen bağlayan parçalar en az bir değişken bölgeden (bir ağır zincir ya da hafif zincir değişken bölgesi) veya belirli bir antijene bağlandığı bilinen bir antikorun bir ya da daha CDR'sinden oluşabilir. Uygun antijen bağlayan parçaların örnekleri, sınır teşkil etmeksizin, diabodiler ve tek zincirli molekül, yanı sıra Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc ve Fv molekül, tek zincirli (Sc) antikorları, ayrı antikor hafif zincirleri, ayrı antikor ağır zincirleri, antikor zincirleri ya da CDR'ler ve diğer proteinler arasında kimerik füzyonlar, protein iskeleleri, ağır zincir monomerleri ya da dimerleri, hafif zincirleri monomerleri ya da dimerleri, bir ağır ve bir hafif zincirden oluşan dimerleri vb. içerir. Tüm antikor izotipleri antijen bağlayan parçalar üretmek için kullanılabilir. Ek olarak, antijen bağlayan parçalar, protein iskeleleri gibi ilgi alanındaki belirli bir antijen için çekim sağlayan bir oryantasyonda polipeptit segmentlerini başarıyla kullanan antikor olmayan proteinli çerçeveleri de içerebilir. Antijen bağlayan parçalar rekombinant olarak ya da intakt antikorların enzimatik ya da kimyasal klivajı ile üretilebilir. "Bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası" öbeği, belirli bir antijen bağlayan parçanın, öbekte atıfta bulunulan antikorun bir ya da daha fazla amino asit segmentini kullandığını belirtmek için kullanılabilir.

Antikorlar ya da antikor parçaları bağlamında kullanıldığında "spesifik bağlama" terimi, immünoglobülin genleri ya da immünoglobülin genlerinin parçaları tarafından, ilgi alanındaki bir proteinin bir ya da daha fazla epitopuna kodlanan, ancak karışık bir antijenik molekül popülasyonu içeren bir örnekteki diğer molekülleri büyük oranda tanımayan ya da bunlara bağlanmayan ortamlar aracılığıyla bağlanmayı temsil eder. Tipik olarak bir antikor, bir soydaş antijene, bir yüzey plazmon rezonans tayini ya da bir hücre bağlama tayini ile ölçülen 1x10⁻⁸ M'den daha düşük bir K_d ile bağlanır.

"Denek" terimi insan ya da tüm omurgalıları, {örn, insan olmayan primatlar, fareler, tavşanlar, koyunlar, köpekler, kediler, atlar, inekler, tavuklar, amfibiler ve sürüngenler gibi memeliler ve memeli olmayanlar) kapsayan insan olmayan hayvanları ifade eder. Açıklanan yöntemin birçok düzeneginde, denek bir insandır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "folat reseptör alfa" (ayrıca FR α , FR-alfa, FOLR-1 ya da FOLR1 olarak da anılır), folat için yüksek çekimli reseptörün alfa izoformunu ifade eder. Membrana bağlanan FR α , hücre yüzeyine bir glikosil fosfatidilinositol (GPI) bağlayıcısı ile bağlanır. FR α 'nın çözünebilir formları, folat reseptörlerine bağlanan proteaz ya da fosfolipaz

5 eylemi tarafından türetilebilir. İnsan FR α için amino asit dizilimi burada şu referansla gösterilmiştir: SEQ ID NO: 1. Varyantlar, örneğin doğal oluşan allelik varyantlar ya da en az bir amino asit ikamesi içeren dizilimler burada kullanılan terimlerin kapsamındadır. Teknikte uzman kişilerin de takdir edeceği üzere, insan FR α 'nın hücreyle ilişkilendirilen ve hücreyle ilişkilendirilmeyen formları SEQ ID NO: 1'in varyant formlarını içerebilir.

10 Burada kullanıldığı şekliyle "örnek" terimi, gerek denekten izole edilmiş gerekse denek içinde bulunan benzer sıvılar, hücreler ya da dokulardan (örn, cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu) oluşan bir koleksiyonu ifade eder. Bazı düzeneklerde örnek biyolojik bir sıvıdır. Biyolojik sıvılar tipik olarak fizyolojik sıcaklıklardaki sıvılardır ve bir denekte ya da biyolojik kaynakta mevcut, çekilen, ekspres

15 edilen ya da ekstrakt edilen doğal oluşan sıvılardır. Belirli biyolojik sıvılar belirli dokulardan, organlardan ya da lokalize bölgelerden türetilir ve diğer belirli biyolojik sıvılar daha genel anlamda ya da sistematik olarak bir denek ya da biyolojik kaynak içinde bulunabilir. Biyolojik sıvıların örnekleri arasında kan, serum ve serosal sıvılar, plazma, lenf, idrar, tükürük, kistik sıvı, göz yaşı, dışkı, balgam, salgı dokularının ve organlarının mukoza salgıları, vajinal salgılar,

20 katı olmayan tümörlerle ilişkilendirilen örnekleri gibi assit sıvılar, plöral, perikardiyal, peritoneal, abdominal ve diğer vücut kavitelerinin sıvıları, bronş lavajı ile toplanan sıvılar vb. yer alır.

Biyolojik sıvılar ayrıca, hücre ya da organ ile koşullandırılmış ortam, lavaj sıvıları vb. içeren hücre ve organ kültür ortamı gibi bir denek ya da biyolojik kaynak ile temas eden sıvı

25 çözeltilerini de içerir. Burada kullanıldığı şekliyle "örnek" terimi, bir denekten çıkartılan materyalleri ya da bir denek içinde yer alan materyalleri kapsar.

FR α -ekspres eden bir kanserin ilerlemesi bağlamında kullanılan "ilerleme" terimi, bir kanserin daha hafif bir durumdan daha ciddi bir duruma geçişini içerir. Bu, tümör sayısında ya da şiddetinde, metastaz derecesinde, kanserin büyüme ya da yayılma hızında vb. bir artışı

30 içerebilir. Örneğin, "yumurtalık kanserinin ilerlemesi" ifadesi, böyle bir kanserin daha hafif

bir durumdan daha ciddi bir duruma ilerlediği, örneğin I. evreden II. evreye ya da II evreden III. evreye vb. geçiş yaptığı anlamını içerir.

FR α -ekspres eden bir kanserin gerilemesi bağlamında kullanılan "gerileme" terimi, bir kanserin daha ciddi bir durumdan daha hafif bir duruma geçişini içerir. Bu, tümör sayısında ya da şiddetinde, metastaz derecesinde, kanserin büyüme ya da yayılma hızında vb. bir azalmayı içerebilir. Örneğin, "yumurtalık kanserinin gerilemesi" ifadesi, böyle bir kanserin daha ciddi bir durumdan daha hafif bir duruma gerilediği, örneğin III. evreden II evreye ya da II. evreden I. evreye vb. geçiş yaptığı anlamını içerir.

FR α ekspres eden kanserde durağanlık bağlamında kullanılan "stabil" terimi, klinik olarak ilgili bir süre zarfında kanserde bir ilerleme ya da kanserde bir gerileme olarak görülmesi için yeterince belirgin değişmemiş hiç değişmemiş bir hastalık koşulunu ifade etmek içindir.

Burada açıklanan düzenekler, belirli yöntemler, reaktifler, bileşikler, kompozisyonlar ya da biyolojik sistemler ile sınırlı değildir; bunlar doğal olarak değişebilir.

FR α -Spesifik Antikorlar ve Antijen Bağlayan Parçalar

Burada, özellikle FR α 'ya bağlanan izole monoklonal antikorlar ve antijen bağlayan parçalar açıklanmıştır. Antikor molekülünün genel yapısı, ağır ve hafif zincirleri içeren bir antijen bağlayan ortamdan ve tamamlayıcı fiksasyon ve bağlayıcı antikor reseptörleri gibi çeşitli işlevleri yerine getiren Fc ortamından oluşur.

Açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar, dört zincirli immünoglobülin yapısının tüm izotiplerini, IgA, IgD, IgE, IgG and IgM ve sentetik multimerlerini içerir. Açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar ayrıca genede tavuk ya da hindi serumunda ve tavuk ya da hindi yumurtası sarısında bulunan IgY izotipini de içerir.

Örnekler bölümünde açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar farelerden türetilmiştir. Benzer antikorlar rekombinant yollarla herhangi bir türden türetilabilir.

Örneğin, antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar kimerik sıçan, keçi, at, domuz, sığır, tavuk, tavşan, devegiller, eşek, insan vb. olabilir. İnsanlara verilmek üzere kullanım için, insan olmayan kökenden türetilen antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar, insan hastaya verildiğinde da az antijenik olmaları için genetik ya da yapısal olarak değiştirilebilir.

5 Bazı düzeneklerde antikorlar ve antijen bağlayan parçalar kimeriktir. Burada kullanıldığı şekliyle "kimerik" terimi, en az bir kısmı, insan olmayan bir memeli, bir kemirgen ya da bir sürüngenden türetilen en az bir değişken ortam içerirken, antikor ya da bunun antijen bağlayan parçalarının kalan kısımları bir insandan türetilen bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası anlamına gelir. Örneğin, bir kimerik antikor, bir insan Fc ya da bu
10 gibi diğer yapısal ortama sahip bir fare antijen bağlama ortamı içerebilir.

Bazı düzeneklerde antikorlar insanlaştırılmış antikorlardır. İnsanlaştırılmış antikorlar, insan olmayan immünoglobülininden türetilen minimal dizilim içeren kimerik immünoglobülinler, immünoglobülin zincirleri ya da bunun parçaları (örn, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ya da diğer antijen bağlayan antikor alt dizileri) olabilir. Esas olarak, insanlaştırılmış
15 antikorlar, insan immünoglobülinlerdir (alıcı antikor), burada alıcının bir tamamlayıcılık-belirleme bölgesinden (CDR) gelen artıklar, fare, sıçan ya da tavşan gibi insan olmayan bir türden (verici antikor) gelen, istenen özgünlük, çekim ve kapasiteye sahip bir CDR ile değiştirilir. Genel olarak insanlaştırılmış antikor, en az bir, ve tipik olarak iki, değişken ortamın büyük oradan tümünü içerecektir, burada CDR bölgelerini tümü ya da büyük oradan
20 tümü insan olmayan immünoglobulinin bölgelerine ve çerçeve bölgelerin tümü ya da büyük oranda tümü insan immünoglobulinin bölgelerine karşılık gelir. İnsanlaştırılmış antikor, bir immünoglobulin sabit bölgesinin (Fc), tipik olarak da bir insan immünoglobulinin en az bir kısmını içerebilir.

Burada açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar çeşitli formlarda oluşabilir,
25 ancak Tablo 1'de gösterilen antikor değişken ortam segmentlerini ya da CDR'lerin birini ya da daha fazlasını içerecektir. Tablo 1'de açıklanan antikorlarının izotipleri, her bir antikoru korumuş dizilimlere sahip olduğu bilinen sabit bölgesini açıklamak için parantez içinde gösterilmiştir. Tablo 1. Açıklanan antikorların ve bunların antijen bağlayan parçalarının antikor segmentleri ("Lc" hafif zinciri ve "Hc" ağır zinciri belirtir).

Antikor Segmenti	SEQ ID NO.	Dizilim
Monoklonal antikor 9F3 (murin IgG2a sabit bölgesi)		
Lc CDR1	2	RASSTVSYSYLH
Lc CDR2	3	GTSNLAS
Lc CDR3	4	QQYSGYPLT
Lc değişken ortam segmenti	5	PAIMSASPGEKVTMTCRASSTVSYSYLHWY QQKSGASPQLWIYGTSNLASGVPARFSGSG SGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPLT FGAGTKLELKRADAAP
Hc CDR1	6	SGYYWN
Hc CDR2	7	YIKSDGSNNYNPSLKN
Hc CDR3	8	EWKAMDY
Hc değişken ortam segmenti	9	ESGPGLVRPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWN WIRQFPGSRLEWMGYIKSDGSNNYNPSLKN RISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYFCTR EWKAMDYWGQGTSVTVSSAKTTPPSVYPL APGCGDT
Monoklonal antikor 19D4 (murin IgG2a sabit bölgesi)		
Lc CDR1	10	RASESVDITYGNNFIH
Lc CDR2	11	LASNLES
Lc CDR3	12	QQNNGDPWT
Lc değişken ortam segmenti	13	PASLAVSLGQRATISCRASESVDITYGNNFIH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS GSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNGDP WTFGGGKLEIKRADAAP
Hc CDR1	14	HPYMH
Hc CDR2	15	RIDPANGNTKYDPKFQG
Hc CDR3	16	EEVADYTMDY
Hc değişken ortam segmenti	17	GAELVKPGASVKLSCTASGFMKHPYMHVW KQRPDQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGK ATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCGR EEVADYTMDYWGQGTSVTVSSAKTTAPSV

		YPLAPV
Monoklonal antikor 24F12 (murin IgG1 sabit bölgesi)		
Lc CDR1	18	SASQGINNFLN
Lc CDR2	19	YTSSLHS
Lc CDR3	20	QHFSKLPWT
Lc değişken ortam	21	TSSLSASLGDRVTISCSASQGINNFLNWWYQQ KPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEPEDIAIYYCQHFSKLPWTFGGGT KLEIKRADAAP
Hc CDR1	22	SYAMS
Hc CDR2	23	EIGSGGSYTYYPDTVTVG
Hc CDR3	24	ETTAGYFDY
Hc değişken ortam	25	SGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSW VRQSPEKRLEWVAEIGSGGSYTYYPDTVTVG RFTISRDNAKSTLYLEMSSLRSEDTAIYYCA RETTAGYFDYWGQGTTTLTVSS
Monoklonal antikor 26B3 (murin IgG1 sabit bölgesi)		
Lc CDR1	26	RTSENIFFSYLA
Lc CDR2	27	NAKTLAE
Lc CDR3	28	QHHYAFPWT
Lc değişken ortam segmenti	29	PASLSASVGETVTITCRTSENIFFSYLAWYQQ KQGISPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT QFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYAFPWTFGG GSKLEIKRADAAP
Hc CDR1	30	GYFMN
Hc CDR2	31	RIFPYNGDTFYNQKFKG
Hc CDR3	32	GTHYFDY
Hc değişken ortam segmenti	33	GPELVKPGASVKISCKASDYSFTGYFMNWV MQSHGKSLEWIGRIFPYNGDTFYNQKFKGR ATLTVDKSSSTAHELMRLSLASEDSAVYFCA RGTHYFDYWGQGTTTLTVSSAKTTPPSVYPL APGSAAQT
Monoklonal antikor 9F3 (murin IgG2a sabit bölgesi)		

Lc CDR1	34	AGGGCCAGCTCAACTGTAAGTTACAGTTA CTTGAC
Lc CDR2	35	GGCACATCCAACTTGGCTTCT
Lc CDR3	36	CAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCACG
Lc değişken ortam segmenti	37	CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGA AAAGGTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCT CAACTGTAAGTTACAGTTACTTGCACTGGT ACCAGCAGAAGTCAGGTGCCTCCCCCAA CTCTGGATTTATGGCACATCCAACTTGGCT TCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGT GGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATC AGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCAC TTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCC ACTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGG AGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC
Hc CDR1	38	AGTGGTTATTACTGGAAC
Hc CDR2	39	TACATAAAGTCCGACGGTAGCAATAATT ACAACCCATCTCTCAAAAAT
Hc CDR3	40	GAGTGGAAAGGCTATGGACTAC
Hc değişken ortam segmenti	41	GAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAGACCTTC TCAGTCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTCAC TGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTACTG GAACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAGCA GACTGGAATGGATGGGCTACATAAAGTCC GACGGTAGCAATAATTACAACCCATCTCT CAAAAATCGAATCTCCATCACTCGTGACA CATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAAGTTGA ATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCTACA TATTTCTGTACAAGGGAGTGGAAGGCTAT GGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTCA CCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCA TCAGTCTATCCACTGGCCCCTGGGTGTGGA GATACAAC

Monoklonal antikor 19D4 (murin IgG2a sabit bölgesi)		
Lc CDR1	42	AGAGCCAGTGAAAGTGTTGATACTTATGG CA ATAATTTTATACAC
Lc CDR2	43	CTTGCATCCAACCTAGAATCT
Lc CDR3	44	CAGCAAAATAATGGGGATCCGTGGACG
Lc değişken ortam segmenti	45	CCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG AGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGA AAGTGTTGATACTTATGGCAATAATTTTAT ACACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGC CACCCAAACTCCTCATTATCTTGCATCCA ACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTT AGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCAC CCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGA TGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATA ATGGGGATCCGTGGACGTTCCGTGGAGGC ACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCTGATGC TGCACCAA
Hc CDR1	46	CACCCCTATATGCAC
Hc CDR2	47	AGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAA AT ATGACCCGAAGTTCCAGGGC
Hc CDR3	48	GAGGAGGTGGCGGACTATACTATGGACTA C
Hc değişken ortam segmenti	49	GGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTC AGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTT CAACATTAAACACCCCTATATGCACTGGG TGAAGCAGAGGCCTGACCAGGGCCTGGAG TGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGG TAATACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGG GCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCC TCCAACACAGCCTACCTACAGCTCAGCAG CCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTA CTGTGGTAGAGAGGAGGTGGCGGACTATA CTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCA

		GTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGC CCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCTGTGTG
Monoklonal antikor 24F12 (murin IgG1 sabit bölgesi)		
Lc CDR1	50	AGTGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTTTT AAAC
Lc CDR2	51	TACACATCAAGTTTACTCA
Lc CDR3	52	CAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTGGACG
Lc değişken ortam segmenti	53	ACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGAC AGAGTCACCATCAGTTGCAGTGCAAGTCA GGGCACCAGATGGCACTGTAAACTCCTG ATCTATTACACATCAAGTTTACTCAGG AGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGATTATTCTCTCACCATCAGC AACCTGGAACCTGAAGATATTGCCATATA CTATTGTCAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTG GACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAA TCAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC
Hc CDR1	54	AGCTATGCCATGTCT
Hc CDR2	55	GAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCTA CTATCCAGACACTGTGACGGGC
Hc CDR3	56	GAAACTACGGCGGGCTACTTTGACTAC
Hc değişken ortam segmenti	57	TCTGGGGGAGGCITAGTGAGGCCTGGAGG GTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG ATCACTTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTG GGTTCGCCAGTCTCCAGAGAAGAGGCTGG AGTGGGTCGCAGAAATTGGTAGTGGTGGT AGTTACACCTACTATCCAGACACTGTGAC GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATG CCAAGAGCACCTGTACCTGGAAATGAGC AGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATCTA TACTGTGCAAGGGAACTACGGCGGGCT ACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACT CTCACAGTCTCCTCA

Monoklonal antikor 26B3 (murin IgG1 sabit bölgesi)		
Lc CDR1	58	CGAACAAGTGAGAATATTTTCAGTTATTT AGCA
Lc CDR2	59	AATGCAAAAACCTTAGCAGAG
Lc CDR3	60	CAACATCATTATGCTTTTCCGTGGACG
Lc değişken ortam segmenti	61	CCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAA ACTGTCACCATCACATGTGCAACAAGTGA GAATATTTTCAGTTATTTAGCATGGTATCA GCAGAAACAGGGAATATCTCCTCAGCTCC TGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAG GGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGG ATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCA ACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGT TATTACTGTCAACATCATTATGCTTTTCCG TGGACGTTCCGGTGGAGGCTCCAAGCTGGA AATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC
Hc CDR1	62	GGCTACTTTATGAAC
Hc CDR2	63	CGTATTTTTCCTTACAATGGTGATACTTTC TACAACCAGAAGTTCAAGGGC
Hc CDR3	64	GGGACTCATTACT'ITGACTAC
Hc değişken ortam segmenti	65	GGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGATT ACTCTTTTACTGGCTACTTTATGAACTGGG TGATGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAG TGGATTGGACGTATTTTCCTTACAATGGTG ATACTTTCTACAACCAGAAGTTCAAGGGC AGGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTC TAGCACAGCCCACATGGAGCTCCGGAGCC TGGCATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTTT GTGCAAGAGGGACTCATTACTTTGACTACT GGGGCCAAGGCACCACTCTCACTGTCTCCT CAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTAT CCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC

		AA
--	--	----

Burada, özellikle FR α 'ya bağlanan izole antikorlar ve antijen bağlayan parçalar açıklanmıştır. Bazı düzeneklerde antikorlar ve antijen bağlayan parçalar murin IgG ya da bunun türevleridir. Antikorlar ve antijen bağlayan parçalar insan, insanlaştırılmış ya da kimerik olabilir, ancak burada örneklendirilen antikorlar ve antijen bağlayan parçalar murindir. Bazı düzeneklerde, antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR1 amino asit dizilimi içerebilir: SEQ ID NO: 26. Bazı düzeneklerde, antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR2 amino asit dizilimi içerebilir: SEQ ID NO: 27. Düzeneklerde, antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR3 amino asit dizilimi içerebilir: SEQ ID NO: 28. Düzeneklerde, antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR1 amino asit dizilimi içerebilir: SEQ ID NO: 30. Düzeneklerde, antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR2 amino asit dizilimi içerebilir: SEQ ID NO: 31. Düzeneklerde, antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR3 amino asit dizilimi içerebilir: SEQ ID NO: 32. Antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR1 amino asit dizilimine: SEQ ID NO: 26; şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR2 amino asit dizilimine: SEQ ID NO: 27; ve şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR3 amino asit dizilimine sahip bir hafif zincir içerebilir: SEQ ID NO: 28. Antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR1 amino asit dizilimine: SEQ ID NO: 30; şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR2 amino asit dizilimine: SEQ ID NO: 31; ve şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR3 amino asit dizilimine sahip bir ağır zincir içerebilir: SEQ ID NO: 32. Antikorlar ve antijen bağlayan parçalar şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR1 amino asit dizilimine: SEQ ID NO: 26; şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR2 amino asit dizilimine: SEQ ID NO: 27; ve şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR3 amino asit dizilimine sahip bir hafif zincir içerebilir: SEQ ID NO: 28; ve ayrıca şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR1 amino asit dizilimine: SEQ ID NO: 30; şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR2 amino asit dizilimine: SEQ ID NO: 31;

ve şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR3 amino asit dizilimine sahip bir ağır zincir içerebilir: SEQ ID NO: 32.

Açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan amino asit dizilimini içeren bir hafif zincir değişken ortamı olabilir: 29.

- 5 Bazı düzeneklerde, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan bir dizilim içeren bir izole polinükleotid: 61, bu hafif zincir değişken ortam amino asit dizilimini kodlayabilir. Açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan amino asit dizilimini içeren bir ağır zincir değişken ortamı olabilir: 33. Bazı düzeneklerde, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan bir dizilim içeren bir
- 10 izole polinükleotid: 65, bu ağır zincir değişken ortam amino asit dizilimini kodlayabilir. Açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar, bir hafif ve bir ağır zincir değişken ortamı içerebilir, burada hafif zincir değişken ortamı, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir amino asit dizilimi: SEQ ED NO: 29, ve ağır zincir değişken ortam şununla aynı ya da benzeri bir amino asit dizilimi içerir: SEQ ID NO: 33.

- 15 Bazı düzeneklerde antikorlar, American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) tarafından 19 Mayıs 2011'de Katılım Numarası PTA-11885 ile depolanan antikor üreten hücreler tarafından üretilmiştir. Bazı düzeneklerde antikorlar ya da bunların antijen bağlayan parçaları, depolanan antikor üreten hücreler tarafından üretilen antikorların FR α 'sı için bir bağlama çekimine sahiptir. Bazı düzeneklerde
- 20 açıklanan antikorlar ya da bunların antijen bağlayan parçaları, depolanan antikor üreten hücreler tarafından üretilen antikorların hafif ve ağır zincir CDR'lerini içerir. Bazı düzeneklerde antikorlar ya da bunların antijen bağlayan parçaları, depolanan antikor üreten hücreler tarafından üretilen antikorların hafif ve ağır zincir değişken bölgelerini içerir.

- Ayrıca özellikle FR α 'ya bağlanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar kodlayan
- 25 polinükleotidler de açıklanmıştır. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR1 dizilimine sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 26, örneğin SEQ ID NO: 58. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR2'ye sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 27, örneğin SEQ ID
- 30 NO: 59. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer

bir hafif zincir CDR3'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 28, örneğin SEQ ID NO: 60. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 30, örneğin SEQ ID NO: 62. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR2'ye sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 31, örneğin SEQ ID NO: 63. Bazı düzeneklerde, izole polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR3'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlar: SEQ ID NO: 32, örneğin SEQ ID NO: 64. Polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 26, örneğin SEQ ID NO: 58; CDR2'ye sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 27, örneğin SEQ ID NO: 59; CDR3'e sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlayabilir: SEQ ID NO: 28, örneğin SEQ ID NO: 60. Polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir ağır zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 30, örneğin SEQ ID NO: 62; CDR2'ye sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 31, örneğin SEQ ID NO: 63; CDR3'e sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlayabilir: SEQ ID NO: 32, örneğin SEQ ID NO: 64. Polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir hafif zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 26, örneğin EQ ID NO: 58; şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir nükleotid dizilimi ile kodlanan CDR2'ye sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 27, örneğin SEQ ID NO: 59; ve şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir nükleotid dizilimi ile kodlanan CDR3'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 28, örneğin SEQ ID NO: 60; bir ağır zincir CDR1'e sahip bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 30, örneğin SEQ ID NO: 62; CDR2'ye sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını: SEQ ID NO: 31, örneğin SEQ ID NO: 63; CDR3'e sahip antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlayabilir: SEQ ID NO: 32, örneğin SEQ ID NO: 64. CDR'lerin antijen bağlayan düzenlemeleri ayrıca CDR iskelesi olarak antikor benzeri proteinler kullanılarak tasarlanabilir. Bu gibi tasarlanan antijen bağlayan proteinler açıklamanın kapsamı dahilindedir.

Burada açıklanan polinükleotidler, şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir amino asit dizilimi içeren bir hafif zincir değişken ortam segmentine sahip antikorları ya da

bunların antijen bağlayan parçalarını kodlayabilir: SEQ ID NO: 29, örneğin SEQ ID NO: 61.

Bazı düzeneklerde açıklanan polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir amino asit dizilimi içeren bir ağır zincir değişken ortam segmentine sahip antikorları ya da bunların antijen bağlayan parçalarını kodlayabilir: SEQ ID NO: 33, örneğin SEQ ID NO: 65.

- 5 Bazı düzeneklerde açıklanan polinükleotidler şununla büyük oranda aynı ya da benzer bir amino asit dizilimi içeren bir hafif zincir değişken ortam segmentine sahip antikorları ya da bunların antijen bağlayan parçalarını kodlayabilir: SEQ ID NO: 29, örneğin SEQ ID NO: 61, ve ağır zincir değişken ortam segmenti, şu SEQ ID NO ile büyük oranda aynı ya da benzer olan amino asit dizilimini içerir: 33, örneğin SEQ ID NO: 65. Burada açıklanan değişken ortam
- 10 segmentleri kodlayabilen polinükleotidler, antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar üretmek için aynı ya da farklı vektörleri içerebilir.

Ayrıca tasarlanan antijen bağlayan proteinleri kodlayan polinükleotidler de açıklamanın kapsamı dahilindedir. Bazı düzeneklerde açıklanan polinükleotidler (ve bunların kodladığı peptitler) bir öncül dizilim içerir. Teknikte bilinen herhangi bir öncül dizilim

15 kullanılabilir. Öncül dizilim, sınır teşkil etmemek kaydıyla bir kısıtlama alanını ya da bir işlem başlangıç alanını içerebilir.

Burada açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar, açıklanan antikorların ya da antijen bağlayan parçaların biyolojik özelliklerini (örn., bağlama çekimi ya da immün etkileyici etkinliği) koruyan tekil ya da çoğul amino asit ikamelere, silmelere ya da

20 eklemelere sahip varyantları içerir. Uzman kişiler tekli ya da çoklu amino asit ikameleri, silmeler ya da değişikliklere sahip varyantlar oluşturabilir. Bu varyantlar şunları içerebilir: (a) bir ya da daha fazla amino asit artığının koruyucu olan ya da olmayan amino asitlerle ikameli olduğu varyantlar, (b) bir ya da daha fazla amino asidin polipeptide eklendiği ya da silindiği varyantlar, (c) bir ya da daha fazla amino asidin bir ikame grubu içerdiği varyantlar ve (d)

25 polipeptidin başka bir peptit ya da bir füzyon partneri, bir protein etiketi ya da diğer kimyasal kısım gibi, polipeptide, bir antikör için bir epitop, bir polihistidin dizilimi, bir biotin payı vb. kullanışlı özellikler kazandıran polipeptit ile kaynaştığı varyantlar. Burada açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar, bir türden gelen amino asit artıklarının başka türdeki ilgili artık için, korunan ya da korunmayan konumlarda ikame edildiği varyantları

30 içerir. Diğer düzeneklerde, korunmayan konumlardaki amino asit artıkları koruyucu olan ya

da olmayan artıklarla ikame edilir. Bu varyantları elde etmeye yönelik genetik (supresyonlar, silmeler, mutasyonlar vb.), kimyasal ve enzimatik teknikler teknikte orta düzeyde bilgisi olan kişilerce bilinmektedir.

Burada açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar IgM, IgD, IgG, IgA ve IgE gibi çeşitli antikor izotiplerini kapsayabilir. Antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasının özgünlüğü büyük ölçüde CDR'lerin amino asit dizilimi ve düzenleri ile belirlenir. Bu nedenle bir izotipin CDR'leri, antijen özgünlüğünü değiştirmeden başka bir izotipe aktarılabilir. Alternatif olarak, antijen özgünlüğünü değiştirmeden bir antikor izotipi üretiminden bir başkasına geçiş için (izotip değiştirme) hibridomlara neden olacak teknikler de belirlenmiştir. Buna göre bu gibi antikor izotipleri açıklanan antikorların ve antijen bağlayan parçaların kapsamındadır

Burada açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar, FR α için yaklaşık 1×10^{-8} M'den az bir ayrışma sabitini (KD) içeren bağ çekimlerine (M cinsinden) sahiptir. Bir düzenekte antikor 9F3, FR α için $7,15 \times 10^{-10}$ M'lik bir çekime sahiptir. Bir düzenekte antikor 19D4, FR α için $5,67 \times 10^{-10}$ M'lik bir çekime sahiptir. Bir düzenekte antikor 24F12, FR α için $1,02 \times 10^{-10}$ M'lik bir çekime sahiptir. Bir düzenekte antikor 26B3, FR α için $2,73 \times 10^{-11}$ M'lik bir çekime sahiptir. Bir düzenekte antikor 9F3, FR α için yaklaşık $6,5 \times 10^{-10}$ M ile yaklaşık 8×10^{-10} M'lik bir çekime sahiptir. Bir düzenekte antikor 19D4, FR α için yaklaşık 5×10^{-10} M ile yaklaşık $6,5 \times 10^{-10}$ M'lik bir çekime sahiptir. Bir düzenekte antikor 24F12, FR α için yaklaşık $0,5 \times 10^{-10}$ M ile yaklaşık 2×10^{-10} M'lik bir çekime sahiptir. Bir düzenekte antikor 26B3, FR α için yaklaşık 1×10^{-11} M ile yaklaşık $3,5 \times 10^{-11}$ M'lik bir çekime sahiptir.

Ayrıca burada açıklanan polinüklelotidleri içeren vektörler de verilmiştir. Vektörler ekspresyon vektörleri olabilir. İlgili bir polipeptit kodlayan bir dizilimi içeren rekombinant ekspresyon vektörleri bu şekilde bu açıklamanın kapsamında tasarlanmıştır. Ekspresyon vektörleri sınır teşkil etmemek kaydıyla düzenleyici dizilimler (örn, destekçi, geliştirici), bir seçim işaretçisi ve bir poliadenilasyon sinyali gibi bir ya da daha fazla ek dizilim içerebilir. Çok çeşitli konakçı hücreleri dönüştürmeye yönelik olan vektörler iyi bilinmektedir ve sınır teşkil etmemek kaydıyla, plazmidleri, fajmidleri, kozmidleri, bakulovirüsleri, bakmidleri, bakteriyel yapay kromozomları (BAC'ler), maya yapay kromozomlarını (YAC'ler), yanı sıra diğer bakteriyel, maya ve viral vektörleri içerir.

Açıklamanın kapsamına dahil rekombinant ekspresyon vektörleri, uygun düzenleyici elemanlara uygulanabilir bir şekilde bağlanabilen en azından bir rekombinant proteini kodlayan sentetik, genomik ya da cDNA-türevi nükleik asit parçaları içerir. Bu gibi düzenleyici elemanlar, transkripsiyonel bir destekleyici, uygun mRNA ribozomal bağlanma alanları ve transkripsiyon ve translasyonun sonlanmasını kontrol eden dizilimleri içerebilir. Ekspresyon vektörleri, özellikle memeli ekspresyon vektörleri ayrıca bir replikasyonun kökeni, ekspres edilecek gene bağlanan uygun bir destekleyici ve geliştirici, diğer 5' ya da 3' kopyalanmamış yan dizilim, 5' ya da 3' dönüştürülmemiş dizilim (örneğin gerekli ribozom bağlama alanları), bir poliadenilasyon alanı, birleşme yeri donörü ve alıcı alanlar gibi kopyalanmamış bir ya da daha fazla eleman ya da transkripsiyonel sonlandırma dizilimi içerebilir. Bir konukçuda kopyalama yeteneği sunan bir replikasyon kökeni de ayrıca dahil edilebilir.

Omurga hücrelerini dönüştürme kullanılacak ekspresyon vektörlerindeki transkripsiyonel ve translasyonel kontrol dizilimleri viral kaynaklardan sağlanabilir. Örnek vektörler şu yayında açıklanan şekilde oluşturulmuştur: Okayama ve Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

Bazı düzeneklerde antikor ya da antijen bağlayan parça kodlayan dizilim, şu genlere yönelik destekleyiciler gibi güçlü bir temel yapı destekleyicisinin kontrolü altına yerleştirilmiştir: Hipozantin fosforibozil transferaz (HPRT), adenosin deaminaz, piruvat kinaz, beta-aktin, insan miyosin, insan hemoglobin, insan kas kreatin ve diğerleri. Ek olarak birçok viral hızlandırıcı, esas olarak ökaryotik hücrelerde çalışır ve açıklanan düzeneklerle kullanıma uygundur. Bu gibi viral hızlandırıclar, sınırlandırma olmaksızın, Sitomegalovirüs (CMV) ara erken hızlandırıcı, SV40 erken ve geç hızlandırıcı, Fare Memeli Tümör Virüsü (MMTV) hızlandırıcı, Maloney lösemi virüsünün uzun terminal tekrarları (LTR'ler), İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV), Epstein Barr Virüsü (EBV), Rous Sarcoma Virüsü (RSV) ve diğer retrovirüsleri, ve Herpes Simplex Virüsünün timidin kinaz hızlandırıcısının içerir. Bir düzenekte, antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını kodlayan dizilim, metalloprotein hızlandırıcı, tetrasiklin uyarılabilir hızlandırıcı, doksisisiklin-uyarılabilir hızlandırıcı, protein kinaz R 2',5'-oligoadenilat sintetazlar, Mx genleri, ADAR1 vb. bir ya da daha fazla interferon-uyarımlı yanıt elemanları (ISRE) içeren hızlandırıclar gibi uyarılabilir bir hızlandırıcının kontrolü altına yerleştirilmiştir.

Burada açıklanan vektörler bir ya da daha fazla Dahili Ribozom Giriş Alanı (IRES) içerebilir. Bir IRES diziliminin fuzyon vektörlerine girmesi, bazı proteinlerin ekspresyonunu geliştirmek için yararlı olabilir. Bazı düzeneklerde vektör sistemi bir ya da daha fazla poliadenilasyon alanı (örn, SV40) içerebilir, bu, daha önce bahsedilen herhangi bir nükleik asit diziliminin yukarı ya da aşağı akışında olabilir. Vektör bileşenleri bitişik olarak bağlanmış, ya da gen ürünlerinin ekspresyonu için optimum alan sağlayacak şekilde düzenlenmiş (örn, ORF'ler arasına "ara" nükleotitlerin dahil edilmesi) ya da başka bir şekilde konumlandırılmış olabilir. IRES motifi gibi düzenleyici elemanlar, ayrıca ekspresyon için optimum alan sağlayacak şekilde düzenlenebilir.

Vektörler, teknikte iyi bilinen seçim işaretçileri içerebilir. Seçim işaretçileri, antibiyotik direnç genleri (örn, neomisin direnç geni, bir higromisin direnç geni, bir kanamisin direnç geni, bir tetrasiklin direnç geni, bir penisilin direnç geni), glutamat sitaz genleri, gansiklovir seçimi için HSV-TK ve HSV-TK türevleri ya da 6-metilpürin seçimi için bakteriyel pürin nükleosit fosforilaz geni gibi pozitif ve negatif seçim işaretçileridir (Gadi ve diğerleri, 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)). Bir seçim işaretçisini ya da klonlama alanını kodlayan bir nükleik asit dizilimi, ilgili bir polipeptiti kodlayan ya da alanını klonlayan bir nükleik asit diziliminin yukarı akışı ya da aşağı akışında olabilir.

Burada açıklanan vektörler, açıklanan antikorları ya da antijen bağlayan parçaları kodlayan genleri olan çeşitli hücreleri dönüştürmek için kullanılabilir. Örneğin vektörler antikor ya da antijen bağlayan parça üreten hücreler oluşturmak için kullanılabilir. Dolayısıyla, başka bir yön, burada açıklanan ve örneklendirilen antikorlar ya da antijen bağlayan parçalar gibi özellikle FR α 'ya bağlanan bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçasını kodlayan bir nükleik asit dizilimi içeren vektörlerle dönüştürülen konakçı hücrelere sahiptir.

Yabancı genlerin hücrelere dahil edilmesi için teknikte sayısız teknik bilinmektedir ve bunlar, açıklanan yöntemlerin, burada açıklanan ve örneklendirilen çeşitli düzeneklere uygun şekilde gerçekleştirilmesi için rekombinant hücrelerin yapılandırılmasında kullanılabilir. Kullanılan teknik, heterolog gen diziliminin hücre nesli tarafından kalıtımla aktarılabilmesi ve ekspres edilebileceği ve alıcı hücrelerin gerekli geliştirme ve fizyolojik işlevlerinin bozulmayacağı şekilde, heterolog gen diziliminin konak hücreye kararlı aktarımını

sağlamalıdır. Kullanılabilecek teknikler, sınır teşkil etmemek kaydıyla, kromozom aktarımı (örn., hücre füzyonu, kromozom aracılı gen aktarımı, mikro hücre aracılı gen aktarımı), fiziksel yöntemler (örn., nükleik asit verme işlemi, sferoplast füzyonu, mikroenjeksiyon, elektroporasyon, lipozom taşıyıcı), viral vektör aktarımı (örn., rekombinant DNA virüsleri, rekombinant RNA virüsleri) vb. (Cline, 29 Pharmac Ther. 69-92 (1985) ile açıklandığı gibi) içerebilir. Kalsiyum fosfat çökeltme ve memeli hücrelerle poletilen glikol (PEG) uyarımlı bakteriyel protoplast füzyonu da hücreleri dönüştürmek için kullanılabilir.

Burada açıklanan antikörlerin ve antijen bağlayan parçaların ekspresyonunda kullanım için uygun hücreler tercihen ökaryotik hücreler, daha tercih edileni, diğerleri ile birlikte ve sınır teşkil etmemek kaydıyla, NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK, HEK293 hücreleri, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L hücreleri, C127, 3T3, HeLa, NS1, Sp2/0 miyelom hücreleri ve BHK hücre dizileri gibi bitki, kemirgen ya da insan kökenli hücrelerdir. Ek olarak, antikörlerin ekspresyonu hibridom hücreleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Hibridomlar üretme yöntemleri teknikte iyi belirlenmiştir.

Burada açıklanan ekspresyon vektörleri ile dönüştürülen hücreler, burada açıklanan antikörlerin ya da antijen bağlayan parçaların rekombinant ekspresyon için seçilebilir ya da taranabilir. Rekombinant pozitif hücreler genişletilir ve yüksek seviyeli ekspresyon, gelişmiş büyüme özellikleri ya da örneğin protein modifikasyonu ya da değiştirilmiş post-translasyonel modifikasyonlar nedeniyle istenen biyokimyasal karakteristiklere sahip proteinler verebilme gibi istenen bir fenotip sergileyen alt klonlar için taranır. Bu fenotipler belirli bir alt klonun kalıtsal özelliklerine ya da mutajeneze bağlı olabilir. Mutajenez, kimyasallar, UV-dalga boyunda ışık, radyasyon, virüsler, insersiyonel mutajenler, DNA uyumsuzluk onarımının önlenmesi ya da bu gibi yöntemlerin bir kombinasyonu kullanılarak etkilenebilir.

Burada bir örnek içindeki FR α 'nın, örneğin, burada açıklanan bir antikör ya da bunun antijen bağlayan bir parçası ile temas ettirilmesiyle saptanmasına yönelik yöntemler açıklanmıştır. Burada açıklandığı üzere, örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, asitler, dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreleri, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn., serbest hücreler), dokular (örn., cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklardan vb. türetilir. Bazı düzeneklerde açıklanan

yöntemler, bir örnek içindeki FR α 'nın, örneğin, istemlerde açıklanan şekilde, folat reseptör alfa için spesifik bir antikor ya da bunun antikor parçası ile temas ettirilmesiyle belirlenmesini içerir. İki antikorun ya da bunların antijen bağlayan bir parçasının kullanıldığı düzeneklerde, antikorlardan biri ya da bunun antijen bağlayan parçaları istemlerde

5 tanımlandığı gibidir ve ikinci antikor şunların arasından seçilir:

(a) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri ile aynı epitopa bağlanan bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

(b) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

10 (c) Tablo 1'de açıklandığı gibi antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12 ya da antikor 26B3 arasından herhangi birinin ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve hafif zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası;

15 (d) Tablo 1'de açıklandığı gibi, antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12 ya da antikor 26B3 arasından herhangi birinin ağır zincir değişken ortam segmentini ve hafif zincir değişken ortam segmentini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası; ya da

(e) katılım numarası PTA-11887, PTA-11884, PTA-11886 ya da PTA-11885 olan ATCC ile depolanan hücre dizilerinden herhangi biri tarafından üretilen antikorun ya da bunun antijen bağlayan bir parçasının amino asit dizilimine sahip bir antikor.

20 Bazı düzeneklerde örnek birden fazla burada açıklanan antikorlar ya da antijen bağlayan parçaların birden fazlası ile temas ettirilebilir. Örneğin, bir örnek bir birinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir, ve ardından bir ikinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir, burada birinci antikor ya da antijen bağlayan parçası ve ikinci antikor ya da antijen bağlayan parça aynı antikor ya da antijen bağlayan parça değildir. Bazı düzeneklerde, birinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası, örneğe temas etmeden önce bir yüzeye, örneğin birçok kuyulu plakaya, yongaya ya da benzer alt tabakaya eklenebilir. Diğer düzeneklerde birinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası, örneğe temas etmeden önce herhangi bir şeye eklenmeyebilir.

25

Antikorların ya da bunun antijen bağlayan parçalarının çeşitli kombinasyonları, bir örnekteki FR α 'yı saptamak için kullanılabilir.

Bir düzenekte, örnek, önce, antikor 26B3'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve açık zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir, ve ardından ayrı olarak antikor 9F3'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve hafif CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. Bir düzenekte, örnek, önce Antikor 26B3'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve açık zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir, ve ardından ayrı olarak antikor 24F12'nin (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve hafif CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. Bir düzenekte, örnek, önce Antikor 26B3'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve açık zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir, ve ardından ayrı olarak antikor 19D4'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve hafif CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir.

Bir düzenekte örnek önce antikor 26B3'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir değişken ortam segmenti ve hafif zincir değişken ortam segmenti amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir, ve ardından ayrı olarak antikor 9F3'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir değişken ortam segmenti ve hafif zincir değişken ortam segmenti amino asit dizilimlerini içeren ikinci bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. Bir düzenekte örnek önce antikor 26B3'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir değişken ortam segmenti ve hafif zincir değişken ortam segmenti amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir, ve ardından ayrı olarak antikor 24F12'nin (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir değişken ortam segmenti ve hafif zincir değişken ortam segmenti

amino asit dizilimlerini içeren ikinci bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. Bir düzenekte örnek önce antikor 26B3'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir değişken ortam segmenti ve hafif zincir değişken ortam segmenti amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir, ve

5 ardından ayrı olarak antikor 19D4'ün (Tablo 1'de sunulduğu gibi) ağır zincir değişken ortam segmenti ve hafif zincir değişken ortam segmenti amino asit dizilimlerini içeren ikinci bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir.

Bir düzenekte örnek önce ATCC katılım numarası PTA-11885'e sahip bir hücre dizisi tarafından üretilen antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası ile temas ettirilebilir, ve

10 ardından ayrı olarak ATCC katılım numarası PTA-11884'e sahip hücre dizisi tarafından üretilen ikinci bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası ile temas ettirilebilir. Bir düzenekte örnek önce ATCC katılım numarası PTA-11885'e sahip bir hücre dizisi tarafından üretilen antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası ile temas ettirilebilir, ve ardından ayrı olarak ATCC katılım numarası PTA-11887'ye sahip hücre dizisi tarafından üretilen ikinci

15 bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası ile temas ettirilebilir. Bir düzenekte örnek önce ATCC katılım numarası PTA-11885'e sahip bir hücre dizisi tarafından üretilen antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası ile temas ettirilebilir, ve ardından ayrı olarak ATCC katılım numarası PTA-11886'ya sahip hücre dizisi tarafından üretilen ikinci bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası ile temas ettirilebilir.

20 Açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçalar saptanabilir şekilde etiketlenebilir. Bazı düzeneklerde etiketlenen antikorlar ve antijen bağlayan parçalar, burada açıklanan yöntemler aracılığıyla FR α 'nın saptanmasını kolaylaştırabilir. Bu gibi birçok etiket zaten teknikte uzman kişilerce bilinmektedir. Örneğin, uygun etiketler, sınırlandırıcı olarak görülmemesi kaydıyla radyo etiketleri, flüoresan etiketleri (DyLight® 649 gibi), epitop

25 etiketleri, biyotin, kromofor etiketleri, ECL etiketleri ya da enzimleri içerir. Daha özel olarak açıklanan etiketler rutenyum, 111In-DOTA, 111In- dietilenetriaminepentaasetik asit (DTPA), yaban turpu peroksidaz, alkalın fosfataz beta-galaktosidaz, poli-histidin (HIS etiketi), akridin boyaları, siyanin boyaları, flüoron boyaları, oksazin boyaları, fenantridin boyaları, rodamin boyaları, Alexafluor® boyaları vb. içerir.

Açıklanan antikorlar ve antijen bağlayan parçaları bir örnekteki FR α 'yı saptamak için çeşitli tاینلرde kullanılabilir. Bazı uygun tاینلر arasında, sınırlandırma olarak görölmemek kaydıyla, western blot analizi, radyoimmünoassay, immünoflüorimetri, immünopresipitasyon, denge diyalizi, immunodifüzyon, elektrokemilüminesans (ECL) 5 immünoassay, immünohistokimya, flüoresans ile etkinleştirilen hücre sınıflandırma (FACS) ya da ELISA testi yer alır.

Burada açıklanan bazı düzeneklerde, bir denekte FR α -ekspres eden kanser hücrelerinin saptanması denegin, FR α 'ya karşı yönlendirilen bir terapötik madde ile tedavi edilebileceğini belirlemek için kullanılabilir. Bazı düzeneklerde, FR α 'ya karşı yönlendirilen 10 terapötik madde Farletuzumab gibi bir antikör olabilir.

Kanser Tanı Yöntemleri

Burada, bir denekte, epitel kökenli yumurtalık, göğüs, tiroid, kalın bağırsak, endometriyal, fallop tüpü ya da akciğer kanseri tanı yöntemleri sunulmuştur. Bazı düzeneklerde, yukarıda açıklandığı üzere, FR α 'nın, histolojik bir örnek, bir ince iğne aspirat 15 örneği, rezeke tümör dokusu, dolaşım hücreleri, dolaşımdaki tümör hücreleri vb. gibi bir örnek içinde saptanması, örneğin alındığı denekte kanser tanısı yapabilme olanağı sunar. Bazı düzeneklerde, örneğin alındığı denekte kanser olduğu zaten bilinmektedir, ancak denegin yakalandığı kanser türü henüz teşhis edilmemiş olabilir ya da bir ön tanı belirsiz olabilir, bu yüzden denekten alınan bir örnekte FR α 'nın saptanması kanser tanısını 20 sağlayabilir ya da netleştirebilir.

Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler arasında, denekten alınan bir örnekte mevcut FR α miktarı saptanarak ve gözlenen FR α miktarı ile bir kontrol örneğinde yer alan FR α miktarı karşılaştırılarak bir denegin FR α ekspres eden bir kansere yakalanıp yakalanmadığını belirlemeyi içerir, burada denekten alınan örnekte yer alan FR α miktarı ile 25 kontrol örneğindeki FR α miktarı arasındaki fark, denegin FR α ekspres eden bir kansere yakalanıp yakalanmadığına dair bir göstergedir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α seviyesi, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikörler gibi bir antikör içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. Benzer yöntemler, bir denegin, artan FR α üretimi ile ilişkilendirilmeyen kansere yakalanıp yakalanmadığını belirlemek için kullanılabilir. FR α

varlığı açısından değerlendirilen örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreler, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn, serbest hücreler), dokular (örn, cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklardan vb. türetilir. Bazı düzeneklerde denek bir

5 insandır.

Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden bir kanseri tanılama yöntemi şunları içerecektir: Bir deneğin bir biyolojik örneğini bir FR α -spesifik antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası (örneğin Tablo 1'deki antikorlar ve parçalardan türetilenler) ile temas ettirmek, örnek içinde antikora ya da bunun antijen bağlayan parçasına bağlanan FR α miktarını belirlemek, örnekte mevcut FR α miktarını bilinen bir standart ile karşılaştırmak; ve deneğin FR α seviyelerinin kanser ile ilişkilendirilen FR α seviyeleri dahilinde olup olmadığını belirlemek. Ek bir düzenekte, tanılama yöntemi, daha sonra kansere özel bir tedavinin verilmesine yönelik bir ek adım içerebilir. Bazı düzeneklerde, kansere özel tedavi, Farletuzumab gibi FR α ekspres eden kanserlere karşı olabilir.

15 Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler, denekten alınan bir örnekte mevcut ve bir hücre ya da bir doku ile ilişkilendirilen FR α miktarını belirleyerek; ve gözlenen FR α miktarını bir kontrol örneğindeki FR α miktarı ile karşılaştırarak bir deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanıp yakalanmadığını belirlemeyi de içerir, burada denekten alınan örnekteki FR α miktarı ile kontrol örneğindeki FR α miktarı arasındaki fark, deneğin FR α -ekspres eden 20 kansere yakalanıp yakalanmadığına ilişkin bir göstergedir.

Bazı düzeneklerde kontrol örneği FR α -ekspres eden kansere yakalanmamış bir denekten elde edilebilir. Bazı düzeneklerde, kontrol örneği FR α -ekspres eden kansere yakalanmış bir denekten alınabilir. Kontrol örneğinin, FR α ekspres eden kanser ile ilişkilendirilmeyen bir denekten alındığı bazı düzeneklerde örnekteki FR α varlığında, kontrol 25 örneğinden gözlenen miktara bağlı bir artış deneğin FR α -ekspres eden bir kansere yakalandığına dair bir göstergedir. Kontrol örneğinin FR α -ekspres eden bir kansere yakalanmayan denekten alındığı bazı düzeneklerde, test örneği içinde mevcut FR α miktarında, kontrol örneği için gözlenen miktara bağlı gözlenen bir azalma ya da benzerlik, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanmadığına ilişkin bir göstergedir. Kontrol örneğinin 30 FR α -ekspres eden bir kansere yakalanan denekten alındığı bazı düzeneklerde, test örneği

5 içinde mevcut FR α miktarında, kontrol örneği için gözlenen miktara bağlı gözlenen bir benzerlik, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalandığına ilişkin bir göstergedir. Kontrol örneğinin FR α -ekspres eden bir kansere yakalanan denekten alındığı bazı düzeneklerde, test örneği içinde mevcut FR α miktarında, kontrol örneği için gözlenen miktara bağlı gözlenen bir azalma, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanmadığına ilişkin bir göstergedir.

10 Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α miktarı, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreler, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn, serbest hücreler), dokular (örn, cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklar olabilir.

15 Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler, denekten alınan bir örnekte mevcut ve bir hücre ya da bir doku ile ilişkilendirilmeyen FR α miktarını belirleyerek; ve gözlenen FR α miktarını bir kontrol örneğindeki FR α miktarı ile karşılaştırarak bir deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanıp yakalanmadığını belirlemeyi de içerir, burada denekten alınan örnekteki FR α miktarı ile kontrol örneğindeki FR α miktarı arasındaki fark, deneğin FR α -ekspres eden kansere yakalanıp yakalanmadığına ilişkin bir göstergedir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan örnekteki FR α miktarı, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, histolojik hazırlıklar vb. olabilir.

20 Açıklanan yöntemlerin çeşitli düzeneklerinde kanser, FR α -ekspres eden bir kanser olabilir. Belirli bir düzenekte FR α -ekspres eden kanser yumurtalık kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser endometriyal kanser olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser kolon kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser göğüs kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser tiroid kanseri olabilir. Bazı 25 düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser fallop tüpü kanseri olabilir. Başka bir düzenekte, FR α -ekspres eden kanser, adenokarsinom gibi küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir. Alternatif olarak, açıklanan yöntemler, skuamöz hücre karsinomu gibi FR α ekspres etmeyen kanseri tanımlamak için kullanılabilir.

Çeşitli yönlerde, FR α miktarı, FR α bağlayan antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını içeren örneğin temas ettirilmesi ile belirlenir. Bazı düzeneklerde, örnek, FR α bağlayan birden fazla antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. Bazı düzeneklerde, örnek, FR α 'ya 1 ile 3 arasındaki istemlerde açıklandığı gibi bağlanan bir birinci antikora ya da bunun antijen parçasına temas ettirilebilir, ardından FR α 'ya bağlanan bir ikinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. İkinci antikor şunları içeren gruptan seçilir:

(a) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri ile aynı epitopa bağlanan bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

10 (b) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

(c) Tablo 1'de açıklandığı gibi antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12 ya da antikor 26B3 arasından herhangi birinin ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve hafif zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası;

(d) Tablo 1'de açıklandığı gibi, antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12 ya da antikor 26B3 arasından herhangi birinin ağır zincir değişken ortam segmentini ve hafif zincir değişken ortam segmentini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası; ya da

(e) katılım numarası PTA-11887, PTA-11884, PTA-11886 ya da PTA-11885 olan ATCC ile depolanan hücre dizilerinden herhangi biri tarafından üretilen antikorun ya da bunun antijen bağlayan bir parçasının amino asit dizilimine sahip bir antikor. Saptama yöntemleri açıklayan genel bölümde, (a)-(e) kapsamında açıklanan antikorların ve antijen bağlayan parçaların yukarıda ayrıntılı açıklanan çeşitli kombinasyonları, açıklanan tanılama yöntemlerini yürütmek için bir "birinci" ve "ikinci" antikor ya da antijen bağlayan parça sağlamak amacıyla kullanılabilir.

Belirli düzeneklerde, FR α miktarı western blot analizi, radyoimmünoassay, immünoflüorimetri, immünopresipitasyon, denge diyalizi, immunodifüzyon,

elektrokemilüminesans (ECL) immünoassay, immünohistokimya, flüoresans ile etkinleştirilen hücre sınıflandırma (FACS) ya da ELISA assay ile belirlenir.

Açıklanan tanılama yöntemlerinin çeşitli düzeneklerinde bir kontrol örneği kullanılmaktadır. Kontrol örneği, kullanılan miktar tayininin düzgün çalışmasını sağlayan bir pozitif ya da negatif miktar tayini kontrolü olabilir; örneğin bu doğadaki bir miktar tayini kontrolü immünohistokimya miktar tayinlerinde yaygın olarak kullanılabilir. Alternatif olarak, kontrol örneği, sağlıklı bir denekte yer alan standartlaştırılmış bir FR α kontrol miktarı olabilir. Bazı düzeneklerde, test edilen deneğin gözlenen FR α -seviyeleri, FR α -ekspres eden kansere yakalandığı bilinen kontrol deneklerinden alınan örneklerde gözlenen FR α seviyeleri ile karşılaştırılabilir. Bazı düzeneklerde, kontrol deneğinin FR α -ekspres eden kanseri bir yumurtalık kanseri, endometrial kanser, kalın bağırsak kanseri, göğüs kanseri, tiroid kanseri, fallop tüpü kanseri ya da adenokarsinom gibi akciğer kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde, kontrol deneğinin, I. evre yumurtalık kanseri, endometrial kanser, kalın bağırsak kanseri, göğüs kanseri, tiroid kanseri, fallop tüpü kanseri ya da akciğer kanseri (örn, adenokarsinom) gibi erken evre FR α -ekspres eden kanseri olduğu bilinmektedir. Bazı düzeneklerde, kontrol deneğinin, II. evre yumurtalık kanseri, endometrial kanser, kalın bağırsak kanseri, göğüs kanseri, tiroid kanseri, fallop tüpü kanseri ya da akciğer kanseri (örn, adenokarsinom) gibi ara evre FR α -ekspres eden kanseri olduğu bilinmektedir. Bazı düzeneklerde, kontrol deneğinin, III. evre ya da IV. evre yumurtalık kanseri, endometrial kanser, kalın bağırsak kanseri, göğüs kanseri, tiroid kanseri, fallop tüpü kanseri ya da akciğer kanseri (örn, adenokarsinom) gibi geç evre FR α -ekspres eden kanseri olduğu bilinmektedir.

Burada açıklanan tanılama yöntemleri ayrıca, bir deneğin tanıdan sonraki 5 yılda hayatta kalma olasılığının görece daha yüksek ya da düşük olup olmadığını ön görmeyi olanaklı kılacak bir temel sunar. Bazı düzeneklerde, açıklanan yöntem, adenokarsinomu olan bir denek için olumlu bir sonuç ön görmek için kullanılabilir, burada olumlu bir sonuç 5 yıllık yüksek bir hayatta kalma oranı olarak tanımlanır. Burada sunulan verilerin gösterdiği üzere, FR α ekspres etmeyen I. evre ya da II. evre adenokarsinomu olduğu belirlenen deneklerin beş yıl içinde ölme olasılığı, FR α ekspres eden I. evre ya da III. evre adenokarsinomu olduğu belirlenen deneklere göre daha yüksektir. Buna göre, burada açıklanan tanılama yöntemleri bu bilgi ile birleştirilerek, kanserli olduğu belirlenen denekler

için 5 yıllık hayatta kalma olasılığının belirlenmesine yönelik bir yöntem sağlanabilir. Bazı düzeneklerde, yöntem adenokarsinomu olduğu belirlenen denekler için 5 yıllık hayatta kalma olasılığının ön görülmesi amacıyla kullanılır.

- Bazı düzeneklerde açıklanan prognostik yöntem şunları içerecektir: bir deneğin bir biyolojik örneğini FR α -spesifik bir antikora ya da bunun antijen bağlayan parçasına (Tablo 1'de verilen antikorlar ve parçalarından türetilenler gibi) temas ettirmek, örnekte mevcut, antikora ya da bunun antijen bağlayan parçasına bağlanan FR α miktarını belirlemek, örnekte mevcut FR α miktarını bilinen bir standart ile karşılaştırmak; ve deneğin FR α seviyelerinin FR α ekspres eden bir kansere işaret edip etmediğini belirlemek, böylece kanser tanısı koyulduktan sonra deneğin beş yıl hayatta kalma olasılığını tahmin etmek için bir yol sunmak. Bazı düzeneklerde deneğin adenokarsinomu olduğu bilinmektedir ya da belirlenmiştir. Bazı düzeneklerde denek bir insandır.

Kanser Takip Yöntemleri

- Burada, bir denekte epitelyal kökenli kanseri izlemeye yönelik yöntemler sunulmuştur. Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler arasında, denekten alınan test örneğinde mevcut FR α miktarını belirleyerek; ve gözlenen FR α miktarını denekten daha önce alınan bir örnekteki FR α miktarı ile karşılaştırarak FR α -ekspres eden kanserin ilerlemesini, gerilemesini ya da stabil kalmasını değerlendirme de yer alır, burada test örneği ile daha önceki örneğin FR α miktarı arasındaki fark kanserin ilerlemesi, gerilemesi ya da stabil kalmasına ilişkin bir göstergedir. Bu açıdan, önceki örnek için gözlenen miktara göre yüksek FR α miktarına sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir ilerleme göstergesi olabilir. Tersine, önceki örnek için gözlenen miktara göre düşük FR α miktarına sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir gerileme göstergesi olabilir. Bu doğrultuda, önceki örnek için gözlenen miktara test örneğindeki FR α miktarı arasındaki önemsiz bir fark, FR α -ekspres eden bir kanser için bir stabil durum göstergesi olabilir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan bir örnekteki FR α miktarı, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreleri, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn., serbest hücreler),

dokular (örn., cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklardan vb. türetilbilir. Bazı düzeneklerde denek bir insandır.

Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden bir kanseri takip yöntemi şunları içerecektir: Bir denegin bir biyolojik örneğini bir FR α -spesifik antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası (örneğin Tablo 1'deki antikorlar ve parçalardan türetilenler) ile temas ettirmek, örnek içinde antikora ya da bunun antijen bağlayan parçasına bağlanan FR α miktarını belirlemek, örnekte mevcut FR α miktarını aynı denekten saha önceki bir zamanda aşınan örnekteki miktarla karşılaştırmak; ve denegin FR α seviyelerinin zaman içinde değişip değişmediğini belirlemek. Önceki örnek için gözlenen miktara göre yüksek FR α miktarına sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir ilerleme göstergesi olabilir. Tersine, önceki örnek için gözlenen miktara göre düşük FR α miktarına sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir gerileme göstergesi olabilir. Bu doğrultuda, önceki örnek için gözlenen miktara test örneğindeki FR α miktarı arasındaki önemsiz bir fark, FR α -ekspres eden bir kanser için bir stabil durum göstergesi olabilir. Bazı düzeneklerde, örneğin FR α seviyeleri, tek başına ya da daha önce değerlendirilen bir örnekte gözlenen FR α seviyeleri ile birlikte bilinen bir standartla karşılaştırılabilir. Bazı düzeneklerde bilinen standart, bilinen bir konsantrasyondaki at (örn., rekombinant ya da saflaştırılmış bir FR α protein örneği) FR α proteini olabilir. Ek bir düzenekte, tanılama yöntemi, daha sonra kansere özel bir tedavinin verilmesine yönelik bir ek adım içerebilir. Bazı düzeneklerde, kansere özel tedavi, Farletuzumab gibi FR α ekspres eden kanserlere karşı olabilir.

Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler arasında, denekten alınan test örneğinde mevcut, bir hücre ya da doku ile ilişkilendirilen FR α miktarını belirleyerek; ve gözlenen FR α miktarını denekten daha önce benzer şekilde alınan bir örnekteki FR α miktarı ile karşılaştırarak FR α -ekspres eden kanserin ilerlemesini, gerilemesini ya da stabil kalmasını değerlendirme de yer alır, burada test örneği ile daha önceki örneğin FR α miktarı arasındaki fark kanserin ilerlemesi, gerilemesi ya da stabil kalmasına ilişkin bir göstergedir. Bu açıdan, önceki örnek için gözlenen miktara göre yüksek FR α miktarına sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir ilerleme göstergesi olabilir. Tersine, önceki örnek için gözlenen miktara göre düşük FR α miktarına sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir gerileme göstergesi olabilir. Bu doğrultuda, önceki örnek için gözlenen

miktara test örneğindeki FR α miktarı arasındaki önemsiz bir fark, FR α -ekspres eden bir kanser için bir stabil durum göstergesi olabilir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan bir örnekteki FR α miktarı, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek

- 5 dolaşımdaki hücreler, dolaşımdaki tümör hücreler, dokularla ilişkili olmayan hücreler (örn, serbest hücreler), dokular (örn, cerrahi olarak rezeke edilmiş tümör dokusu, biyopsiler, ince iğne aspirasyonu), histolojik hazırlıklar olabilir.

Bazı düzeneklerde açıklanan yöntemler arasında, denekten alınan test örneğinde mevcut, bir hücre ya da doku ile ilişkilendirilmeyen FR α miktarını belirleyerek; ve gözlenen

10 FR α miktarını denekten daha önce benzer şekilde alınan bir örnekteki FR α miktarı ile karşılaştırarak FR α -ekspres eden kanserin ilerlemesini, gerilemesini ya da stabil kalmasını değerlendirme de yer alır, burada test örneği ile daha önceki örneğin FR α miktarı arasındaki fark kanserin ilerlemesi, gerilemesi ya da stabil kalmasına ilişkin bir göstergedir. Bu açıdan, önceki örnek için gözlenen miktara göre yüksek FR α miktarına sahip bir test örneği FR α -

15 ekspres eden bir kanser için bir ilerleme göstergesi olabilir. Tersine, önceki örnek için gözlenen miktara göre düşük FR α miktarına sahip bir test örneği FR α -ekspres eden bir kanser için bir gerileme göstergesi olabilir. Bu doğrultuda, önceki örnek için gözlenen miktara test örneğindeki FR α miktarı arasındaki önemsiz bir fark, FR α -ekspres eden bir kanser için bir stabil durum göstergesi olabilir. Bazı düzeneklerde, denekten alınan bir

20 örnekteki FR α miktarı, FR α 'ya bağlanan, burada açıklanan antikorlar gibi bir antikor içeren örnek ile temas ederek değerlendirilir. FR α varlığı açısından değerlendirilen örnek idrar, kan, serum, plazma, tükürük, assitler, histolojik hazırlıklar vb. olabilir.

Açıklanan yöntemlerin çeşitli düzeneklerinde kanser, FR α -ekspres eden bir kanser olabilir. Belirli bir düzenekte FR α -ekspres eden kanser yumurtalık kanseri olabilir. Bazı

25 düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser endometriyal kanser olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser kolon kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser göğüs kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser tiroid kanseri olabilir. Bazı düzeneklerde FR α -ekspres eden kanser fallop tüpü kanseri olabilir. Başka bir düzenekte, FR α -ekspres eden kanser, adenokarsinom gibi küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir.

Çeşitli yönlerde, FR α miktarı, FR α bağlayan antikor ya da bunun antijen bağlayan parçasını içeren örneğin temas ettirilmesi ile belirlenir. Bazı düzeneklerde, örnek, FR α bağlayan birden fazla antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. Bazı düzeneklerde, örnek, 1 - 3 arasındaki istemlerde tanımlanan FR α 'ya bağlanan bir birinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ve ardından FR α 'ya bağlanan bir ikinci antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası ile temas ettirilebilir. İkinci antikor şunlar arasından seçilebilir:

(a) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri ile aynı epitopa bağlanan bir antikor ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

10 (b) antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12, ya da antikor 26B3 arasından herhangi biri ya da bunun antijen bağlayan bir parçası;

(c) Tablo 1'de açıklandığı gibi antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12 ya da antikor 26B3 arasından herhangi birinin ağır zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini ve hafif zincir CDR1, CDR2 ve CDR3 amino asit dizilimlerini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası;

(d) Tablo 1'de açıklandığı gibi, antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12 ya da antikor 26B3 arasından herhangi birinin ağır zincir değişken ortam segmentini ve hafif zincir değişken ortam segmentini içeren bir antikor ya da bunun antijen bağlayan parçası; ya da

(e) katılım numarası PTA-11887, PTA-11884, PTA-11886 ya da PTA-11885 olan ATCC ile depolanan hücre dizilerinden herhangi biri tarafından üretilen antikorun ya da bunun antijen bağlayan bir parçasının amino asit dizilimine sahip bir antikor. Saptama yöntemleri açıklayan genel bölümde, (a)-(e) kapsamında açıklanan antikorların ve antijen bağlayan parçaların yukarıda ayrıntılı açıklanan çeşitli kombinasyonları, açıklanan takip yöntemlerini yürütmek için bir "birinci" ve "ikinci" antikor ya da antijen bağlayan parça sağlamamak amacıyla kullanılabilir.

Belirli düzeneklerde, FR α miktarı western blot analizi, radyoimmünoassay, immünoflüorimetri, immüno-presipitasyon, denge diyalizi, immunodifüzyon,

elektrokemilüminesans (ECL) immünoassay, immünohistokimya, flüoresans ile etkinleştirilen hücre sınıflandırma (FACS) ya da ELISA assay ile belirlenir.

Özetlenen konunun ek yönleri ayrıntılı açıklamada, verilen örneklerde ve ilişkilendirilen şekillerde daha fazla ayrıntı ile verilmiştir.

5

FR α Saptama Kitleri

Burada, İstem 29'da tanımlanan şekilde, bir örnekte mevcut FR α 'yı saptamaya yönelik kitler verilmiştir.

10 Verilen antikor ya da antijen bağlayan parça çözelti içinde; liyofilize; bir sübstraya, taşıyıcıya ya da plakaya eklenmiş şekilde; ya da saptanabilir bir etikete konjüge olabilir.

Açıklana kitler ayrıca burada açıklanan yöntemleri gerçekleştirme için kullanışlı bileşenler de içerebilir. Örnek vermek gerekirse, kitler bir denekten bir örnek alma yollarını, bir kontrol örneğini, örn. yavaş ilerleyen kanseri olan ve/veya kanser olmayan bir denekten bir örneği, bir ya da daha fazla örnek bölmesini, ve/veya buluşun bir yönteminin nasıl
15 gerçekleştirileceğini açıklayan talimat materyalini ve dokuya özel kontrolleri/standartları içerebilir.

FR α seviyesini belirleme yolları ayrıca, örneğin, FR α seviyesini belirlemeye yönelik bir testte kullanılacak tamponları ya da diğer reaktifleri de içerir. Talimatlar, örneğin, testin yapılmasına yönelik yazdırılmış talimatlar ve/veya FR α ekspresyonunu değerlendirmeye
20 yönelik talimatlar olabilir.

Açıklanan kitler ayrıca bir denekten bir örneği izole etme yollarını da içerebilir. Bu yollar, bir denekten sıvı ya da doku elde etmek için kullanılabilecek bir ya da daha fazla ekipman bileşenini ya da reaktifi içerebilir. Bir denekten bir örnek almaya yönelik yollar ayrıca serum gibi kan bileşenlerini bir kan örneğinde izole etme yollarını da içerebilir.
25 Tercihen, kit bir insan denekte kullanım için tasarlanmıştır.

Açıklanan kitler ayrıca bir birincil ya da ikincil antikorun spesifik olmayan bağlanmasını azaltmak için bir örneğe uygulanabilecek blokaj reaktifini de içerebilir. Bir blokaj reaktifine bir örnek, kullanmadan önce bir tampon içinde seyreltilebilen sığır serum albümindir (BSA). Diğer ticari olarak satın alınabilir blokaj reaktifleri, örneğin Block Ace and ELISA Synblock (AbD serotec), Background Punisher (BIOCare MEDICAL) ve StartingBlock (Thermo Fisher Scientific) teknikte bilinmektedir. Açıklanan kitler ayrıca antikor tabanlı saptama testlerinde pozitif sonuç vermek için FR α 'ya yeterince bağlanmayan bir negatif kontrol birincil antikorunu içerebilir. Ek olarak, açıklanan kitler antikor 9F3, antikor 19D4, antikor 24F12 ya da antikor 26B3 gibi bir FR α birinci antikora bağlanabilen bir ikincil antikorunu içerebilir. Bazı düzeneklerde ikincil antikor, bir örneğe bağlanan birincil antikorunu saptamak için yaban turpu peroksidaz (HRP) ya da bir flüorofor gibi saptanabilir bir etikete konjüge olabilir. Açıklanan kitler ayrıca bağlama bir ikincil antikorun bir örnek içinde saptanmasını sağlayan bir kolorimetrik ya da kemilüminesan sübstrat içerebilir. Bazı düzeneklerde kolorimetrik ya da kemilüminesan sübstrat 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS); 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB); 3,3-Diaminobenzidin (DAB); SuperSignal (Thermo Fisher Scientific); ECL reaktifi (Thermo Fisher Scientific) ya da teknikte uzman kişilerin bildiği diğer bu gibi reaktifler olabilir.

Aşağıdaki örnekler açıklama öncesinde tamamlayıcı olarak verilmiştir ve burada açıklanan konunun daha iyi anlaşılması içindir. Bu örnekler açıklanan konu için sınırlayıcı olarak görülmemelidir.

Mevcut buluş istemler ile tanımlanmıştır. İstemlerin kapsamı dışında kalan tüm örnekler yalnızca referans olarak verilmiştir ve buluşun bir parçası değildir.

ÖRNEK 1 - Rekombinant İnsan FR α 'nın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Burada açıklanan çalışmalarla ilişkili deneyleri yürütmek için, birkaç folat reseptör alfa (FR α)-ekspres eden hücre sistemi ya da dizisi oluşturularak FR α -ekspres eden hücre sübstratları ya da saflaştırılmış rekombinant insan FR α proteini üretilmiştir. Bir ekspresyon sistemi, baculovirus aracılığıyla rekombinant insan FR α ekspres eden bir Sf9 böcek hücresidir. Bu sistem böcek hücresi ekspresyonu için optimize edilmiş bir öncül dizilim, bir N-terminal 6x histidin (6xhis) epitop etiketi ve intakt bir yerleşik GPI ekleme alanı içeren bir

insan FR α dizilimi kullanılarak hazırlanmıştır. Hücreler daha sonra 1L'lik bir çalkalama şişesinde inkübe edilmiş ve Sf9 böcek hücrelerinin log-faz kültürlerine, birden fazla <1 (MOI) engeksiyonu ile rekombinant baculovirus bulaştırılmıştır. Hücreler 30L'lik kültürden hasat edilmiş, çözünmüş ve 10 mM 3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonio]-l-propansülfonat (CHAPS) içeren 1X fosfat-tamponlu tuzlu su (PBS) ile 2x ekstrakt edilmiştir. NaCl konsantrasyonu 300 mM'ye ayarlanmış ve 0,2 μ m'lik bir membran ile filtre edilmiştir. Arıtılan süpernatant çekim kromatografisi ile, tampon olarak 2M NaCl, 1 mM CHAPS, pH 7,4 içeren 1X PBS kullanılarak saflaştırılmış, ardından 10 mM 3-(N-morfolino)propansülfonik asit (MOPS), 3M MgCl₂, 1 mM CHAPS, pH 6,8 ile elüe edilmiştir. Pik kısımları 1X PBS, pH 7,4 ile kapsamlı şekilde diyalize edilmiş, SDS-PAGE ile saflığı analiz edilmiş, bisinkoninik asit miktar tayini (BCA) testi ile miktarı belirlenmiş, sıvı bölüntü haline getirilmiş ve -80 Celsius derece saklanmıştır.

Stabil olarak insan FR α ekspres eden ve salgılayan bir Çin hamster yumurtalığı (CHO) hücre dizisi bir insan immünoglobülin kappa öncül dizilimi ve GPI ek yerini değiştiren bir C-terminal 6xhis epitop etiketi içeren bir insan folat reseptör alfa (FR α) dizilimi kullanılarak üretilmiştir. Üretim tamamlandığında, FR α -ekspres eden CHO hücreleri 25L-ölçekli mikrodalga torbalarında büyütülmüştür. Salgılanan FR α proteinini saflaştırmak için, hücre süpernatantı derin filtreleme ile hücre tortularından temizlenmiş ve ardından teğet akış filtrasyonu ile 10 kat konsantre edilerek 50 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 1 mM imidazol, pH 8,0 içine diafiltre edilmiştir. Bu, önceden paketlenmiş bir Talon® IMAC kolonuna bir FPLC kullanılarak yüklenmiştir. Bağlanmayan materyal 50 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8,0 kullanılarak yıkanmış ve bağlanan protein, bir 5 mM - 100 mM imidazol lineer gradyanı kullanılarak 50 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, pH 8,0 içinde elüe edilmiştir. Pik kısımları 1X PBS, pH 7,4 ile kapsamlı şekilde diyalize edilmiş, SDS-PAGE ile saflığı analiz edilmiş, BCA testi ile miktarı belirlenmiş, sıvı bölüntü haline getirilmiş ve -80 Celsius derece saklanmıştır.

Ayrıca insan folat reseptör beta (FR β), insan folat reseptör gamma (FR γ) ve insan folat reseptör delta (FR δ) için benzer bir hücre sistemi de üretilmiştir. Özetle, 293F hücrelerinin 1L'lik kültürlerini kısa süreli vermek için bir insan immünoglobülin kappa öncül dizilimi ve GPI ek yerini değiştiren bir C-terminal 6xhis epitop etiketi içeren FR β , FR γ ya da

FR δ yapıları kullanılmıştır. Rekombinant FR proteinleri insan FR α için yukarıda açıklanan şekilde saflaştırılmıştır.

Ayrıca, bir insan immüoglobülin kappa öncül dizilimi ve GPI ek yerini değiştiren bir C-terminal 6xhis epitop etiketi içeren bir insan mezotelin dizilimini stabil olarak ekspres eden ve salgılayan bir Çin hamster yumurtalık (CHO) hücre dizisi de hazırlanmıştır, zira mezotelin birçok çalışmada bir negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnsan mezotelin-ekspres eden CHO hücreleri 25L ölçekli mikrodalga fırın torbalarında büyütülmüştür. Salgılanan mezotelin proteinini saflaştırmak için, hücre süpernatantı oluklu fiber filtreleme ile tortulardan temizlenmiş ve saflaştırılmış süpernatant teğet akış filtrasyonu ile 10 kat konsantre edilmiştir. Süpernatant NaCl konsantrasyonu 300 mM'ye NaCl ve 0,5 mM imidazole ayarlanmıştır. Bu, önceden paketlenmiş bir Talon® IMAC kolonuna bir FPLC kullanılarak yüklenmiştir. Bağlanmayan materyal 50 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 3 mM imidazol, pH 8,0 kullanılarak yıkanmış ve bağlanan protein, 50 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 150 mM imidazol, pH 8,0 kullanılarak elüe edilmiştir. Pik kısımları 50 mM potasyum fosfat, pH 7,5 ile kapsamlı bir şekilde dialize edilmiştir. 1M'lik nihai konsantrasyona amonyum sülfat eklenmiş ve nihai saflaştırma, 1M - 0M amonyum sülfatın kademeli bir gradyanı kullanılarak 50 mM potasyum sülfat, pH 7,5 içinde, önceden paketlenmiş bir fenil sefaroz kolonu üzerinde yapılmıştır. Pik kısımları 1X PBS, pH 7,4 ile kapsamlı şekilde diyalize edilmiş, SDS-PAGE ile saflığı analiz edilmiş, BCA testi ile miktarı belirlenmiş, sıvı bölüntü haline getirilmiş ve -80 Celsius derece saklanmıştır.

ÖRNEK 2 - Saflaştırılmış, İndirgenmiş Alkilleştirilmiş FR α Üretimi

İndirgenmiş ve alkilleştirilmiş bir antijenik FR α formu üretilmeye çalışılmıştır. Proteinini indirgemek için saflaştırılmış FR α , fosfat tamponlu tuzlu suda (pH 7,4), santrifüjlü filtreler (Amicon Ultra, 3 kD MW limit) kullanılarak 2 mg/mL'ye konsantre edilmiştir. Protein konsantrasyonu bir BCA testi (Thermo Scientific) kullanılarak belirlenmiştir. Ortaya çıkan FR α , 4M üre içeren PBS içinde 1 mg/mL'lik bir nihai FR α konsantrasyonu üretmek için 8M üre/ PBS içinde 1:1 oranında seyreltilmiştir. 10 mM'lik bir nihai konsantrasyon için ditiyotretol çözeltisi (PBS içinde 500 mM) eklenmiştir. Çözelti 65 Celsius derecede bir saat inkübe edilmiş ve da sıcaklığına soğutulmuştur.

Ardından fosfat tamponlu tuzlu su içinde 1M iyot asetamid çözeltisi eklenmiş indirgenmiş folat reseptör çözeltisine eklenerek 10 mM'lik nihai konsantrasyon elde edilmiş ve reaksiyon 30 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında tutulmuştur. Protein, bu koşullar altında çözünebilir kalmıştır. İmmünizasyon için kullanılacak nihai indirgenmiş FR α 4M üre, 10 mM DTT ve 10 mM iyot asetamid içeren fosfat tamponlu tuzlu su içinde saklanmıştır.

Şekil 1'de yerleşik FR α proteininin ve indirgen olmayan koşullar altında SDS-PAGE ile analiz edilen proteinin indirgenmiş ve alkileştirilmiş bir formunun diferansiyel geçişi gösterilmektedir.

10

ÖRNEK 3 - FR α kullanılarak hibridomların üretimi

Sekiz haftalık dişi Balb/c farelerine hekza-histidin etiketli FR α proteini (n=5) ya da indirgenmiş ve alkileştirilmiş FR α proteini (n=5) ile bağışıklık kazandırılmıştır. Tam Freund destekleyicisi (Rockland, Cat# D614-0050) ile 1:1 (h:h) oranında karıştırılmış 50 μ g ilgili immünojen içeren ilk intraperitoneal immunizasyon 0. gün verilmiştir. Fareler daha sonra, tam olmayan Freund destekleyicisi (Rockland, Cat# D615-0050) ile 1:1 (h:h) oranında karıştırılan ve 14 gün sonra ve ardından her 21 günde intraperitoneal olarak verilen 50pg immünojen ile güçlendirilmiştir. Bağışıklık kazandırılmış farelerden ilk immünizasyondan 24 gün sonra ve ardından her 21 günde kan örnekleri alınmıştır.

Alınan kan örnekleri doğrudan enzim bağlantılı immünoassay (EIA) ile FR α 'ya göre analiz edilmiştir. Plakalar FR α proteini (100ml PBS içinde 1 mg/mL çözelti, 0,02 M potasyum fosfat, 0,15 M Sodyum Klorür, pH 7,2) ile kaplanmış ve gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiş, 0,2 Tween®-20 (PBST; Rockland, Cat# MB-075-1000) içeren PBS ile yıkanmış ve %3 balık jeli (Sigma) ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiştir. Ayrı fare serum örneklerinin 3 kat dilüsyon serisinin oda sıcaklığında 1 saat boyunca bağlanmasına izin verilmiş, plakalar 3 kez PBST ile yıkanmış ve ardından bir HRP-konjüge tavşan-anti-fare antikoru (Rockland, Cat#610-4320) ile 1:2500 oranında 30 dakika boyunca 37°C'de problanmış. TMB süstratı (Rockland, Cat# TMBE-100) eklenmiş ve reaksiyon 30 dakika sonra, 450nm'de absorbans okuması (Microplate Reader "Benchmark"; Biorad) alınmadan önce 100mL 1M HC1

eklenerek durdurulmuştur. Tüm örnekler, negatif kontrol olarak hekza-histidin etiketli rekombinant mezotelin (mezotelin-His6) proteini için sayaç taramasına alınmıştır.

Farelerden en yüksek antijen-spesifik titreleri gösteren dalaklar alınmış ve elektrofüzyon yoluyla (Hybrimmune™ Model CEEF-50B Waveform Generator; Collectis, Romainville, France) Sp2/0 Ag14 miyelom hücreleri (ATTC CRL1581) içeren splenositlerin hibridomları hazırlanmıştır. Adından, hibridom süpernatantları, pozitif parental füzyon hücre dizisini seçmek için yukarıda açıklanan şekilde ELISA testi ile FR α ve rekombinant Mezotelin-His için taranmıştır.

rekombinant insan FR α 'ya (rhFR α) reaktif antikorlar ürettiği belirlenen seçilen parental hücre dizileri daha sonra sınırlı seyreltme ile alt klonlanmıştır. Bu hücreler tarafından üretilen antikorlar daha sonra FR α bağı için yeniden test edilmiş ve Clonotyping™ Sistemi (SouthernBiotech, Birmingham, AL) kullanılarak izotip işlemine alınmıştır. Bu klonlardan gelen süpernatantlar, doğrudan ELISA ile üç ek insan folat reseptör izoformu (FR β , FR γ ve FR δ) için yeniden taranarak reseptör özgünlüğü belirlenmiştir. Plakalar gece boyunca 100 μ L'lik 1 ug/mL ilgili FR α izoformu çözeltisi ile 4°C'de inkübe edilmiş, %0,2 Tween®-20 (Rockland, Cat# MB-075-1000) içeren PBS ile yıkanmış ve %3 balık jeli (Sigma) ile bloke edilmiştir. Kültür süpernatantlarının 3 katlı bir dilüsyon serisinin, yukarıda açıklandığı gibi plakalar yıkanmadan ve bir HRP-konjüge anti-fare antikoru ile problemlenmeden önce 1 saat boyunca oda sıcaklığında bağlanmasına izin verilmiştir. FR β , FR γ ve FR δ 'ya reaktif antikorlar üreten klonlar analizin devamı için seçilmemiştir.

Dört seçilmiş hibridom klonu, 19D4.B7, 26B3.F2, 24F12.B1 ve 9F3.H9.H3.H3.B5.G2, American Type Culture Collection ile ve sırasıyla ATCC katılım numaraları PTA-11884, PTA-11885, PTA-11886 ve PTA-11887 ile 19 May 2011'de depolanmıştır.

25 **ÖRNEK 4 - FR α 'ya Safılaştırılmış Monoklonal Antikor Üretimi**

Seçilen hücre dizileri, 0,5x10⁵ hücre/mL oranında serumsuz ortam (Invitrogen, Cat#12045-076) ve %5 düşük IgG FBS (0,1 μ g/ml) (Gibco, Cat# 16250-078) içeren 1L'lik silindir şişelere tohumlanmadan önce bir mikoplazma test kiti (Rockland, Cat# MAB-012)

kullanılarak mikoplazma için test edilmiştir. Kültürlerin 37°C'de 14 ya da 21 gün boyunca büyümelerine izin verilmiş, ardından süpernatant alınmış ve 50kDa'lık bir filtrasyon membranı (Spectrum Labs, Rancho Dominguez CA) içinde yaklaşık 10 kat konsantre edilmiş ve ardından protein A kromatografisi (Rockland, Cat# PA50-00-0025) kullanılarak

5 saflaştırılmıştır. Bağlanan antikor, antikor izotipine göre 0,1M sodyum sitrat, pH 3,5/4,5 ile elüe edilmiş, ve tampon 12-14kDa'lık membranlı bir tüp (Spectrum Labs, Rancho Dominguez CA) kullanılarak diyaliz yoluyla PBS'ye karşı değiştirilmiştir. Saflaştırılmış antikor 0,22 µm Express™PLUS Stericups (Millipore, Billerica MA) kullanılarak steril filtre edilmiş ve diğer testler için 4°C'de saklanmıştır.

10 Seçilen dört hibridom klonunun (9F3-H9, 19D4-B7, 24F12-B1 ve 26B3-F2) ağır ve hafif zincirleri dizilmeye çalışılmıştır. Önce, toplam RNA, RNAqueous® kiti (Ambion) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılarak her bir hibridom hücre dizisinden (hücre pelletleri, her hücrede 1 x 10³ ila 1 x 10⁵) izole edilmiştir. RNA, bir NanoDrop™ 8000 spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür.

15 İzole RNA daha sonra, bir Mastercycler® EP Gradyan Termal Saykır (Eppendorf) ile her hibridom için üçlü yapılan çok katmanlı RT-PCR ile büyütülmüştür. Önce, Ig yeniden düzenleme sırasında hangi Ig ağır ve hafif zincir genlerinin kullanıldığını belirlemek için her bir hibridom için iki ayrı gen-spesifik cDNA büyütmesi gerçekleştirilmiştir (≤ halka RNA/reaksiyon). Her bir kokteyl, potansiyel murin Ig V gen ailelerinden (IGHv, IGKv) ve Ig

20 sabit bölge genlerinden (IGHcGamma, IGKc) herhangi birine tutunan, eşsiz ve aileye özel primerlerden oluşmaktadır. cDNA üretme ve büyütme işlemi, aşağıdaki koşullar altında Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen) ile Superscript® III Tek Adımlı RT-PCR Sistemi kullanılarak yapılmıştır: 55°C'de 30 dakika ve 95°C'de 2 dakika, ardından 95°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 68°C'de 1 dakikalık 40 döngü ve son olarak 68°C'de 10 dakikalık

25 tamamlama adımı. DNA ürünlerine %2'lik bir agaroz jeli üzerinde elektroforez uygulanmıştır. Uygun bantlar kesilmiş ve jel, üretici protokolü doğrultusunda QIAquick® Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış DNA, her bir hibridomla ifade edilen germ hattı gen segmentlerinin belirlenmesi için dizilime (GENEWIZ, Inc., South Plainfield, NJ) gönderilmiştir.

Ayrıca daha sonra her bir hibridom için tanımlanan özel genlere uygun RT-PCR analizi, yukarıdaki ile aynı RNA kaynağı ve gen-spesifik primerler (çok katmanlı RT-PCR karışımındaki aileye özel primerlerin tersine) kullanılarak yapılmıştır. Klonlamayı kolaylaştırmak için büyütülmüş Ig cDNA'ları bir In-Fusion (IF) ekspresyon vektörüne

- 5 yerleştirilmiştir, her bir gen-spesifik primer ayrıca homolog köprüyü sağlayabilecek vektör uyumlu bağlayıcı dizilimleri içermektedir. Diğer tüm reaktifler ve termal saykıl koşulları, yukarıda açıklanan çok katmanlı RT-PCR deneyleri için kullanılanlarla aynıdır.

ÖRNEK 5: FR α 'ya Bağlanan Antikorun Karakterizasyonu

- 10 Saflaştırılmış monoklonal antikorların FR α 'ya bağlanma karakteristikleri, yüzey plazmon rezonansı (SPR) deneyleri ile belirlenmiştir. Tüm SPR deneyleri 25°C'de bir BIAcore T100 kullanılarak ve araştırma derecesi CM5 yongalar (GE Healthcare) ile, üretici tarafından belirtilen şekilde yapılmıştır. İlk olarak, fare antikor yakalama kitinde (GE Healthcare) gelen anti-fare IgG, CM5 sensör yongalarına amid bağlantısı ile hareketsizleştirilmiştir. Fare anti-
- 15 FR α monoklonal antikorları (26B3, 24F12, 19D4 ya da 9F3) ayrı akış hücrelerinde bağlama döngüsüne göre yakalanırken, dört akış hücresi referans olarak kullanılmıştır. Bağlama deneyleri, çalışan tampon olarak HBS-P (GE Healthcare) ile 30[nL/dak. düşük akış hızında yapılmıştır. Her bir monoklonal antikor örneği (0,5µg/mL) antikor yakalamak için 3 dakika boyunca enjekte edilmiştir. Saflaştırılmış rekombinant insan FR α 'nın (rh-FR α) (1nM - 30nM)
- 20 çeşitli konsantrasyonları daha sonra FR α -spesifik ve referans yüzeyler üzerine 3 dakika boyunca enjekte edilmiş ve tek döngülü kinetik yöntem kullanılarak bağ sensogramları kaydedilmiştir. Ayrışma profili 25 dakika boyunca izlenmiştir. Bağlar arasında, yüzey 30µl'lik bir 10mM glisin (pH 1,7) enjeksiyonu ile yeniden üretilmiştir. Sensogramlar işleme alınmış ve BIAcore T100 değerlendirme yazılımı (version 2.0.1) kullanılarak 1:1 oranında bir Langmuir
- 25 bağlama modeline eklenmiştir. 26B3, 24F12, 19D4 ve 9F3 antikorlarının bazı bağlanma modelleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: FR α -spesifik antikorların bağlanma karakteristikleri.

Kısaltılmış Klon Adı	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Chi.Sq
26B3	$5,24 \times 10^5$	$1,43 \times 10^{-5}$	$2,73 \times 10^{-11}$	2,48
24F12	$3,93 \times 10^5$	$3,99 \times 10^{-5}$	$1,02 \times 10^{-10}$	1,08
19D4	$4,27 \times 10^5$	$2,42 \times 10^{-4}$	$5,67 \times 10^{-10}$	0,656
9F3	$4,34 \times 10^5$	$3,10 \times 10^{-4}$	$7,15 \times 10^{-10}$	1,89

ÖRNEK 6: Seçilen FR α -spesifik Antikorların Epitop Eşleştirmesi

FR α -spesifik antikorlar 26B3, 24F12 ve 9F3 ayrıca Octet QK kullanılan epitop bağlama çalışmalarında da değerlendirilmiştir. Sonuçlar saflaştırılmış insan FR α için yüksek çekim gücüne sahip 26B3 ve 24F12'nin FR α 'ya bağlanmada birbiri ile rekabet ettiğini göstermiştir. Böylece bu antikorlar ortak bir epitopu paylaşabilir ya da birbirine yan yana bitişik epitoplara sahip olabilir. Sonuçlar ayrıca 9F3 antikorunun benzersiz bir epitopu olduğunu da göstermiştir, zira FR α 'ya bağlanma konusunda diğer FR α -spesifik antikorlarla rekabet etmemiştir.

ExSAR™ tarafından hidrojen/döteryum değişimi kütle spektrometrisi ve yanaştırma yöntemleri kullanılarak ek epitop eşleştirme çalışmaları yapılmıştır. Antikorlar 9F3, 24F12 ve 26B3 için yapılan bu çalışmaların sonuçları Şekil 2'de gösterilmiştir. Antikor 26B3'in epitopu ile ilgili olarak, bu veriler, 26B3'ün yerleşik FR α 'yı tanıma yeteneği göz önünde bulundurulduğunda bunun, akış sitometrisi ile yerleşik, membrana bağlı yapıda erişilebilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu veriler, indirgenmiş western blotları üzerinde protein algılama yeteneğinin de gösterdiği üzere MAb 26B3 ile tanınan epitopun doğrulama kısıtlamalarının, sistein 111 ile bir disülfid köprüsü oluşturan FR α proteinindeki konum 185'te yer alan sistein ile ilgilidir.

ÖRNEK 7: Denatüre ve Kimyasal Olarak Korunan FR α Formlarını Tanıma

Yukarıda açıklanan FR α -spesifik antikorlardan herhangi birinin denatüre FR α formlarını tanıyıp tanımayacağını belirlemek için deneyler yapılmıştır. Bu analizler için stabil olarak GPI-bağlantılı insan FR α , β , ya da Δ ekspres eden CHOK1 hücreleri, Tam Mini Proteaz İnhibitör Kokteyli (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) ve PMSF (100 nM) ile tamamlanan 1,1 OBG tamponunda (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, %1,1 OBG) çözünmüş ve 15 dakika boyunca buz üzerine yerleştirilmiştir. Lizatlar, tortuları gidermek için 13.000 rpm santrifüj ile 15 dakika boyunca önceden temizlenmiştir. İndirgenmiş ve denatüre örneklerde, eşit miktarlarda protein (20 μ g) 10 dakika boyunca %5 P-merkaptoetanol + 40 mM DTT içeren NuPAGE® LDS örnek tamponunda (Invitrogen) kaynatılmıştır. Proteinler, %4-12'lik bir bis-tris jeli (Invitrogen) üzerinde SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak ayrılmış ve bir PVDF membranına aktarılmıştır. Membran PBST+ %5 yağsız süt içinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloke edilmiş, her birinden sonra membran PBST ile iki kez yıkanmıştır. İmmüno blot işlemi, FR α için spesifik saflaştırılmış fare monoklonal antikorları 9F3, 19D4, 24F12 ya da 26B3 (1 μ g/nL) kullanılarak yürütülmüştür, bunlar bir keçi-anti-fare HRP-konjüge antikor ile saptanmış ve SuperSignal West Pico kemilüminesan sübstrat (Pierce, Rockford, EL) kullanılarak görselleştirilmiştir. Lüminesans, UltraQuant™ 6.0 yazılımı (Ultra-Lum) kullanılarak gerçekleştirilen görüntü analizi ile Omega 12iC moleküler görüntüleme sistemi (Ultra-Lum, Claremont, CA) kullanılarak görselleştirilmiştir.

Ayrıca saflaştırılmış folat reseptör preparatları kullanılarak Western blot analizleri yapılmıştır. Bu deneyler için, Örnek 1'de açıklanan şekilde üretilmiş 0,5pg saflaştırılmış insan FR α , β , Γ ya da Δ , 20 mM DTT ile ya da olmadan 1X SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda (Invitrogen) inkübe edilmiş, 10 dakika kaynatılmış ve 4-12 gradyan SDS-PAGE jelleri üzerinde elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Protein PVDF membranına aktarılmış ve blotlar yukarıda açıklanan şekilde proplanmıştır. Jeller Benchmark™ önceden boyanmış protein merdiveni (Novex®) kullanılarak çalıştırılmış, ayrıca saflaştırılmış rekombinant FR proteinleri kullanan jeller, eşit miktarda protein yüklenmesini sağlamak için gümüş boyama aracılığıyla görselleştirilmiştir.

Western blot analizleri antikorlar 19D4, 9F3, 24F12, ve 26B3'ün indirgenmemiş FR α 'yı tanıdığını, ancak indirgenmiş ve denatüre örneklerle bağlanma bu antikorların herhangi biri için saptanmamıştır (Şekil 3(A) ve (B)).

- Ayrıca antikorlardan herhangi birinin formalinle sabitlenen parafine gömülü seröz yumurtalık kanser dokusu örneklerine bağlanıp bağlanamayacağını belirlemek için immünohistokimya (IHC) çalışmaları da yapılmıştır. MACH4™ Universal HRP-Polimer Saptama Kiti (Biocare Medical) kullanılarak FR α için dolaylı IHC testi gerçekleştirilmiştir. Formalinle sabitlenen parafine gömülü numunelerin pozitif yüklü cam slaytlar üzerinde 5 mikronda kesitleri çıkarılmış ve yaklaşık 60 dakika 60 °C'de ısıtılmıştır. Slaytlar her biri 3 dakikalık 3 sıralık ksilen banyosunda deparafinize edilmiş, her biri 3 dakikalık üç sıralı %100 alkol banyosuna aktarılmış, ardından her biri 3 dakikalık üç sıralı %95 alkol banyosuna aktarılmış ve sonra 5 dakika boyunca deiyonize (DI) su ile durulanmıştır. Hazırlanan örnekler daha sonra Diva ısıyla tetiklenen ve DI suyunda 1:10 oranında seyreltilen epitop alma çözeltisi (Biocare Medical) ile ön işleme alınmış ve 500 ml DI suyu ile doldurulmuş bir basınçlı decloaking bölmesine yerleştirilmiştir. Örnekler 15 dakika boyunca, basınçlı inkübasyonun 30 saniye boyunca maksimum 125 °C ve 16 PSI'a ulaştığı decloaking bölümünde inkübe edilmiş ve sonra 15 dakika boyunca 95 °C'ye soğutulmuştur. Slaytlar daha sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığına soğutulmuştur. Soğutmadan sonra slaytlar, her biri 3 dakika boyunca 3 sıralı Tris Tamponlu Tuzlu Su/%0,1 Tween-20® yıkama tamponunda (TBST) yıkanmıştır. Sonraki tüm tampon yıkamaları da bu şekilde yapılmıştır. Slaytlar daha sonra Peroksidaz-1 (Biocare Medical) blokaj çözeltisinde, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca bloke edilmiş, TBST ile yıkanmış, ve ardından Background Sniper (Biocare Medical) serum içermeyen evrensel blokaj reaktifi 10 dakika boyunca oda sıcaklığında uygulanmıştır. Örnekler bloke edildikten sonra slaytlar, Antikor Seyreltisi (Dako) ya da Evrensel Negatif Kontrol - Fare kullanıma hazır negatif kontrol antikor (negatif izotip dokusu için Dako) içinde seyreltilen 2,5 µg/ml 26B3 antikor ile 60 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra slaytlar TBST ile yıkanmış ve MACH4™ Fare Prob Birincil Antikor Geliştirici (Biocare Medical MACII4™ kitinde sunulan) ile 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra slaytlar yeniden TBST ile yıkanmış ve bir Polimer-HRP reaktifi (Biocare Medical MACH4 kitinde sunulan) ile 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, slaytlar TBST ile yıkanmış ve bir 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorür

(DAB) çözeltisi (Dako) ile 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından slaytlar DI suyu ile, her biri 30-60 saniye olacak şekilde 3 kez tümüyle durulanmış, hematoksilin (Dako) ile 2 dakika boyunca ters boyama işlemine alınmış, TBST ile yıkanmış, her biri 30 saniye olmak üzere 3 sıralı %95 ve %100 alkol çözeltisinde dehidre edilmiş ve her biri 30 saniye boyunca 3 sıralı ksilen banyosunda temizlenmiştir. Son olarak analizden önce slaytlara lamel uygulanmıştır.

Genel olarak bir antikorun, ilgi alanındaki antijenin bir lineer epitopunun formalinle sabitlenen parafine gömülü dokunun immünohistokimyası için etkili olup olmayacağını tanıyabilmesi gerektiği düşünülür, çünkü antijen, doku fiksasyonunun yıkıcı doğasından dolayı üçlü yapıdan yoksundur. Bu yüzden antikor 26B3'ün bu test içinde FR α 'yı tanıyamaması (Şek. 4) şaşırtıcıdır, çünkü western blot ile, indirgenmiş ve denatüre FR α 'yı tanımamaktadır. Ayrıca, FR α 'nın normal dokular için gözlenen antikor 26B3 ile boyama deseni, çeşitli derecelerde ekspresyon gösteren pankreas, tiroid, akciğer, tükürük bezi, böbrek, hipofiz, serviks ve göğüs ile diğer çeşitli antikorlar ve teknikler kullanılarak daha önce yayınlanan literatürle tutarlı gözlenmiştir (Tablo 3). Şekil 5'te gösterildiği üzere, normal akciğer (A) ve normal böbrek (B) kesitlerinde örneklendirilen normal dokulardaki boyama deseni, büyük oranda epitelyal hücrelerle sınırlıdır ve tipik olarak apikal doğadadır.

Tablo 3. Normal insan dokularında FR α ekspresyonu

Doku Tipi	Boyama (Sayı/Yoğunluk)	Yorumlar
Beyin	0/3	
Beyincik	0/3	
Böbrek üstü bezi	0/3	
Yumurtalık	0/3	
Pankreas	3/3; 2+	Duktal ve asiner hücrelerin luminal sınırları ile sınırlı
Tiroid	2/5; 1+ (seyrek)	Foliküler hücrelerde sitoplazmik boyama

Hipofiz	3/3; 1+	Baskın sitoplazmik
Testis	0/3	
Göğüs	3/3; 1+/2+	Luminal ve membran boyamalı duktal hücreler
Dalak	0/3	
Bademcik	0/3	
Timüs	0/3	
Kemik İliği	0/3	
Akciğer	3/3; 2+	Bronşiyal ve alveolar hücrelerde boyama
Kalp	0/3	
Ozofagus	0/3	
Mide	0/2	
İnce Bağırsak	0/3	
Kolon	0/3	
Karaciğer	0/3	
Tükürük Bezi	3/3; 3+	Duktal ve asiner hücreler
Böbrek	3/3; 3+	Proksimal tübüler hücrelerin luminal boyaması
Prostat	0/3	
Endometriyum	0/3	
Serviks	1/3; 1+	Endoservikal hücreler
İskelet Kası	0/3	
Cilt	0/3	
Sinir	0/3	
Mezotelyum (plevra ve akciğer)	3/3; 2+	Alveolar hücreler

ÖRNEK 8: Yerleşik FRα Formlarının Tanınması

Seçilen FR α -spesifik antikorların yerleşik proteine bağlanma kabiliyetini değerlendirmek için akış sitometrisi çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalar için FR α ekspres eden Çin hamster yumurtalık (CHO) hücreleri toplanmış, yıkanmış ve buzlu büyüme ortamında (%10 FBS ile tamamlanan RPMI) yeniden süspansiyon haline getirilmiştir.

- 5 Hücreler 1 saat boyunca buz üzerinde 9F3, 19D4, 24F12 ya da 26B3 (1 μ g/mL) ile inkübe edilmiş, yıkanmış ve ardından FITC-konjüge ikincil antikorlarla [1:100 seyrelti] (Southern Biotech, Birmingham, AL) inkübe edilmiştir. Analizden önce hücreler, yaşamayan hücrelerin hariç tutulması için 7-amino-aktinomisin D (7-AAD) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) ile etiketlenmiştir. Ayrıca FR α ekspres etmeyen CHO hücreleri de, negatif kontrol olarak aynı
- 10 deneysel prosedürlere tabi tutulmuştur. Hücreler bir EasyCyte™ Akış Sitometresinde (Guava® Technologies, Hayward, CA) analiz edilmiştir. Tablo 4'te sunulan veriler, dört antikorun tümünün de yerleşik FR α 'ya bağlanabildiğini göstermektedir.

Tablo 4: FR α -spesifik antikorlar hücre yüzeyinde ekspres edilen FR α 'yı tanır

Hedef	Antikor için Gözlemlenen Geometrik Ortalama			
	9F3	26B3	24F12	19D4
Sadece hücreler	2,7	2,7	2,7	2,0
CHOK1	5,9	5,7	5,9	---
FR α	759,5	853,7	777,0	1130,5
FR β	6,1	5,9	6,6	---
FR Δ	5,6	5,4	5,9	---

15

ÖRNEK 9: FR α 'nın Yumurtalık Kanseri olduğu bilinen Deneklerin Serumunda Saptanması

Burada açıklanan FR α -spesifik antikorların yumurtalık kanseri olduğu bilinen hastaların serumunda FR α 'yı saptayabilip saptayamadığını belirlemek için elektrokemilüminesans çalışmaları yürütülmüştür. Bu deneyler için yakalama MAb olarak

20 MAb 26B3 kullanılmış ve 75 μ g/mL'lik konsantrasyonda ECL plakalarına eklenmiştir. Plakalar yıkanmış ve 50 pL örnek serum her bir kuyuya eklenip 2 saat inkübe edilmiştir. Serum

örnekleri normal sağlıklı dişilerden (negatif kontrol) ve yumurtalık kanser hastalarından elde edilmiştir. Örnekler PBST (%0,01 Tween®20 içeren fosfat tamponlu tuzlu su, pH7,4) içinde1:4 oranında seyreltilmiştir. İnkübasyondan sonra, örnekler PBST ve 25 µL/kuyu MAb 19D4 (1µg/mL) ile yıkanmış, yaklaşık 13 etiket/IgG molekülü oranında Ru ile etiketlenmiş, bağlanmış örneği saptamak için her bir kuyuya eklenmiştir. 2 saatlik inkübasyon süresinden sonra, plakalar PBST ile yıkanmış ve 2X MSD Tampon T ile okunmuştur. Tablo 5'teki sonuçlar serumdaki FRα'nın yakalanabileceğini ve monoklonal antikorlar 26B3 ve 19D4 kullanılarak saptanabileceğini göstermektedir.

Tablo 5: FRα'nın bağlı serum seviyeleri

Kategori (n)	Ortalama FRA pg/ml.	Standart Sapma
Normal (15)	223	74
Yumurtalık Kanseri	1815	3896

ÖRNEK 10: Yumurtalık Kanseri olduğu bilinen Deneklerin Serumunda ve İdrarındaki FRα'nın Saptanması

Burada açıklanan FRα-spesifik antikorların yumurtalık kanseri olduğu bilinen hastaların serumunda ve idrarında FRα'yı saptayabilip saptayamadığını belirlemek için elektrokemilüminesans çalışmaları yürütülmüştür. Bu deneyler için yakalama MAb olarak MAb 26B3 kullanılmış ve 75µg/mL'lik konsantrasyonda ECL plakalarına eklenmiştir. Plakalar yıkanmış ve 50 µL örnek serum her bir kuyuya eklenip 2 saat inkübe edilmiştir. Eşleşen serum ve idrar örnekleri normal sağlıklı dişilerden (negatif kontrol) ve yumurtalık kanser hastalarından elde edilmiştir. Örnekler PBST (%0,01 Tween®20 içeren fosfat tamponlu tuzlu su, pH7,4) içinde1:4 oranında seyreltilmiştir. İnkübasyondan sonra, örnekler PBST ve 25 µL/kuyu MAb 19D4 (1µg/mL) ile yıkanmış, yaklaşık 13 etiket/IgG molekülü oranında Ru ile etiketlenmiş, bağlanmış örneği saptamak için her bir kuyuya eklenmiştir. 2 saatlik inkübasyon süresinden sonra, plakalar PBST ile yıkanmış ve 2X MSD Tampon T ile

okunmuştur. Tablo 5'teki sonuçlar serumdaki ve idrardaki FR α 'nın yakalanabileceğini ve monoklonal antikorlar 26B3 ve 19D4 kullanılarak saptanabileceğini göstermektedir.

Tablo 6: FR α 'nın bağıl serum ve idrar seviyeleri

Hasta	Serum FRalfa pg/ml.	İdrar FRalfa pg/ml.
Normal 1	398	3080
Normal 2	236	11508
Normal 3	315	7704
Normal 4		
Yumurtalık Kanseri 1	19749	368066
Yumurtalık Kanseri 2	4144	23738
Yumurtalık Kanseri 3	986	165826
Yumurtalık Kanseri 4	719	414187

5

ÖRNEK 11: İmmünohistokimya Sonuçları için Metrik Olarak M-Skoru

Her bir örneğin boyaması (M-skoru) için bir metrik geliştirilmiştir ve aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

$$M_i = \frac{\sum_{j=1}^3 W_j \cdot X_{ij}}{\sum_{j=1}^3 W_j} = \frac{\sum_{j=1}^3 W_j \cdot X_{ij}}{6}$$

10

Denklemden, X_{ij} , hasta i için j yoğunluğunda boyanan tümörün yüzdesi ve w_j , yoğunluğun mutlak değeridir (0 ile 3+ arasında değişen). Metrik sıfır (pozitif boyama yok) ile elli (3+ yoğunlukta %100 hücre boyaması) arasında teorik bir aralığa sahiptir. Bu şekilde, M-skoru, FR α pozitif hücrelerinin oranını hem de boyama yoğunluğunu yakalayan FR α IHC tümör hücresi membran boyaması için ağırlıklı bir skordur. Her hastanın M-skorları, uygun yerlerde

15

birden çok doku mikro dizilim (TMA) örneği üzerinde ortalama hesaplanmıştır. Bir örnek sonuçlardan yoksunsa, örn. bir tümör varlığı ya da nekrotik doku yoksa, M-skoru yoksun olmayan determinasyonlara atanmıştır.

Yukarıdaki denklemin pratik bir uygulaması aşağıda verilmiştir:

5

3+	2+	1+	0	M Skoru
X=40	Y=30	Z=10		$M=(3x+2y+z)/6$
$3 \times 40 = 120$	$2 \times 30 = 60$	$1 \times 10 = 10$		$(120+60+10)/6 = 31,67$

Burada, x = 3+ yoğunlukta boyanan % tümör; y = 2+ yoğunlukta boyanan % tümör; z = 1+ yoğunlukta boyanan % tümördür.

- Belirli bir histoloji dahilinde yer alan FR α ekspresyonunun pozitif oranı, bir pozitif sonuç tanımına göre pozitif boyanan örneklerin oranı olarak hesaplanmıştır ($\geq$ toplam tümör hücreleri boyamasının %5'i). Kesin binomiyal güven aralıkları, oluşturulan yöntemler kullanılarak belirlenecektir (Clopper C.J. ve Pearson R.C., Biometrika. 26:404-13 (1934)). Tüm demografik değişkenler ve M-skor için özel istatistikler burada sunulmuştur. Ortalama değerlerin farkları, genel tip I hatası için post-hoc testlerin kontrolü ile tek yönlü ANOVA kullanılarak belirlenmiştir. Test ile ilişkilendirilen p-değeri ilgili test için Bonferroni ayarlı tip I hatasından (maksimum Tip I hatası = 0,05) farklıysa ortalama değerlerdeki farklar istatistiksel olarak farklıdır.

ÖRNEK 12: Akciğer Karsinom Hücrelerinin Antikor 26B3 ve Antikor BN3.2 ile Karşılaştırmalı Boyaması

20

Literatürde, kısmen, çoğu ticari olarak temin edilebilir çeşitli antikorların kullanımından dolayı IHC ile belirlenen şekilde FR α ekspres eden çeşitli karsinomların yüzdesine ilişkin önemli varyasyon vardır. Ticari olarak temin edilebilir ve IHC tarafından

FFPE kesitlerinde FR α saptadığı gösterilen bir FR α spesifik MAb antikor BN3.2'dir (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL). Bu nedenle, akciğer kanserinin çeşitli histolojik türlerini içeren ticari bir TMA kullanarak FR α saptamaya için hem spesifiklik hem de duyarlılık açısından antikor BN3.2'yi antikor 26B3 ile karşılaştırmak amacıyla çalışmalar yürütülmüştür.

- 5 Her iki antikor da diğer histolojik alt türler, özellikle de sküamöz hücre karsinom ile karşılaştırıldığında adenokarsinom için son derece spesifik olmuştur. Ancak, antikor 26B3, sırasıyla 26/36 (%72; M-skor ortalama $\pm$ SD = 19,84 $\pm$ 18,64) ve 22/36 (%61; M-skor ortalama $\pm$ SD = 11,38 $\pm$ 14,25) adenokarsinom örneklerini ($p < 0,0001$) tanımlayan BN3.2'den çok daha duyarlı olmuştur. Bu veriler antikor BN3.2'nin FFPE doku örneklerinde FR α ekspresyonunun
- 10 saptanması için antikor 26B3'ten çok daha az duyarlı olduğunu göstermiştir ve Şekil 6'da gösterildiği üzere, bu iki antikor için akciğer adenokarsinomlarında gözlenen M-skorlarındaki ilişki lineer değildir.

ÖRNEK 13: FR α 'nın Akciğer Adenokarsinomu olduğu bilinen Deneklerde Saptanması

- Antikor 26B3 tarafından saptandığı üzere FR α pozitif histoloji varlığının akciğer
- 15 kanserinin özel formları ile ilişkilendirilip ilişkilendirilmediğini belirlemek için deneyler yürütülmüştür. Normal ve I. evre, II. evre, III. evre ve IV. evre kanserli akciğer doku numunelerinin kopya örneklerini içeren bir doku mikro dizilimi, Örnek 7'de açıklandığı üzere antikor 26B3 kullanılarak IHC boyama yoluyla FR α ekspresyonu için değerlendirilmiştir. Tablo 6'daki veriden görülebileceği üzere, FR α , sınırlı pozitif boyama sergileyen sküamöz hücre
- 20 karsinomlarına bağlı adenokarsinomlarla ilişkilendirilmiştir.

Tablo 7: Kanserli doku örneklerinin histolojik değerlendirmesi

Membran Boyama			Membran Pozitif		Toplam
			Negatif	Pozitif	
	Adenokarsi nom	Sayım	11	27	

Histoloji Grupları		Histoloji Gruplarında %	428,9	471,1	38
					4100,0
	Sküamöz	Sayım	28	3	31
		Histoloji Gruplarında %	490,3	49,7	4100,0
	Diğer Karsinomlar	Sayım	17	4	21
		Histoloji Gruplarında %	481,0	419,0	4100,0
	Normal	Sayım	2	8	10
		Histoloji Gruplarında %	420,0	480,0	4100,0
Toplam		Sayım	58	42	100
		Histoloji Gruplarında %	458,0	442,0	4100,0

Doku mikro diziliminde, histolojik örneklerin 89'unda başka analizler gerçekleştirilmiştir, bunlardan 36'sı (%40) adenokarsinom, 32'si (%36) sküamöz hücre karsinomu, 2'si (42) adenosküamöz karsinomdur ve kalan 19'u (%21) çeşitli histolojileri temsil etmektedir (Tablo 8). FR α pozitifliğin genel oranları histolojik alt türlerin her biri için büyük oranda değişiklik göstermiştir. Adenokarsinom tümörlerinin belirgin ölçüde daha yüksek oranı, sküamöz hücre karsinomlar (%72'ye karşı %13, p<0,0001) ile karşılaştırıldığında FR α için pozitif belirlenmiştir. 4 pozitif sküamöz hücre karsinom örneğinden yalnızca 1 tanesi her iki örnekte de 3+ boyama göstermiştir; 1 tanesi her iki

örnekte orta (2+) boyama göstermiş ve diğer 2'si tek bir örnekte son derece zayıf bir pozitiflik göstermiştir (tümör hücrelerinin %5-10'unda 1+). Dahası, iki adenosküamöz karsinom örneğinin de FR α için pozitif olduğu ve boyamanın bu örneklerin adenokarsinom kısmıyla sınırlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 7).

5 Tablo 8: NSCLC Türü# Arasında FR α Ekspresyonunun Dağılımı

<i>Değişken</i>	FRα negatif N(%)	FRα pozitif N(%)	Toplam m	P değeri*
Tümör Histolojisi				
Normal	1 (10)	9 (90)	10	
Skuamöz hücre karsinomu	28 (87)	4 (14)	32	<0,0001
Büyük hücreli karsinom	3 (60)	2 (40)	5	
Küçük hücreli karsinom	7 (87)	1 (13)	8	
Nöroendokrin karsinom	4 (67)	2 (33)	6	
Adenokarsinom* *	10 (16)	28 (74)	38	
Tümör Derecesi				
Derece 1	1 (20)	4 (80)	5	
Derece 2	5 (22)	18 (78)	23	
Derece 3	4 (40)	6 (60)	10	0,517
Tümör Evresi				
I. Evre	4 (29)	11 (71)	15	
II. Evre	2 (17)	10 (83)	12	
III. + IV. Evre***	4(36)	7(64)	11	0,563
Cinsiyet				
Kadın	3 (18)	14 (82)	17	
Erkek	7 (33)	14 (67)	21	0,46

#US Biomax Akciğer Kanseri TMA (katalog no BC041114; 90 vaka, kopya çekirdekler)

* Fisher'in kesin testi ya da ki-kare testi kullanılarak belirlenen P değerleri: Sküamöz hücre karsinomu ve adenokarsinom karşılaştırması $p < 0,0001$; erkekler ve dişiler karşılaştırması, $p = 0,46$; evre, $p = 0,563$; derece, $p = 0,517$

- 5 ** Her ikisi de yalnızca adenokarsinom kısmında FR α için pozitif olan 2 adenosküamöz vakası
*** Yalnızca 1 IV. evre vaka

Kopya adenokarsinom histoloji örneklerinin M-skoru analizleri, antikor 26B3 (Şekil 8) ile boyamada az değişim göstermiştir, bu da antikor 26B3 boyamanın sağlamlığının bir yansımasıdır. Ayrıca, adenokarsinom histolojik alt türünde evreye ve dereceye göre yapılan bir M-skoru incelenmesi, hastalığın ne evresinin ne de derecesinin, M-skorları ile tanımlanan boyamanın derecesi ile ilişkili olmadığını göstermemiştir (veri gösterilmemiştir).

Akciğer adenokarsinom ve sküamöz hücre karsinom örneklerinin FR α boyaması için M-skoru dağılımı Şekil 9'da gösterilmiştir. Antikor 26B3 ile boyanan adenokarsinom ve sküamöz hücre karsinom örnekleri için ortalama ($\pm$ SD) M-skorumu, sırasıyla 19,84 ($\pm$ 18,64) ve 1,39 ($\pm$ 5,54) olarak belirlenmiştir ($p < 0,0001$). Ayrıca adenokarsinom için M-skoru, diğer tüm akciğer kanseri histolojik türleri ile karşılaştırıldığında büyük oradan daha yüksek belirlenmiştir. Ek olarak adenokarsinom olan kanserin histolojisi için riskleri belirlemek amacıyla bir Ağaç Analizi gerçekleştirilmiştir. 21,7'den büyük bir M-skoru 16'lık bir risk oranı (OR) vermiştir, bu da FR α 'nın adenokarsinom histolojisinde baskın olarak ekspres edildiğini göstermektedir (analiz gösterilmemiştir).

Formalinle sabitlenen, parafine gömülü (FFPE) doku blokları nadiren geç evre akciğer kanseri olan hastalardan alınabilir, zira cerrahi rezeksiyonlar tipik olarak gerçekleştirilmemiştir. Bu nedenle, ince iğne aspirasyon (FNA) numunelerinin MAb 26B3 kullanarak FR α IHC için uygunluğunu belirleyecek çalışmalar yapılmıştır, zira geç evre akciğer kanseri en çok küçük biyopsi ya da sitoloji materyali aracılığıyla teşhis edilir. Bu çalışmalar için, bir torasik lenf düğümü aspiratının sitolojik değerlendirmesi ile teşhis edilen (Şekil 10) dokuz geç evre adenokarsinom hastasından örnekler alınmış ve FR α pozitiflik oranının (%63)

akciğer kanseri TMA'da değerlendirilen histolojik numuneler için görülenlerle karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir. Yalnızca küçük bir örnek boyutu olmasına rağmen, bu veriler sitolojik numunelerin geç evre adenokarsinom hastalarında FR α ekspresyonu belirlemek için uygun bir doku kaynağı olabileceğini göstermektedir.

5 ÖRNEK 14 - FR α , Küçük Olmayan Hücreli Akciğer Karsinomu olduğu bilinen Hastaların Kanından İzole Edilmiş CK+/CD45- Hücreleri tarafından Ekspres edilir ancak CK-/CD45+ Hücreleri tarafından Ekspres edilmez

FR α 'nın, Küçük Olmayan Hücreli Akciğer Karsinomu olduğu bilinen Hastaların dolaşım tümör hücrelerindeki (CTC'ler) ekspresyonunu belirlemek için çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalar için, 15 sağlıklı donörden ve 5 IV. evre akciğer kanseri hastasından kan örnekleri alınmış ve ardından ApoCell's ApoSteam™ sistemi kullanılarak CTC'ler için zenginleştirilmiştir. Zenginleştirmeden sonra, her örnek sitokeratin (CK), CD45 (protein tirozin fosfataz reseptörü tip C), çekirdekler ve FR α için boyanmıştır. FR α boyama, birincil antikor olarak antikor 26B3 kullanılarak gerçekleştirilmiştir, bu daha sonra bir fare-spesifik, DyLight® 649'a kojüğe ikincil antikor kullanılarak saptanmıştır. Tablo 9'da gösterildiği üzere, FR α ekspresyonu CK+/CD45- CTC'ler tarafından gözlenmiş ancak CK-/CD45+ CTC'ler tarafından gözlenmemiştir.

Tablo 9 - Küçük olmayan hücreli akciğer karsinomu olduğu bilinen hastaların dolaşımdaki tümör hücreleri tarafından FR α ekspresyonu

Hasta Kimliği	CK-/CD45+ sayımı	CK-/CD45+/FR α + %	FR α MFI (CK-/CD45+)
Hasta 1	2,270	0,0	YOK
Hasta 2	24.462	0,0	YOK
Hasta 3	26.503	0,0	YOK
Hasta 4	16.540	0,0	YOK
Hasta 5	2.652	0,0	YOK

Hasta Kimliği	7,5 mL kan içinde CK+/CD45- hücre	CK+/CD45-/FR α +%	FR α MFI (CK+/CD45-)
---------------	--------------------------------------	--------------------------	-----------------------------

	sayımı		
Hasta 1	55	15,6	32.195
Hasta 2	105	32,8	172.669
Hasta 3	216	9,3	146.521
Hasta 4	57	15,7	179.027
Hasta 5	47	8,1	277.335

ÖRNEK 15: FR α ekspres eden Akciğer Adenokarsinomu olan ve olmayan Deneklerin 5 Yıllık Hayatta Kalma Durumu

Antikor 26B3 tarafından saptanan şekilde FR α varlığı pozitif histolojisinin daha iyi ya da daha kötü 5 yıllık hayatta kalma durumu ile ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceğini belirlemek için deneyler yürütülmüştür. Normal ve I. evre ya da II. evre adenokarsinomlu kanserli akciğer dokusu numuneleri Örnek 7'de açıklanan şekilde IHC boyamaya tabi tutulmuş ve ardından okunmuştur. Tümör üzerindeki boyanın 3+, 2+, 1+ ve 0 yoğunluk yüzdesi kaydedilmiştir. Bir hastanın ikili ya da üçlü kopyası olarak yorumlanabilecek 177 slayt vardır. Değerlendirilebilir klinik ve histolojik veri ile birleştirildiğinde 53 değerlendirilebilir vaka tanımlanmıştır. Küçük olmayan hücreli akciğer adenokarsinomunun teşhisinden sonraki 5. yılda demografik, klinik ve hayatta kalma durumu ile ilgili veriler ışığında analizler gerçekleştirilmiştir.

M-skoru için bir optimum kesme noktası belirlemek amacıyla bir alıcı çalışma karakteristiği (ROC) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizde teşhis doğruluğu önemsiz olmuştur; ancak pozitif testin teşhis olasılık oranının negatif testin teşhis olasılık oranına oranı önemli olarak değerlendirilmiştir. Bu oranlar Pepe MS, The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction, New York: Oxford University Press (2003) yayınında açıklandığı gibi tanımlanmıştır. 10'luk kesme noktasında maksimum 6,62 risk oranı elde edilmiştir. Bu M değeri boyalı bir slaytın pozitifliğini belirlemek için seçilmiştir.

Kaplan-Maier hayatta kalma işlevleri, prognostik faktör olarak FR α ilişkisi ile üretilmiştir. Bir log sıra testi, FR α için pozitif olmanın ölümcül olmayan olaylarda avantajlı

olduğunu göstermiştir (Ki-kare=7,34, df=1, p=0,007). Şekil 11'de, 26B3 saptamasına göre FR α pozitif ve FR α negatif oldukları varsayılan I. evre ve II. evre adenokarsinom grupları için hayatta kalma işlevleri gösterilmiştir. 5. yılda tehlike oranı 2,42'dir. Bu durum, FR α için negatif (M<10) olan tümörlere sahip deneklerin teşhisten sonraki beş yıl içinde ölme olasılığının FR α -pozitif tümörlere (M $\geq$ 10) sahip deneklere göre 2,5 kat fazla olduğunu göstermektedir.

ÖRNEK 16: Folat Reseptör Alfa Ekspresyonu Üçlü-Negatif Göğüs Kanseri Formları ile İlişkilendirilmiştir

Göğüs kanseri doku örnekleri ile FR α ekspresyonunu değerlendirmek için çalışmalar yürütülmüştür. Analizler, Örnek 7'de açıklanan şekilde antikör 26B3 ile boyanan doku mikro dizilimi (TMA) örnekleri ve Örnek 7'de açıklanan şekilde antikör 26B3 ile hazırlanan ve boyanan FFPE histoloji örnekleri kullanılarak yürütülmüştür.

Göğüs kanseri TMA'da mevcut histolojilerin dağılımı (ABD BioMAX katalog no BR 1503a; 72 vaka, kopya çekirdekler) Tablo 10'da gösterilmiştir, temsil edilen vakaların çoğu invazif ductal karsinom (IDC) olarak tanımlanmıştır. TMA 2 normal göğüs örneği içermiş, bunlar, MAb 26B3 ile belirlenen şekilde FR α ekspresyonu için pozitif olarak gözlenmiştir. Normal göğüsteki boyama, luminal ve membran boyaması olan duktal hücrelerle sınırlanmıştır. Üç fibroadenom vakalarından ikisi (%67), 0/2 sistosarkoma vakaları (%0) ve 1/6 duktal karsinom in situ vakası (%17) FR α için pozitif olarak belirlenmiştir. Tekil invazif lobüler karsinom (LLC), FR α boyama için negatif olarak belirlenmiştir. 59 EDC örneğinden 18'i (%31) FR α için pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 12). Bu TMA'daki pozitif vakaların düşük sayısı düşünüldüğünde, evre ya da dereceye bağlı geçerli bir FR α ekspresyon analizi mümkün olmamıştır; ancak, örneklerin çoğunun T1 ya da T2 olduğuna dikkat edilmelidir. FR α ekspresyonunun, ER/PR pozitif tümörlerle (p=0,012) bağlı ER/PR negatif tümörlerle ve üçlü negatif göğüs kanserleri (TNBC) (ER/PR+ ya da Her2+ ve ER/PR/Her2- karşılaştırması, p<0,0001) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

18 FR α pozitif IDC vakasından, yalnızca 2'si (%11) Her2 pozitif belirlenmiştir, bu da büyük çoğunun (%89) Her2 negatif olduğu anlamına gelmektedir. Bu veriler FR α pozitifliğinin Her2 negatifliği ile daha yakından takip ettiğini göstermektedir. Ayrıca 18 FR α pozitif IDC vakasından 3'ü estrogen reseptör (ER) pozitif ve 4'ü progesteron reseptör (PR) pozitif olarak belirlenmiştir, ancak tüm ER/PR pozitif/FR α pozitif vakalar Her2 negatif olarak belirlenmiştir. 18 FR α pozitif IDC vakasından 12'si (%67) üçlü negatif göğüs kanserleridir (TNBC), bu da FR α 'nın çok zayıf prognoz TNBC moleküler alt türü için bir işaretçi ve hedef olabileceğini göstermektedir. TMA'ya bir bütün olarak bakıldığında, 13 Her2 pozitif vakadan yalnızca 2'si (%15) ayrıca FR α için pozitif olarak belirlenmişken, 46 Her2 negatif vakalarından 16'sı (%35) ayrıca FR α pozitif olarak belirlenmiştir, bu da FR α ekspresyonunun Her2 ekspresyonu ile negatif ilişkili olduğunu desteklemektedir. Bu TMA için moleküler alt tür (her-2 (+) ve her-2 (-)) ile bağlı M-skorlarının dağılımının bir temsili Şekil 13'te gösterilmiştir.

Yukarıda açıklanan TMA öncelikle erken evre göğüs kanserlerinde oluşmaktadır: I. evre, 6/60 (10); II. evre, 44/60 (73); III. evre, 10/60 (17). Bu nedenle, TMA'da elde edilen sonuçları onaylamak ve genişletmek için, bilinen ER/PR ekspresyonu %0-100 pozitif arasında olan IV. evre (T4) Her2 negatif göğüs kanserlerinden 61 FFPE doku bloku değerlendirilmiştir (FFPE doku blokları Genzyme Genetics arşivlerinden elde edilmiştir). Bu 61 örneğin tümü, birincil tümörden değil metastazlardan gelmiştir. Bu çalışmanın sonuçları Tablo 11'de özetlenmiştir.

Tablo 10: Histoloji türleri arasında FR α pozitiflik dağılımı - TMA verisi

Tümör Histolojisi	FR α pozitif N (%)	FR α negatif N (%)	Toplam	P değeri*
Normal	2 (%100)	0 (%0)	2	
Fibroadenom	2 (%67)	1 (%33)	3	
Sistosarkoma	0 (%0)	2 (%100)	2	
DCIS - Duktal karsinom in situ	1 (%17)	5 (%83)	6	
ILC - İnvazif lobüler karsinom	0 (%0)	1 (%100)	1	
IDC - İnvazif duktal karsinom	18 (%31)	41 (%69)	59	
Toplam	21 (%30)	50 (%70)	71	
karsinomlar:				
IDC Moleküler alt tür				
analizi:				
ER/PR +	4 (%14)	24 (%86)	28	0,012
ER/PR -	14 (%45)	17 (%55)	31	
Her2 +	2 (%15)	11 (%85)	13	
Her2 -	16 (%35)	30 (%65)	46	
ER/PR/Her 2-	12 (%67)	6 (%33)	18	<0,0001
				(ER/PR+ ya da Her2+

ER/PR/Her2-
karşılaştırması)

T1	3 (%43)	4 (%57)	7		
T2	10 (%26)	29 (%74)	39		
T3	5 (%63)	3 (%37)	8		
T4	0 (%0)	5 (%100)	5		
N0	18 (%35)	33 (%65)	51		5
N1/N2*	0 (%0)	8 (100)	8	0,992	
*					
Derece 1	1 (%14)	6 (%86)	7		
Derece 2	12 (%36)	21 (%64)	33	0,393	
Derece 3	5 (%26)	14 (%74)	19	0,6465	10

*P değerleri, Fisher'ın kesin testi kullanılarak 2X2 ihtimal tablosu analizi aracılığıyla hesaplanmıştır.

** 8 N1/N2 örneğinin 4'ü (%50) Her2+ olarak belirlenmiştir

15

FRα ekspresyonu (Şekil 14) bu hastalarda 22/61 (%36) oranında belirlenmiştir, bu da erken evre hastalıkta belirlenen FRα pozitif numunelerin/tümörlerin bir Her2 negatif popülasyonunda geç evre metastatik hastalıkta korunduğunu göstermektedir (TMA pozitifliği = %35; IV. evre metastatik hastalık = %36). 22 FRα pozitif IV. evre metastatik hastadan, yalnızca 3'ü (%14) ER/PR için herhangi bir pozitiflik göstermiş, böyle bir pozitifliğin trendi düşük aralıkta gözlenmiştir (%30'a kadar). Böylece, 19/22 (%86) oranında FRα pozitif hasta, üçlü negatif moleküler alt türdeydir. Tekrar, bu veriler, tercihen, TMA'da erken evre

20

hastalıkta elde edilen verilerle karşılaştırılır, burada tüm FR α pozitif hastaların %67'si üçlü negatif alt türde dir.

Tablo 11: Metastatik göğüs kanserinin moleküler alt türlerinde FR α pozitifliğinin dağılımı

Tümör	FR α pozitif	FR α	Topla	P değeri*
Moleküler alt tür	N (%)	negatif N (%)	m	
Toplam				
Ornek:	22 (% 36)	39 (% 64)	61	
ER/PR+	3 (% 14)	20 (% 86)	23	
ER/PR/Her2-	19 (% 50)	19 (% 50)	38	0,0054
				(ER/PR+ ve ER/PR/Her2- karşılaştırması)
Derece 1	3 (% 30)	7 (% 70)	10	
Derece 2	11 (% 28)	28 (% 72)	39	1,0
				(Derece 1 ve Derece 2 karşılaştırması)
Derece 3	8 (% 67)	4 (% 33)	12	0,037
				(Derece 1 ya da 2 ve Derece 3 karşılaştırması)

* P değerleri, Fisher'ın kesin testi kullanılarak 2X2 ihtimal tablosu analizi aracılığıyla hesaplanmıştır.

Ek olarak, IV. evre metastatik hastalıkta gelen örnekler lenf düğümü, kemik, cilt ve karaciğer gibi bir dizi metastatik bölgeden elde edilmiştir, yanı sıra birincil olarak plevra ve parasentezden elde edilen sıvı ve ince iğne aspirasyon (FNA) örnekleri de mevcuttur. Bu 'sıvı biyopsilerin' birkaçının FR α için pozitif boyanması (Şekil 15), açıklanan IHC metodolojisinin birden çok numune türüne genel olarak uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

ÖRNEK 17: Histolojik Jinekolojik Kanser Örneklerinin Folat Reseptör Alfa Ekspresyonu için Değerlendirilmesi

Yumurtalık, endometriyum ve fallop tüpü gibi jinekolojik tümörlerdeki FR α ekspresyonunu değerlendirmek için immünohistokimyasal çalışmalar yürütülmüştür. Analizler, Örnek 7'de açıklanan şekilde antikor 26B3 ile boyanan doku mikro dizilimi (TMA) örnekleri ve Örnek 7'de açıklanan şekilde antikor 26B3 ile hazırlanan ve boyanan FFPE histoloji örnekleri kullanılarak yürütülmüştür. Ticari doku mikro dizimleri, US Bio max, Inc.'den (Rockville, MD) yumurtalık karsinomları (katalog no OV1921; 96 vaka, kopya çekirdekler); endometriyal karsinomlar (katalog no EMC1021; 102 vakalar, tekli çekirdekler); ve fallop tüpü karsinomlar (katalog no UTE601; 30 vaka, kopya çekirdekler) temin edilmiştir.

Membranlı boyama için pozitif tümör hücrelerinin yüzdesi herhangi bir yoğunlukta %5'e eşit ya da daha büyükse bir örnek FR α ekspresyonu için pozitif olarak kabul edilmiştir. Bir örnek, jinekolojik patolog tarafından bunun tümüyle eksik ya da değerlendirme için yeterli sayıda canlı hücre içeren nekrotik dokudan oluşmadığı şeklinde tanımlandığında reddedilmiş ve bu nedenle analizlere dahil edilmemiştir. Endometriyal örneklerden altı tanesi yalnızca adenokarsinom olmadan atipik kompleks hiperplazi içermiştir. Hücre türünün ve derecesinin histolojik sınıflandırmasında, WHO'nun Göğüs ve Kadın Jenital Organ Sınıflandırması (Tavassoli ve Devilee) temel alınmıştır. FIGO ve TNM sistemini temel alan klinik evre TMA üreticisi (US Biomax) tarafından verilmiştir.

Belirli bir tümör tipi dahilinde yer alan FR α ekspresyonunun pozitif oranı, bir pozitif sonuç tanımına göre pozitif boyanan tümörlerin oranı olarak hesaplanmıştır (tümör hücre membranı boyamasının $\pm$ %5'i). Grup, örn. histolojiler, evre ya da derece arasındaki FR α pozitifliğinin farkları 2x2 ihtimal tabloları ve Fisher'in kesin testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Test ile ilişkilendirilen p-değeri ilgili test için Bonferroni ayarlı tip I hatasından (maksimum Tip I hatası = 0,05) farklıysa ortalama değerlerdeki farklar istatistiksel olarak farklıdır.

Membran ve sitoplazmik boyama yoğunluğu boyasız örnekler için 0; zayıf için 1+; orta için 2+ ve güçlü için 3+ olarak puanlanmıştır. Her yoğunluk için örnekteki hücrelerin yüzdesi de ayrıca belirlenmiştir. Doku 4x, 10x, 20x ve 40x hedefler altında analiz edilmiştir. Güçlü membran boyama (3+), 4x altında kolayca görselleştirilmiş ve 10x'te onaylanmıştır. Orta membran boyama (2+) 10x'te görünür olarak gözlenmiş ve 20x'te onaylanmıştır. Zayıf boyama (1+) için 20x ya da 40x gerekmiştir (Şekil 16). 3+ boyama varlığında, membran apikal

ve lateral hücre sınırlarında kalın oluşmuştur. Teğet kesitlerde, komple çevresel bir desen belirgin gözlenmiştir (Şekil 16 (A) ve (B)). 2+ membran boyama yoğunluk açısından daha zayıf ve 3+'ten daha ince, ve genel olarak apikal luminal sınırlarda ve ara sıra lateral hücre sınırlarında gerçekleşmiştir. 1+ zayıf membran genel olarak luminal sınırlarla sınırlanmıştır.

- 5 Birlikte gelişen sitoplazmik boyama tümörlerin türüne göre değişken gözlenmiştir.

Yumurtalık tümör TMA'da 94 değerlendirilebilir örnekten 70'i (%74) seröz tipte, 10'u (%11) müsinöz, 4'ü (%4) endometrioid, 3'ü (%3) şeffaf hücre tipi ve kalan 7'si (%8) çeşitli nadir tümörler olarak belirlenmiştir. 87 yumurtalık karsinomu örneğinde, her hücre türü için FR α pozitif oranı aşağıdaki gibidir: seröz türde %100 (70/70), müsinöz türde %80 (8/10), endometrioid türde %75 (3/4) ve şeffaf hücre türünde %67 (2/3). Seröz ve müsinöz tür arasındaki fark, Fisher'ın kesin testi ile 0,014 p değeri ile belirgindir (Tablo 12). FR α durumu histolojik derece ya da klinik evre için belirgin değildir. Birlikte görülen sitoplazmik boyama genel olarak seröz türde 2+ ya da 3+ ve diğer tümör türlerinde daha zayıf ve daha seyrek.

Tablo 12: Yumurtalık karsinomlarında histoloji türüne, klinik evreye ve histolojik dereceye bağlı FR α pozitifliği dağılımı

Tümör Histolojisi*	FR α negatif N (%)	FR α pozitif N (%)	Toplam n	P değeri**
Seröz karsinom	0 (%0)	70 (%100)	70	
Müsinöz karsinom	2 (%20)	8 (%80)	10	0,014
Endometrioid karsinom	1 (%25)	3 (%75)	4	
Şeffaf hücre karsinomu	1 (%33)	2 (%67)	3	
Toplam	4 (%5)	83 (%95)	87	
II. Evre	4 (%9)	41 (%91)	45	
III. Evre	0 (%0)	29 (%100)	29	0,15
IV. Evre	0 (%0)	13 (%100)	13	
Derece 1	2 (%15)	11 (%85)	13	NS***
Derece 2	1 (%3)	31 (%97)	32	NS
Derece 3	1 (%3)	39 (%97)	40	NS

* 1 geçişli hücre karsinomu, 1 sküamöz karsinom, 1 Embriyonel karsinom, 2 yumurta kesesi tümörü ve 2 granüloz hücre tümörü analize dahil edilmemiştir

** Fisher'ın kesin testi ya da ki-kare testi kullanılarak belirlenen P değerleri: Seröz karsinom ve müsinöz karsinom karşılaştırması $p=0,014$

5 *** NS=Önemli Değil

Endometriyal örneklerde, FR α , normalde %80 (4/5) (Şekil 17(A)), atipik kompleks hiperplazide $\neq$ 100 (6/6) (Şekil 17(B)) ve 88 endometrioid tür ve 1 şeffaf hücre türü de dahil adenokarsinomlarda %89 (80/90) oranında ekspres edilmiştir (Şekil 18 ve 19). Sekiz endometrioid adenokarsinom sküamöz metaplazi alanlarını içermiştir. Normal endometriyumda, membran boyama zayıf ve apikal luminal sınırlarla sınırlı olarak gözlenmiştir (Şekil 17(A)). Atipik kompleks hiperplazi ve karsinomlarda, boyama baskın olarak luminal gözlenmiş ve ayrıca bazı vakalarda lateral hücre sınırlarında gözlenmiştir (Şekil 17(B)). 3+ membran boyama varlığında, sitoplazmik boyama güçlüden (Şekil 18(A)) zayıfa (Şekil 18(B) ve (C)) değişkenlik göstermiştir. 1+ ya da 2+ membran boyamalı tümör hücreleri nadiren sitoplazmik boyama ekspres etmiştir. Metazatik sküamöz hücrelerin ve şeffaf hücrelerin çoğunluğu orta ila güçlü membran boyaması sergilemiştir. (Şekil 19(A) ve (B)).

FR α ekspresyonu, 1. derece tümörlerin %100'ünde, 2. derecenin %96'sında ve 3. derecenin %74'ünde pozitif gerçekleştirilmiştir (1. derece ve 3. derece karşılaştırması, p değeri=0,0029; 2. derece ve 3. derece karşılaştırması, $p=0,034$). FR α durumu T1 ve T2/3; N0 ve N1 ve I. evre ve II/III. evre karşılaştırmasına göre belirgin gözlenmemiştir.

Normal fallop tüplerinin on yedi çekirdeği, 16 kronik salpenjit örneği ve 20 tubal seröz karsinomun hepsi membran ve sitoplazmik boyama için güçlü düzeyde pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 20 (A) - (C)).

ÖRNEK 18: Histolojik Kalın Bağırsak Örneklerinin Folat Reseptör Alfa Ekspresyonu için Değerlendirilmesi

Kalın bağırsak doku örneklerinde FR α ekspresyonunu değerlendirmek için immunohistokimyasal çalışmalar yürütülmüştür. US Biomax'tan (katalog no BC051111) elde edilen doku mikro dizilim (TMA) örnekleri kullanılarak analizler yürütülmüştür. TMA, kalın bağırsak kanseri olduğu bilinen deneklerden alınan 90 kopya doku örneği ve 10 normal kalın bağırsak örneği içermiştir. Örnekler, antikor 26B3 ile, Örnek 7'de açıklanan şekilde boyanmıştır. Kalın bağırsak kanseri olduğu bilinen deneklerden alınan 90 örnekten, 18'i (%20) FR α ekspresyonu için pozitif olarak belirlenmiş, normal örneklerden hiçbiri pozitif olarak belirlenmemiştir. Ayrıca pozitif boyama genel olarak orta ila zayıf olarak belirlenmiş ve hastalığın evresi ile görünür bir ilişki belirlenmemiştir.

10 **ÖRNEK 19: Histolojik Tiroid Örneklerinin Folat Reseptör Alfa Ekspresyonu için Değerlendirilmesi**

Tiroid doku örneklerinde FR α ekspresyonunu değerlendirmek için immunohistokimyasal çalışmalar yürütülmüştür. US Biomax'tan (katalog no TH802a) elde edilen doku mikro dizilim (TMA) örnekleri kullanılarak analizler yürütülmüştür. Örnekler, antikor 26B3 ile, Örnek 7'de açıklanan şekilde boyanmıştır. Tiroid papiller karsinom FR α membran ekspresyonu için güçlü seviyede pozitif (26/28, %93) ve 5 örneğin tümünün önceki raporlara uygun şekilde FR α boyama için negatif olduğu medüller karsinomdan ayırt edilebilir olarak belirlenmiştir. İlginç şekilde, foliküler adenomlar makrofoliküler tipe ve mikrofoliküler tipe, FR α ekspresyon için sırasıyla 3/13 (%23) ve 18/22 (%82) pozitiflik ile ayrılabilmiştir. Ayrıca bu TMA'da yer alan az sayıda Hurthle hücreli tümör (2/3, %67) ve foliküler karsinom (3/7, %43) örneklerinde de biraz pozitiflik görülmüştür. Bu sonuçlar Tablo 13'te özetlenmiştir.

Tablo 13 - Tiroid doku örneklerinde FR α ekspresyonu

Tiroid Kanseri Histolojik Alt Türü (N = 78)	FR α pozitif	FR α negatif
	N (%)	N (%)
Papiller karsinom, 28 (%36)	26 (%93)	2 (%7)
Meduller karsinom, 5 (%6)	0 (%0)	5 (%100)
Foliküler Adenom, makrofoliküler tip, 13 (%17)	3 (%23)	10 (%77)
Foliküler Adenom, mikrofoliküler tip, 22 (%28)	18 (%82)	4 (%18)
Hurthle hücreli tümör, 3 (%4)	2 (%67)	1 (%33)
Foliküler karsinom, 7 (%9)	3 (%43)	4 (%57)

DİZİ LİSTESİ

<110> FIEISAI R & D MANAGEMENT COMPANY, LTD.

<120> ANANTI-FOLAT RESEPTÖR ALFA ANTİKORLAR VE BUNLARIN KULLANIMI

<130> MOR-0839

<140>

<141>

<150> 61/604,954

<151> 2012-02-29

<150> 61/604,412

<151> 2012-02-28

<150> 61/508,444

<151> 2011-07-15

<160> 66

<170> Pat:Patent'in sürüm 3.5

<210> 1

<211> 257

<212> FRT

<213> ArtYapay Dizilim

<220>

<221> sarkaynak

<223> /n/not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"
pol.

<400> 1

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

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

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
 195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255

Ser

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 2
 Arg Ala Ser Ser Thr Val Ser Tyr Ser Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 3
 Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser

: 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 p

<400> 4
 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
 : 5

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"
 p

<400> 5
 Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Ser Thr Val Ser Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30

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

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 50 55 60

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

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 85 90 95

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"

P

<400> 6
Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> AYapay Dizilim

<220>
<221> skaynak
<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
P

<400> 7
Tyr Ile Lys Ser Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> AYapay Dizilim

<220>
<221> skaynak
<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
P

<400> 8
Glu Trp Lys Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 9
<211> 129
<212> PRT
<213> AYapay Dizilim

<220>
<221> skaynak
<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"
P

<400> 9
Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr
1 5 10 15

Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp
20 25 30

Ile Arg Gln Phe Pro Gly Ser Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Lys
35 40 45

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

Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser

65					70					75						80
Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Glu	Trp	Lys	
				85					90					95		
Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
			100					105					110			
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Cys	Gly	Asp	
			115				120					125				

Thr

```
<210> :0
<211> :5
<212> PRT
<213> AYapay Dizilim
```

```
<223>
<221> kaynak
<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
F
```

<400> 10
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Asn Phe Ile His
1 5 10 15

```
<213> 11
<211> 7
<212> PR7
<214> AYapay Dizilim
```

```
<220>
<221> kaynak
<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
P'
```

«400» 11
Lau Ala Ser An Lau Gla Ser
1 5

```
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> AYapay Dizilim
```

```
<220>
<221> s_kaynak
<223> /:/not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
P
```

<400> 12
Gln Gln Asn Asn Gly Asp Pro Trp Thr
1 5

<2:0> 13

<211> 110
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> s kaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"
 P

<400> 13
 Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 1 5 10 15
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Asn Phe Ile His Trp
 20 25 30
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala
 35 40 45
 Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60
 Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala
 65 70 75 80
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Gly Asp Pro Trp Thr Phe Gly
 85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> s kaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 14
 His Pro Tyr Met His
 1 5

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> s kaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 15
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 16
 Glu Glu Val Ala Asp Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"
 P

<400> 17
 Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys His Pro Tyr Met His Trp Val Lys Gln
 20 25 30

Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn
 35 40 45

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

Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val
 115 120 125

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 18
 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Phe Leu Asn
 1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 19
 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 20
 Gln His Phe Ser Lys Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"
 P

<400> 21
 Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
 20 25 30

Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His

35

40

45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
50 55 60

Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Ile Tyr Tyr
65 70 75 80

Cys Gln His Phe Ser Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
85 90 95

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> AYapay Dizilim

<220>

<221> skaynak

<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
P

<400> 22

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> AYapay Dizilim

<220>

<221> skaynak

<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
P

<400> 23

Glu Ile Gly Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> AYapay Dizilim

<220>

<221> skaynak

<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
P

<400> 24

Glu Thr Thr Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr

1

5

<210> 25
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"
 P

<400> 25
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 20 25 30

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

Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile
 50 55 60

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Thr Ala
 85 90 95

Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 P

<400> 26
 Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> skaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"

P

<400> 27

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> AYapay Dizilim

<220>

<221> skaynak

<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"

P

<400> 28

Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> AYapay Dizilim

<220>

<221> skaynak

<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"

P

<400> 29

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

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
20 25 30

Gln Gly Ile Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala
35 40 45

Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe
50 55 60

Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr
65 70 75 80

Cys Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys
85 90 95

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> s.kaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 p

<400> 30
 Gly Tyr Phe Met Asn
 1 5

<210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> s.kaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 p

<400> 31
 Arg Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> s.kaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik peptid"
 p

<400> 32
 Gly Thr His Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 33
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> AYapay Dizilim

<220>
 <221> s.kaynak
 <223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polipeptid"
 p

<400> 33
 Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 1 5 10 15

Ala Ser Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln
 20 25 30

Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Tyr Asn

35				40				45							
Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr
	50					55					60				
Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	His	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Ala
65					70					75					80
Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Thr	His	Tyr	Phe
				85					90					95	
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr
			100					105					110		
Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr
		115					120					125			

```
<210> 34
<211> 36
<212> cDNA
<213> Yapay Dizilim

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
      kolonükleotid"
```

<400> 34
agggccagct caactgttag ttaagttac ttgcac 36

```
<210> 35
<211> 21
<212> tDNA
<213> Yapay Dizilim

<220>
<221> kaynak
<223> //not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
        koligonükleotid"
```

```
<400> 35
ggcacatcca acttggttc t
```

```
<210> 36
<211> 27
<212> cDNA
<213> Yapay Dizilim

<220>
<221> Kaynak
<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
      poligonükleotid"
```

<400> 36
caqcaqlaca utqqltaccs actcaccg 27

<210> 37
 <211> 323
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polinükleotid"

<400> 37
 ccagcaatca tctctgcats tccaggggaa aaggtcacca tgacctgcag gccacgtca 60
 actgtaagtt acagttactt gcaatggtac cagcagaagt caggtgcctc cccccaacts 120
 tggatttatg gcacatccaa ctggcttct ggagtcctg ctgcctcag tggcagtggg 180
 tctgggaact ctactctct cacaatcagc agtgtggagg ctgaagatgc tgcacttat 240
 taatggcagc agtaagtggt ttaccactc acgttcgggt ctgggaccaa gctggagctg 300
 aaacgggctg atgtgcacc aac 323

<210> 38
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 38
 agtggttatt actggaac 18

<210> 39
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 39
 tacataaagt ccgacggtag caataattac aacccatctc tcaaaaat 48

<210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 40
 gactggaagg ctatggacta c 21

<210> 41
 <211> 389
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polinükleotid"

<400> 41
 gagtcaggac atggcctcagt gagacattct cagtctctgt ctctcactg ctctgtcact 60
 ggctactcca tcaccagtgg ttattactgg aactggatcc ggcagtttcc aggaagcaga 120
 ctggaatgga tgggtacat aaagtccgac ggtagcaata attacaaccc atctctcaaa 180
 aatcgaatct ccctcactcg tgacacatct aagaaccagt ttttctgaa gtigaattct 240
 gtgactactg aqgacacagc tacatatctc tqtacaaggc aqtggaaggc tatggactac 300
 tggggtcagg gaacctcagt caccgtctcc tcagccaaaa caacaccccc atcagtctat 360
 ccactggccc ctgggtgtgg agatacaac 389

<210> 42
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 42
 aqagccagtg aaagtgttga tacttatggc aataatttta tacac 45

<210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 43
 cttagcatcca acctagaatc t 21

<210> 44
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 44
cagcaaaata atggggatcc gtggacg 27

<210> 45
<211> 331
<212> DNA
<213> Yapay Dizilim

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polinükleotid"

<400> 45
ccagcttctt tgcctgtgtc tctagggcag agggccacca tatcctgcag agccagtcaa 60
agtgttgata cttatggcaa taattttata cactggtaac agcagaaac aggacagcca 120
cccaaacctc tcattttatct tgcatacaac ctagaatctg gggctccctgc caggttcagt 180
ggcagtgggt ctaggacaga attcaccctc accattgata ctgtggaggc tgatgatgct 240
gcacccctatt actgtcagca aaataatggg gatccgttga cgttcgggtg aggcaccaag 300
ctggagatca aacgggctga tgcctgacca a 331

<210> 46
<211> 15
<212> DNA
<213> Yapay Dizilim

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 46
caccctata tgcac 15

<210> 47
<211> 51
<212> DNA
<213> Yapay Dizilim

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 47
aggattgatc ctgcgaatgg taactctaaa tatgaccca agttccaggc c 51

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> Yapay Dizilim

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 48

gaggagggtgg aggaattataa tatggactac

30

<210> 49

<211> 380

<212> DNA

<213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polinükleotid"

<400> 49

ggggcaagagc ttgtgaagcc agggggcctca gtcaagttgt cctgcacagc ttctggcttc 60

aacattaaaa aacctatataa ggaatgggtg aagagagggc ctgancaggg cctggagtgg 120

attggaagga ttgatcctgc gaatggtaac actaaataig accegaagtt ccaqggcaag 180

ggaactataa cagcagacac atcctccaac acagcctacc tacagctcag cagcctgaca 240

tatgaggana ctgcctgata ttactgtggt agagaggagg tggcggacta tactatggac 300

taattgggtc aaqgaacctc agtcaccgtc tctcagcca aaacaacagc cccatcggtc 360

tatccantgg cccctgtgtg 380

<210> 50

<211> 33

<212> DNA

<213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 50

agtgcaggtc agggcattaa caatttttta aac

33

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 51

tacacatcaa gtttacactc a

21

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 52

cagcacttta gtaagcttcc gtggacg

27

<210> 53
 <211> 320
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polinükleotid"

<400> 53

acatctctccc tgtctgcttc tctgggagac agagtcacca tcagttgcag tgcgaagtcag 60

ggcatttaaca atttttlaaa ctggatcag cagaaaccag atggcactgt taaactcctg 120

atttatataa catcaagttt acattcagga gtcacatcaa ggttcagtgg cagtgggtct 180

gggacagatt attctctcac catcagcaac ctggaacctg aagatattgc catatactat 240

tgtcagactt ttagtaagct tccgtggagc ttccgtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 300

cgggtctgatg ctgcaccaac 320

<210> 54
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 54

agctatgcca tgtct

15

<210> 55
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 55

gaaattggta gtgggtggag ttacacctac catccagaca ctgtgacggg c

51

<210> 56
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 56
 gaaactacgg cgggctactt tgactac

27

<210> 57
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polinükleotid"

<400> 57
 tctgggggag gcttagtgag gccaggaggg tccctgaaac tctctgtgc agcctctgga 60
 ttccctttca gtagctatgc catgtcttgg gtccgccagt ctccagagaa gaggcctggag 120
 tgggtgcag aatttggtag tgggtgtagt tacacctact atccagacac tgtgacgggc 180
 cgaaccaca tctccagaga caatgccaaq agcacctgt acctggaaat gagcagtctg 240
 aggtctgagg acacggccat ctattactgt gcaagggaaa ctacggcggg ctactttgac 300
 tactggggcc aaggaaccac tctccagtc tctctca 336

<210> 58
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 58
 cgaacaagtq acaatatttt cagttattta gca

33

<210> 59
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik
 oligonükleotid"

<400> 59
 satgcaaaaa ccttagcaga g

21

<210> 60
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 60
 caacatcatt atgtttttcc gtggacg 27

<210> 61
 <211> 320
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polinükleotid"

<400> 61
 ccagcctccc tatctgcata tgtgggagaa antgtcacca tcacatgtcg aacaagtgag 60
 aatattttca gttatttaqc atqgtatcaq caaacaacagq caatatctcc tcaqctcctg 120
 gtctataatg caaaaaacctt agcagagggt gtgccatcaa ggttcagtgg cagtggatca 180
 ggcacacagt tttctctgaa gatcaacagc ctgcagcctg aagattttgg gagttattac 240
 tgtcaaacata attatgcttt tccgtggang ttgggtggag gtcacaagct ggaatcaca 300
 cgggctgatg ctgcacccac 320

<210> 62
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 62
 ccctacttta tgaac 15

<210> 63
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizilim

<220>
 <221> kaynak
 <223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 63
 cgtatttttc cttaacaatgg tgatactttc tacaaccaga agtcaaggg c 51

<210> 64
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik oligonükleotid"

<400> 64

gggactcatt actttgacta c

21

<210> 65

<211> 386

<212> DNA

<213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik polinükleotid"

<400> 65

ggacctgagc tgggtgaagcc tgggggttca gtgaagatat cctgcaaggc ttctgattac	60
tcttttactg gctactttat gaactgggtg atgcagagcc atggaaagag ccttgagtgg	120
attqqaqcta tttttcetta caatqgtgat actttctaca accaqaagt t caaqqqcaqg	180
gccacattga ctgtagacaa atctctatgc acagcccaca tggagctccg gagcctggca	240
tctgaggact ctgcagtcta tttttgtgca agagggactc attactttga ctactggggc	300
caaggcacca ctctcactgt ctctcagcc aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg	360
gcccttqqat ctgctgcccc aactaa	386

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Yapay Dizilim

<220>

<221> kaynak

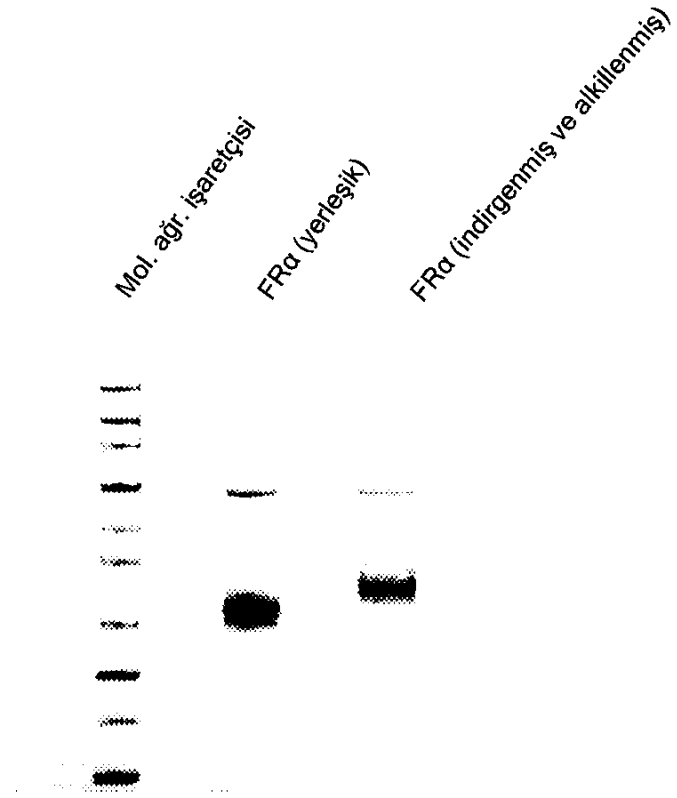
<223> /not="Yapay Dizilimin Açıklaması: Sentetik 6xHis etiket"

<400> 66

His His His His His His

1

5



Şekil 1

10 20 30 40 50 60
 MAQSMITTELI LLNWWAVVGS EAQTETAWAR TELLNWOMNA KHHEKKGDE DKLHEQCRFW
 70 80 90 100 110 120
 RKNACLS TNT SQEAKRVSY LYRPNWNHIG ENATACKLHF IQUTQLYBCS PNLGFWIOQV
 130 140 150 160 170 180
 DQSWKKRVL NVPLCKKQCE LWQEDURISY LKSNWIKGN NWTSGFNKCA VHAACQPPHF
 190 200 210 220 230 240
 YPPTKTVLON FIWTHSYVS NYSKSGRGL QMWELPQDN PNEELVAPYA AAMSCADWA
 250
 ANPPLSLAL MLWILS (SEQ ID NO:1)

Lejant

Artıklar 1-24 (çift alt çizgi) = Sinyal Dizilimi (rh-FR α 'da mevcut değildir)

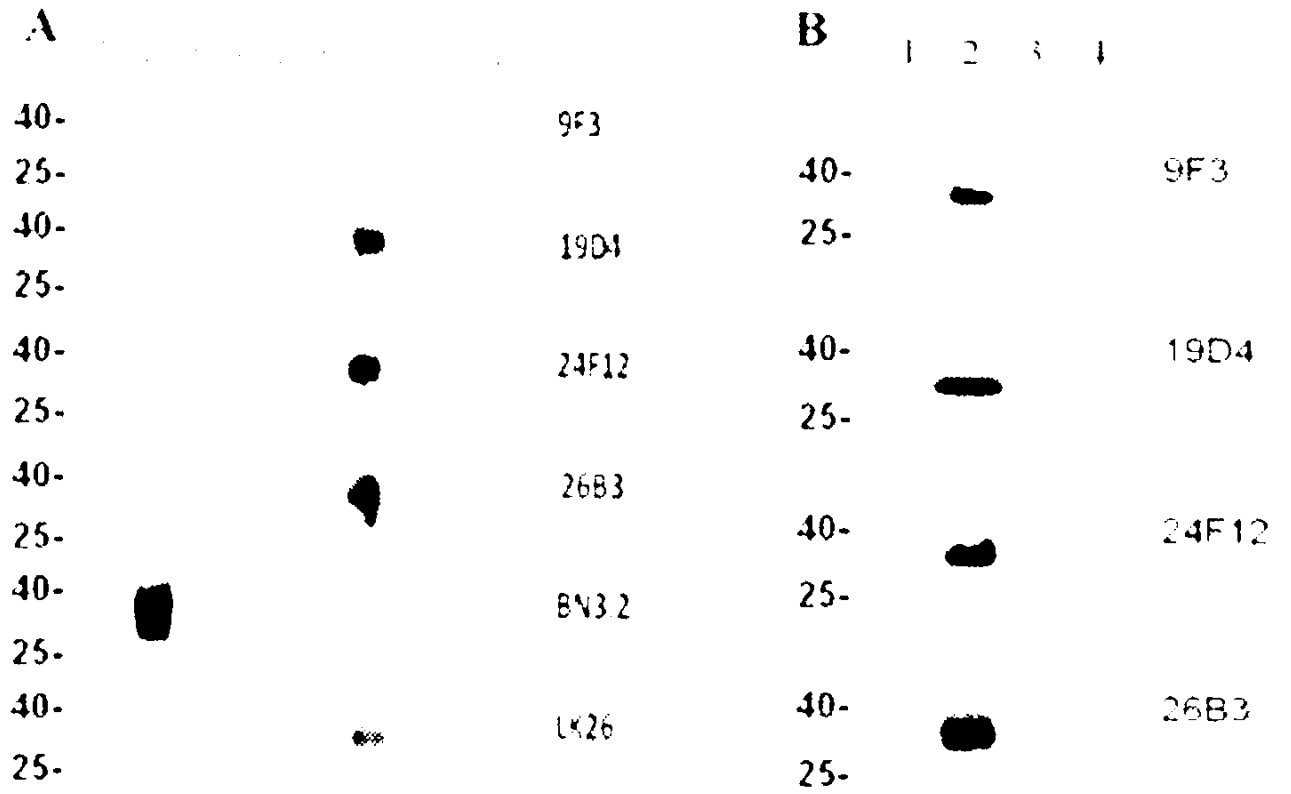
Artıklar 41-53 (gölgeli) = MAb 9F3 (PTA-11887) epitop

Artıklar 68-80 ve 92-105 (gölgeli) = MAb 24F12 (PTA-11886) epitop

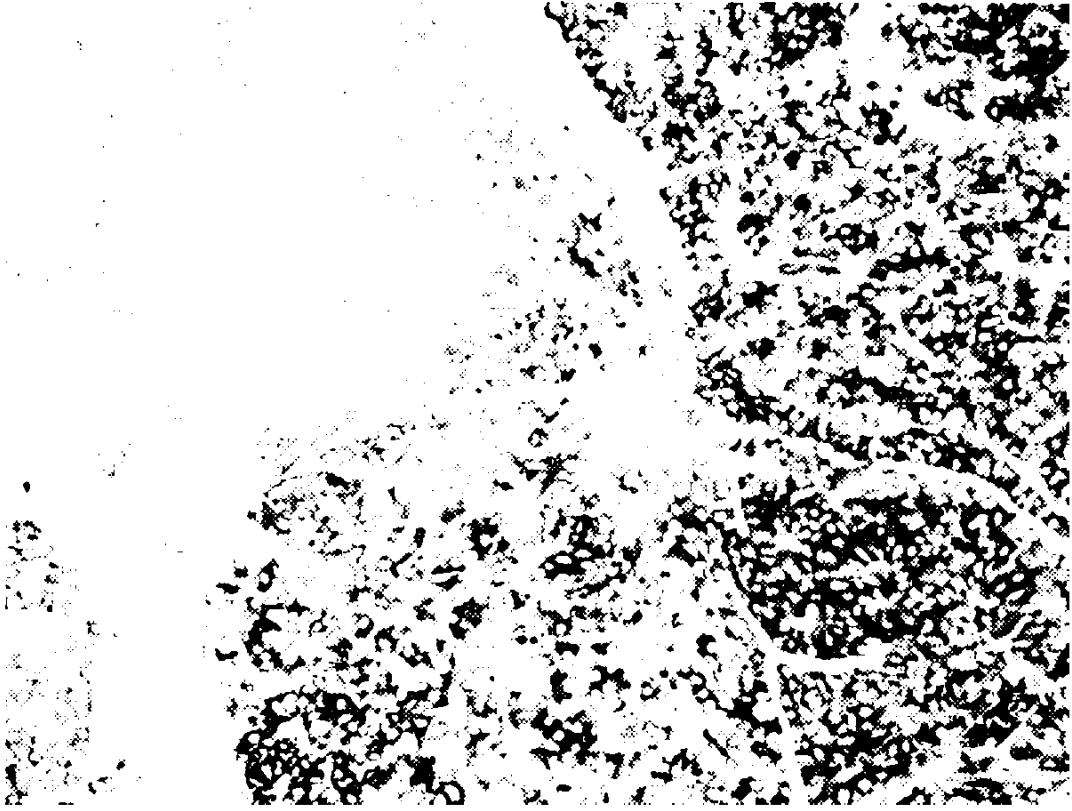
Artıklar 199-209 (gölgeli) = MAb 26B3 (PTA-11885) epitop

Artıklar 236-257 (altı çizili) = GPI-bağlayıcı Dizilimi (rh-FR α içinde mevcut değildir)

Şekil 2



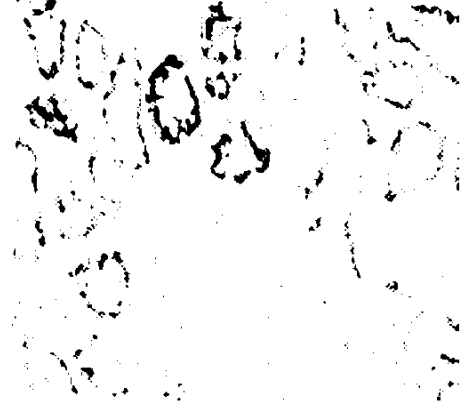
Şekil 3



Şekil 4

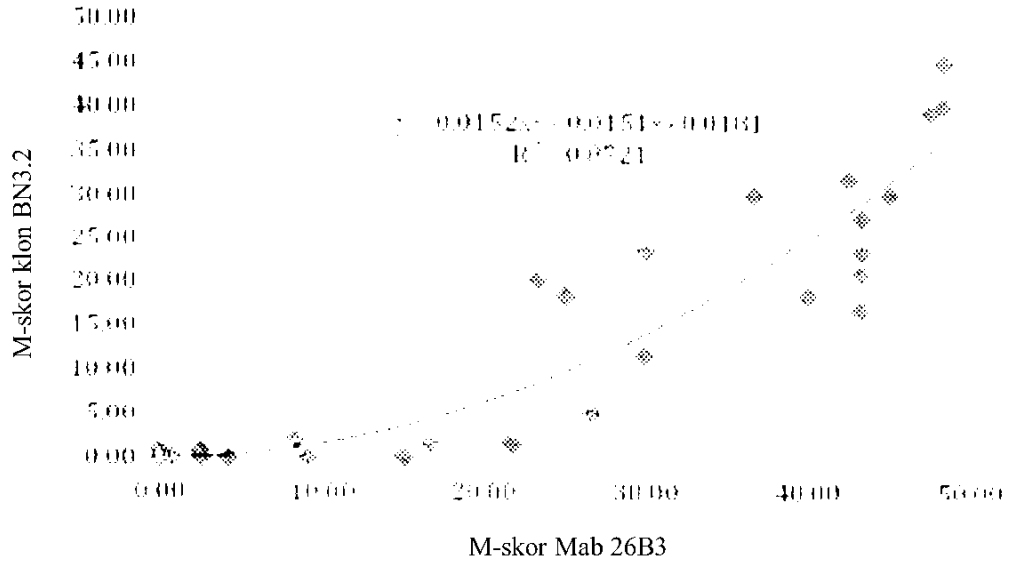
A.

B.



Şekil 5

NSCL adenokarsinomu: MAb 26B3 ve klon BN3.2 karşılaştırması



Şekil 6

A.



B.



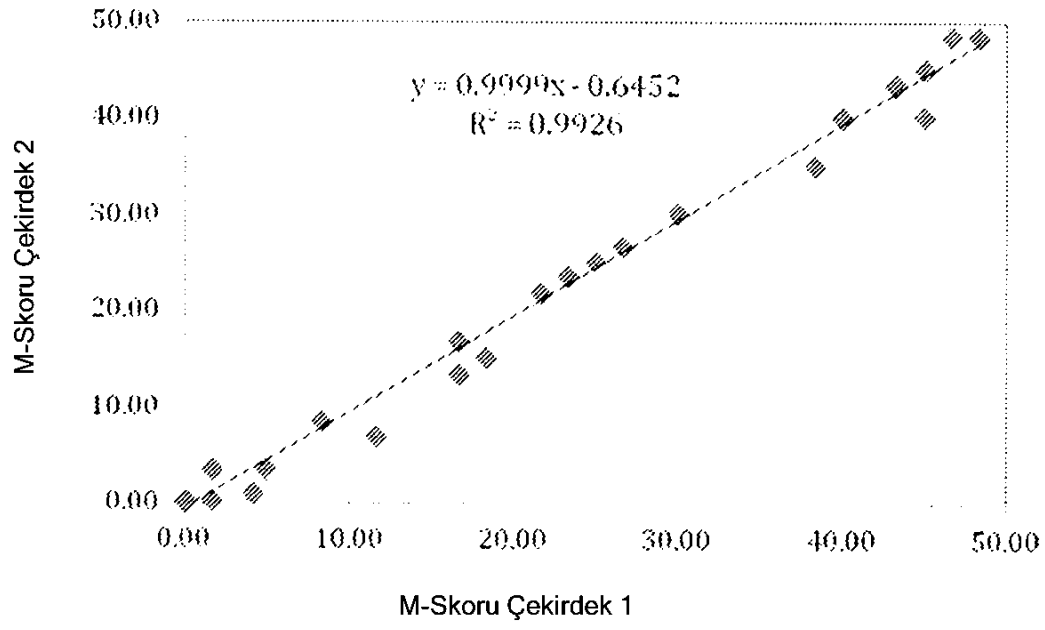
C.



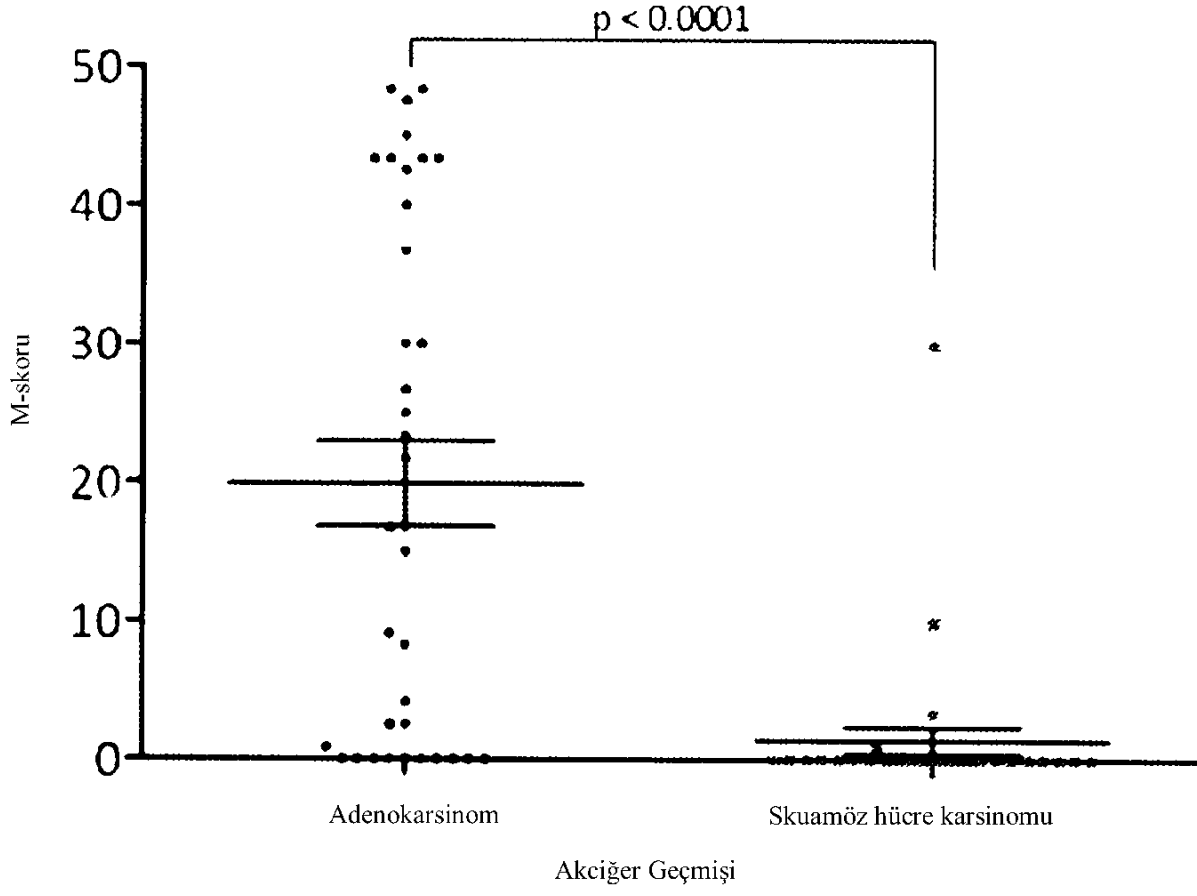
D.



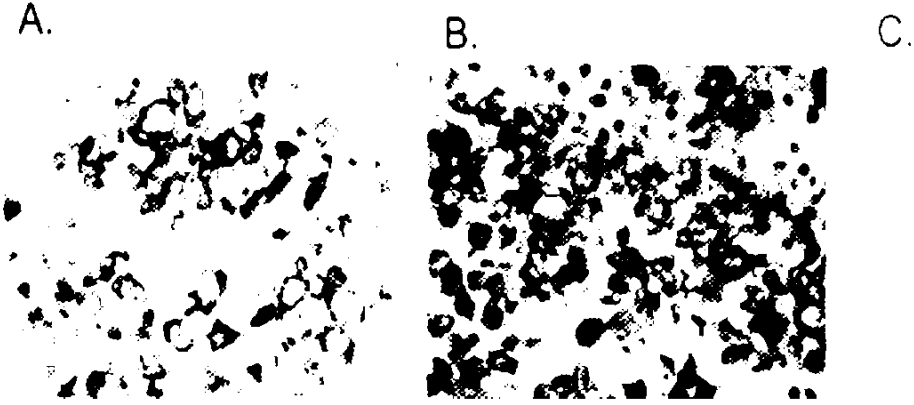
Şekil 7



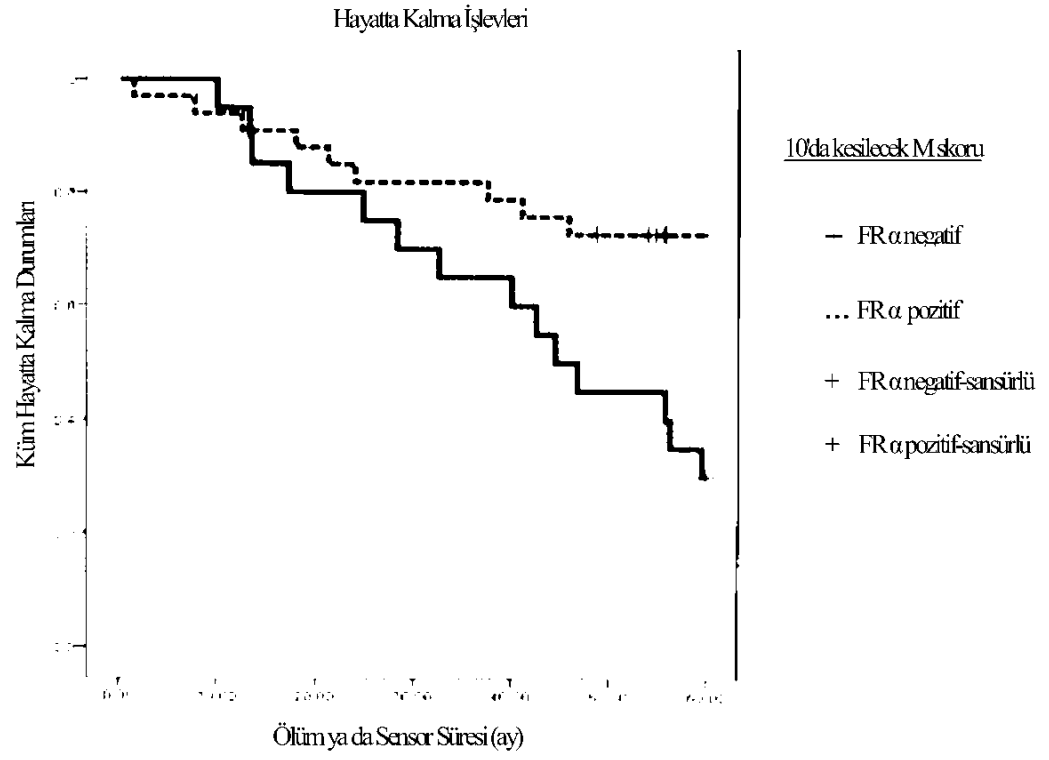
Şekil 8



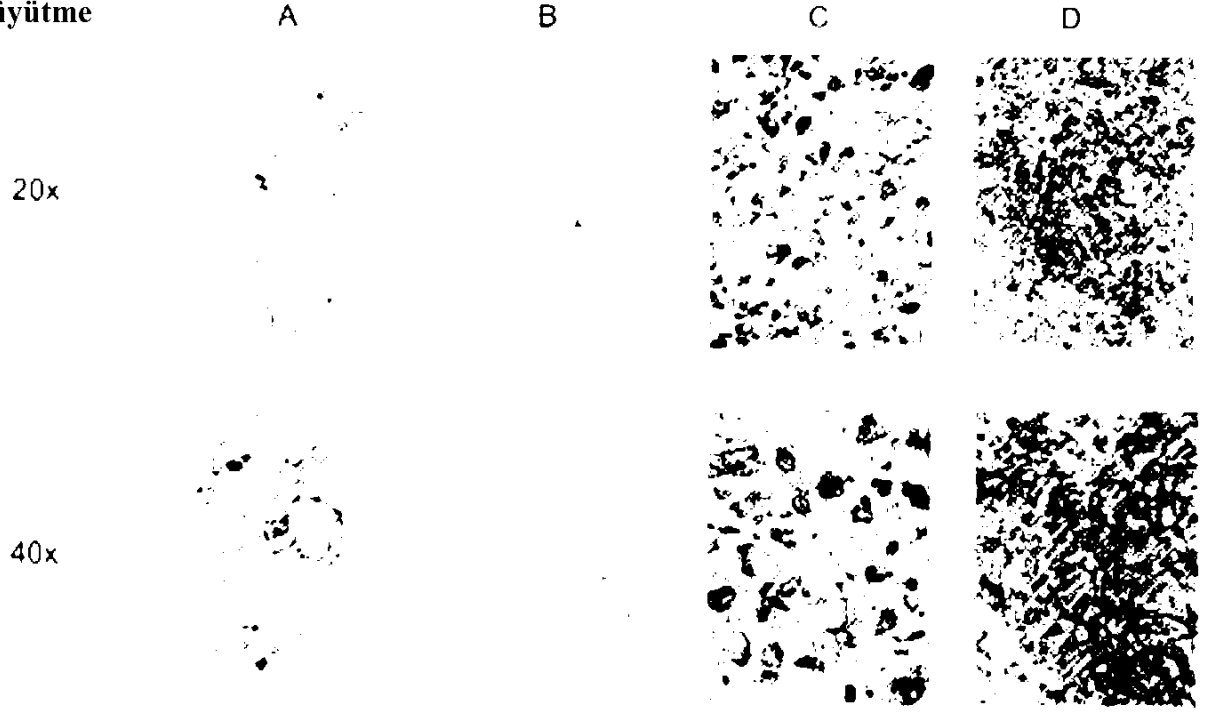
Şekil 9



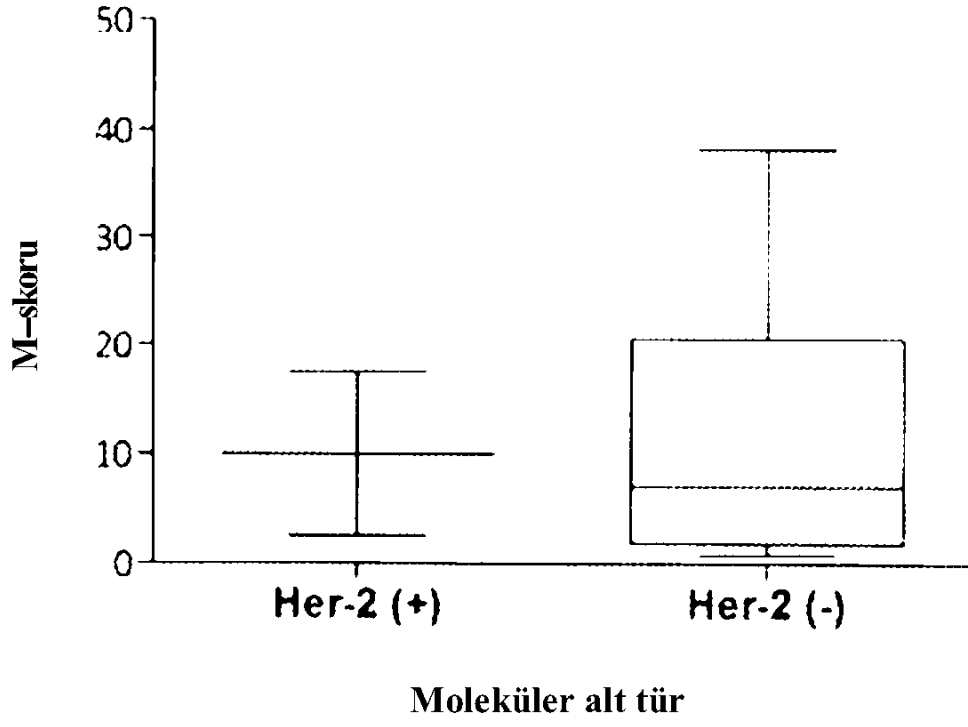
Şekil 10



Şekil 11

Büyütme

Şekil 12



Şekil 13

Büyütme

A

B

C

D

20x



40x



Şekil 14

A



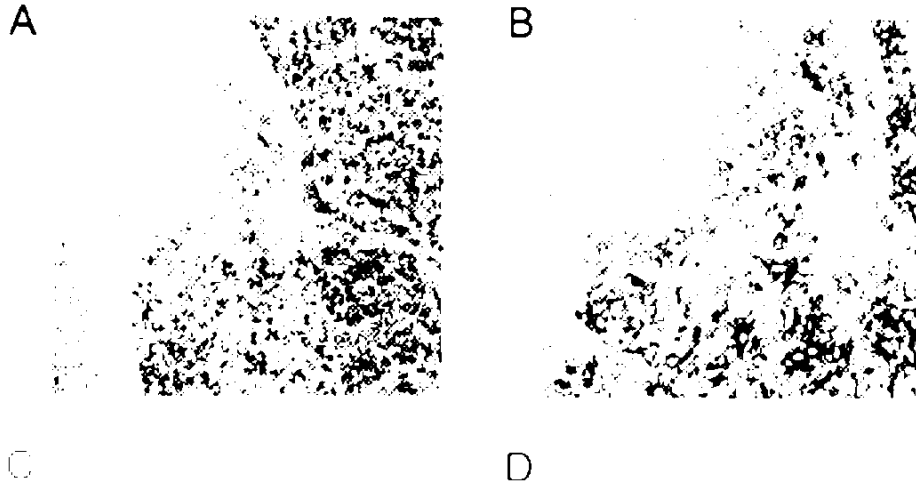
B



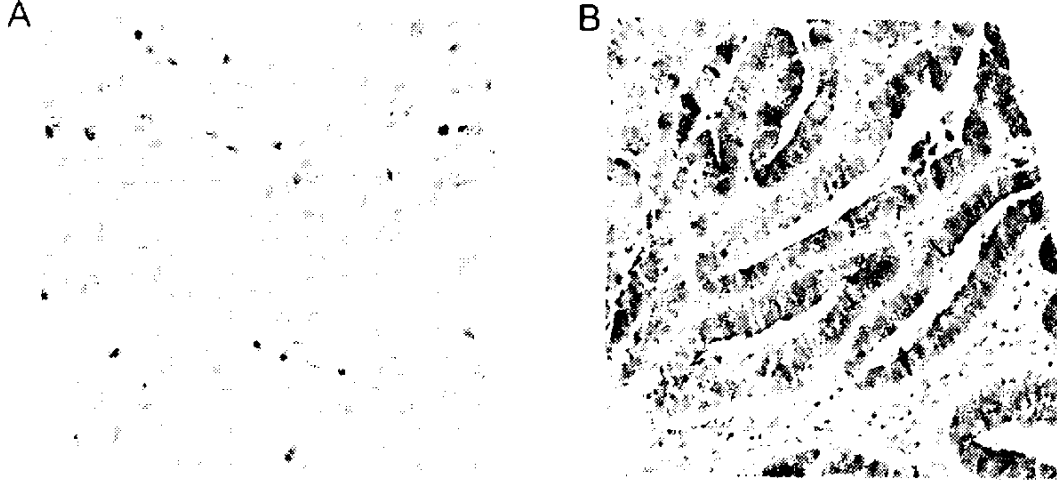
C



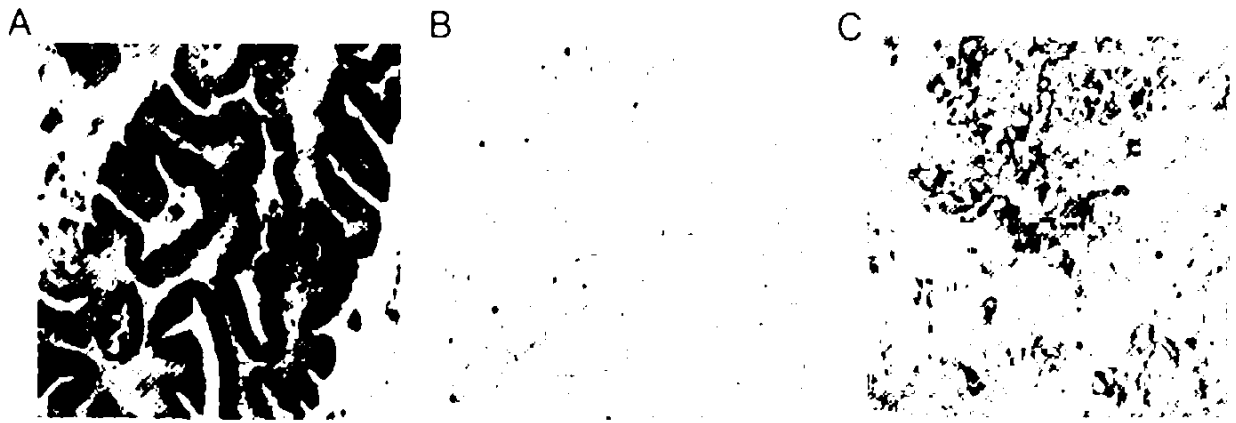
Şekil 15



Şekil 16



Şekil 17

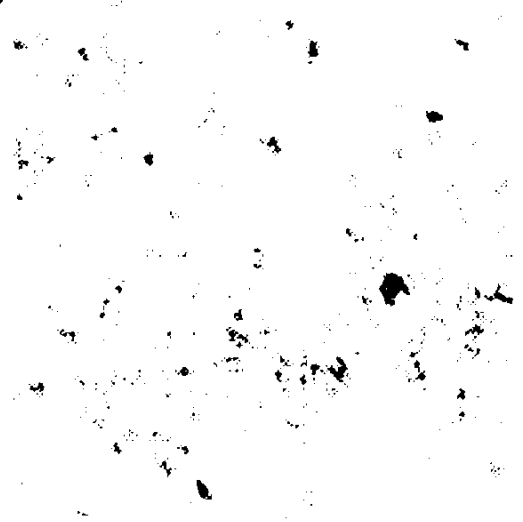


Şekil 18

A



B



Şekil 19



Şekil 20



Şekil 21