

ÖZET

TÜMÖRLERDE DİFERANSİYEL OLARAK İFADE EDİLEN GEN ÜRÜNLERİ VE BUNLARIN KULLANIMI

- 5 Buluşa göre, tümörle bağlantılı olarak ifadelendirilen gen ürünleri ve bunlara yönelik olarak kodlama yapan nükleik asitler tanımlanmıştır. Mevcut buluş, tümörle bağlantılı olarak ifadelendirilen bu gen ürünlerinin aberan olarak ifadelendirildiği hastalıkların tedavisi ve tanısı ile ilgilidir. Buluş, bunun yanı sıra tümörle bağlantılı olarak ifadelendirilen protein, polipeptit ve peptitler ile bunlara
- 10 yönelik olarak kodlama yapan nükleik asitlerle ilgilidir.

İSTEMLER

1. Bir tümör bağlantılı antijeni ifadelendiren tümör hücrelerinin tespit edilmesine yönelik yöntemde, bir antikor uygulamasıdır, burada antikor, tümör bağlantılı antijene bağlanır, burada, antikor, SEQ ID NO: 142-148'den oluşan gruptan seçilen bir amino asit dizisine sahip bir peptit veya polipeptit ile bağışıklştırma yoluyla elde edilir ve burada, tümör dokusunda ifadelendirilen tümör bağlantılı antijen SEQ ID NO:16'ya göre aminoasit dizilimi içerir ve sağlıklı normal dokuya kıyasla, tümör bağlantılı antijenin deglikosile çeşidini gösterir, burada, glikosilasyon, bir N-glikosilasyondur ve tümör bir mide tümörüdür veya bir akciğer tümörüdür ve yöntem, biyolojik bir örnekte tümörle bağlantılı antijenin deglikosile edilmiş varyantının saptanmasını içerir.
2. İstem 1'e göre uygulamadır, burada antikor bir monoklonal antikordur.
3. İstem 2'ye göre uygulamadır, burada antikor, kimera özellikle veya insanlaştırılmış bir antikor veya selektif olarak tümörle bağlantılı antijene bağlanan bir antikor fragmanıdır.
4. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre uygulamadır, burada antikor bir tanı elemanı ile eşleştirilir.

TARİFNAME
TÜMÖRLERDE DİFERANSİYEL OLARAK İFADE EDİLEN GEN
ÜRÜNLERİ VE BUNLARIN KULLANIMI

- 5 Artan disiplinler arası yaklaşımlara ve klasik terapi usullerinin tüm olanaklarıyla kullanılıyor olmasına karşın kanser hastalıkları halâ ölüm nedenleri sıralamasında başı çekmektedir. Yakın geçmişte ortaya konan terapötik yaklaşımlarda, rekombinan tümör aşılı ve antikor terapisi gibi diğer spesifik önlemlerin uygulamaya konmasıyla hastanın bağışıklık sisteminin uygulanan terapötik
- 10 yaklaşım ile bütünleştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu tür bir stratejinin başarısı, hastaların bağışıklık sistemindeki etkin güçlerin dışarıdan müdahaleyle kuvvetlendirilmesi ve bu suretle tümöre spesifik veya tümör ile bağlantılı antijenlerin, diğer bir deyişle epitopların bağışıklık sistemi tarafından tanınmasının sağlanmasına bağlıdır. Tümör hücrelerinin yapısı, biyolojik olarak
- 15 kötücül olmayan asıl hücrelerin yapısından oldukça farklıdır. Bu farklılıklar, tümör oluşumu sırasında meydana gelen genetik değişikliklerden kaynaklanır ve kanser hücrelerinde birçok değişime yol açarken gerek niteliksel gerekse niceliksel açıdan değişime uğramış moleküler yapıların oluşmasına da neden olur. Spesifik olarak tümörle bağlantılı bir şekilde bağışıklık sisteminde ortaya çıkan bu
- 20 tür yapıların tümörü taşıyan konakçı tarafından tanınması durumu, tümörle bağlantılı antijen olarak tanımlanmaktadır. Tümörle bağlantılı antijenlerin tanınmasında işlevsel olarak birbiriyle bağlantılı iki birimden oluşan özel hücresel ve humoral mekanizmalar kullanılır: Bir taraftan $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositleri, Sınıf II veya Sınıf I MHC (Temel Doku Uygunluğu Bileşeni) molekülleri
- 25 üzerinde gösterilen işleme tabi tutulmuş antijenleri tanıırken lenfositleri, devridaim yapan ve doğrudan işleme tabi tutulmamış antijenlere bağlanan antikor molekülleri üretir. Tümörle bağlantılı antijenlerin klinik terapisi açısından potansiyel önemi, ur yapısındaki hücrelerin üzerindeki antijenlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasının sitotoksik Effekton mekanizmalarını tetiklemesi
- 30 ve T yardımcı hücrelerin mevcudiyeti durumunda kanser hücrelerinin bertaraf

- edilmesine olanak vermesiyle kendini göstermektedir (Pardoll, Nat. Med. 4:525-31, 1998). Buna göre tümör immünolojisi biliminin temel amacı, bu tür yapıların moleküler açıdan tanımlanmasıdır. Bu antijenlerin moleküler yapısı, uzun süre gizemini korumuştur. Ancak ilgili klonlama tekniklerinin geliştirilmesi sonucundadır ki sitotoksik T lenfositlerin (CTL) hedef yapılarının prob olarak analizi yoluyla (van der Bruggen et al., Science 254:1643-7, 1991) diğer bir deyişle devridaim yapan otoantikörler ile (Sahin et al., Curr. Opin. Immunol. 9:709-16, 1997) özel cDNA tümör tanımlama bankalarının tümörle bağlantılı antijenler üzerinde sistematik bir şekilde gösterilmesi mümkün olmuştur. Bu işlemde cDNA tanımlama bankaları, zinde tümör dokusu üzerinde üretilmiş ve uygun sistemler içinde protein olarak rekombinan yapıda ifade edilmiştir. İlgili antijenlerin klonlanması için hastalardan izole edilmiş bağışıklık efektörleri, yani tümöre özel lizis örneği veya devridaim yapan antikörler kullanılmıştır.
- 15 Son yıllarda bu tür yaklaşımlarla birçok neoplazi vakasında antijen tanımlaması yapılmıştır. Aslında yukarıda tanımlanan klasik yöntemlerde hastalardan alınan, kural olarak ileri derecede kanserli bağışıklık efektörleri (devridaim yapan otoantikörler veya CTL klonları) prob olarak kullanılır. Bazı araştırma sonuçları, tümörlerin T hücrelerinin tolerize edilmesi ve acze düşmelerine neden
- 20 olabileceğini ve hastalığın seyri sırasında bağışıklık efektör dağılımı içindeki etkili bağışıklık tepkisi vermelerini sağlayabilecek spesifik özelliklerin kaybolduğunu göstermiştir. Hastalar üzerinde yapılan güncel araştırmalarda henüz şu ana kadar tespit edilen ve kullanılan tümörle bağlantılı antijenlerin gerçek etkisi ile ilgili kesin bir kanıt elde edilememiştir. Buna göre anlık bağışıklık
- 25 tepkilerini tetikleyen proteinlerin yanlış hedef yapısı olması ihtimali de mümkündür.

Mevcut buluşun amacı, hedef yapıların kanser hastalıklarının tanı ve tedavisinde kullanılmasının sağlanmasıdır.

Bu amaç, buluş uyarınca patent istemleri kapsamında yerine getirilmektedir.

Buluşa göre, tümörle bağlantılı olarak ifade edilen antijenlerin ve bunun için kodlanan nükleik asitlerin tanınması ve hazır hale getirilmesi amacına yönelik bir strateji izlenmiştir. Bu strateji, organlara spesifik olarak, örneğin sadece kalın bağırsak, akciğer veya böbrek dokusuna spesifik olarak ifade edilen belirli genlerin ilgili organlarda aynı zamanda tümör hücrelerinden ve bunun yanı sıra diğer dokulardaki tümör hücrelerinde ektopik ve izinsiz olarak tekrar canlandırılması olgusu üzerine bina edilmektedir. Öncelikle veri madenciliği yoluyla organa spesifik tüm tanınan genlerin mümkün olduğunca eksiksiz bir listesi düzenlenir ve bunlar daha sonra spesifik RT-PCR yöntemi vasıtasıyla yapılan ifade analizleri yoluyla çeşitli tümörler içinde anormal etkinleştirmeye tabi tutulmamaları açısından değerlendirilir. Veri madenciliği, tümörle bağlantılı genlerin tespit edilmesi için uygulanan tanınmış bir yöntemdir. Geleneksel stratejilerde kural olarak normal doku bankalarının transkriptomları elektronik olarak tümörlü doku bankalarından çıkarılır, bu işlem sonunda kalan genlerin tümöre spesifik olduğu varsayılır (Schmitt et al., Nucleic Acids Res. 27: 4251-60, 1999; Vasmataz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:300-4, 1998; Scheurle et al., Cancer Res. 60:4037-43, 2000).

Buluşa göre, çok daha başarılı olduğu kanıtlanmış olan konsept, veri madenciliğinin organa spesifik tüm genlerin elektronik çıkarımı için kullanımı ve daha sonra bunların tümörlerde ifade edilmesi konusunda değerlendirmeye tabi tutulmasına dayanmaktadır. Mevcut öğreti, bu şekilde bir yönüyle dokuya spesifik ve tümörlerde diferansiyel olarak ifade edilmiş genlerin tanınmasına yönelik bir strateji ile ilgilidir. Bu strateji, kamu dizi bankalarındaki ("*in silico* ortamda") veri madenciliği ve onu takip eden değerlendirme amaçlı deneysel laboratuvar araştırmalarını ("*wet bench* araştırma") kombine eden bir stratejidir.

İki değişik biyoenformatik senaryo üzerine kurulu kombine bir strateji, buluşa

göre yeni tümör genlerinin tanınmasına olanak sağlamıştır. Bunlar, bugüne kadar sadece organa spesifik olarak sınıflandırılmıştır. Bu genlerin aberan olarak tümör genlerinde aktive edilebildiği bilgisi, bunlara işlevsel çıkarımlara olanak veren yeni bir nitelik özgülemeyi mümkün kılmaktadır. Tümörle bağlantılı bu genlerin ve bunlarla kodlanan gen ürünlerinin tanınması ve kullanıma hazır hale getirilmesi, immünojen bir etkiden bağımsız olarak meydana gelmiştir.

Tümörlere bağlı tanımlanan antijenler, (a): SEQ ID NO: 1-8, 41-44, 51-59, 84, 117, 119 ve 138 olan gruptan, onun bir bölümünden veya türevinden seçilmiş bir nükleik asit dizilimini kapsayan nükleik asitten, (b): (a) paragrafındaki nükleik asit ile bağlayıcı koşullar altında melezleştirilen bir nükleik asitten, (c): (a) ve (b) paragrafındaki nükleik asitlerle ilişkili olarak dejenere edilen bir nükleik asitten ve (d): (a), (b) ve (c) paragrafındaki nükleik asitleri tamamlayıcı nitelikte olan bir nükleik asitten meydana gelen gruptan seçilen bir nükleik asit tarafından kodlanan bir aminoasit dizisi göstermektedir. Tercih edilen bir uygulama usulünde tümörle bağlantılı tanımlanmış bir antijen, SEQ ID NO: 1-8, 41-44, 51-59, 84, 117, 119 ve 138 diziliminden oluşan bir gruptan seçilmiş bir nükleik asit ile kodlanmış olan amino asit dizilimi göstermektedir. Bir başka tercih edilen uygulama tarzında ise tümörle bağlantılı tanımlanmış bir antijen, SEQ ID NO: 9-19, 45-48, 60-66, 85, 90-97, 100-102, 105, 106, 111-116, 118, 120, 123, 124, 135-137, 139 ve 142-150 diziliminden oluşan bir gruptan, onun bir kısmı veya türevinden seçilmiş bir amino asit dizilimi göstermektedir.

Mevcut açıklama, genel olarak açıklamaya uygun olarak tanımlanan tümörle bağlantılı antijenlerin veya bunların bir kısmının veya türevlerinin veya bunun için kodlanmış nükleik asitlerin veya kodlayan nükleik asitlere karşı yöneltilmiş nükleik asitlerin veya tümörle bağlantılı tanımlanan antijenlere veya bunların bir kısmına veya türevlerine karşı yöneltilmiş nükleik asitlerin tedavi ve tanı için kullanımını içermektedir. Bu kullanım, tanı, tedavi ve süreç kontrolü için tek tek antijenleri kapsadığı gibi, bu antijenlerden oluşan kombinasyonları, işlevsel

kısımları, nükleik asitleri, antikorları ve başka öğeleri de kapsayabilir ve kullanım biçimi olarak diğer tümörle bağlantılı gen ve antijenlerle kombinasyon da yapılabilir.

- 5 Tedavi ve/veya tanı için tercih edilen hastalıklar, açıklama uyarınca tümörle bağlantılı tanımlanan antijenlerden biri veya birkaçıyla ilgili selektif ifadelendirme veya anormal ifadelendirme bulunan hastalıklardır.

10 Açıklama, tümör hücrelerine bağlı olarak ifadelendirilen nükleik asit ve gen ürünlerini de kapsamaktadır.

Mevcut teknik öğreti, ayrıca gen ürünlerini, diğer bir deyişle bilinen genlerin değiştirilmiş birleştirimi (bağlantı değişkenleri) veya alternatif açık okuma çerçeveleri kullanılarak yapılan değiştirilmiş aktarımı yoluyla oluşan nükleik asitleri ve proteinleri, yani peptitleri de kapsamaktadır. Bu kapsamda dizilim 15 protokolünün SEQ ID NO: 3-5 olan dizilimlerden oluşan gruptan seçilen nükleik asitler açığa çıkar. Bildirimi yapılan öğreti, bu kapsamda bunun dışında, dizilim protokolünün SEQ ID NO: 10 ve 12-14 dizilimlerinden oluşan gruptan seçilmiş amino asit dizilimini içeren protein veya peptitleri de kapsamaktadır. Açıklamada 20 yer alan bağlantı değişkenleri, tümör hastalıklarının tanı ve tedavisinde kullanılabilir özelliktedir.

Mevcut öğreti, özellikle dizilim protokolünün SEQ ID NO: 10 uyarınca, buluş uyarınca tanımlanan alternatif açık okuma tarama örüntüsü ile kodlanan ve 25 yukarıda tanımlanan protein diziliminden (SEQ ID NO:9) proteinin N ucunda 85 ilave amino asitle farklılaşan bir aminoasit dizilimini de kapsamaktadır.

Bağlantı değişkenlerinin oluşumu, aşağıdaki örneklerde görüldüğü gibi çok çeşitli mekanizmaların oluşumuna bağlı olabilmektedir:

30

- değişken transkripsiyon başlatma noktalarının kullanımı,
- ilave ekson kullanımı,
- münferit veya birkaç eksonun tamamen veya parça parça birleřtirilmesi,
- değişime uğratılmış birleştirim dűzenleyici dizilerin mutasyonu (yeni verici/alıcı dizilimlerin silinmesi veya yaratılması),
- intron dizilimlerinin tamamlanmamıř eliminasyonu.

Bir genin deęişime uęratılmıř birleřtirimi, deęiřtirilmiř transkript dizilimine (baęlantı deęiřkenine) yol aęar. Bir baęlantı deęiřkeninin kendi deęiřtirilmiř dizilim kısmında aktarılması durumunda ۆzgűn yapısından yapı ve iřlev olarak ۆnemli ۆlçűde farklılık gۆsterebilen deęişime uęramıř bir protein ortaya ęıkar. Tűmۆrle baęlantılı baęlantı deęiřkenlerinde tűmۆrle baęlantılı transkriptler ve tűmۆrle baęlantılı proteinler/antiijenler ortaya ęıkabilmektedir. Bunlar, gerek tűmۆr hűcrelerinin kanıtı gerekse tűmۆrlerin terapۆtik hedeflenmesine yۆnelik molekűler iřaretleyici olarak kullanılabilir. Tűmۆr hűcrelerinin ۆrneęin kan, serum, ilik, balgam, bronř lavajı, vűcut salgıları ve doku biyopsilerinde tespiti, buluřa gۆre ۆrneęin nűkleik asitlerin baęlantı deęiřkenlerine ۆzgű oligonűkleotitlerle PCR amplifikasyonu vasıtasıyla ekstrasyonu yoluyla yapılabilir. Tűmۆrle baęlantılı olan ve en azından biri baęlayıcı kořullar altında baęlantı deęiřkeni bۆlgesine baęlanmış olan primer ęiftler, ۆzellikle oligonűkleit olarak uygundur. Aęıklama uyarınca ۆrneklerde bu amaęla tanımlanan oligonűkleitler, ۆzellikle dizilim protokolűnde SEQ ID NO: 34-36, 39, 40 ve 107-110 olan diziden seęilen bir dizilim gۆsteren veya kapsayan kapsayan oligonűkleitler uygundur. Kanıt olarak dizilime baęlı tűm tespit sistemleri uygundur. Bunlar arasında PCR yۆntemi yanı sıra ۆrneęin genęip / mikro dizilim sistemleri, Northern-Blotlama, RNA koruma ۆlçűmleri (RDA) vb. bulunmaktadır. Tespit iřleminin en az bir baęlantı deęiřkenine spesifik nűkleik asit dizilimli spesifik melezleřtirme iřlemine dayandırılması, tűm tespit sistemlerinin ortak yanısıdır. Tűmۆr hűcrelerinin tespiti, baęlantı deęiřkeni űzerinden kodlanan spesifik bir epitopu tanıyabilen antikorlar űzerinden de yapılabilir. Antikor

üretimi için bu bağlantı değişkenine özgü olan peptitler bağışıklık kazandırmak için kullanılabilir. Bildirimi yapılan öğreti, bu bakımdan özellikle dizilim protokolündeki SEQ ID NO: 17-19, 111-115, 120 ve 137 diziden seçilmiş bir dizilim gösteren veya kapsayan peptitleri ve buna karşı yönlendirilmiş spesifik antikorları kapsamaktadır. Tümör hücrelerinin tespiti, tümöre spesifik değiştirilmiş glikosilasyon değişkenlerini tanıyan antikorlarla da yapılabilir. Bu tür antikorların oluşturulması için tümör hücrelerinde ve sağlıklı hücrelerde glikosilasyona bağlı olarak ayırt edilen peptit bölgeleri de kullanılabilir. Açıklama, bu bakımdan özellikle dizilim protokolünün SEQ ID NO: 17-19, 111-115, 120 , 137 ve 142-145 dizisinden seçilen bir dizilim gösteren veya kapsayan ve buna karşı yönlendirilen spesifik antikorları kapsamaktadır. Asparagin, N bağlantılı şeker kalıntılarının endojen deglikosilasyonu yoluyla aspartik aside dönüştürülür. Bu nedenle buluşa göre burada tanımlanan proteinler, tümöre spesifik dizilim değişikliğine uğramış olabilir ve bu şekilde başka biyokimyasal ve antikor bağlanımı özellikleri gösterebilir. Bildirimi yapılan öğreti, bu bakımdan özellikle dizilim protokolünün SEQ ID NO. 146-150 dizisinden seçilen bir dizilim gösteren veya kapsayan peptitleri ve bunlara karşı yönlendirilmiş spesifik antikorları kapsamaktadır. Bağışıklaştırma için gen ürününün tercihen sağlıklı hücrelerde oluşan değişkenine/değişkenlerine belirgin epitop farklılıkları gösteren amino asitler özellikle uygundur. Bu meyanda tümör hücrelerinin antikorlarla kanıtlanması, hastadan izole edilen bir prob veya intravenöz yoldan uygulanan antikorlarla yapılan görüntüleme ile yapılabilir. Yeni veya değiştirilmiş epitop gösteren bağlantı değişkenleri, tanısal amaçlı kullanılabilmesinin yanında bağışıklık terapisi için de cazip hedef oluşturmaktadır. Epitoplar, terapötik olarak etkili monoklonal antikorların veya T lenfositlerin hedeflendirilmesinde kullanılabilir. Pasif bağışıklık terapisinde bağlantı değişkenlerine spesifik epitopları tanıyan antikorlar veya T lenfositler, adoptif olarak transfer edilebilir. Antikorların oluşturulması, diğer antijenlerde olduğu gibi bu epitopları içeren polipeptitleri kullanarak standart teknolojilerle de (hayvanların bağışıklaştırılması, rekombinan antikorların izolasyonuna yönelik lavaj stratejileri) yapılabilir.

Alternatif olarak bu epitopları içeren oligopeptit ve polipeptitleri kodlayan nükleik asitler de bağışıklıklaştırma için kullanılabilir. Epitopa özgü T lenfositlerin in vitro ve in vivo ortamlarda oluşturulmasına yönelik çeşitli teknikler bilinmektedir ve ayrıntılı bir şekilde tanımlanmıştır (örneğin Kessler JH, et al. 2001, Sahin et al., 1997 karşılaştırınız) ve aynı zamanda bağlantı değişkenlerine spesifik epitoplar içeren oligopeptit veya polipeptitlerin veya bunları kodlayan nükleik asitlerin kullanımına dayanır. Bağlantı değişkenlerine özgü epitoplar içeren oligopeptit veya polipeptitler veya bu polipeptitleri kodlayan nükleik asitler, farmasötik anlamda etkili maddeler olarak aktif bağışıklık tedavisinde (aşılama, aşı terapisi) kullanılabilir.

Mevcut durumda normal ve tümörlü dokularda ikincil modifikasyonlarının cins ve miktarı ile farklılık gösteren proteinler de tanımlanmaktadır (Örneğin Durand & Seta, 2000; Clin. Chem. 46: 795-805; Hakomori, 1996; Kanser Araştırma Çalışması 56: 5309-18).

Protein modifikasyonlarının analizi, Western blotlama tekniği ile yapılabilir. Özellikle kDa büyüklüğü nispeten fazla olan glikosilasyonlar, SDS-PAGE yönteminde çözülen hedef proteinde daha büyük bir toplam kitle oluşmasına yol açar. Spesifik O ve N glikosidik bağlantıların kanıtı için proteolizatlar mahiyetinin değiştirilmesi öncesinde SDS vasıtasıyla O veya N glikosilatları ile inkübasyona tabi tutulur (PNGase, Endoglykosidase F, Endoglykosidase H, Roche Diagnostics gibi üreticilerin verilerine dayanarak). Takiben Western blotlama uygulanır. Bir hedef proteinin boyutunun küçültülmesi işleminde glikosidazla inkübasyondan sonra spesifik bir glikosilasyon kanıtlanabilir ve bu yolla bir modifikasyonun tümör özelliği de analiz edilebilir. Tümör hücrelerinde ve sağlıklı hücrelerde diferansiyel olarak glikosile olan protein alanları özellikle ilginçtir. Ancak bu tür glikosilasyon farklılıkları, şu ana kadar (örneğin Muc1 gibi) çok az sayıda hücre yüzeyi proteinleri için tanımlanmıştır.

Buluşa göre, Claudin-18 için tümörlerde diferansiyel bir glikosilasyonun varlığı kanıtlanmıştır. Sindirim sistemi kanseri, pankreas kanseri, yemek borusu tümörleri, prostat tümörleri ve akciğer tümörleri, Claudin-18'in daha az glikosile olmuş bir biçimini ihtiva etmektedir. Sağlıklı dokulardaki glikosilasyon, tümör hücreleri üzerinde glikosilasyon olmaması nedeniyle açıkta kalmış olan Claudin-18'in protein epitoplarını maskeleymektedir. Buluşa göre, buna uygun şekilde bu alanlara bağlanan ligand ve antikolar seçilebilmektedir. Buluş uyarınca bu tür ligand ve antikolar, sağlıklı hücreler üzerindeki epitoplar glikosilasyon sonucu maskelenmiş olduğu için bu hücrelerin üzerindeki Claudin-18'e bağlanmazlar.

10

Bunun sonucunda, diferansiyel glikosilasyon, yukarıda tümörle bağlantılı bağlantı değişkenlerinden türetilen protein epitopları için yapılan tanımlamaya benzer olarak normal hücrelerin ve tümör hücrelerinin tanı ve tedavi amacıyla ayırt edilmesinde kullanılabilir.

15

Açıklama, bir yönüyle açıklamaya göre tanımlanan tümörle bağlantılı antijenleri tanıyan ve tercihen açıklamaya göre tanımlanan tümörle bağlantılı antijenin ifadesini veya anormal ifadesini gösteren hücreler için seçilmiş olan bir aracıyı kapsayan farmasötik bir bileşimle ilgilidir. Bu aracı, belirli uygulama usulleriyle hücre ölümü endüksiyonu, hücrenin büyümesinin azaltılması, hücre membranının hasara uğraması veya sitokinlerin sekresyonunda etkili olabilmekte ve tercihen tümörü engelleyici bir faaliyet göstermektedir. Aracı, uygulama usullerinden birinde selektif olarak tümörle bağlantılı antijen için kodlama yapan nükleik asitle melezleştirilen antisens bie nükleik asittir. Aracı, bir diğer uygulama usulünde selektif olarak tümörle bağlantılı antijene bağlanan bir antikör, özellikle tümörle bağlantılı antijene bağlanan kompleman olarak aktive edilen veya toksine konjuge bir antikordur. Aracı, bir başka uygulama usulünde her seferinde selektif olarak değişik tümörle bağlantılı antijenleri tanıyan birçok maddeyi kapsamaktadır ki burada tümörle bağlantılı antijenlerden en az biri, açıklamaya uygun olarak tanımlanmış tümörle bağlantılı antijendir. Tanımanın doğrudan faaliyetin

30

engellenmesi veya antijenin ifadelendirilmesi yoluyla olması gerekmez. Açıklaması yapılan teknik öğretinin bu bakış açısında selektif olarak tümör üzerine sınırlı antijen, tercihen etkileyici mekanizmaların bu spesifik bölgeye doğru çekilmesi için işaretleme işlevi görmektedir. Aracı, tercih edilen bir uygulama usulünde antijeni HLA molekül üzerinde tanıyan ve bu tür işaretlenmiş hücreleri çözen sitotoksik bir T lenfosittir. Aracı, bir diğer uygulama usulünde selektif i olarak tümörle bağlantılı antijene bağlanan ve yapay etkileyici mekanizmaları bu hücreye doğru çeken bir antikordur. Aracı, bir başka uygulama usulünde spesifik olarak bu antijeni tanıyan diğer hücrelerin etkileyici mekanizmalarını güçlendiren bir T yardımcı lenfosittir.

Açıklaması yapılan öğreti, bir yönüyle buluşa uygun olarak tanımlanan bir tümörle bağlantılı antijenin ifadesini veya faaliyetini engelleyen bir aracıyı ihtiva eden farmasötik bir bileşimle ilgilidir. Bu aracı, tercih edilen bir uygulama usulünde seçimli olarak tümörle bağlantılı antijen için kodlama yapan nükleik asitle melezleştirilen antisens bir nükleik asittir. Aracı, Aracı, başka uygulama usulünde seçimli olarak tümörle bağlantılı antijene bağlanan bir antikordur. Aracı, bir diğer uygulama usulünde her seferinde selektif olarak farklı tümörle bağlantılı antijenlerin ifade veya faaliyetini engelleyen birçok maddeyi kapsamaktadır ki burada tümörle bağlantılı antijenlerden en az birisi, açıklamaya uygun tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijendir.

Açıklaması yapılan öğreti, bunların yanında verildiğinde selektif olarak açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı antijende HLA molekülü ile peptit epitop arasındaki komplekslerin miktarını artıran bir aracı içeren farmasötik bir bileşimle ilgilidir. Bu aracı, bir uygulama usulünde (i) tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmından, (ii) tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı için kodlama yapan bir nükleik asitten (iii) tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmını ifadelendiren bir konakçı hücreden ve (iv) tümörle bağlantılı antijenden kaynaklanan peptit epitoplar ile bir MHC molekül arasındaki izole

komplekslerden oluşan gruptan seçilmiş olan bir veya birçok bileşenden oluşmaktadır. Aracı, bir uygulama usulünde her seferinde selektif olarak, tümörle bağlantılı antijenlerden en az birinin açıklamaya uygun olarak tanımlanmış tümörle bağlantılı antijen olduğu durumda, tümörle bağlantılı farklı antijenlerin

5 MHC molekülleri ve peptit epitopları arasındaki kompleks miktarlarını artıran çeşitli araçları ihtiva etmektedir.

Bunun yanı sıra açıklaması yapılan öğreti, (i) açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijen veya onun bir kısmından (ii) açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijen veya onun bir kısmı için kodlama yapan

10 bir nükleik asitten, (iii) açıklamaya göre tanımlanmış bir tümörle bağlantılı antijene veya onun bir kısmına bağlanan bir antikordan, (iv) spesifik olarak açıklamaya göre tanımlanmış bir tümörle bağlantılı antijen için kodlama yapan bir nükleik asitle melezleştirilen bir antisens nükleik asitten, (v) açıklamaya göre

15 tanımlanmış bir tümörle bağlantılı antijeni veya onun bir kısmını ifade eden bir konakçı hücreden ve (vi) açıklamaya göre tanımlanmış bir tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı ile bir HLA molekül arasındaki izole komplekslerden oluşan bir gruptan seçilmiş olan bir veya birkaç bileşeni içeren parmasötik bir bileşim ile ilgilidir.

20

Açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijen veya onun bir kısmı için kodlama yapan bir nükleik asit, parmasötik bileşimde bir ifade vektöründe bulunabilir ve işlevsel olarak bir kolaylaştırıcı ile bağlantılı olabilir.

25 Bir farmasötik bileşimin içeriğinde bulunan konakçı hücre, tümörle bağlantılı bir antijeni veya onun bir kısmını tecrit edebilir, yüzeyde ifade edebilir veya ilave olarak tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmına bağlanan bir HLA molekülünü ifade edebilir. Uygulama usullerinden birinde konakçı hücre, HLA molekülünü endojen olarak ifade etmektedir. Konakçı hücre, bir başka uygulama

30 usulünde HLA molekülünü ve/veya tümörle bağlantılı antijen veya onun bir

kısmını rekombinan olarak ifade etmektedir. Konakçı hücre, tercihen proliferatif özellikte değildir. Konakçı hücre, tercih edilen bir uygulama usulünde antijen ortaya çıkaran bir hücre olup özellikle bir monosit veya bir makrofajdır.

- 5 Farmasötik bir bileşimin içeriğinde bulunan bir antikör, monoklonal bir antikör olabilir. Antikör, diğer uygulama usullerinde kimera özellikli veya insanlaştırılmış bir antikördür, doğal bir antikörün bir fragmanıdır, veya birleşimsel tekniklerle üretilen bir sentetik antikördür. Antikör, tedavi veya tanı açısından yararlı bir aracı veya madde ile bağlanmış olabilir.

10

Farmasötik bir bileşimde bulunan antisens nükleik asit, açıklama gereğince tanımlanmış bir tümörle bağlantılı antijen için kodlama yapan bir nükleik asitten 6-50, özellikle 10-30, 15-30 veya 20-30 nükleotidin birbirine bağlı olduğu bir dizilim içerebilir.

15

Diğer uygulama usullerinde açıklamaya uygun farmasötik bir bileşim vasıtasıyla doğrudan veya bir nükleik asidin ifadelendirilmesiyle oluşturulan tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı, hücrelerin yüzeyindeki MHC moleküllerine bağlanır ki bu bağlanma, tercihen sitolitik bir reaksiyonu tetikleyen ve/veya sitokin salınımını teşvik eden bir bağlanmadır.

20

Farmasötik bir bileşim, farmasötik açıdan uyumlu bir taşıyıcı ve/veya bir adjuvan içerebilir. Adjuvan; saponin, GM-CSF, CpG nükleotitleri, RNA, bir sitokin veya bir kemokinden seçilmiş olabilir. Bir farmasötik bileşim, tercihen bir tümörle bağlantılı antijenin selektif ifadelendirilmesi veya anormal ifadelendirilmesi ile kendini gösteren bir hastalığın tedavisi için uygulanır. Hastalık, tercih edilen bir uygulamada kanserdir.

25

Açıklaması yapılan öğreti, bunun yanında bir veya birçok tümörle bağlantılı antijenlerin ifadelendirilmesi veya anormal ifadelendirilmesi ile kendini gösteren

30

bir hastalığın tedavisi, tanısı ve/veya takibine yönelik bir yöntem ile ilgilidir. Tedavi, bir uygulama usulünde farmasötik bir bileşim verilmesini kapsamaktadır.

5 Hastalık, tercihen kanserdir ve "kanser" terimi, bunlarla sınırlı olmamak üzere, kan kanseri, erbezi kanseri, melanom, teratom, beyin uru, böbrek, böbreküstü bezi, tiroit bezleri, bağırsak, karaciğer, kalın bağırsak, mide, sindirim sistemi, lenf bezi, yemek borusu, kolorektal, pankreas, gırtlak, burun, kulak (kulak-burun-boğaz), göğüs, prostat, rahim, yumurtalık ve akciğer kanserlerini ve bunların metastazlarını kapsamaktadır.

10

Açıklama, bir yönüyle açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijenin ifade edilmesi veya anormal ifade edilmesi ile kendini gösteren bir hastalığa tanı konulmasına yönelik bir yöntem ile ilgilidir. Yöntem, bir hastadan izole edilen biyolojik örnekte (i) tümörle bağlantılı bir antijeni kodlayan bir nükleik asidin veya onun bir kısmının ve/veya (ii) tümörle bağlantılı antijenin veya onun bir kısmının ve/veya (iii) tümörle bağlantılı bir antijen veya onun bir kısmına karşı yönlendirilen bir antikorun ve/veya (iv) tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı için spesifik olan sitotoksik veya yardımcı T lenfositlerin kanıtlanmasını kapsamaktadır. Kanıt, belirli uygulama usullerinde (i) biyolojik 15 örneğin spesifik olarak tümörle bağlantılı bir antijen veya onun bir kısmı için kodlama yapan bir nükleik aside, tümörle bağlantılı antijene veya onun bir kısmına, antikora veya tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı için spesifik olan sitotoksik veya yardımcı T lenfositlere bağlanan bir aracıyla temas ettirilmesini ve (ii) aracı ile nükleik asit veya onun bir kısmı, tümörle bağlantılı 20 antijen veya onun bir kısmı, antikor veya sitotoksik veya yardımcı T lenfositler arasındaki kompleks oluşumunun kanıtlanmasını kapsamaktadır. Hastalık, bir uygulama usulünde birçok farklı tümörle bağlantılı antijenlerin ifadesi veya anormal ifadesi ile kendini göstermektedir ve kanıt, birçok farklı tümörle bağlantılı antijenleri kodlayan birçok nükleik asitin veya onların bir kısmının 25 kanıtını, birçok farklı tümörle bağlantılı antijenlerin veya onların bir kısmının 30

kanıtını, tümörle bağlantılı birçok farklı antijene veya onların bir kısmına bağlanan birçok antikoru kanıtını veya tümörle bağlantılı birçok antijen için spesifik olan birçok sitotoksik veya yardımcı T lenfositlerin kanıtlanmasını kapsamaktadır. Bir diğer uygulama usulünde hastadan izole edilen biyolojik örnek, kıyaslanabilir normal bir biyolojik örnekle kıyaslamaya tabi tutulur.

Açıklanan öğreti, bir başka bakımdan bir hastalığın gerilemesi, gelişme süreci veya ortaya çıkışının belirlenmesine yönelik, açıklamaya göre tanımlanmış tümör bağlantılı bir antijenin ifadelendirilmesi veya anormal ifadelendirilmesi ile kendini gösteren ve hastalık tanısı almış veya (i) tümörle bağlantılı antijen için kodlama yapan bir küme antijenden veya onun bir kısmından, (ii) tümörle bağlantılı bir küme antijen veya onun bir kısmından, (iii) tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmına bağlanan bir küme antikordan ve (iv) tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı ile bir MHC molekül arasındaki komplekse spesifik olan bir küme sitolitik T hücresi veya yardımcı T hücresinden oluşan gruptan seçilen bir veya birkaç parametre itibarıyla hastalığa yakalanma şüphesi bulunan bir hastadan alınan örneğin gözlemlenmesini içeren bir yöntemi kapsamaktadır. Yöntem, tercihen parametrenin veya parametrelerin alınan birinci ve ikinci bir örnekte belirli zamanlarda belirlenmesini ve bu şekilde her iki örneğin kıyaslanmasıyla hastalığın gidişatının tespit edilmesini kapsamaktadır. Hastalık, belirli uygulama usullerinde tümörle bağlantılı birçok farklı antijenin ifadelendirilmesi veya anormal ifadelendirilmesi ile kendini göstermektedir ve gözlemlene, (i) tümörle bağlantılı birçok farklı antijen veya onların bir kısmı için kodlama yapan birçok nükleik asitten oluşan bir kümenin ve/veya (ii) tümörle bağlantılı birçok farklı antijenin veya onların bir kısmının olduğu bir kümenin ve/veya (iii) tümörle bağlantılı birçok farklı antijene ve bunların bir kısmına bağlanan birçok antikordan oluşan bir kümenin ve/veya (iv) tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı ile bir MHC molekül arasındaki kompleks spesifik olan bir küme sitolitik T hücresi veya yardımcı T hücresinin gözlemlenmesinden oluşmaktadır.

Bir nükleik asidin veya onun bir kısmının kanıtlanması veya bir küme nükleik asidin veya onun bir kısmının gözlemlenmesi, buluşa göre spesifik olarak nükleik asit veya onun bir kısmıyla melezleştirilen polinükleotit bir sonda ile veya nükleik asit veya onun bir kısmının selektif olarak genişletilmesi ile yapılabilir.

5 Polinükleotit sonda, bir uygulama usulünde nükleik asitten 6-50, özellikle 10-30, 15-30 veya 20-30 bağlantılı nükleotitlerden oluşan bir dizilimden oluşmaktadır.

Kanıtlanacak tümör bağlantılı antijen veya onun bir kısmı, belirli uygulama usullerinde hücre içinde veya hücre yüzeyinde bulunur. Tümör bağlantılı bir

10 antijenin veya onun bir kısmının kanıtlanması veya tümör bağlantılı bir antijenin veya onun bir kısmının gözlemlenmesi, buluşa göre spesifik olarak tümörle bağlantılı antijene veya onun bir kısmına bağlanan bir antikor ile yapılabilir.

Diğer uygulama usullerinde kanıtlanacak olan tümörle bağlantılı antijen veya

15 onun bir kısmı, bir MHC molekülü, özellikle bir HLA molekülü bir komplekste bulunmaktadır.

Bir antikorla ilgili kanıtlama veya bir küme antikorun gözlemlenmesi, buluşa göre spesifik olarak antikora bağlanan bir protein veya peptit yapıdır.

20

Sitolitik T hücreleri veya yardımcı T hücrelerinin kanıtlanması veya bir antijen veya onun bir kısmı ile MHC molekülleri arasındaki komplekslere spesifik olan sitolitik T hücresi veya yardımcı T hücresi kümelerinin gözlemlenmesi, buluşa göre antijen veya onun bir kısmı ile bir MHC molekülü arasındaki kompleksi

25 gösteren bir hücre ile yapılabilir.

Kanıtlama veya gözlemleme işlemi için kullanılan polinükleotit sonda, antikor, protein veya peptit veya hücre, tercihen kanıtlanabilir olarak işaretlenir. Kanıtlanabilir işaretleyici, belirli uygulama usullerinde bir radyoaktif belirteç

30 veya enzim belirteçidir. T lenfositlerin kanıtlanması, ilave olarak

proliferasyonlarının, sitokin üretimlerinin ve aynı zamanda MHC ve tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmıyla tetiklenen spesifik simülasyon ile yapılan sitotoksik faaliyetleri vasıtasıyla kanıtlanabilir. T lenfositlerle ilgili kanıtlama, bunun yanında rekombinant bir MHC molekülle veya aynı zamanda tümörle bağlantılı bir veya birkaç antijenden ilgili imünojen fragmanla yüklenen birçok molekülden meydana gelen bir kompleks ile ve spesifik T hücre reseptörünün temas ettirilmesi yoluyla yapılabilir ki bu suretle T lenfositler de tanımlanabilecektir.

- 10 Açıklaması yapılan öğreti, bir başka boyutuyla açıklamaya göre tanımlanan tümörle bağlantılı bir antijenin ifade edilmesi veya anormal ifade edilmesi ile kendini gösteren bir hastalığın tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmına bağlanan bir antikoru verilmesini kapsayan ve terapötik veya tanıya yönelik bir aracı veya madde ile bağlantılı tedavisi, tanısı ve takibi ile ilgilidir. Antikor, 15 monoklonal bir antikor olabilir. Antikor, diğer uygulama usullerinde kimera özellikli veya insanlaştırılmış bir antikordur veya doğal bir antikorun fragmanıdır.

- Açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı antijenin ifade edilmesi veya anormal ifade edilmesi ile kendini gösteren bir hastalığın tanısı veya 20 gözlemlenmesine yönelik olarak açıklaması yapılan yöntemler, bazı uygulama usullerinde disemine tümör hücrelerinin veya tümör metastazlarının yardımıyla veya vasıtasıyla gerçekleşir. Disemine tümör hücrelerinin kanıtlanması,örneğin kan, serum, ilik, balgam, bronşiyal aspirat ve/veya bronşiyal lavajda yapılabilir.

- 25 Açıklaması yapılan öğreti, açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijenin ifade edilmesi veya anormal ifade edilmesi ile kendini gösteren bir hastalık tanısı konmuş hastanın tedavisine yönelik (i) hastadan bağışıklığa tepkisel hücreleri haiz bir örnek alınması, (ii) alınan örneğin tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmına karşı sitolitik T hücrelerinin üretimini teşvik eden 30 koşullarda tümörle bağlantılı antijeni veya onun bir kısmını ifade eden bir konakçı

hücre ile temas ettirilmesi, (iii) sitolitik T hücrelerinin tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmını ifade eden hücrelerin çözülmesi için uygun olan bir miktarda hastaya verilmesini kapsayan bir yöntemle de ilgilidir. Sunulan öğreti, aynı zamanda sitolitik T hücrelerinin T hücre reseptörlerinin tümörle bağlantılı antijenlere karşı klonlanmasını ile de ilgilidir. Bu, istenen özelliğin elde edilebilmesi ve (iii) sayılı yan cümlede açıklandığı gibi hastaya verilebilmesi için diğer T hücrelerine de transfer edilebilir.

Konakçı hücre, bir uygulama usulünde HLA molekülünü endojen olarak ifade etmektedir. Bir başka uygulama usulünde konakçı hücre, bir HLA molekülünü ve/veya tümörle bağlantılı antijeni veya onun bir kısmını rekombinan olarak ifade etmektedir. Konakçı hücre, tercihen proliferatif değildir. Konakçı hücre, tercih edilen bir uygulama usulünde antijen sunucu bir hücre, özellikle ağaç görünümü bir hücre, bir monosit veya bir makrofajdır.

Mevcut açıklama bir diğer yönüyle, tümörle bağlantılı bir antijenin ifadesi veya anormal ifadesiyle kendini gösteren bir hastalık tanısı konmuş bir hastanın (i) açıklamaya göre tanımlanmış olan ve hastalıkla bağlantılı olan hücreler tarafından ifade edilen tümörle bağlantılı bir antijeni kodlayan nükleik asitlerden birinin tanımlanmasını, (ii) bir konakçı hücrenin nükleik asit veya onun bir kısmıyla transfekte edilmesini (iii) transfekte edilen konakçı hücrenin nükleik asidin ifadesi için uygun ortamda üretilmesini (bu işlem, yüksek transfeksiyon oranının sağlandığı durumlarda zorunlu değildir) ve (iv) konakçı hücrelerin veya onlardan alınan bir ekstraktın hastanın hastalıkla bağlantılı hücrelerine karşı bağışıklık reaksiyonunu güçlendirmeye yetecek oranda hastaya verilmesini kapsayan tedavi yöntemiyle ilgilidir. Yöntem, bunun yanı sıra tümörle bağlantılı bir antijen veya onun bir kısmını temsil eden bir MHC molekülün tanımlanmasını da kapsayabilir ki burada konakçı hücre, MHC molekülünü ifadelendirir ve tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmını temsil eder. Bağışıklık reaksiyonu, B hücresi reaksiyonunu veya T hücresi reaksiyonunu kapsayabilir. T hücreleri reaksiyonu,

bunun yanı sıra tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmını temsil eden konakçı hücreler için spesifik olan veya hastanın tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmını ifade eden hücreleri için spesifik olan sitolitik T hücresi ve/veya yardımcı T hücresi üretimini de kapsayabilir.

5

Açıklaması yapılan öğreti, açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı antijenin ifadesi veya anormal ifadesiyle kendini gösteren bir hastalığın tedavisi ile ilgili (i) hastadan alınan ve tümörle bağlantılı antijenin anormal miktarlarını ifade eden hücrelerin tanımlanmasını (ii) hücre örneklerinin izole edilmesini (iii) hücrelerin kültive edilmesini (iv) hücrelerin, hücrelere karşı bağışıklık reaksiyonunu tetikleyemeye uygun miktarda hastaya verilmesini kapsayan bir yöntem ile de ilgilidir.

10

Açıklamaya göre kullanılan konakçı hücreler, tercihen proliferatif olmayan veya proliferatif yapılmayan hücrelerdir. Tümörle bağlantılı bir antijen ve onun bir kısmının ifadelendirilmesi veya anormal ifadelendirilmesi yoluyla kendisi gösteren hastalık özellikle kanserdir.

15

Mevcut açıklama, bunun yanı sıra (a) SEQ ID NO. 3-5 olan bir grubu, onun bir kısmını veya türevini kapsayan bir nükleik asit dizilimini içeren bir nükleik asitten (b) yukarıdaki (a) cümleciğinde belirtilen nükleik asitle bağlayıcı koşullar altında melezleştirilen bir nükleik asitten (c) yukarıdaki (a) veya (b) cümleciklerinde belirtilen nükleik asitlerle ilişkilendirilerek dejenere edilen bir nükleik asitten ve (d) yukarıdaki (a), (b) veya (c) cümleciklerinde belirtilen nükleik asitlere komplementer olan bir nükleik asitten oluşan bir gruptan seçilen bir nükleik asit ile de ilgilidir. Bildirim, bunun yanı sıra SEQ ID NO. 10, 12-14 ve 146-150 olan bir gruptan, onun bir kısmından veya türevinden seçilen bir amino asit dizilimini kapsayan bir protein veya polipeptit için kodlama yapan bir nükleik asitle de ilgilidir.

20

25

Açıklaması yapılan öğreti, bir diğer yönüyle açıklamaya uygun nükleik asitlerin promotör dizilimleriyle de ilgilidir. Bunlar, işlevsel olarak bir başka gen ile tercihen bir ifade vektöründe bağlanabilir ve bu şekilde ilgili hücrelerde bu genin selektif ifadesini sağlamak mümkün olabilir.

5

Buluş, bir başka yönüyle açıklamaya uygun bir nükleik asit içeren rekombinan bir nükleik asit molekülü, özellikle bir DNA veya RNA molekülüdür.

10 Mevcut öğreti, aynı zamanda bildirime uygun bir nükleik asiti kapsayan açıklamaya uygun nükleik asit veya rekombinant nükleik asit molekülü içeren konakçı hücrelerle de ilgilidir.

15 Konakçı hücre, bunun yanı sıra bir HLA molekülü için kodlama yapan bir nükleik asiti kapsayabilir. Konakçı hücre, bir uygulama usulünde HLA molekülünü endojen olarak ifade eder. Bir diğer uygulama usulünde konakçı hücre, HLA molekülünü ve/veya açıklamaya uygun nükleik asidi veya onun bir kısmını rekombinan olarak ifade eder. Konakçı hücre, tercihen proliferatif olmayan bir hücredir. Konakçı hücre, tercih edilen bir uygulama usulünde antijen sunan bir hücredir, özellikle ağaç biçimli bir hücre, bir monosit veya bir makrofajdır.

20

Açıklaması yapılan öğreti, bir diğer uygulama usulünde açıklama uyarınca tanımlanmış nükleik asitleri melezleştiren ve genetik sonda veya “antisens” molekül olarak kullanılabilen oligo nükleotitlerle ilgilidir. Bildirime uygun tanımlanmış bir nükleik asit veya onun kısımlarıyla melezleştirilmiş oligo 25 nükleotit primer veya yeterli örnek şeklinde olan nükleik asit moleülleri, açıklamaya uygun tanımlanmış nükleik asitle benzer kökenli olan nükleik asitlerin bulunmasında kullanılabilir. PCR amplifikasyonu ve güney ve kuzey melezleştirme, benzer kökenli nükleik asitlerin tespit edilmesinde kullanılabilir. Melezleştirme, düşük derecede bağlayıcı koşullarda yapılabilir, ancak daha iyi bir 30 melezleştirme orta dereceli bağlayıcı koşullarda, en iyi melezleştirme ise yüksek

dereceli bağlayıcı koşullarda gerçekleştirilebilir. Buluşa göre buradaki "bağlayıcı koşullar" terimi, polinükleotitler arasında spesifik melezleştirmeye olanak sağlayan koşulları ifade etmektedir.

- 5 Açıklama, bir başka yönüyle (a) SEQ ID NO. 3-5 olan bir gruptan, onun bir kısmından veya türevinden oluşan bir nükleik asit dizilimi içeren bir nükleik asitten (b) yukarıdaki (a) cümleciğinde belirtilen nükleik asitle bağlayıcı koşullarda melezleştirilen bir nükleik asitten (c) yukarıdaki (a) ve (b) cümleciğinde belirtilen nükleik asitlerle ilintili olarak dejenere olan bir nükleik asitten ve (d) yukarıdaki (a), (b) ve (c) cümleciklerinde belirtilen nükleik asitlere komplementer olan bir nükleik asitten oluşan bir gruptan seçilen bir nükleik asit tarafından kodlanan bir protein, polipeptit veya peptit ile ilgilidir. Açıklama, tercih edilen bir uygulama usulünde SEQ ID NO. 10, 12-14 ve 146-150 olan bir gruptan, onun bir kısmından veya türevinden oluşan bir amino asit dizilimi içeren bir protein, polipeptit veya peptit ile ilgilidir.

- Açıklaması yapılan öğreti, bir başka yönüyle açıklamaya göre tanımlanan tümörle bağlantılı bir antijenin immunojen fragmanı ile ilgilidir. Fragman, tercihen bir insan HLA reseptörüne veya bir insan antikoruna bağlanır. Bildirime uygun bir fragman, tercihen en az 6, özellikle en az 8, en az 10, en az 12, en az 15, en az 20, en az 30 veya en az 50 amino asitli bir dizilimi kapsar.

- Açıklama, bu yönüyle özellikle SEQ ID NO: 17-19, 90-97, 100-102, 105, 106, 111-116, 120, 123, 124, 135-137, 139 ve 142-150 olan bir diziden, onun bir kısmından veya türevinden oluşan bir gruptan seçilen bir dizilimi gösteren veya kapsayan bir peptit ile ilgilidir.

- Açıklaması yapılan öğreti, bir diğer yönüyle açıklama gereğince tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijene veya onun bir kısmına bağlanan bir aracı ile ilgilidir. Tercih edilen bir uygulama usulünde bir antikor aracı olarak kullanılır.

Antikor, diğer uygulama usullerinde kimera özellikli, insanileştirilmiş veya kombine tekniklerle üretilmiş bir antikordur veya antikorun bir fragmanıdır. Açıklama, bunun yanında seçmeli olarak (i) açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijen veya onun bir kısmının kompleksine ve (ii) açıklamaya göre tanımlanmış bir tümörle bağlantılı bir antijene veya onun bir kısmına bağlanan bir MHC molekülüne bağlanan bir antikor ile ilgilidir ki burada antikor sadece (i) veya (ii) kapsamında bağlanma yapmaz. Antikor, monoklonal bir antikor olabilir. Antikor, diğer uygulama usullerinde kimera özellikli veya insanlaştırılmış bir antikordur veya doğal bir antikorun bir fragmanıdır.

10

Mevcut açıklama, özellikle bir aracı, özellikle de spesifik olarak SEQ ID NO: 17-19, 90-97, 100-102, 105, 106, 111-116, 120, 123, 124, 135-137, 139 ve 142-150 diziyi haiz bir gruptan, onun bir kısmından veya bir türevinden seçilen bir dizilimi gösteren veya kapsayan bir peptite bağlanan bir antikorla ilgilidir.

15

Buluş, Claudin-18 konusunda spesifik olarak Claudin-18'in bir değişkenine bağlanan bir aracı, özellikle bir antikorla ilgilidir. Aracı, özellikle antikor, bir uygulama usulünde spesifik olarak Claudin 18A1 (SEQ ID NO. 118) değişkenine bağlanır. Aracı, özellikle antikor, bir başka uygulama usulünde ise spesifik olarak Claudin 18A2 (SEQ ID NO. 16) değişkenine bağlanır. Bu tür spesifik antikorlar, örneğin 4 numaralı örnekte tanımlanan peptitlere bağışıklık kazandırılması yoluyla elde edilebilir.

20

Buluş, Claudin 18 ile ilgili olarak bunun yanı sıra belirli araçlarla, özellikle spesifik olarak Claudin 18A2'nin belirli bir glikosilasyon örneği gösteren bir biçimine bağlanan antikorlarla ilgilidir. Aracı, özellikle antikor, bir uygulama usulünde spesifik olarak Claudin 18A2'nin bir veya birkaç muhtemel glikosilasyon noktasında glikosile olmamış bir biçimine bağlanır. Bir diğer uygulama usulünde ise aracı, özellikle antikor, Claudin 18A2'nin bir veya birkaç muhtemel glikosilasyon noktasında glikosile olmuş bir biçimine bağlanır. Bu tür

30

bir muhtemel glikosilasyon noktası, tercihen Claudin 18A2'nin 37, 38, 45, 116, 141, 146 ve 205 amino asit pozisyonlarından oluşan bir gruptan seçilmiş olan bir veya birkaç pozisyon ile ilgilidir. Bu tür bir glikosilasyon, bunun yanı sıra tercihen bir N glikosilasyon ile ilgilidir.

5

Claudin 18'in bir değişkeni, diğer bir deyişle bir başka biçimi için spesifik bir aracı, özellikle Claudin 18'in bir değişkeni, diğer bir deyişle bir başka biçimi için spesifik bir antikor, bu bağlamda aracın, yani antikorun spesifik olarak yönlendiği değişkene, diğer bir deyişle değişik biçime diğer değişken veya değişik biçimlere olduğundan daha güçlü bir şekilde bağlandığı anlamına gelmektedir. Bir aracı, özellikle bir antikor, birinci bir değişkene veya değişik birinci bir değişik biçime veya birinci epitopa, ikinci bir değişkene veya değişik ikinci biçime veya ikinci epitopa bağlandığı çözünme sabitesinden daha düşük bir çözünme sabitesi (K_D) ile bağlandığında, birinci değişkene veya değişik birinci biçime veya birinci epitopa ikinci değişkene veya değişik ikinci biçime veya ikinci epitopa oranla daha kuvvetli bir şekilde bağlanır. Aracın, özellikle antikorun spesifik olarak bağlandığı değişken veya değişik biçim için olan çözünme sabitesi (K_D), tercihen aracın, özellikle antikorun spesifik olarak bağlanmadığı değişken veya değişik biçim için olan çözünme sabitesinden (K_D) 10 kat, tercihen 20 kat , daha tercihlili olarak 50 kat, çok daha tercihlili olarak 100 kat ve özellikle 200 kat, 500 kat veya 1000 kattan daha küçüktür. Aracı, özellikle antikor, tercihen aracı, özellikle antikora spesifik olmayan değişkene veya değişik biçime veya epitopa bağlanmaz veya esas olarak bağlanmaz.

25 Yukarıda tanımlanan ve Claudin 18'in bir değişkenine veya değişik biçimine spesifik olarak bağlanan araçlar, özellikle antikorlar ve onların burada tanımlanan türevleri, buluşa göre bileşim ve yöntemlerde kullanım için de öngörülmüştür.

30 Buluş, bunun yanı sıra açıklamaya göre tanımlanmış tümörle bağlantılı bir antijen veya onun bir kısmına bağlanan açıklamaya uygun aracı veya bildirime uygun bir

antikor ile bir terapötik veya tanıya yönelik bir aracı veya madde arasındaki bir konjugat ile ilgilidir. Terapötik veya tanıya yönelik aracı, bir uygulama usulünde bir toksindir.

- 5 Açıklaması yapılan öğreti, bir başka yönüyle açıklamaya göre tanımlanmış bir tümörle bağlantılı antijenin ifadesi veya anormal ifadesinin kanıtlanmasına yönelik olan ve (i) tümörle bağlantılı antijeni veya onun bir kısmını kodlayan bir nükleik asidin (ii) tümörle bağlantılı antijenin veya onun bir kısmının, (iii) tümörle bağlantılı antijene veya onun bir kısmına bağlanan antikorların ve/veya
- 10 (iv) tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı ile bir MHC molekülü arasındaki komplekse spesifik olan T hücrelerinin kanıtlanmasına yönelik aracı kapsayan bir donatı ile ilgilidir. Nükleik asitlerin veya onların bir kısmının kanıtına yönelik araçlar, bir uygulama usulünde nükleik asitlerin seçimsel amplifikasyonuna yönelik ve özellikle birbirine bağlı 6-50, özellikle 10-30, 15-30
- 15 veya 20-30 nükleik asit nükleotidi içeren bir dizilimi kapsayan nükleik asit molekülleridir.

Buluşun Ayrıntılı Tanımı

- 20 Mevcut buluşta tümör hücrelerinde selektif olarak ifade edilen veya aberan olarak ifade edilen ve tümörle bağlantılı antijenleri temsil eden genler tanımlanmaktadır.

- Açıklama uyarınca bu genler ve/veya bunların gen ürünleri ve/veya onların türevleri ve/veya kısımları, terapötik yaklaşımlar için tercih edilen hedef
- 25 yapılarıdır. Terapötik yaklaşımlar, kavramsal anlamda selektif olarak ifade edilen tümörle bağlantılı gen ürününün faaliyetini baskılama amacına yönelik olabilir. Bu yaklaşım, seçilen ilgili aberan ifadenin fonksiyonel olarak tümör patojenetik anlamda önemli olması ve buna karşı olan engellenmenin ilgili hücrelere selektif olarak hasar verilmesi yoluyla oluşturulması durumunda mantıklı bir yaklaşımdır.
- 30 Diğer terapötik konseptler, tümörle bağlantılı antijenleri, hücrelere zarar verme

potansiyeli olan etkileyici mekanizmaların selektif olarak tümör hücrelerine doğru çekilmesi için kullanılan işaretleme olarak kabul etmektedir. Burada hedef molekülün kendisinin ve üstlendiği rolün tümör oluşumundaki işlevi, tamamen önemsizdir.

5

Açıklamaya göre bir nükleik asidin "türevi" terimi, nükleik asitte tek tek veya çoklu olarak nükleotid ikamesi, çıkarımı veya ilavesi bulunduğu anlamına gelmektedir. "Türev" terimi, bunun dışında bir nükleik asidin nükleotid bazda, şekerde veya fosfatta türevlendirilmesini de kapsamaktadır. "Türev" terimi, bunun yanı sıra doğada bulunmayan nükleotitleri ve nükleotit benzeşiklerini içeren nükleik asitleri de kapsar.

10

Bir nükleik asit, açıklamaya göre tercihen dezoksiribo nükleik asit (DNA) veya ribonükleik asittir (RNA). Nükleik asitler, buluş kapsamında genomik DNA, cDNA, mRNA, rekombinan olarak üretilmiş ve kimyasal olarak sentetize edilmiş moleülleri kapsamaktadır. Bir nükleik asit, açıklama kapsamında tek dizili veya çift dizili ve doğrusal veya ortak değerlikli daire şeklinde kapalı molekül şeklinde bulunabilir.

15

20 Açıklamaya uygun olarak tanımlanmış nükleik asitler, tercihen izole nükleik asitlerdir. "İzole nükleik asit" terimi, buluşa göre nükleik asidin bir (i) in vitro ortamda, örneğin polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) yoluyla amplifiye edilmiş olduğu, (ii) rekombinan olarak klonlama vasıtasıyla üretilmiş olduğu, (iii) örneğin bölme ve jel elektroferöz ayırma yoluyla saflaştırılmış olduğu, veya (iv) 25 örneğin kimyasal bileşimlerle sentetize edilmiş olduğu anlamına gelmektedir. İzole edilmiş bir nükleik asit, rekombinan DNA teknikleri kullanılarak yapılacak bir manipülasyon işlemi için kullanıma sunulan bir nükleik asittir.

25

Bir nükleik asidin diğer bir nükleik aside "komplementer" olması, ancak her iki dizilimin birbiriyle melezlenebilmesi ve stabil çift yönlü bir yapı oluşturabilmeleri

30

durumunda mümkün olabilir ki bu durumda melezlemenin tercihen polinükleotitler arasında spesifik bir melezlenmeye olanak veren koşullar (bağlayıcı koşullar) altında oluşan bir melezleme olması tercih edilmektedir. Bağlayıcı koşullar, örneğin Moleküler Klonlama: Laboratuvar El Kitabı (*Molecular Cloning: A Laboratory Handbook*), J. Sambrook et al., 2. Baskı, Cold Spring Harbor Laboratory Press Yayını, Cold Spring Harbor, New York, 1989 veya Moleküler Biyolojide Güncel Protokoller (*Current Protocols in Molecular Biology*) F.M. Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc., New York gibi çalışmalarda tanımlanmıştır ve örneğin melezleme tampon maddesinde 65°C derecede melezleme işlemini kapsamaktadır (3,5 x SSC, % 0,02 ficol, % 0,02 polivinil pirolidon, % 0,02 sığır serum albümini, 2,5mM NaH₂PO₄ (pH7), % 0,5 SDS, 2mM EDTA). SSC bileşimi, 0,15 M natriyum klorid / 0,15 M natriyum sitrat, pH 7'dir. DNA'nın taşındığı membran, melezleme işleminden sonra örnek olarak oda sıcaklığında 2 x SSC içinde ve sonra 0,1 - 0,5 x SSC / 0,1 x SDS içinde 68°C dereceye kadar olan sıcaklıkta yıkanır.

Komplementer nükleik asitler, buluşa göre nükleotit kimliğinin en az % 40'ını, özellikle en az % 50'sini, en az % 60'ını, en az % 70'ini, en az % 80'ini, en az % 90'ını ve tercihen en az % 95'ini, en az % 98'ini veya en az % 99'unu göstermektedir.

Tümörle bağlantılı antijenler için kodlama yapan nükleik asitler, açıklamaya göre tek başlarına veya diğer nükleik asitlerle, özellikle heterolog nükleik asitlerle kombinasyon halinde bulunabilir. Tercih edilen uygulama usullerinde bir nükleik asit, işlevsel olarak ifade kontrol dizilimleriyle veya nükleik asitlere nazaran heterolog veya homolog durumda olabilen düzenleyici dizilimlerle bağlantı içinde bulunur. Kodlayan bir dizilim ve düzenleyici bir dizilim, ancak kodlayan dizilimin ifadesinin veya transkripsiyonunun düzenleyici dizilimin kontrolü veya etkisi altında olduğu bir durumda birbirleriyle ortak değerlikli olarak bağlantılı olmaları durumunda "işlevsel" olarak birbirleriyle bağlantılı olmuş demektir. Kodlama

yapan dizilimin işlevsel bir proteine aktarılması gerekiyorsa düzenleyici dizilimin endüksiyonu, düzenleyici bir dizilimin kodlayan dizilimle işlevsel bağlantısında, kodlayan dizilimde okuma çerçevesi kaymasına veya kodlayan dizilimde istenen protein veya peptide aktarılması konusunda güçsüzlüğe neden olmaksızın
5 kodlayan dizilimin transkripsiyonuna yol açar.

"İfade kontrol dizilimi" veya "düzenleyici dizilim", buluşa göre bir genin ifadesini denetleyen kolaylaştırıcı, geliştirici unsurları veya diğer kontrol unsurlarını kapsamaktadır. Belirli uygulama usullerinde ifade kontrol dizilimleri
10 düzenlenebilir. Düzenleyici dizilimlerin kesin yapısı, türe veya hücre tipine bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak TATA kutusu, capping dizilimi, CAAT dizilimi ve benzerleri gibi kopyalama veya aktarım işleminin başlangıcında katılım göstermeyen 5' kopyalanmamış ve 5' aktarılmamış dizilimi kapsamaktadır. Özellikle 5' kopyalanmamış düzenleyici dizilimler, işlevsel olarak
15 bağlanan genin transkripsiyonel kontrolü amaçlı bir kolaylaştırıcı dizilimi içeren bir kolaylaştırıcı bölgeyi kapsamaktadır. Düzenleyici dizilimler, geliştirici dizilimleri veya akış yukarı konumlu etkinleştirici dizilimleri de kapsayabilir.

Yani sonuç olarak bir taraftan burada tanımlanan tümörle bağlantılı antijenler,
20 istenildiği kadar çeşitli ifade kontrol dizilimleri ve kolaylaştırıcılar ile kombine edilebilmektedir. Ancak diğer taraftan burada tanımlanan tümörle bağlantılı gen ürünlerini de istenildiği kadar çeşitli genlerle kombine etmek mümkün olmaktadır. Bu durum, kolaylaştırıcılardan seçimlik faaliyetlerde yararlanılmasına olanak vermektedir.

25

Buluşa göre, bir nükleik asit, bunun yanında, nükleik asit tarafından kodlanan proteinin veya polipeptidin konakçı hücreden segresyonunu denetleyen bir polipeptit için kodlama yapan diğer bir nükleik asitle bağlantı içinde bulunabilir. Bir nükleik asit, kodlanan protein veya polipeptidin konakçı hücrenin hücre
30 membranı üzerinde bağlanmasına veya bu hücrenin belirli organellerinde

bölmelere ayrılmasına yol açan bir polipeptit için kodlama yapan bir nükleik asitle de birlikte bulunabilir. Bağlantı, benzer şekilde bir haberci geni veya herhangi bir "etiketi" temsil eden bir nükleik asitle de olabilir.

- 5 Tercih edilen bir uygulama usulünde rekombinan DNA molekülü, gerektiğinde bir nükleik asidin, örneğin açıklamaya uygun tümörle bağlantılı antijeni kodlayan bir nükleik asidin ifadesini kodlayan bir kolaylaştırıcı ile denetleyen bir vektördür. "Vektör" ifadesi, burada en genel anlamında kullanılmaktadır ve nükleik asidin, örneğin prokaryot ve/veya ökaryot hücrelerin içine sokulmasını ve gerektiğinde
- 10 bir genom içine entegre edilmesini mümkün kılan her türlü nükleik asit aracı taşıtını kapsamaktadır. Bu tür vektörler, tercihen hücre içinde kopyalanır ve/veya ifade edilir. Aracı bir taşıt, örneğin elektroporasyonda, mikro projektıl bombalamada, lipozomal ilaç verme yönteminde, agro bakteriler yardımıyla yapılan transferde veya DNA veya RNA virüsleri üzerinden yapılan insersiyonda
- 15 kullanım için uyarlanabilir. Vektörler, plazmid, fajmid veya virüs genomlarını kapsar.

- Açıklama gereğince tanımlanan bir tümörle bağlantılı bir antijeni kodlayan nükleik asitler, konakçı hücrelerin transkripsiyonu için kullanılabilir. Nükleik asit
- 20 terimiyle rekombinan DNA'lar olduğu gibi RNA'lar da kastedilmektedir. Rekombinan RNA, in vitro ortamda yapılan transkripsiyon yoluyla DNA matrisinden üretilebilir. Bunun yanı sıra uygulamadan önce stabilize edici dizilimler, capping ve poli adenilasyon yoluyla modifiye edilebilir.

- 25 "Konakçı hücre" terimi, açıklama kapsamında eksojen bir nükleik asitle dönüştürülebilir veya transfekte edilebilir nitelikte olan her bir hücreyi kapsamaktadır. "Konakçı hücre" terimi, buluşa göre prokaryotik (örneğin *E. Coli*) veya ökaryotik hücreleri (örneğin ağaç biçimli hücreleri, B hücreleri, CHO hücreleri, COS hücreleri, K562 hücreleri, maya hücreleri ve böcek hücreleri)
- 30 kapsamaktadır. İnsan, fare, sıçan, domuz, keçi, primat gibi memelilerin hücreleri

özellikle tercih edilir. Hücreler, çok çeşitli doku tiplerinden alınmış olabilir ve primer hücre ve hücre dizilerini kapsar. Spesifik örnekler, keratinosit, periferik kan lökositleri, kemik iliği kök hücreleri ve embriyonik kök hücrelerini kapsar. Konakçı hücre, diğer uygulama usullerinde antijen sunan bir hücre, özellikle ağaç
5 şeklinde olan bir hücre, bir monosit veya makrofajdır. Bir nükleik asit, konakçı hücrede bir tek veya birçok kopya halinde bulunabilir ve bir uygulama usulünde konakçı hücre içinde ifade edilir.

"İfadelendirme" terimi, açıklamaya göre en genel anlamında kullanılmış olup
10 RNA veya RNA ve protein üretimini kapsamaktadır. Terim, aynı zamanda nükleik asitlerin kısmen ifadelendirilmesini de kapsamaktadır. İfadelendirme, ayrıca kısa süreli veya durağan gerçekleşebilir. Memeli hücrelerinde tercih edilen ifadelendirme sistemleri, G418'e karşı direnç gösteren (ve böylece durağan olarak transfekte edilen hücre dizilerinin seçimini olanaklı kılan) ve bir gen gibi
15 seçilebilir bir işaretçi ve sitomegalo virüsün (CMV) kolaylaştırıcı geliştirici dizilimlerini içeren pcDNA3.1 ve pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA) sistemlerini kapsamaktadır.

Açıklama kapsamında bir HLA molekülünün bir tümörle bağlantılı antijen veya
20 onun bir kısmını sunduğu durumlarda ifadelendirme vektörü, HLA molekülü için kodlayan bir nükleik asidi de kapsayabilir. HLA molekülü için kodlayan nükleik asit dizilimi, tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı için kodlayan nükleik asit ile aynı ifadelendirme vektöründe bulunabilir veya her iki nükleik asit değişik ifadelendirme vektöründe yer alabilir. Her iki ifadelendirme vektörü, bu son
25 durumda bir hücre içine kotransfekte edilebilir. Bir konakçı hücrenin ne tümörle bağlantılı antijeni veya onun bir kısmını ne de HLA molekülü ifade etmemesi durumunda onun için kodlayan her iki nükleik asit, ya aynı ifadelendirme vektöründe ya da ayrı ifadelendirme vektörlerinde hücre içine transfekte edilir. Hücrenin HLA molekülü önceden ifade etmiş olması durumunda sadece tümörle

bağlantılı antijeni veya onun bir kısmını kodlayan nükleik asit dizilimi, hücre içine transfekte edilebilir.

- Açıklamaya göre tümörle bağlantılı bir antijeni kodlayan bir nükleik asidin
- 5 amplifikasyonuna yönelik donatılar kapsama alınmıştır. Bu tür donatılar, örneğin tümörle bağlantılı antijenleri kodlayan nükleik asitlere melezleştirilen birkaç amplifikasyon primerlerini de kapsamaktadır. Primerler, tercihen birbirine bağlı olan ve primer dimer oluşumunu önleme açısından üst üste olmayan 6-50, özellikle 10-30, 15-30 veya 20-30 nükleik asit nükleotitlerinden oluşan bir
- 10 dizilimi kapsamaktadır. Primerlerden biri, tümörle bağlantılı antijeni kodlayan bir nükleik asit yumağında hibritleşir ve diğer primer, tümörle bağlantılı antijeni kodlayan nükleik asidin amplifiye edilmesine olanak tanıyan bir düzen içinde komplementer yumakta hibritleşir.
- 15 "Antisens" moleküller veya "antisens" nükleik asitler, bir nükleik asidin düzenlenmesi, özellikle ifadelendirilmesinin azaltılması amaçlı olarak kullanılabilir. "Antisens molekül" veya "antisens nükleik asit" terimi, buluşa göre oligoribo nükleotid, oligo deoksiribo nükleotid, modifiye edilmiş oligoribo nükleotid veya modifiye edilmiş oligo deoksiribo nükleotid olan ve fizyolojik
- 20 koşullarda belirli bir geni içeren bir DNA'ya veya bu genin mRNA'sına bu genin transkripsiyonunu ve/veya bu mRNA'nın aktarımını bastıracak oranda hibridize olan bir oligonükleotittir. Bir "antisens molekül", açıklamaya göre doğal kolaylaştırıcısı açısından ters yönelimde bir nükleik asit veya onun bir kısmını içeren bir yapıdır. Bir nükleik asidin veya onun bir parçasının antisens transkripti,
- 25 doğal olarak var olan ve enzimi nitelendiren bir mRNA ile bir dupleks oluşturabilir ve bu şekilde mRNA'nın aktif enzim içine yığılmasını veya aktarımını engelleyebilir. Bir diğer olasılık ise nükleik asidin inaktive edilmesine yönelik olarak ribozom kullanımıdır. Tercih edilen antisens oligo nükleotitler, birbirine bağlı 6-50, özellikle 10-30, 15-30 veya 20-30 hedef nükleik asit

nükleotidi içeren bir dizilim gösteren ve tercihen hedef nükleik aside veya onun bir kısmına tamamen komplementer yapıda olanlardır.

- 5 Antisens oligo nükleotit, tercih edilen uygulama usullerinde bir N uçlu veya 5' akıma karşı konumlanmış nokta ile aktarım, kopyalama veya kolaylaştırıcı nokta ile oluyormuş gibi hibride olur. Diğer uygulama usullerinde antisens nükleotit 3' aktarım olmamış bölge veya mRNA uç birleştirme noktasıyla hibride olur.

- 10 Oligo nükleotit bir uygulama usulünde ribo nükleotit, dezoksiribo nükleotit veya bunların bir kombinasyonundan oluşur. Bu kapsamda nükleotitin 5' ucu ve bir diğer nükleotitin 3' ucu, fosfodisteraz bir bağ ile birbiriyle bağlanır. Bu nükleotitler, alışlagelmiş yöntemlerle sentetize edilebilir veya rekombinan olarak üretilebilir.

- 15 Oligonükleotit, tercih edilen uygulama usullerinde "modifiye edilmiş" bir oligonükleotittir. Oligonükleotit, bu kapsamda stabilitesini ve terapötik etkisini yükseltmek için, hedefe bağlanma konusundaki yeteneğinde hiçbir azalma olmaksızın çok çeşitli şekillerde modifiye olabilir. "Modifiye oligonükleotit" terimi, buluşa göre (i) en az iki nükleotitin nükleotit için sentetik bir bağ ile
20 (diğer bir deyişle fosfodisteraz olmayan bir nükleotit içi bağ ile) birbiriyle bağlandığı ve/veya (ii) normal durumda nükleik asitlerde bulunmayan bir kimyasal grubun kovalen olarak oligonükleotitle bağlanmış olduğu oligonükleotit anlamına gelmektedir. Tercih edilen oligonükleotit bağlar; fosforotioat, alkilo fosfonat, fosforoditioat, fosfat ester, alkilo fosfonotioat, fosfor amidatlar, 25 karbamatlar, karbonatlar, fosfat triesteri, asetamidatlar, karboksimetil ester ve peptitlerdir.

- "Modifiye oligonükleotit" terimi kovalen olarak modifiye edilmiş baz ve/veya şeker ihtiva eden oligonükleotit anlamına gelmektedir. "Modifiye
30 oligonükleotitler", örneğin kovalen olarak düşük molekül ağırlıklı, 3'

pozisyonunda hidroksil grubu ve 5' pozisyonunda fosfat grubu olmayan organik gruplarla bağlanmış olan şeker artıkları ihtiva eden oligonükleotitleri kapsamaktadır. Modifiye oligonükleotitler, örnek olarak 2' O alkilleştirilmiş riboz artıkları veya riboz yerine arabinoz gibi başka bir şeker ihtiva edebilir.

5

Açıklamaya göre tanımlanan proteinler ve polipeptitler, tercihen izole durumda olanlardır. "İzole protein" veya "izole polipeptit" terimleri, doğal ortamlarından ayrılmış protein veya polipeptitleri tanımlayan terimlerdir. İzole bir protein veya polipeptit, büyük ölçüde arındırılmış bir durumda bulunabilir. "Büyük ölçüde arındırılmış" terimi, doğada veya *in vivo* ortamda bulunduğu diğer maddelerden büyük ölçüde bağımsız olduğu durumu ifade etmektedir.

Bu tür protein ve polipeptitler, örneğin antikor üretiminde, immünolojik veya tanısal incelemelerde veya terapötik uygulamalarda kullanılır. Açıklamaya göre tanımlanmış protein ve polipeptitler, doku veya hücre homojenatı gibi biyolojik örneklerden izole edilebilir ve birçok prokaryotik veya ökaryotik ifadelendirme sistemlerinde rekombinan olarak ifade edilebilir.

Bir proteinin veya polipeptitin veya bir amino asit diziliminin "türevleri", bu buluş kapsamındaki anlam dahilinde amino asit ekleme değişkenlerini, amino asit silme değişkenlerini ve/veya amino asit substitüsyon değişkenlerini kapsamaktadır.

Amino asit insersiyon değişkenleri, amino ve/veya karboksi uçlu füzyonları ile belirli bir amino asit dizilimindeki tek veya birçok amino asidin insersiyonlarını kapsar. İnsersiyonlu amino asit dizilim değişkenlerinde bir veya birçok amino asit kalıntısı, sonuçta ortaya çıkan ürünün uygun bir şekilde taranması ile rastlantısal bir insersiyon da mümkün olmasına karşın, bir amino asit diziliminde önceden belirlenmiş bir noktaya yerleştirilir. Amino asit silme değişkenleri, dizilimden bir veya birkaç amino asidin uzaklaştırılması ile karakterizedir. Amino asit substitüsyon değişkenleri, en azından bir kalıntının dizilimden uzaklaştırılması ve

onun yerine bir başka kalıntının yerleştirilmesi ile kendini gösterir. Modifikasyonlar, tercihen amino asit dizilimindeki homolog protein veya polipeptitler arasında korunmamış olan pozisyonlarda bulunur. Amino asitler, tercihen hidrofobisite, hidrofilisite, elektro negatiflik, yan zincir oylumu veya benzeri diğer tür özelliklerle ikame edilir (koruyucu substitüsyon). Koruyucu substitüsyonlar, örneğin bir amino asidin, diğer bir amino asitle, aşağıda aynı grupta substitüe edilen amino asit olarak belirtilen amino asitlerle değişimi ile ilgilidir:

- 10 1. Küçük alifatik, polar olmayan veya hafif derecede polar olan kalıntılar: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)
2. Negatif yüklenmiş kalıntılar ve bunların amitleri: Asn, Asp, Glu, Gln
3. Pozitif yüklenmiş kalıntılar: His, Arg, Lys
4. Büyük alifatik, polar olmayan kalıntılar: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
- 15 5. Büyük aromatik kalıntılar: Phe, Tyr, Trp.

Üç kalıntı, protein mimarisindeki önemli rolleri nedeniyle parantez içine alınmıştır. Gly, yan zinciri olmayan yegane kalıntı olup bu özelliğiyle zincire esneklik sağlar. Pro, zinciri güçlü bir şekilde daraltan olağanüstü bir geometriye sahiptir. Cys, bir disülfid köprüsü kurabilir.

Yukarıda tanımlanan amino asit değişkenleri, bilinen peptit sentezleme teknikleriyle, örneğin Katı Faz Sentesi (*Solid Phase Synthesis*, Merrifield, 1964) ile veya benzer tekniklerle veya rekombinan DNA manipülasyonu vasıtasıyla kolayca üretilebilir. Bilinen veya kısmen bilinen dizilime sahip DNA'larda önceden belirlenmiş noktalarda substitüsyon mütasyonları yerleştirmek için kullanılan teknikler, iyi bilinmektedir ve örneğin M13 mutajenezini kapsar. DNA dizilimlerinin substitüsyon, insersiyon veya delesyon ile protein üretimine yönelik olarak manipüle edilmesi konusu, örneğin Sambrock et al. (1989) tarafından yapılan araştırmada ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

Protein, polipeptit veya peptitlerin "türevleri", karbonhidrat, lipid ve/veya proteinler, polipeptitler veya peptitler gibi enzimle bağlantılı olan her türlü proteinin tekli veya çoklu substitüsyonlarını, delesyonlarını ve/veya adisyonlarını da kapsar. "Türev" terimi bunun yanı sıra protein, polipeptit ve peptitlerin işlevsel
5 tüm kimyasal eşdeğerlerini de kapsayan bir terimdir.

Tümörle bağlantılı bir antijenin bir kısmı veya fragmanı, içinden çıktığı polipeptitin işlevsel özelliklerini gösterir. Bu tür işlevsel özellikler, antikorlarla karşılıklı etkileşimi, diğer polipeptit veya proteinlerle karşılıklı etkileşimi, nükleik
10 asitlerin seçmeli olarak bağlanmasını ve bir enzimatik faaliyeti kapsamaktadır. Önemli bir özellik, HLA ile bir kompleks oluşturarak gerektiğinde bir bağışıklık reaksiyonu üretme yeteneğidir. Bu bağışıklık reaksiyonu, sitotoksik veya T yardımcı hücrelerden ilşeri gelen bir reaksiyon olabilir. Tümörle bağlantılı bir antijenin buluşa uygun bir kısmı veya fragmanı, tercihen tümörle bağlantılı
15 antijenden kaynaklanan en az 6, özellikle en az 8, en az 10, en az 12, en az 15, en az 20, en az 30 veya en az 50 birbirini takip eden amino asitten oluşan bir dizilimi kapsar.

Tümörle bağlantılı antijen için kodlayan nükleik asidin bir kısmı veya fragmanı,
20 açıklamaya göre nükleik asidin en azından tümörle bağlantılı antijen için ve/veya tümörle bağlantılı antijenin bir kısmı veya bir fragmanı için yukarıda açıklandığı gibi kodlama yapan kısmı ile ilgilidir.

Tümörle bağlantılı antijenler için kodlayan genlerin izolasyonu ve tanımlanması,
25 bir veya birkaç tümörle bağlantılı antijenin ifadelendirilmesi yoluyla kendini gösteren bir hastalığın tanınmasını olanaklı kılar. Bu yöntemler, tümörle bağlantılı bir antijen için kodlayan bir veya birkaç nükleik asidin belirlenmesini ve/veya kodlanan tümörle bağlantılı antijenin ve/veya ondan türetilen peptitlerin belirlenmesini kapsar. Nükleik asitlerin belirlenmesi, polimeraz zincirleme
30 reaksiyon veya işaretlenmiş bir sonda ile melezleştirme dahil alışıl gelmiş

yöntemlerle yapılabilir. Tümörle bağlantılı antijenlerin veya onlardan türetilen peptitlerin belirlenmesi, hastanın özel antikorlu serumlarının antijen ve/veya peptitlerin tanınmasına yönelik olarak taranması yoluyla yapılabilir. Bu, aynı zamanda hastanın T hücrelerinin ilgili tümörle bağlantılı antijenin özelliklerine yönelik taranmasıyla da gerçekleştirilebilir.

Mevcut öğreti, antikorlar ve tümörle bağlantılı antijenlerin hücrel bağlantı partnerleri dahil olmak üzere burada tanımlanan tümörle bağlantılı antijenlere bağlanan proteinlerin izolasyonunu da mümkün kılar.

10

Mevcut öğretide belirli uygulama usullerinde tümörle bağlantılı antijenlerden türetilen "dominant negatif" polipeptitler de kullanıma sunulur. Dominant nitelikli negatif bir polipeptit, bir proteinin, hücrel mekanizma ile karşılıklı etkileşim ilişkisi dahilinde, hücrel mekanizma ile kendi etkileşimi içinden aktif bir proteini baskılayan veya aktif bir proteinle yarıştırmak aktif proteinin etkisinin azalmasına yol açan aktif olmayan bir değişkenidir. Örneğin bir ligandı bağlayan, ancak ligand bağlanımına reaksiyon olarak hiçbir sinyal üretmeyen dominant nitelikli bir negatif reseptör, ligandın biyolojik etkisini azaltabilir. Benzer şekilde normal olarak hedef proteinler ile karşılıklı etkileşim içinde olan, ancak hedef proteinleri fosforile etmeyen dominant nitelikli katalitik aktif olmayan bir kinaz, hücrel sinyalle etki içinde hedef proteinlerin fosforilasyonunu azaltabilir. Benzer şekilde bir genin kontrol bölgesindeki promotör noktaya bağlanan, ancak genin transkripsiyonunu yükseltmeyen dominant negatif bir transkripsiyon faktörü, normal bir transkripsiyon faktörünün etkisini promotör bağlantı noktalarını istila ederek transkripsiyonu yükseltmeksizin azaltabilir.

Dominant negatif bir polipeptidin bir hücre içinde ifadelendirilmesi, aktif proteinlerin işlevinin azaltılması ile sonuçlanır. Uzman, bir proteinin dominant negatif değişkenlerini örneğin geleneksel mutajenez yöntemleriyle ve değişken polipeptitin dominant negatif etkisini değerlendirerek üretebilir.

- Açıklanan öğreti, tümörle bağlantılı antijenlere bağlanan polipeptit gibi maddeleri de kapsamaktadır. Bu tür bağlanma maddeleri, örneğin tümörle bağlantılı antijenlerin ve bağlantı maddeleriyle birlikte tümörle bağlantılı antijenlerin komplekslerinin kanıtlanmasına yönelik uygulanan tarama testleri ile tümörle bağlantılı antijenlerin veya onların komplekslerinin bağlantı partnerleri ile birlikte saflaştırılmasında kullanılabilir. Bu tür maddeler, tümörle bağlantılı antijenlerin aktivitesinin, örneğin bu tür antijenlerin bağlanması yoluyla, bastırılmasında da kullanılabilir.
- 10 Bu nedenle selektif olarak tümörle bağlantılı antijenlere bağlanma becerisi gösteren antikör veya antikör fragmanları, açıklama kapsamındaki bağlama maddeleridir. Antikörler, geleneksel usullerle üretilen poliklonal ve monoklonal antikörleri kapsamaktadır.
- 15 Bu tür antikörler, proteinleri doğal durumlarında ve/veya denatüre oldukları durumda tanıyabilirler (Anderson et al., J. Immunol. 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, J. Immunol. Methods 234: 107-116, 2000; Kayyem et al., Eur. J. Biochem. 208: 1-8, 1992; Spiller et al., J. Immunol. Methods 224: 51-60, 1999).
- 20 Spesifik olarak hedef proteine bağlanan spesifik antikörler içeren antiserumlar, çeşitli standart yöntemlerle üretilir. Kıyaslama için örnek çalışmalar: "Monoklonal Antikörler: Pratik bir Yaklaşım (*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*)", Yazarları: Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9, "Antikörler: Laboratuvar El kitabı (*Antibodies: A Laboratory Manual*)" Yazarları: Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142 ve "Antikörleri Kullanmak: Laboratuvar El Kitabı: Taşınabilir NO Protokolü (*Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO*)" Yazarları: Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447. Bu kapsamda kompleks membran proteinlerini doğal şekillerinde tanıyan affine ve spesifik antikörler üretmek de mümkündür (Azorsa et al., J. Immunol. Methods 229: 35-48, 1999; Anderson et
- 30

al., J. Immunol. 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, J. Immunol. Methods. 234: 107-116, 2000). Bu, öncelikle terapötik uygulamalarda kullanılma durumunda olan antikorlar için olduğu kadar aynı zamanda birçok tanısal uygulama için de önemlidir. Bu amaçla tüm proteinle, hücre dışı kısmi dizilimlerle ve hedef molekülünü fizyolojik katlı formda ifade eden hücrelerle bağışıklık kazandırılabilir.

Monoklonal antikorlar, geleneksel olarak hibridoma teknolojisiyle üretilir (Teknik ayrıntılar için bkz: Monoklonal Antikorlar: Pratik bir Yaklaşım (*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*), Yazarları: Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9, "Antikorlar: Laboratuar El kitabı (*Antibodies: A Laboratory Manual*)" Yazarları: Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142 ve "Antikorları Kullanmak: Laboratuar El Kitabı: Taşınabilir NO Protokolü (*Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO*)" Yazarları: Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447).

Antikoru kendi epitopuna bağlanmasında antikor molekülünün sadece küçük bir parçasının, yani paratopun rol oynadığı bilinmektedir (kıyaslayınız Clark, W.R. (1986), *Modern İmmünolojinin Deneysel Temelleri (The Experimental Foundations of Modern Immunology)*, Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991), *Temel İmmünoloji (Essential Immunology)*, 7. Baskı, Blackwell Bilimsel Yayıncılık, Oxford). Örneğin pFc' ve Fc bölgeleri, kompleman kaskadının etkileyicileridir, ancak antijen bağlanımında bir rolleri yoktur. Bünyesinden pFc' bölgesinin enzimatik olarak ayrılmış olduğu veya pFc' bölgesi olmaksızın üretilmiş olan, F(ab')₂ fragmanı olarak tanımlanan bir antikor, eksiksiz bir antikoru her iki antijen bağlanma noktalarını taşır. Benzer şekilde bünyesinden Fc bölgesinin enzimatik olarak ayrılmış olduğu veya Fc bölgesi olmaksızın üretilmiş olan, Fab fragmanı olarak tanımlanan bir antikor, sağlam bir antikor molekülünün antijen bağlanım noktasını taşır. Bunun yanı sıra Fab fragmanları, bir antikoru kovalen bağlı hafif zincirinden ve antikoru Fd olarak tanımlanmış

ağır zincirinin bir kısmından oluşur. Fd fragmanları, antikor özelliğinin ana belirleyicileridir (tek bir Fd fragmanı, antikorun özelliğini değiştirmeksizin, 10 adede kadar farklı hafif zincirle ilişkilendirilebilir) ve Fd fragmanları, izolasyon durumunda epitopa bağlanma yeteneğini kaybetmez.

5

Antikorun antijen bağlayan kısmında doğrudan antijenin epitopu ile karşılıklı etkileşime giren tümleyici-belirleyici bölgeler (CDR'ler) ve paratopların tersiyer yapılarını koruyan iskele bölgeleri (FR'ler) bulunur. Hem ağır zincirin Fd fragmanında hem de IgG immünglobüllerin hafif zincirinde ayrı ayrı üç tümleyici-belirleyici bölge ile bölümlenen (CDR1'den CDR3'e kadar) dört iskele bölgesi (FR1'den FR4'e) bulunur. CDR'ler ve özellikle CDR3 bölgeleri ve daha da fazlasıyla ağır zincirin CDR3 bölgesi, büyük ölçüde antikor spesifisitesinden sorumludur.

15 Bir memelinin antikorlarının CDR olmayan bölgelerinin eşit veya değişik bir spesifiteye sahip antikorların benzer bölgeleriyle ikame edilebildikleri ve bu sırada ilk antikorun epitop spesifisitesinin değişmeden kaldığı bilinmektedir. Bu durum, işlevsel antikor üretimi için insan dışındaki canlılardan alınan CDR'lerin kovalen olarak insani FR ve/veya Fc/pFc' bölgeleriyle ilişkilendirildiği
20 "insanlaştırılmış" olarak tanımlanan antikorların geliştirilmesine olanak tanımıştır.

"SLAM" olarak adlandırılan teknoloji, bunu kullanmaktadır. Burada tam kandan B hücreleri izole edilir ve hücreler monoklonal hale getirilir. Bunu takiben izole edilmiş B hücrelerinin arta kalanı, antikor spesifisitesi açısından analiz edilir.

25 Akabinde hibridoma teknolojisinin aksine antikorun değişken bölgesi, tek PCR hücresiyle amplifiye edilir ve uygun bir vektör içine klonlanır. Bu şekilde monoklonal antikor kazanımı hızlandırılır (de Wildt et al. İmmünolojik Yöntemler Bülteni (*J. Immunol. Methods*) 207:61-67, 1997).

30 WO 92/04381 numaralı patentte bir başka örnek olarak insanlaştırılmış RSV

antikorlarının, fareden alınan FR bölgelerinin en az bir kısmının insandan alınan FR bölgeleri ile ikame yoluyla fareden üretilmesi ve kullanımı tanımlanmaktadır. Antijene bağlanım yetenekli sağlam antikorların fragmanları dahil bu tür antikorlar, sıklıkla "kimera" antikor olarak tanımlanmaktadır.

5

Açıklama uyarınca antikorların F(ab')₂, Fab, Fv und Fd fragmanları, ve/veya Fc ve/veya FR ve/veya CDR1 ve/veya CDR2 ve/veya hafif zincirli CDR3 bölgelerinin homolog insan kaynaklı veya insan kaynaklı olmayan dizilimlerle ikame edildiği kimera antikorlar, FR ve/veya CDR1 ve/veya CDR2 ve/veya hafif zincirli CDR3 bölgelerinin homolog insan kaynaklı veya insan kaynaklı olmayan dizilimlerle ikame edildiği kimera nitelikli F(ab')₂ fragman antikorlar, FR ve/veya CDR1 ve/veya CDR2 ve/veya hafif zincirli CDR3 bölgelerinin homolog insan kaynaklı veya insan kaynaklı olmayan dizilimlerle kimera nitelikli Fab fragman antikorlar ve FR ve/veya CDR1 ve/veya CDR2 bölgelerinin homolog insan kaynaklı veya insan kaynaklı olmayan dizilimlerle ikame edildiği kimera nitelikli Fd fragman antikorlar da kullanıma sunulmaktadır. Tek zincirli antikor olarak tanımlananlar da açıklama uyarınca kapsama dahil edilmiştir.

Spesifik olarak tümörle bağlantılı antijenlere bağlanan polipeptitler de açıklama kapsamındadır. Bu tür polipeptit bağlama maddeleri, örneğin çözelti içinde basit bir şekilde hareketsizleştirilmiş formda veya faj gösterimli kütüphane olarak üretilen dejenere edilmiş peptit kütüphaneleri yoluyla da kullanıma hazır hale getirilebilir. Bir veya birkaç amino asitli birleşimsel peptit kütüphanelerini de üretmek mümkündür. Kütüphaneler, bunun yanı sıra peptoidlerden veya peptidik olmayan sentetik kalıntılardan da üretilir.

Faj gösterimi, buluşa uygun bağlama peptitlerinin tanımlanmasında özellikle etkili olabilir. Bu işlemde örneğin (örnek olarak m13, fd veya lamda faj kullanmak suretiyle) 4 ila yaklaşık 80 amino asit kalıntısından oluşan bir uzunlukta eklentiler gösteren bir faj kütüphanesi üretilir. Daha sonra ise tümörle bağlantılı antijenlere

- bağlanan eklentileri taşıyan fajlar seçilir. Bu süreç, tümörle bağlantılı antijenlere bağlanan fajların geri seçimi şeklinde muhtelif döngülerde tekrarlanabilir. Tekrarlanan döngüler, belirli dizilimleri taşıyan fajların zenginleşmesine yol açar. İfade edilen polipeptit dizilimlerinin tanınması için DNA dizilimlerinin analizi yapılabilir. Dizilimin tümörle bağlantılı antijene bağlanan en küçük lineer kısmı belirlenebilir. Maya "ikili hibrit sistemi", tümöre bağlı antijenlere bağlanan polipeptitlerin tanımlanmasında da kullanılabilir. Buluşa göre tanımlanan tümörle bağlantılı antijenler veya onların fragmanları, tümörle bağlantılı antijenlerin peptit bağlanma partnerlerinin tanımlanması ve seçilmesi için faj gösterim kütüphaneleri dahil peptit kütüphanelerinin taranması için kullanılabilir. Bu tür moleküller, örnek olarak tarama incelemeleri, saflaştırma protokolleri, tümörle bağlantılı antijenin işleviyle yapılacak bir girişim veya uzmanlar tarafından bilinen diğer amaçlar için kullanılabilir.
- Yukarıda tanımlanan antikor ve diğer bağlantı molekülleri, örneğin tümörle bağlantılı antijeni ifade eden dokuların tanımlanması için kullanılabilir. Antikorlar, ayrıca tümörle bağlantılı antijenleri ifadelendiren hücre ve dokuların gösterimine yönelik olarak tanı amaçlı kullanılan spesifik maddelerle de eşleştirilebilir. Antikorları bunun yanı sıra terapötik anlamda yararlı maddelerle de eşleştirmek mümkündür. Tanısal amaçlı kullanılan maddeler, bunlarla sınırlı olmamak üzere, baryum sülfat, iosetamik asitleri, iopan asitleri, kalsiyum ipodat, sodyum diyatrizoat, meglumin diyatrizoat, metrizamid, sodyum tiropanoat ile flüör 18 ve karbon 11 gibi pozitron emitörleri, iyot 123, teknetyum 99 m, iyot 131 ve indiyum 111 gibi gama emitörleri, manyetik çekirdek rezonansında kullanılan flüörin ve gadolinyum gibi nüklitleri içeren radyolojik tanı maddelerini kapsamaktadır. ‘Terapötik anlamda yararlı madde terimi’, buluş kapsamında anti kanserojen maddeler, radyoaktif iyot ihtiva eden bağlantılar, toksinler, sitostatik veya sitolitik ilaç maddeleri vs. dahil isteğe göre bir veya birkaç tümörle bağlantılı antijeni ifadelendiren hücreye taşınan her türlü terapötik molekülü ifade etmektedir. Anti kanserojen maddeler, örnek olarak aminoglutetimid, azatioprin,

- bleomisin sülfat, busulfan, carmustine, klorambusil, sisplatin, siklofosfamid, siklosporin, sitarabidin, dacarbazin, daktinomisin, daunorubin, doksorubisin, taksol, etoposide, flouorouracil, interferon alfa, lomustin, mercaptopurin, metotreksat, mitotan, prokarbazin HCl, tioguanin, vinblastin sülfat ve vinkristin sülfat gibi maddelerdir. Diğer antikanserojen maddeler, örneğin Goodman ve Gilman: Terapi Biliminin Farmakolojik Temeli (*Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*) 8. Baskı, 1990, McGraw-Hill, Inc., adlı eserde, özellikle bu eserin 52. bölümünde [Antineoplastik Ajanlar (*Antineoplastic Agents*) (Yazarlar: Paul Calabresi ve Bruce A. Chabner)] tanımlanmıştır.
- 10 Toksinler, şekerçi boyası bitkisinden antiviral protein, kolera toksini, pertussis toksini, risin, gelonin, abrin, difteri eksotoksini veya pseudo monas eksotoksin olabilir. Toksin kalıntıları, kobalt 60 gibi yüksek enerji yayan radyo nükleitler de olabilir.
- 15 "Hasta" terimi, açıklamaya göre insan, insanın dışındaki primatlar veya diğer bir hayvan, özellikle inek, at, domuz, koyun, keçi, köpek, kedi gibi memeli hayvanlar veya fare ve sıçan gibi kemirgen hayvanları ifade etmektedir. Hasta, özellikle tercih edilen bir uygulama usulünde insandır.
- 20 "Hastalık" terimi, açıklamaya göre tümörle bağlantılı antijenlerin ifadelendirildiği veya anormal ifadelendirildiği her türlü patolojik durumu ifade etmektedir. "Anormal ifadelendirme", buluş ve açıklama kapsamında ifadelendirmenin sağlıklı bir bireydeki duruma kıyasla değiştirildiği, tercihen artırıldığı anlamına gelmektedir. İfadelendirmenin artırılması, en az % 10, özellikle en az % 20, en az
- 25 % 50 veya en az % 100 oranında artırıma gönderme yapmaktadır. Bir uygulama usulünde tümörle bağlantılı antijen, sadece hasta bireyin dokusunda ifadelendirilirken sağlıklı bireydeki ifadelendirilme baskılanır. Bu tür bir hastalığa örnek kanserdir ve "kanseri" terimi, buluş kapsamında kan kanseri, erbezi kanseri, melanom, teratom, beyin uru, böbrek, böbreküstü bezi, tiroit bezleri, bağırsak,
- 30 karaciğer, kalın bağırsak, mide, sindirim sistemi, lenf bezi, yemek borusu,

kolorektal, pankreas, gırtlak, burun, kulak (kulak-burun-boğaz), göğüs, prostat, rahim, yumurtalık ve akciğer kanserlerini ve bunların metastazlarını kapsamaktadır.

- 5 Biyolojik bir örnek, buluşa göre doku ve/veya hücre örneği olabilir ve kullanım için burada tanımlanan çok çeşitli, örneğin punch biyopsi dahil doku biyopsisi, ve kandan, bronşial aspirat, balgam, ürin, dışkı veya diğer vücut sıvılarından alım gibi yöntemlerle alışılagelmiş şekilde elde edilebilir.
- 10 "İmmünreaktif hücre" terimi, açıklamaya göre uygun bir uyarımla bir imun hücre (örneğin B hücresi, T yardımcı hücre veya sitolitik T hücresi) içine olgunlaşabilen bir hücredir. İmmünreaktif hücreler, CD34⁺ hematopoietik kök hücrelerini, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış T hücrelerini ve olgunlaşmamış ve olgunlaşmış B hücrelerini kapsar. Tümörle bağlantılı antijenleri tanıyan sitolitik veya yardımcı T
- 15 hücrelerinin üretilmesi isteniyorsa immünreaktif hücre, sitolitik hücrelerin ve yardımcı T hücrelerinin üretim, farklılaşma ve/veya seleksiyonunu kolaylaştıran koşullarda tümörle bağlantılı bir antijeni ifadeleyen bir hücreyle temas ettirilir. T hücre öncülerinin bir antijenle karşı karşıya getirilmesi durumunda sitolitik T hücre olarak farklılaşması, bağışıklık sisteminin klonal seleksiyonuna benzer bir
- 20 durumdur.

- Bazı terapötik yöntemler, hastanın bağışıklık sisteminin, bir veya birkaç tümöre bağlı antijen sunan kanser hücreleri gibi antijen sunan hücrelerinin çözülmesine yol açan reaksiyonuna dayanır. Burada örneğin bir tümörle bağlantılı antijen ve
- 25 bir MHC molekülü kompleksi için spesifik olan otolog sitotoksik T lenfositleri, hücre anormalitesi olan bir hastaya verilir. Bu tür sitotoksik T lenfositlerinin *in vitro* ortamda üretilmesi bilinmektedir. T hücrelerinin farklılaştırılması ile ilintili yöntemle ilgili bir örnek, WO-A-9633265 patentte bulunmaktadır. Genellikle hastadan kan hücreleri gibi hücrelerle ilgili bir örnek alınır ve hücreler, bir
- 30 kompleks sunan ve sitotoksik T lenfositlerin (örneğin ağaç biçimli hücrelerin)

çoğalmasını tetikleyebilen bir hücreyle temas ettirilir. Hedef hücre, bir COS hücresi gibi transfekte edilmiş bir hücre olabilir. Transfekte edilmiş bu hücreler, yüzeylerinde istenen kompleksi sunarlar ve sitotoksik T lenfositlerle temas ettirilmeleri durumunda çoğalmalarını teşvik eder. Klonal genişletilmiş otolog sitotoksik T lenfositleri, daha sonra hastaya verilir.

Antijene spesifik sitotoksik T lenfositlerinin seleksiyonuna yönelik bir başka yöntemde MHC sınıf I molekül peptit komplekslerinin florojen tetramerleri, sitotoksik T lenfositlerinin spesifik klonlarının kanıtı için kullanılır (Altman et al., 10 *Bilim (Science)* 274:94-96, 1996; Dunbar et al., Güncel Biyoloji (*Current Biology*) 8:413-416, 1998). Çözülebilir MHC sınıf I molekülleri, *in vitro* ortamda β_2 mikroglobulin ve sınıf I moleküle bağlanan bir peptit antijeninin varlığında katlamaya tabi tutulur. Bunlar, MHC/peptit komplekslerinin saflaştırılmasından sonra biyotin ile işaretlenir. Tetramerler, biyotinlenmiş peptit MHC 15 komplekslerinin işaretlenmiş avidin (örneğin fikoeritrin) 4:1 molar oranı dahilinde oluşturulur. Tetramerler, daha sonra periferik kan veya lenf boğumları gibi sitotoksik T lenfositleri ile temas ettirilir. Tetramerler, peptit antijen/MHC sınıf I kompleksini tanıyan sitotoksik lenfositlere bağlanır. Tetramere bağlanan hücreler, florışıl güdümlmeli hücre tasnifi yoluyla reaktif sitotoksik T 20 lenfositlerin izolasyonu için tasnif edilebilir. İzole edilen sitotoksik T lenfositler, daha sonra *in vitro* ortamda çoğaltılabilir.

Adoptif transfer olarak tanımlanan bir terapötik yöntemde (Greenberg, J. Immunol. 136(5):1917, 1986; Riddel et al., Science 257:238, 1992; Lynch et al., 25 Eur. J. Immunol. 21:1403-1410, 1991; Kast et al., Cell 59:603-614, 1989) istenen kompleksi sunan hücreler (örneğin ağaç biçimli hücreler), tedavi edilen hastanın sitotoksik T lenfositleri ile kombine edilir, bu sayede spesifik sitotoksik T lenfositlerin çoğalması sağlanır. Çoğaltılan sitotoksik T lenfositleri, daha sonra spesifik kompleks sunan belirli anormal hücrelerle karakterize olan bir hücresel

anomali gösteren bir hastaya verilir. Sitotoksik T lenfositler, daha sonra anormal hücreleri parçalar, bu sayede arzu edilen terapötik etki elde edilir.

- Bir hastanın T hücre dağarcığından bu tür bir spesifik komplekse karşı, sıklıkla sadece düşük dereceli afın T hücreleri çoğalır, çünkü yüksek dereceli afın olanlar tolerans gelişiminde imha edilir. T hücre reseptörlerinin transferi, burada bir alternatif olabilir. Bunun için aynı şekilde arzu edilen kompleksi sunan (örneğin ağaç biçimli) hücreler, sağlıklı kişilerin veya diğer bir türün (örneğin farenin) sitotoksik T lenfositleri ile kombine edilir. Bu, T lenfositlerin spesifik kompleksle o ana kadar hiçbir temasta bulunmamış bir bağışçı organizmadan kaynaklanması durumunda yüksek afın nitelikteki sitotoksik T lenfositlerin çoğalmasına yol açar. Çoğaltılan bu spesifik T lenfositlerin yüksek afın T hücre reseptörü, klonlanır. Bunlar, yüksek afın T hücre reseptörlerinin başka bir türden klonlanmış olması durumunda değişik ölçülerde insanileştirilir. Daha sonra bu tür T hücre reseptörleri, gen transferi yoluyla, örneğin retroviral vektörlerle istenildiği kadar hastanın T hücrelerine transdüksiyon yoluyla verilir. Adoptif transfer, daha sonra bu genetik olarak değiştirilmiş T lenfositler ile yapılır (Stanislowski et al., Nat Immunol. 2:962-70, 2001 ; Kessels et al., Nat Immunol. 2:957-61, 2001).
- Yukarıda açıklanan terapötik yaklaşımlar, hastanın en azından bazı anormal hücrelerinin tümörle bağlantılı antijen ve bir HLA molekülü kompleksini sunması durumundan yola çıkmaktadır. Bu tür hücrelerin tanımlanması, kendi içinde bilinen bir yolla yapılır. Kompleks sunan hücreler tanımlandığında hastadan alınan ve sitotoksik T lenfositleri içeren bir örnekle kombine edilebilir. Kompleks sunan hücrelerin sitotoksik hücreler tarafından çözülmesi durumunda tümörle bağlantılı bir antijen sunumu olduğu kabul edilebilir.

- Adoptif transfer, buluş uyarınca uygulanan tek terapi şekli değildir. Sitotoksik T lenfositleri, *in vivo* ortamda kendi içinde bilinen yöntemle de üretilebilir. Bir yöntemde kompleksi ifadelendiren proliferatif olmayan hücreler kullanılır. Bu

yöntemde kullanılan hücreler, normalde kompleksi ifadelendiren ışınlanmış hücreler veya kompleksin sunumu için gerekli olan bir veya her iki genle transfekte olan hücreler olacaktır (diğer bir deyişle antijen peptit ve sunucu HLA molekülü). Çeşitli hücre tipleri kullanılabilir. Bunun yanı sıra ilgili bir grni
5 veya her iki geni taşıyan vektörler de kullanılabilir. Viral veya bakteriyel vektörler özellikle tercih edilir. Örneğin bir tümörle bağlantılı antijen veya onun bir kısmı için kodlayan nükleik asitler, işlevsel olarak tümörle bağlantılı geni veya onun bir fragmanının ifadesini belirli dokularda veya hücre tiplerinde denetleyen kolaylaştırıcı ve geliştirici dizilimlerle ilişkilendirilebilir. Nükleik asit bir
10 ifadelendirme vektörü içine yerleştirilebilir. İfade vektörleri, içlerine eksojen nükleik asit insersiyonunun mümkün olduğu modifiye edilmemiş ekstra kromozal nükleik asitler, plazmitler veya viral genomlar olabilir. Tümörle bağlantılı bir antijen için kodlama yapan nükleik asitler, retroviral bir genom içine de yerleştirilebilirler ki bu suretle nükleik asidin hedef doku veya hedef hücrenin
15 genomu içine entegrasyonu sağlanır. Bu sistemlerde vaksinia virüsü, poks virüs, herpes simpleks virüs, retro virüs veya adeno virüs gibi bir mikro organizma ilgili geni taşır ve konakçı hücreleri de fakto olarak "enfekte" eder. Bir diğer tercih edilen form, tümörle bağlantılı antijenin rekombinan RNA olarak yerleştirilmesidir. Bunlar, örneğin liposomal transfer veya elektro porasyon
20 yoluyla hücrelere yerleştirilebilir. Sonuçta oluşan hücreler, ilgili kompleksi sunar ve daha sonra çoğalan otolog sitotoksik T lenfositler tarafından tanınırlar.

Benzer bir etki, antijen sunan hücrelere *in vivo* ortamda bir yerleştirme gerçekleştirebilmek için tümörle bağlantılı antijen veya onun bir fragmanının bir
25 adjuvan ile kombinasyonu yoluyla elde edilebilir. Tümörle bağlantılı antijen veya onun bir fragmanı, protein, DNA (örneğin bir vektörün içinde) veya RNA olarak sunulmuş olabilir. Tümörle bağlantılı antijen, HLA molekül için peptit partner elde etmek için işleme tabi tutulurken diğer taraftan onun bir fragmanı, başka bir işleme tabi tutmaya gerek olmaksızın sunulabilir. Bu sonuncu durum, özellikle
30 bunların HLA molekülüne bağlanabildiği durumu ifade etmektedir. Tüm antijenin

in vivo ortamda ağaç biçimli bir hücre tarafından işleme tabi tutulduğu verme biçimleri, burada aynı zamanda yardımcı T hücrelerinde de tepki oluşma ihtimali nedeniyle tercih edilir. Etkili bir bağışıklık tepkisi, bunlara ihtiyaç duyar (Ossendorp et al., Immunol Lett. 74:75-9, 2000; Ossendorp et al., J. Exp. Med. 187:693-702, 1998). Genel olarak tümörle bağlantılı bir antijenin etkili bir miktarı hastaya örneğin intradermal enjeksiyon yoluyla zerk edilebilir. Ancak enjeksiyon, intranodal yolla bir lenf boğumuna da yapılabilir (Maloy et al., Proc Natl Acad Sci USA 98:3299-303, 2001). Enjeksiyon aynı zamanda ağaç biçimli hücreler içine alımı kolaylaştıran ayıracıların kombinasyonu yoluyla da yapılabilir. Tercih edilen tümörle bağlantılı antijenler, alojen kanser anti serumlarıyla veya birçok kanser hastasının T hücreleriyle reaksiyon gösterenlerdir. Ancak öncesinde kendilerine karşı anlık bağışıklık tepkisi olmayanlar, özellikle ilginçtir. Bunlara karşı kanıtlanabilir şekilde dış etkiyle tümörleri çözen bağışıklık etkisi oluşturulabilir (Keogh et al., J Immunol. 167:787-96, 2001; Appella et al., Biomed Pept Proteins Nucleic Acids 1:177-84, 1995; Wentworth et al., Mol Immunol. 32:603-12, 1995).

Açıklamaya göre tanımlanan farmasötik bileşimler, bağışıklık kazandırmaya yönelik aşı olarak da kullanılabilir. "Bağışıklaştırma" veya "aşılama" terimleri açıklamaya göre bir antijene karşı bağışıklık reaksiyonunun artırılması veya aktive edilmesini ifade etmektedir. Hayvan modelleri, kansere karşı bağışıklık kazandıran bir etkinin test edilmesi amacıyla yönelik olarak tümörle bağlantılı bir antijen veya onun için kodlama yapan bir nükleik asitten yararlanılarak kullanılabilir. Örneğin insandan alınan kanser hücreleri, bir tümör oluşturmak için bir fareye yerleştirilebilir ve tümörle bağlantılı antijen için kodlayan bir veya birkaç nükleik asit zerk edilebilir. Kanser hücreleri üzerindeki etki (örneğin tümörün büyüklüğünde meydana gelen azalma), nükleik asitlerle yapılan bağışıklığın bir ölçüsü olarak alınabilir.

Bir veya birkaç tümörle bağlantılı antijen veya onların uyarıcı fragmanları,

- bağışıklık kazandırma amaçlı bir bileşiğin bir parçası olarak bir veya birkaç adjuvan bağışıklık reaksiyonunu başlatmak veya bağışıklık reaksiyonunu artırmak için zerk edilebilir. Adjuvan, antijen içine yerleştirilen veya bununla birlikte zerk edilen ve bağışıklık reaksiyonunu güçlendiren bir maddedir. Adjuvan maddeler,
- 5 antijen dağarcıklarının (hücre dışı veya makrofaj olarak) düzenlenmesi, makrofajların aktivasyonu ve/veya belirli lenfositlerin uyarılması yoluyla bağışıklık reaksiyonunu güçlendirilebilirler. Adjuvan maddeler, bilinen maddeler olup bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla monofosforil lipid A (MPL, SmithKline Beecham), QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO
- 10 96/33739), QS7, QS17, QS18 und QS-L1 (So et al., Mol. Cells 7:178-186, 1997) gibi saponinleri, tam olmayan Freund adjuvan, tam Freund adjuvan, E vitamini, Montanid, Alaun, CpG oligo nükleitler(kıyaslayınız Kreig et al., Doğa (*Nature*) 374:546-9, 1995) ve skual ve/veya tokoferol gibi biyolojik olarak ayrışabilen yağlardan elde edilen farklı yağ/su emülsiyonlarını kapsamaktadır. Peptitler,
- 15 tercihen DQS21/MPL içeren bir karışım ile zerk edilir. DSQ21'in MPL'ye oranı, genel anlamda yaklaşık 1:10 ila 10:1, tercihen yaklaşık 1:5 ila 5:1 ve özellikle yaklaşık 1:1'dir. İnsana verilme amaçlı DQS21 ve MPL, genel olarak yaklaşık 1 µg ila yaklaşık 100 µg aralığında aşı formülasyonu olarak mevcuttur.
- 20 Hastanın bağışıklık reaksiyonunu uyaran diğer maddeleri de vermek mümkündür. Örneğin sikotinler, lenfositler üzerindeki düzenleyici özellikleri nedeniyle aşılama kullanılabılır. Bu tür sikotinler, örneğin aşılarda koruyucu etkilerini güçlendirdiği kanıtlanmış olan interleukin 12(IL 12) (kıyaslayınız Science 268:1432-1434, 1995), GM-CSF ve IL-18'i kapsamaktadır.
- 25 Bağışıklık reaksiyonunu güçlendiren ve bu nedenle aşılama işleminde kullanılabılme niteliğinde olan bir dizi bağlantı vardır. Bu bağlantılar, protein veya nükleik asit olarak hazır hale getirilen kostimulan molekülleri kapsamaktadır. Bu tür kostimulan moleküller, örneğin ağaç biçimli hücreler (DC)
- 30 üzerine ifade edilen ve T hücreleri üzerine ifade edilen CD28 molekülleri ile

karşılıklı etkileşim içinde olan B7-1 ve B7-2 (CD80 veya CD86) gibi moleküllerdir. Bu karşılıklı iletişim, antijen/MHC/TCR tarafından stimüle edilen (sinyal 1) T hücre için bir kostimülasyonu (sinyal 2) sağlar ki bunun neticesinde T hücrenin çoğalımı ve efektör işlevi güçlendirilir. B7, aynı zamanda CTLA4 (CD152) T hücreleri ile de karşılıklı etkileşime girer ve CTLA4 ve B7 ligandlarının dahil edildiği araştırmalar, B7 ile CTLA4 arasındaki karşılıklı etkileşimin tümöre karşı bağışıklığı ve CTL çoğalımını güçlendirebildiğini göstermiştir (Zheng, P. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95(11):6284-6289 (1998)).

10

B7, T hücreleri için etkili antijen sunucu hücre (APC) olmamaları için tipik olarak tümör hücrelerine ifadelendirilmez. B7 ifadelendirmesinin başlatılması, tümör hücrelerinin sitotoksik T lenfositlerinin çoğalımını ve etkileyici nitelikli bir işlevin tetiklenmesini mümkün kılar. B7/IL-6/IL-12 kombinasyonunun kostimülasyonu IFN gama ve Th1 sitokin profilinin bir T hücre popülasyonu içinde tetiklendiğini, bunun da daha güçlü bir T hücre faaliyetine neden olduğunu göstermiştir (Gajewski et al., J. Immunol. 154:5637-5648 (1995)).

Sitotoksik T lenfositlerinin tam bir aktivasyonu ve tam bir etkileyici fonksiyon, T yardımcı hücreleri üzerindeki CD 40 ligandlarının ve ağaç biçimli hücreler tarafından ifade edilen DC40 molekülü arasındaki karşılıklı etkileşim yoluyla T yardımcı hücrelerin katılımını gerektirir (Ridge et al., Nature 393:474 (1998), Bennett et al., Nature 393:478 (1998), Schönberger et al., Nature 393:480 (1998)). Bu kostimülasyon sinyalinin mekanizması, muhtemelen B7 ve bağlantılı IL-6 / IL-12 üretiminin ağaç biçimli hücreler (antijen sunucu hücreler) yoluyla artırımı ile ilgilidir. CD40 /CD40 L karşılıklı etkileşimi, bu şekilde sinyal 1(antijen/MHC-TCR) karşılıklı etkileşimi ve sinyal 2 (B7-CD28) karşılıklı etkileşimini tamamlar.

Ağaç biçimli hücrelerin uyarılması için anti CD40 antikollarının kullanımı,

5 beklentiye uygun şekilde doğrudan normal olarak iltihaplı reaksiyon alanının dışında bulunan veya uzman olmayan antijen sunucu hücreler (tümör hücreleri) tarafından sunulan tümör antijenlere karşı reaksiyonu güçlendirir. Bu durumlarda T yardımcı ve B7 kostimüle edici sinyaller sağlanmaz. Bu mekanizma, antijen darbeli ağaç biçimli hücrelere dayalı terapilerle bağlantılı olarak kullanılmaz.

Açıklamaya göre nükleik asitlerin, polipeptit veya peptitlerin verilmesi de öngörülmektedir. Poliepetit ve peptitlerin verilmesi, kendi içinde bilinen yollarla yapılır. Bir uygulama usulünde nükleik asitlerin verilmesi *ex vivo* yöntemle, yani 10 hastadan hücrelerin alınması, tümörle bağlantılı bir antijen yerleştirilmesi için hücrelerin genetik olarak değiştirilmesi ve değiştirilmiş hücrelerin tekrar hastaya verilmesi suretiyle yapılır. Bu, genel olarak bir genin işlevsel bir kopyasının hastanın hücrelerine *in vitro* ortamda yerleştirilmesi ve genetik olarak değiştirilmiş hücrelerin tekrar hastaya verilmesini kapsar. Genin işlevsel kopyası, 15 genin genetik olarak değiştirilmiş hücrelerde ifadelendirilmesine olanak tanıyan düzenleyici unsurların işlevsel kontrolü altındadır. Transfeksiyon ve transdüksiyon ile ilgili yöntemler uzmanlarca bilinmektedir. Açıklama kapsamında nükleik asitlerin *in vivo* ortamda virüs ve hedef denetimli liposomlar gibi vektörler kullanılarak verilmesi de öngörülmektedir.

20 Tercih edilen bir uygulama usulünde adeno virüsleri, adeno bağlantılı virüsler, vaksinya virüsü ve atenüe poks virüsleri, semliki forest virüsü, retro virüsler, sindbis virüsü ve Ty virüs benzeri partiküller dahil poks virüslerinden oluşan gruptan seçilen viral bir vektör, tümörle bağlantılı bir antijen için kodlayan bir 25 nükleik asidin verilmesinde kullanılır. Adeno virüsleri ve retro virüsler, özellikle tercih edilir. Retro virüsler, genellikle replikasyonu yetersiz (yani enfeksiyöz partikül üretim yeteneği olmayan) virüslerdir.

Açıklamaya göre nükleik asitlerin *in vitro* veya *in vivo* ortamda hücre içine 30 yerleştirilmesine yönelik olarak çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu tür yöntemler,

- nükleik asit CaPO_4 çökeltilerinin transfeksiyonunu, DEAE ile bağlantılı olan nükleik asitlerin transfeksiyonunu, ilgili nükleik asitleri taşıyan yukarıda belirtilen virüslerin transfekte veya enfekte edilmesini, liposom aracılığıyla yapılan transfeksiyonları ve benzeri yöntemleri kapsar. Belirli uygulama usullerinde
- 5 nükleik asidin belirli hücrelere yönlendirilmesi tercih edilir. Bu tür uygulama usullerinde bir nükleik asidin bir hücreye (örneğin bir retro virüs veya bir liposoma) verilmesinde kullanılan bir taşıyıcı, bağlı bir hedef denetleme molekülüne sahip olabilir. Örneğin bir molekül, hedef hücrede yüzey zarı proteini için spesifik olan bir antikör veya hedef hücredeki bir reseptörün ligandı gibi
- 10 nükleik asit taşıyıcıya yerleştirilebilir veya ona bağlanabilir. Tercih edilen antikörler, selektif olarak tümörle bağlantılı bir antijeni bağlayan antikörleri kapsar. Nükleik asidin liposom vasıtasıyla verilmesinin istenmesi durumunda endositozla bağlantılı olan yüzey zarı proteinini bağlayan proteinler, hedefli bir yönlendirme veya alımı mümkün kılmak için lipozom formülasyonuna
- 15 yerleştirilir. Bu tür proteinler, belirli bir hücre tipi için spesifik olan kapsid proteinlerini veya onların fragmanlarını, internalize edilen proteinlere karşı antikörleri, hücre içi bir noktayı tetikleyen proteinleri ve benzeri proteinleri kapsar.
- 20 Açıklamaya uygun terapötik bileşimler, farmasötik açıdan uygun preparasyonlar şeklinde zerk edilebilir. Bu tür preparasyonlar, genel olarak tuz, tampon maddeler, koruyucu maddeler, taşıyıcılar, adjuvan maddeler, CpG ve sikotinler gibi bütünlüleyici bağışıklık artırıcı maddelerin uygun farmasötik derişimlerini ve gerektiğinde diğer terapötik araçları kapsayabilir.
- 25 Terapötik araçlar, enjeksiyon veya infüzyon dahil bilinen tüm yollarla verilebilir. Araçların verilmesi, örneğin oral, intravenöz, intraperitoneal, intramüsküler, subkütan veya transdermal yollarla yapılabilir. Antikörlerin terapötik amaçla verilmesi için tercih edilen yol, akciğer aerosolüdür. Antisens nükleik asitlerin
- 30 verilmesi ise tercihen intravenöz yolla yavaş bir şekilde yapılır.

- Bileşimler, etkili miktarlarda verilir. "Etkili miktar", tek başına veya çeşitli dozlarda istenen reaksiyonu veya istenen etkiyi yaratabilen miktardır. Kendini bir veya birkaç tümörle bağlantılı antijenin ifadelendirilmesiyle gösteren belirli hastalıklarda veya belirli durumlarda arzu edilen reaksiyon, hastalığın ilerleyişinin baskılanmasıdır. Bu reaksiyon, hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılması ve özellikle hastalığın ilerleyişinin kesintiye uğratılmasını kapsar. Bir hastalığın veya bir durumun tedavisinde ulaşılmak istenen reaksiyon, hastalığın veya durumun ortaya çıkışının geciktirilmesi veya önlenmesi de olabilir.
- 5
- 10 Buluşa uygun bileşimin etkili miktarı, tedavi edilen durum, hastalığın ağırlık derecesi, yaş, psikolojik durum, boy ve ağırlık dahil hastayla ilgili bireysel parametreler, tedavinin süresi, (eğer varsa) eşlik eden terapinin niteliği, spesifik ilaç verme yolu ve benzer unsurlara da bağlı olacaktır.
- 15 Farmasötik bileşimler, tercihen steril ve istenen reaksiyon veya istenen etkinin yaratılabilmesi için terapötik açıdan etkili maddenin etkili bir miktarını içeren bileşimlerdir.
- Verilen bileşimlerin dozajları, verilme usulü, hastanın durumu, arzu edilen verilme süresi vb. gibi parametrelere de bağlı olabilir. Hastaya verilen başlangıç dozajında elde edilen reaksiyonun yetersiz olması durumunda daha yüksek dozlar (veya bir başka, daha güçlü yerleşimli veriliş yoluyla elde edilen etkili daha yüksek dozlar) uygulanabilir.
- 20
- 25 Tedavi veya bağışıklık reaksiyonu yaratılması veya artırılması için genel olarak tümörle bağlantılı antijenin 1ng ila 1 mg arasındaki dozları, tercihen 10 ng ila 100 µg arasındaki dozları formüle edilir ve verilir. Tümörle bağlantılı antijenler için kodlayan nükleik asitlerin (DNA ve RNA) verilmesi isteniyorsa 1 ng ila 0,1 mg arasındaki dozlar formüle edilerek verilir.

Farmasötik bileşimler, genellikle farmasötik olarak uygun miktarlarda ve farmasötik açıdan uygun bileşimlerde verilir. "Farmasötik olarak uygun" terimi, farmasötik bileşimin aktif unsuruyla karşılıklı etkileşime girmeyen toksik olmayan bir maddeyi ifade etmektedir. Bu tür preparasyonlar, genel olarak tuz, 5 tampon maddeleri, koruyucu maddeler, taşıyıcılar ve gerektiği durumlarda diğer terapötik etken maddeleri kapsayabilir. Tuzlar, tıbbi bir kullanımda farmasötik olarak uygun olmalıdır. Ancak farmasötik olarak uygun olmayan tuzlar, farmasötik uygun tuz üretiminde kullanılabilir ve bu, buluş kapsamında olan bir konudur. Bu tür farmakolojik ve farmasötik olarak uygun tuzlar, bunlarla sınırlı 10 olmamak kaydıyla, hidrojen klorür asidi, bromlu hidrojen asidi, kükürt asidi, potasyum nitrat, fosfor, dikardon asidi, sirke asidi, salisilik asit, sitrik asit, formik asit, malonik asit, suksinik asit ve benzeri asitlerden elde edilen tuzları kapsar. Farmasötik olarak uygun tuzlar, sodyum tuzu, kalyum tuzu veya kalsiyum tuzu gibi alkalik metal veya alkalik maden tuzu olarak da üretilebilir.

15

Buluşa uygun farmasötik bir bileşim, farmasötik olarak uygun bir taşıyıcıyı içerebilir. "Farmasötik olarak uygun taşıyıcı" terimi, buluşa göre insanlara verilmeye uygun dolgu maddeleri, inceltici maddeler veya kapsül şeklinde maddeleri ifade etmektedir. "Taşıyıcı" terimi, aktif bileşenin kullanımını 20 kolaylaştırmak için kombine edildiği doğal veya sentetik yapıları organik veya inorganik bir bileşeni ifade etmektedir. Farmasötik bileşimlerdeki bileşenler, o ölçüde alışlagelmiş maddelerdir ki istenilen farmasötik etkiyi önemli ölçüde engelleyen bir etkileşim meydana getirmezler.

25 Farmasötik bileşimler, tuzda sirke asidi, tuzda sitrik asit, tuzda bor asidi ve tuzda fosfor asidi gibi uygun tampon maddelerini içerebilir.

Farmasötik bileşimler, gerektiği durumlarda benzalkonyum klorür, klor butanol, paraben ve timerosal gibi uygun koruyucu maddeleri de içerebilir.

Farmasötik bileşimler, genel olarak bir örnek doz şeklinde sunulur ve bileşim bazında bilinen şekilde üretilir. Farmasötik bileşimler, açıklamaya göre örneğin kapsül, tablet, ağızda eriyen pastil, süspansiyon, şurup, içecek veya emülsiyon olarak sunulabilir.

5

Parenteral yoldan verilme için uygun olan bileşimler, genel olarak tercihen alıcının kanıyla izotonik olan etkin maddenin steril sulu veya sulu olmayan bir preparasyonudur. Uygun taşıyıcılar ve çözücü maddeler, örneğin ringer çözeltisi ve izotonik sodyum klorürdür. Genel olarak bunlara ilaveten çözelti veya süspansiyon aracı olarak steril, fikse edilmiş yağlar kullanılır.

10

Mevcut buluş, aşağıda sadece açıklama amaçlı olarak verilmiş olan ve konuyu sınırlandırıcı olarak anlaşılmaması gereken şekil ve örneklerde ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Konunun uzmanı kişiler, açıklama ve örneklerden yola çıkarak kolayca daha başka uygulama usulleri ortaya koyabilirler.

15

Şekiller:

Şekil 1. Claudin-18A2.1-Mide ve yemek borusunda ve mide ve pankreas tümörlerinde ifadesi

20

Claudin-18A2.1 spesifik primerlerle (SEQ ID NO: 39, 40) yapılan RT-PCR analizi, buluşa göre 8/10 mide tümörü biyopsilerinde ve 3/6 pankreas tümörü biyopsilerinde çok belirgin bir şekilde Claudin18A2.1 ifadesini göstermiştir. Ayrıca mide ve yemek borusundaki normal dokularda da belirgin bir ifadelendirmenin varlığı kanıtlanmıştır. Buna karşılık yumurtalık ve yumurtalık tümörlerinde herhangi bir ifadelendirme tespit edilmemiştir.

25

Şekil 2. Claudin18 konformasyonlarının şematik gösterimi

Claudin 18A2 polipeptidi, buluşa göre hücre üzerinde iki konformasyon halinde bulunur. Protein, 1. konformasyonda 4 trans membran domain (TM) ile birlikte bulunur ve hücre dışında konumlu iki ayrı domain gösterir. 2. konformasyonda ise her iki orta hirofob alanı (h-fob), trans membran domain fonksiyonunu yerine getirmez. Bu konformasyonda bu özellik sayesinde 1. konformasyona kıyasla hücre dışında ilave peptit bölgeleri bulunur. Bunun yanı sıra bu konformasyon sonucunda 116. pozisyonda ilave bir glikosilasyon noktası (daha kalın ok) ortaya çıkar. Öngörülen tüm glikosilasyon domainleri şeklin alt kısmında gösterilmiştir. Ex 1: hücre dışı domain 1, Ex 2: hücre dışı domain 2, TM: Trans membran domainleri, H fob: hücre dışı hidrofob bölge.

Şekil 3. Claudin18'in Nicel İfadelenirilmesi, Değişken A1

Claudin 18A1, akciğer ve mide dokuları dışında hiçbir normal dokuda tespit edilmemektedir. Claudin 18A1, birçok tümörlü dokuda dikkate değer ölçüde ifadelendirilir. Mide, akciğer, pankreas ve yemek borusu tümörlerinde özellikle dikkate değer bir ifadelendirme görülmektedir.

Şekil 4. Claudin 18'in Nicel İfadelenirilmesi, Değişken A2

Claudin18A2 mide dokuları dışında hiçbir normal dokuda tespit edilmemektedir. Claudin18A2 birçok tümörlü dokuda, özellikle mide, akciğer, pankreas ve yemek borusunda ifadelendirilir.

Şekil 5. Claudin 18A2'ye spesifik antikorların (hücre dışı domainler) kullanımı

5 **A:** Claudin 18A2 pozitif mide tümörü hücrelerinin (SNU 16, metanol ile fikslenmiş) bir peptitin (SEQ ID NO:17) bağışıklaştırılması ile üretilen bir antikorla boyanması. Hücre/hücre karşılıklı etkileşim alanlarında özellikle çok belirgin bir şekilde membran boyası ortaya çıkmaktadır. Protein, fokal membran alanlarında bir araya toplanmaktadır.

10 **B, C, D:** Claudin 18A2 GFP içinde transfekte edilen 293T hücrelerinin kolokalizasyon analizi ile antikorun spesifisitesinin kanıtlanması. B: GFP flüör ışıma; C: Anti Claudin18A2; D: Bindirme.

Şekil 6. Claudin18A2'ye spesifik antikorların (hücre dışı domainler) kullanımı

15 Claudin 18A2 pozitif mide tümörü hücrelerinin (SNU 16) bir peptitin (SEQ ID NO: 113, N uçta konumlu hücre dışı domainler) bağışıklandırılması ile üretilen bir antikorla membran boyaması. Karşı boyama için E kadherine karşı yönlendirilmiş olan monoklonal bir antikor kullanılmıştır. A: Claudin18A2 antikorları; B: Anti E Kadherin karşıt boyama; C: Bindirme.

20

Şekil 7. Antikorların claudin 18'in C uçlu hücre dışı domainlerine karşı kullanımı

25 Soldaki şekiller: Claudin 18A2 pozitif mide tümörü hücrelerinin (SNU 16) bir peptitin (SEQ ID NO: 116, C uçlu hücre dışı domainler) bağışıklaştırılması ile üretilen bir antikorla membran boyaması. Karşı boyama için E kadherine karşı yönlendirilmiş olan monoklonal bir antikor kullanılmıştır (sağdaki şekiller).

Şekil 8. Claudin 18A1'e spesifik antikorların kullanımı

Üstte: Mide tümörü hücrelerinin (SNU 16; claudin 18A2 pozitif) claudin 18A1'e spesifik bir peptidin (SEQ ID NO: 115) bağışıklaştırılması ile üretilen bir antikor ile zayıftan boyama ile eksik boyama arasında boyanması. A: Anti E Kadherin; B: Anti Claudin18A1; C: Bindirme.

Altta: Claudin 18A1 GFP içinde transfekte edilen 293T hücrelerinin kolokalizasyon analizi ile antikor spesifitesinin kanıtlanması A: GFP flüör ışımı; B: AntiClaudin18A1; C: Bindirme.

Şekil 9. Claudin 18A2'nin Western blot testinde kanıtlanması

Claudin 18A2 spesifik antikor ile çeşitli sağlıklı dokulardan alınan lizatlarla western blotlama, SEQ ID NO. 17 olan epitopa karşı yönlendirilmiş durumda. 1: Mide; 2: Testis; 3: Deri; 4: Göğüs; 5: Karaciğer; 6: Kolon; 7: Akciğer; 8: Böbrek; 9: lenf boğumu normal dokuları.

Şekil 10. Mide ve mide tümörleri ile çeşitli tümör hücresi dizilerinden alınan örnekler ile claudin 18A2'nin western blot testi.

Mide ve mide tümörleri lizatları (A,B) ve tümör hücresi dizileri (C,D), blotlamaya tabi tutularak claudin 18A2'ye spesifik bir antikor ile SEQ ID NO. 17 olan epitopa karşı test edildi. Mide tümörleri, claudin 18A2'nin daha az glikozile olmuş bir formunu göstermektedir. Mide lizatlarının PNGase F ile işlenmesi, düşük glikolize bir formun oluşması ile sonuçlanmaktadır.

A: 1: Normal mide dokusu #A; 2: Mide tümörü #A; 3: Normal mide dokusu #B; 4: Mide tümörü #B

B: 1: Normal mide dokusu #A; 2: Normal mide dokusu #B; 3: Normal mide dokusu #B + PNGase F; 4: Mide tümörü #C; 5: Mide tümörü #D; 6: Mide tümörü #D + PNGase F

5 **C:** 1: Normal mide dokusu; 2: MDA-MB-231; 3: SK-MEL-37; 4: AGS; 5: SNU-1; 6: SNU-16; 7: EFO27; 8: TOV-112D; 9: OVCAR. Tümör hücre dizilerinin claudin 18A2'nin deglikosile değişkesini ifadelendirdiği göz önünde bulundurulmalıdır.

D: Claudin 18A2'ye spesifik antikorlarla test edilen hücre dizilerinden çeşitli örnekler için western blot verilerinin çizelge şeklinde özeti.

10

Şekil 11. Claudin 18'in akciğer tümörlerinde ifadelendirilmesi

Şekil 30'a uygun olarak akciğer tümörlerinde düşük glikosile claudin 18A2 değişkeleri kanıtlanmıştır. 1: Normal mide dokuları; 2: Mide tümörleri; 3-9:

15 Akciğer tümörleri.

Şekil 12. Claudin 18'in claudin 18A2'ye spesifik antikorlarla normal dokularda immünohistokimyasal analizi

20 Mide mukozasında sadece farklılaşmış epitelial hücreleri, bezelerin açıklığında ve tabanında boyanır. Claudin 18A2'nin mide kök hücrelerinde varlığı kanıtlanmamıştır. Tarafımızca incelenen tüm diğer normal dokular da, örnek olarak böbrek, akciğer ve kolon için gösterildiği gibi, bu geni ifade etmemektedir.

Şekil 13. Claudin 18A2'ye spesifik poliklonal antiserumunun immünohistolojik sonuçları

A: Akciğer tümörü dokularının spesifik boyanmasına örnekler. Claudin 18A1 değişkesini ifadelendiren normal akciğer dokusunun claudin

18A2'ye spesifik antiserum tarafından tanınmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

B: Yemek borusu tümörlerinin spesifik tümör boyaması ile ilgili örnekler. Çevredeki sağlıklı hücrelerin boyanmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

5 **C:** Mide tümörü epitelyumlarının spesifik tümör boyaması ile ilgili örnekler. Burada da çevredeki sağlıklı hücreler boyanmaz.

D: Claudin 18A2'ye spesifik antikorlarla immünohistokimyasal boya verilerinin örnek niteliğinde çizelgeli özeti. AdenoCa: Adeno karsinom; SCC: Yassı epitel karsinomu; RCC: Böbrek karsinomu.

10

Şekil 14. Dizilimler

Burada atıf yapılan dizilimler gösterilmiştir.

15 **Şekil 15. Claudin 18A2'nin hücre dışı alanlarının araştırılması**

EX1 (= hücre dışı domainler 1), EX2 (=hücre dışı domainler 2) veya D3 (= domainler 3) domainlerinden birinde ayrı ayrı bir işaretleyici dizilim (myc veya HA-Tag) taşıyan 3 yapı üretildi (yukarıda). Bunlar, hücre dizilerine transfeke edildi ve arkasından bu işaretleyici dizilimlere karşı yönlendirilen bir antikorun permeabilite edilmemiş hücrelere bağlanıp bağlanmadığı test edildi. Bu, proteinin ilgili alanının topolojik açıdan hücre dışında olmasını gerektirir. Akışlı hücre ölçümünde molekülün her üç alanının antikorlar için ulaşılabilir olduğu görüldü (aşağıda).

25

Şekil 16. Claudin 18A2 membran topolojisi

Verilerimize göre claudin 18A2, her iki iç hidrofob domainlerinin entegral olmayan biçimde hücre membranları arasından geçtiği 2. konformasyonda bulunabilir. Bu şekilde bu molekülün daha büyük olan alanları, hücre dışı

30

alanlardır. Burada verilerimize göre normal mide dokusunda glikosile olan, ancak tümörlerde olmayan glikosilasyon domainleri de bulunmaktadır. Bu suretle sadece tümör dokusuna spesifik epitoplara oluşur.

5 **Şekil 17. Claudin 18'in hücre dışı lokalizasyonunun tespitine yönelik FACS analizi**

Şekilde claudin 18A1, claudin 18A2 ve Mock'un tam uzunluğu ve claudin 18A2'nin parçalarıyla transfekte edilmiş permeabilite olmayan hücrelerde yapılan akışlı hücre ölçümü analizleri görülmektedir. mAB1 ve mAB2 antikorlarının spesifik olarak hücre yüzeyindeki claudin 18A2 (sol sütun) ve hücre dışı 2. domaini (Ex2, 3. sütun) tanıdıkları, bu sırada da claudin 18A1 (2. sütun) ve negatif kontrolün (son sütun) negatif olduğu fark edilmektedir. mAB1 antikor, mAB2'nin aksine, spesifik olarak 1. hücre dışı domaine (Ex 1, 4. sütun) bağlanır.

15

Örnekler:

Gereç ve Yöntemler

"*In silico*", "elektronik" ve "sanal klonlama" terimleri, sadece veri bankalarına dayanan ve laboratuvar ortamında deneysel işlemlerin simüle edilebildiği yöntemlere atıf yapmaktadır.

Tüm diğer terim ve süreler, açıkça başka bir şekilde tanımlanmadığı sürece, uzmanlar tarafından anlaşıldığı biçimde kullanılır. Anılan teknik ve yöntemler, kendi içinde bilinen şekilde uygulanır ve örneğin Sambrook et al., Moleküler Klonlama : Laboratuvar El Kitabı (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 2. Baskı (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press yayını, Cold Spring Harbor, N. Y çalışmasında tanımlanmıştır. Donatı ve ayıraç içeren tüm yöntemler, üreticinin verilerine göre uygulanır.

30

Tümörle bağlantılı yeni genlerin tespitinde veri madenciliğine dayalı strateji

İki *in silico* strateji, yani gen bankası tanıtıcı sözcük araştırması ve cDNAx profilleyici kombine edilmiştir. ENTREZ araştırması ve NCBI Edinim Sistemler
5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) kullanılarak gen bankasında belirli dokularda spesifik ifadelendirilmiş olarak not düşülmüş aday genler aranmıştır (Wheeler et al., Nükleik Asit Araştırması (*Nucleic Acids Research*) 28:10-14, 2000).

10 Örneğin "colon-specific gene", " stomach--pecific gene" veya "kidney specific gene" gibi anahtar sözcüklerle yapılan sorgulamada veri bankasından aday genler [GOI genler (genes of interest / ilgi çekici genler)] seçip çıkarılmıştır. Sorgulama, veri bankalarındaki bilgilerin bir kısmıyla sınırlı tutulmuş, organizma için "homo sapiens" ve molekül türü içinse "mRNA" sınırlamaları altında sorgulama
15 yapılmıştır.

GOI genlerin listesi düzenlenerek aynı dizilim için farklı tanımlamalar tespit edilmiş ve bu tür fazlalık bilgiler düzeltilmiştir.

20 Anahtar sözcük araştırması sonucunda bulunan tüm aday genler, bir kez daha "electronic Northern" (eNorthern) yöntemi kullanılarak doku dağılımı açısından incelenmiştir. eNorthern yöntemi, bir GOI geninin diziliminin veri bankasında bir EST etiketine (expressed sequence tag/tanımlanmış dizilim etiketi) karşı eşleştirilmesine dayanmaktadır (Adams et al., Science 252:1651, 1991)
25 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Girişi yapılan her bir GOI genine homolog olarak denk gelen her bir EST etiketi doku kaynak tespiti açısından incelenir ve bu şekilde tüm EST etiketlerinin toplam miktarı üzerinden GOI geninin doku dağılımı için geçici bir tahmin ortaya konur. Sadece organ spesifik olmayan normal dokulardan kaynaklanan EST etiketlerine homolog karşılığı
30 olmayan GOI genleri daha geniş incelemeye alınmıştır. Bu değerlendirmede

kamusal domain alanlarında hatalı notlandırılmış cDNA bankalarının olduğu da dikkate alınmıştır (Scheurle et al., Cancer Res. 60: 4037-4043, 2000) (www.fau.edu/cmabb/publications/cancergenes6.htm). İkinci data madenciliği yöntemi olarak NCBI Kanser Genomu Anatomisi Projesinin cDNA x profil tanımlayıcısı kullanılmıştır (http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler) (Hillier et al., Genome Research 6:807-828, 1996; Pennisi, Science 276:1023-1024, 1997). Bu, veri bankalarında dosyalanmış transkriptom havuzlarının mantıksal operatörler kullanılarak birbirleriyle olan ilişki bazında düzenlenmesine olanak verir. Örneğin Havuz A tanımlı bir havuz tanımlanarak kolon kaynaklı olarak üretilen tüm ifadelendirme kütüphaneleri, karışık kütüphaneler dışarıda bırakılarak buraya eklenmiştir. Havuz B tanımlı diğer bir havuza ise kolon kaynaklı olanlar hariç olmak üzere normal doku kaynaklı olarak üretilen tüm cDNA kütüphaneleri eklenmiştir. Tüm cDNA bankaları, genel olarak üretiminde esas alınan yöntemden bağımsız olarak kullanılmış, ancak büyüklük olarak sadece > 1000 olanlar uygun görülmüştür. B Havuzu, BUT NOT operatör vasıtasıyla dijital olarak A Havuzundan çıkarılmıştır. Bu şekilde bulunan GOI genleri seti, aynı zamanda e-Northern araştırmasına da tabi tutulmuş ve ayrıca bir emniyet unsuru olarak literatür araştırması yapılmıştır.

Bu kombine veri madenciliği işlemi, kamusal domain alanında bulunan 13.000 tam uzunluktaki genin yaklaşık tamamını kapsamakta ve bunların içinden potansiyel organ spesifik ifadelendirmeli olanların ön belirlemesini yapmaktadır.

Tüm diğer genler, önce spesifik RT PCR ile normal dokularda değerlendirilmiştir. Organ spesifik olmayan normal dokularda ifadelendirilmiş olarak görünen tüm GOI genler, hatalı pozitif olarak değerlendirilerek devam eden incelemelerde dikkate alınmamıştır. Kalanlar büyük bir panoda çeşitli tümör dokularına yönelik olarak incelenmiştir. Burada aşağıda gösterilen antijenler, tümör hücrelerinde aktive edilmiş olarak görülmüştür.

30

RNA çıkarımı, poly-d(T) astarlı cDNA üretimi ve konvansiyonel RT PCR analizi

Tüm RNA, kaotrofem amil olarak guanidyum isotiosiyanat kullanılarak natif doku
5 materyalinden çıkarılmıştır (Chomczynski & Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-9, 1987) RNA, fenolik asitle çıkarım ve isopropanol ile çökeltim sonrasında DEPC ile işleme tabi tutulmuş suda çözölmüştür.

2-4 µg tüm RNA'dan 20µl reaksiyon karışımı içinde superskript II (invitrojen)
10 yoluyla ve üreticinin talimatları doğrultusunda birinci yumak cDNA sentezi uygulanmıştır. Primer olarak dT(18) oligonökleotit kullanılmıştır. cDNA'nın bütönlüğü ve kalitesi, p53 amplifikasyonu yoluyla 30 çevrim PCR (sens CGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCG, antisens CCTAACCAGCTGCCCAACTGTAG, melezleme ısısı 67°C) dahilinde kontrol
15 edilmiştir.

Bir dizi normal doku ve tümör antitelerinden birinci yumak cDNA arşivi oluşturulmuştur. İfadeliendirme araştırması için bu cDNA'lardan 0,5 µl kadar bir miktar, 30 µl reaksiyon karışımında GOI spesifik primerlerle (aşağıya bakınız) ve
20 1 U HotStarTaq DNA Polimeraz (qiagen) ile amplifiye edilmiştir. Reaksiyon karışımı, her seferinde 0,3 mM dNTP, her bir primerden her biri için 0,3 µM ve 3 µl 10 x reaksiyon tamponundan oluşmuştur.

Primerler, 2 ayrı ekson üzerinde olacak şekilde seçilmiş ve hatalı pozitif
25 sonuçların nedeni olarak kontamine edici genomik DNA tarafından oluşturulan parazitin bertaraf edilmesi, matris olarak revers olarak kopyalanmamış DNA'lar vasıtasıyla teyit edilmiştir. 95°C derecede 15 dakika sonra HotStarTaq DNA Polimerazının aktivasyonuna yönelik olarak 35 çevrim PCR uygulanmıştır (1 dakika 94°C, 1 dakika ayrı ayrı melezleme ısısı, 2 dakika 72°C ve sonuçta 72°C
30 derecede 6 dakika boyunca elongasyon).

Bu reaksiyondan 20µl, etidyum bromür ile boyanmış agarose jel içinde çözülmüş ve analiz edilmiştir.

Aşağıda belirtilen primerler, belirlenmiş melezleme ısılarında ilgili antijenlerle
5 ilintili ifadelendirme analizi için kullanılmıştır.

Claudin-18A1 (64°C)

Sens: 5'-GAGGCAGAGTTCAGGCTTCACCGA-3' (SEQ ID NO: 109)

Antisens: 5'-TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC-3' (SEQ ID NO: 110)

Claudin-18A2 (68°C)

Sens1: 5'-GGTTCGTGGTTTCACTGATTGGGATTGC-3' (SEQ ID NO: 39)

Antisens 1: 5'-CGGCTTTGTAGTTGGTTTCTTCTGGTG-
3' (SEQ ID NO: 40)

Sens2: 5' -TGTTTTCAACTACCAGGGGC-3' (SEQ ID NO:
107)

Antisens2: 5' -TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC-3' (SEQ ID NO:
108)

10

Random hexamer astarlı cDNA üretimi ve niceliksel reel zamanlı PCR

Muhtelif genlerin ifadelendirilmesi, reel zamanlı PCR ile niceliksel olarak
ölçülmüştür. Bu işlemde SYBR yeşil olan PCR ürünleri, ekleyen roportör boya
15 olarak belirlenmiştir. SYBR yeşilin roportör florışılı, çözelti içinde bastırılmış ve
boya maddesi, ancak çift sarmallı DNA fragmanına bağlanım sonrasında aktif
hale gelmiştir. Her bir PCR çevriminden sonra SYBR yeşil florışılın GOI spesifik
primerlerle spesifik olarak amplifiye edilmesi sonucu artması, niceliksel ölçüm
için kullanılmıştır. Hedef geninin niceliksel ölçümle ifadelendirilmesi, koşulsuz

veya bir kontrol geninin incelenecek olan dokularda sürekli ifadelendirilmesi yoluyla ifadelendirilmesi ile bağıntılı olarak gerçekleşir. İfadelendirme, örneklerin referans gen olarak 18s RNA'ya karşı normalizasyonu sonrasında $\Delta\Delta-C_t$ yöntemi kullanılarak (PE Bio sistemler, ABD) tespit edilmiştir. Reaksiyonlar, çiftli 5 karışımlarda uygulanmış ve üçlü kopya dahilinde belirlenmiştir. Üretici talimatları doğrultusunda QuantiTect SYBR-Green PCR Kiti (Qiagen, Hilden) kullanılmıştır. cDNA'nın sentezi, üreticinin talimatları doğrultusunda hexamer primer kullanılarak High Capacity cDNA Archive Kiti (PE Bio sistemler, ABD) ile yapılmıştır. 5 µl inceltirilmiş cDNA, her seferinde PCR için 25 µl toplam hacimde 10 yerleştirilmiştir: sens primer 300nM, antisens primer 300nM; başlangıç denatürasyonu 95°C 15 dakika; 95°C 30 saniye; öze dönü 30 saniye; 72°C 30 saniye; 40 çevrim. Kullanılan primerlerin dizilimleri, ilgili örneklerde gösterilmiştir.

15 **Klonlama ve dizi analizi**

Tam uzunluklu genlerin veya gen fragmanlarının klonlanması, alışlagelmiş yöntemlerle yapılmıştır. Dizinin tespiti için ilgili antijenler proof reading polimeraz pfu (Stratagene) yoluyla amplifiye edilmiştir. Fragmanların üreticinin 20 talimatları doğrultusunda TOPO TA vektöründe klonlanması için PCR'nin sona ermesini takiben HotStarTaq DNA polimerazı yoluyla ampikonun uçlarına adenosin bağlanmıştır. Dizileme için ticari hizmet alınmıştır. Dizilimler, alışlagelmiş prediksyon programları ve algoritmaları yardımıyla analiz edilmiştir.

25

Western blotlama

Hücre kültürü ile elde edilen hücreler (hedef genin endojen olarak ifadelendirilmesi veya hedef proteinin hedef proteini kodlayan ifade vektörünün 30 transfekyonu sonrasında sentezi) veya içeriğinde hedef proteinin bulunabildiği

doku örnekleri, % 1'lik SDS çözeltisinde çözülür. SDS, bu sırada lizatın içeriğindeki proteinleri denatüre eder. Deneysel bir karışımdaki lizatlar, arzu edilen protein büyüklüğüne bağlı olarak % 8-15'lik denatüre edici poliakrilamid jelinde (% 1 SDS içerikli) büyüklüklerine göre elektroforetik olarak çözülürler (SDS poliakrilamid gel elektroforezi, SDS PAGE). Bunu takiben proteinler yarı kuru elektro blotlama yöntemiyle (biorad) istenen proteinin kanıtlama işleminin yapılabilceği nitroselülöz membrana (Schleicher & Schüll) transfer edilir. Membran, bunun için öncelikle (örneğin süt tozu ile) bloke edilir ve akabinde spesifik antikor ile 1:20-1:200 inceltirme dahilinde (antikorun spesifitesine göre) 60 dakika süreyle inkübasyona tabi tutulur. Membran, bir yıkama aşamasından sonra bir işaretçi ile (örneğin peroksidaz veya alkalik fosfataz gibi enzimlerle) birleştirilmiş ve birinci antikoru tanıyan ikinci bir antikor ile inkübasyona tabi tutulur. Hedef protein, bunu takiben bir diğer yıkama aşamasında boya veya kemiluminesansı reaksiyonu ile membran üzerinde görünür hale getirilir (örneğin ECL, Amersham Bioscience). Sonuç, uygun bir kamera ile fotoğrafı çekilerek belgelenir.

Protein modifikasyonlarının analizi, kural olarak western blotlama ile yapılır. Kural olarak birkaç kDa büyüklüğünde olan glikosilasyonlar, SDS-PAGE yönteminde çözülen hedef proteinlerinin daha büyük toplam hacim almasına yol açar. Spesifik N ve O glikosidik bağlantıların kanıtlanması için doku veya hücre protein lizatları, O veya N glikosidazlı SDS işlemiyle denatürasyondan önce inkübasyona tabi tutulur (İlgili üreticinin verileri doğrultusunda, örneğin PNGase, Endoglikosidaz F, Endoglikosidaz H, Roche Diagnostics). Takiben yukarıda tanımlandığı gibi western blotlama yapılır. Hedef proteinin büyüklüğünün azaltılması durumunda bu şekilde inkübasyondan sonra bir glikosidazla spesifik bir glikosilasyon kanıtlanabilir ve bu yolla modifikasyonun tümör spesifitesi de analiz edilebilir. Algoritma ve prediksyon programlarıyla glikosile amino asitlerin kesin konumu önceden tahmin edilebilir.

İmmün flüör ışıma

Burada yerleşik hücre dizilerinin hücreleri kullanılır ki bunlar, ya hedef proteinleri endojen olarak sentezleyen (RNA kanıtı RT PCR'de veya protein kanıtı western blotlama ile) veya IF'den önce plazmid DNA ile transfekte edilmiş olanlardır. Hücre dizilerinin transfeksiyonuna yönelik olarak çok çeşitli yöntem (örneğin elektroporasyon, lipozom dayalı transfeksiyon, kalsiyum fosfat presipitasyonu) bilinmekte ve etkili bir şekilde uygulanmaktadır (örneğin Lemoine et al. Methods Mol. Biol. 1997; 75: 441-7). Transfekte edilen plazmid, imnoflorışıl sırasında modifiye edilmemiş proteini kodlayabilir veya çeşitli amino asit işaretleyicilerini hedef proteinle bağlayabilir. En önemli işaretleyiciler, örneğin çok çeşitli diferansiyel florışıl saçan şekillerde bulunan yeşil florışıl protein ("green fluorescent protein" (GFP)) ve yüksek afin ve spesifik antikorlar için yararlanılan 6-12 amino asitli kısa peptit dizilimleridir. Hedef proteinleri sentezleyen hücreler, paraformaldehit, saponin veya metanol ile fikse edilir. Akabinde hücreler gerekirse inkübasyon yoluyla temizleyicilerle (örneğin % 0,2 Triton X 100 ile) permeabilite edilir. Hücreler, fiksasyon/permeabilite işleminden sonra hedef proteine veya bağlanmış bir işaretçiye karşı yönlendirilen primer bir antikorla inkübe edilir. Katkı maddesi, bir yıkama aşamasından sonra florışıl saçan bir işaretçiyle (örneğin fluorescein, texas red, dako) birleşmiş ve ilk antikora bağlanan ikinci bir antikorla inkübe edilir. Takiben bu şekilde işaretlenmiş hücreler gliserinle katmanlaştırılır ve florışıl mikroskop yardımıyla üreticinin talimatları doğrultusunda analiz edilir. Bu sırada, kullanılan maddelere bağımlı olarak spesifik uyarma yoluyla spesifik florışıl emisyonları sağlanır. Analizle kural olarak hedef proteinin kesin konumu belirlenir ki burada hedef proteine ilave olarak antikor kalitesi ve hedef proteinin çiftli boyama ile teyit edilmesi amacıyla konumları mevcut literatürde tanımlanmış olan bağılı amino asit işaretçileri veya diğer işaretçi proteinler de boyanır. Doğrudan uyarılabilen ve kendiliğinden florışıl veren, dolayısıyla kanıtlanmaları için herhangi bir antikor gerektirmeyen GFP ve değışkeleri, istisnai durum teşkil etmektedir.

İmmün histokimyası

Imun histokimyası (IHC) özellikle (1) tümörlü ve normal dokularda hedef protein

miktarının tahmin edilmesi (2) tümörlü ve sağlıklı dokularda hedef geni sentetize

5 eden hücre miktarının analiz edilmesi ve/veya (3) bir dokuda (tümör, sağlıklı

hücre) hedef proteinin kanıtlanabilir olduğu hücre tipinin tanımlanması

konularında yardımcı olan bir yöntemdir.

Münferit antikorlara göre çeşitli protokollerin kullanılması gerekir (örneğin

Tanısal İmun Histokimyası (*Diagnostic Immunohistochemistry*) Yazarı: David J.,

10 MD Dabbs ISBN: 0443065667" veya Mikroskopi, İmmün Histokimyası ve

Antijen Erişim Yöntemleri: Işık ve Elektron Mikroskobu İçin ("*Microscopy,*

Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron

Microscope" ISBN:0306467704).

15 IHC, spesifik doku örneklerinde ilgili dokuda protein kanıtlaması amaçlı olarak

kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin amacı, işlevsel olarak sağlam olan bir doku

birliğindeki proteinin konumunun belirlenmesidir. IHC) özellikle (1) tümörlü ve

normal dokularda hedef protein miktarının tahmin edilmesi (2) tümörlü ve sağlıklı

dokularda hedef geni sentetize eden hücre miktarının analiz edilmesi ve/veya (3)

20 bir dokuda (tümör, sağlıklı hücre) hedef proteinin kanıtlanabilir olduğu hücre

tipinin tanımlanması konularında yardımcı olan bir yöntemdir. Hedef gendeki

protein miktarları, alternatif olarak dokunun imnoflorışılı yardımıyla dijital

kamera ve uygun yazılımla (örneğin Tillvision, Till-photonics, Almanya)

ölçülebilir. İlgili teknoloji hakkında birçok yayın yapılmıştır, bu nedenle boyama

25 ve mikroskopi ile ilgili ayrıntılar, örneğin Tanısal İmmün Histokimyası

(*Diagnostic Immunohistochemistry*) Yazarı: David J., MD Dabbs ISBN:

0443065667" veya Mikroskopi, İmmün Histokimyası ve Antijen Erişim

Yöntemleri: Işık ve Elektron Mikroskobu İçin ("*Microscopy,*

Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron

30 *Microscope*" (ISBN:0306467704) gibi kaynaklarda bulunabilir. Antikorların

özellikleri nedeniyle etkili bir sonuca ulaşabilmek için çeşitli protokollerin kullanılması gerektiği göz önünde tutulmalıdır (aşağıda bir örnek tanımlanmıştır).

- 5 IHC yönteminde kural olarak histolojik olarak tanımlanmış tümör dokuları ve referans olarak kıyaslanabilir sağlıklı dokular kullanılır. Hedef genin varlığının RT PCR analizleri yoluyla bilindiği hücre dizilerinden de negatif ve pozitif kontrol olarak yararlanılabilir. Her zaman bir arka plan kontrolü de yapılmalıdır.

- 10 Fikse edilmiş dokular (örneğin aldehit içeren maddeler, formaldehit, paraformaldehitte veya alkol içeren çözeltilerde) veya 1-10 µm arasındaki şoklanarak dondurulmuş doku parçaları, cam bir taşıyıcı üzerine alınır. Parafine gömülü örnekler, örneğin ksilol ile deparafine edilir. Örnekler, TBS-T ile yıkanır ve serum içinde bloke edilir. Bunu takiben birinci antikor ile 1-18 saat süre için kural olarak affinite saflaştırılmasına tabi tutulmuş antikorların kullanıldığı
- 15 inkübasyon işlemi yapılır (İnceltme: 1:2 ila 1:2000). Bir yıkama aşamasından sonra alkalik bir fosfataz (alternatif olarak: örneğin perkosidaz) ile birleşen ve birinci antikora karşı yönlendirilen ikinci antikorla yaklaşık 30-60 dakika süreli bir inkübasyon yapılır. Takiben, bağlanan enzim tarafından yerleri değiştirilen renk alt katmanları kullanılarak bir renk reaksiyonu oluşturulur (örneğin
- 20 kıyaslayınız: Shi et al., J. Histochem. Cytochem. 39: 741-748, 1991; Shin et al., Lab. Invest. 64: 693-702, 1991). Reaksiyon, antikor spesifitesinin kanıtlanmasına yönelik olarak immünojenin önceden verilmesi yoluyla rekabete tabi kılınmış olur.

25 **Bağışıklık kazandırma**

- (Bu kaynaklara da bkz. Monoklonal Antikorlar: Pratik Bir Yaklaşım (*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*) Yazarı: Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN: 0-19-963722-9; Antikorlar:Laboratuvar El Kitabı (*Antibodies: A Laboratory*
- 30 *Manual*) Yazarı: Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142; Antikorları

Kullanmak: Laboratuar El Kitabı: Taşınabilir Protokol NO) Yazarı: Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447).

Aşağıda antikor üretim süreci kısaca açıklanmıştır, Ayrıntılar anılan yayınlarda bulunabilir. Öncelikle hayvanlara (örneğin tavşana) hedef proteinin ilk enjeksiyonu ile birinci bağışıklık kazandırılır. Belirli bir zaman süresi içinde (bir önceki bağışıklaştırma işleminden sonra yaklaşık 2-4 hafta içinde) yapılan ikinci ve üçüncü bağışıklaştırma işlemiyle hayvanın immünojene karşı bağışıklık tepkisi güçlendirilir. Belirlenmiş farklı sürelerde hayvanlardan tekrar kan alınır (1. kanlanma 4 hafta sonra, akabinde yaklaşık 2 haftada bir toplam 5 kan alımı) ve bunlardan bağışıklık serumu elde edilir.

Hayvanların bağışıklaştırılmasında kural olarak yaygın olarak uygulanan 4 yöntem kullanılır, ancak başka yöntemler de mevcuttur. Bu bağlamda hedef protein için spesifik olan peptitlerle, proteinin tamamıyla veya proteinin deneysel yolla veya prediksyon programlarıyla tanımlanabilen hücre dışı kısmi dizilimleriyle bağışıklaştırma yapılabilir.

(1) Birinci durumda KLH genine (keyhole limpet hemosiyanin) eşlenik peptitler (uzunluk: 8-12 aminoasit) standartlaştırılmış bir in vitro yöntemle sentetize edilir ve bu peptitler bağışıklaştırma için kullanılır. Kural olarak 5-1000 µg/bağışıklaştırma konsentrasyonu ile 3 bağışıklaştırma yapılır. Bağışıklaştırma bu konuda hizmet veren kişilere de yaptırılabilir.

(2) Bağışıklaştırma, alternatif olarak rekombinan proteinlerle de yapılabilir. Bunun için hedef genin klonlanan DNA'sı bir ifadelendirme vektörüne klonlanır ve hedef protein, ilgili üreticinin (örneğin Roche Diagnostics, Invitrogen, Clontech, Qiagen) koşullarına benzeşik olarak örneğin in vitro ortamda hücresiz, bakterilerde (örneğin E. Coli), mayada (örneğin B. S. pombe), böcek hücrelerinde veya memeli hücrelerinde sentezlemeye tabi tutulur. Sistemlerden birinde yapılan sentezlemeden

sonra kural olarak standartlaştırılmış kromatografik yöntemler kullanılarak hedef protein saflaştırılır. Bu sırada moleküler bir çapa üzerinden saflaştırmada yardımcı madde olarak hizmet gören proteinler de bağışıklaştırma işleminde kullanılabilir (örneğin His-Tag, Qiagen; FLAG-Tag, Roche Diagnostics; Gst-füzyon proteinleri). Örnek olarak Moleküler Biyolojide Güncel Protokoller (*Current Protocols in Molecular Biology*), John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience çalışmasında birçok protokol mevcuttur.

(3) İstenen proteini endojen olarak sentetize eden bir hücre dizisinin bulunması durumunda bu hücre dizisi de spesifik antiserumun üretilmesinde kullanılabilir. Bağışıklaştırma, bu işlemde her seferinde yaklaşık $1-5 \times 10^7$ hücre ile 1-3 enjeksiyonla yapılır.

(4) Bağışıklaştırma, DNA enjeksiyonu vasıtasıyla da yapılabilir (DNA bağışıklaştırması). Bu amaçla hedef dizilimin güçlü bir ökaryotik destekleyicinin (örneğin CMV destekleyicisinin) kontrolü altında olması için hedef gen öncelikle bir ifadelendirme vektörüne klonlanır. Takiben 5-100 µg DNA, immünojen olarak bir "gen tabancası" ile bir organizmada (örneğin fare, tavşan) yoğun bir şekilde kanayan kılcal bölgeye transfer edilir. Transfer edilen DNA hayvanın hücrelerinden alınır, hedef gen ifadelendirilir ve hayvan sonuçta hedef gene karşı bir bağışıklık tepkisi geliştirir (Jung et al., Mol Cells 12: 41-49, 2001; Kasinrerk et al., Hybrid Hybridomics 21: 287-293, 2002).

Poliklonal serum veya antikorların kalite kontrolü

Spesifisitenin kanıtlanmasına yönelik en uygun testler, akabinde **western blotlama** ile kombine edilen hücre kültürü bazlı testlerdir (farklı uygulamalar örneğin Protein Kimyasında Güncel Protokoller ("Current Protocols in Proteinchemistry"), John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience çalışmasında bulunabilir). Kanıt için güçlü bir ökaryotik destekleyicinin (örneğin

5 sitomegalovirüs destekleyicisinin) kontrolü altında bulunan hücreler bir cDNA ile hedef protein için transfecte edilir. Hücre dizilerinin DNA ile transfectiyonuna yönelik olarak çok çeşitli yöntemler (örneğin elektroporasyon, liposom bazlı transfectiyon, kalsiyum fosfat presipitasyon) bilinmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (örneğin Lemoine et al., Methods Mol. Biol. 75: 441-7, 1997). Anternatif olarak hedef genini endojen olarak ifadelendiren hücre dizileri de kullanılabilir (kanıtı hedef gene spesifik RT PCR ile). Deneyde ideal durumda, kontrol amaçlı olarak takip eden western blotlama işleminde analiz edilen antikorun spesifitesinin kanıtlanabilmesi için homolog genler de birlikte 10 transfecte edilir.

Hedef proteini içirme olasılığı olan hücre kültürü veya doku örneği kaynaklı hücreler, müteakiben yapılan western blotlama işleminde % 1'lik SDS çözeltisinde çözülür ve bu sırada proteinler denatüre edilir. Lizatlar, % 8-15'lik denatüre edici 15 poliakrilamid jellerinde (% 1 SDS içerikli) elektroforik olarak büyüklüklerine göre ayrılır (SDS-Poli akrilamid jel elektroforazı, SDS-PAGE). Proteinler, bunu takiben muhtelif blotlama yöntemlerinden biri kullanılarak (örneğin yarı kuru elektro blotlama; biorad) spesifik bir membrana transfer edilir (örneğin nitrosellülöz, Schleicher & Schüll). İstenilen protein, bu membran üzerinde 20 görünür hale getirilebilir. Bunun için membran önce hedef proteini tanıyan antikorla 60 dakika süreyle inkübe edilir (inceltme: 1:20 - 1:200, antikorun spesifitesine göre). Membran, bir yıkama aşamasından sonra bir işaretçiyle (örneğin peroksidaz veya alkalik fosfataz gibi enzimlerle) birleştirilmiş ve birinci antikoru tanıyan ikinci bir antikorla inkübe edilir. Hedef protein, bunu takiben 25 boya veya kemilumin esansı reaksiyonu ile membran üzerinde görünür hale getirilir (örneğin ECL, Amersham Bioscience). En ideal durum, hedef proteine yüksek spesifiteli bir antikorun istenen proteinin kendisini tanıdığı durumdur.

30 İn silico yaklaşımla tanımlanmış membran konum belirleme işleminin teyidi için çeşitli yöntemler kullanılır. Yukarıda tanımlanan antikorların kullanımıyla

gerçekleştirilen önemli ve yaygın olarak bilenen ve kullanılan bir yöntem, immunofloışıl (FI) yöntemidir. Bunun için hedef proteinin sentetize eden (RNA kanıtı RT PCR veya protein kanıtı western blotlama ile) veya plasmid DNA ile transfekte edilmiş olan yerleşik hücre dizilerinin hücreleri kullanılır. Hücre

5 dizilerinin DNA ile transfeksiyonu için birçok yöntem (örneğin elektroporasyon, lipozom bazlı transfeksiyon, kalsiyum fosfat presipitasyon) bilinmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (örneğin Lemoine et al., *Methods Mol. Biol.* 75: 441-7, 1997). Hücrelere transfekte edilen plasmid, immunofloışıl sırasında modifiye edilmemiş proteini kodlayabilir veya farklı amino asit işaretçilerini hedef proteine

10 bağlayabilir. En önemli işaretleyiciler, örneğin çok çeşitli diferansiyel floışıl veren şekillerde bulunan yeşil floışıllı protein ("green fluorescent protein" (GFP)), yüksek afın ve spesifik antikolar için yararlanılan 6-12 amino asitli kısa peptit dizilimler veya sisteinleri üzerinden spesifik floışıl maddeleri bağlayabilen (invitrojen) kısa Cys-Cys-X-X-Cys-Cys amino asit dizilimidir. Hedef proteini

15 sentetize eden hücreler, örneğin paraformaldehit veya metanol ile fikse edilir. Bunu takiben hücreler gerekirse inkübasyon yoluyla temizleyicilerle (örneğin % 2 triton X 100 ile) permeabilite edilebilir. Hücreler, bunun arkasından hedef proteine veya birleştirilmiş işaretçilerden birine karşı yönlendirilmiş olan primer bir antikorla inkübe edilir. Tortu, bir yıkama aşamasından sonra floışıl özellikli

20 bir işaretleyiciyle (örneğin floresin, Texas Red, Dako) birleşmiş olan ve birinci antikoru tanıyan ikinci bir antikorla inkübe edilir. Bunu takiben bu şekilde işaretlenmiş hücreler gliserin tabakasıyla kaplanır ve üreticinin talimatları doğrultusunda floışıl mikroskop yardımıyla analiz edilir. Bu sırada, kullanılan maddelere bağlı olarak spesifik uyarımla floışıl emisyonları elde edilir. Analizle

25 kural olarak hedef proteinin kesin konumu belirlenir ki burada hedef proteine ilave olarak antikor kalitesi ve hedef proteinin çiftli boyama ile teyit edilmesi amacıyla konumları mevcut literatürde tanımlanmış olan bağlı amino asit işaretçileri veya diğer işaretçi proteinler de boyanır. Doğrudan uyarılabilen ve kendiliğinden floışıl veren, dolayısıyla kanıtlanmaları için herhangi bir antikor

30 gerektirmeyen GFP ve değişkenleri, istisnai durum teşkil etmektedir. Temizleyici

kullanımıyla denetlenebilen membran permeabilitesi, immunoflorişıl işleminde bir epitopun hücrenin içinde mi yoksa dışında mı konumlandığına ilişkin kanıt sağlar. Seçilen proteinlerin prediksyonu, bu şekilde deneysel olarak desteklenebilir. Hücre dışı domainlerin kanıtlanması, alternatif olarak akış sitometrisi yoluyla da yapılabilir. Bunun için hücreler geçirgensiz koşullarda (örneğin PBS/sodyum asit/% 2 FCS/5mM EDTA ile) fiks edilir ve akış sitometrisinde üreticinin talimatları doğrultusunda analiz edilir. Bu yöntemde analiz edilecek antikorlar tarafından sadece hücre dışı epitoplar tanınır. İmmunoflorişıl yönteminden farklı olarak örneğin propidyumiodid veya tripan mavisi kullanılarak ölü ve yaşayan hücreler ayırt edilebilir ve bu şekilde hatalı pozitif sonuçlar önlenmiş olur.

Afinite saflaştırımı

Poliklonal serumların saflaştırılması, peptit antikorlar için tamamıyla veya rekombinan proteinlere karşı yönlendirilen antikorlar da kısmi olarak bu konuda hizmet veren firmalara yaptırılmıştır. Bunun için her iki durumda ilgili peptit veya rekombinan protein kovalen olarak bir matrise bağlanır ve matris, bağlanma sonrasında natif bir tamponla (PBS:fosfatla tamponlanmış salin) dengelenir ve akabinde ham serumla inkübe edilir. PBS ile yapılan başka bir yıkama aşamasından sonra antikor, 100 mM glisin, pH2,7 ile ayrıştırılmış ve ayrıştırılan madde, hemen o anda 2 M TRIS, pH 8 içinde nötralize edilmiştir. Bu şekilde saflaştırılan antikorlar, daha sonra western blotlama veya immunoflorişıl yöntemiyle hedef proteinlerin spesifik belirlenimi için kullanılabilir.

25 GFP transfektanlarının elde edilmesi

Heterolog olarak ifade edilen tümörle bağlantılı antijenlerin immunoflorişıl mikroskopla tetkik işlemi için antijenlerin tüm ORF'si pGFP-C1 ve pGFP-N3 vektörlerinde (Clontech) klonlanmıştır. Lam üzerinde kültive edilen CHO ve NIH3T3 hücreleri, ilgili plazmid yapılarla FuGENE transpeksiyon ayıracı (Roche)

kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda transfekte edilmiş ve 12-14 saat sonra imonoflorişil mikroskopi yoluyla analiz edilmiştir.

Akış sitometrisi

5

Akış sitometrisiyle yapılan ölçümler, bilinen yöntemlerle yapılmıştır (örneğin Robinson (Editor) Akış Sitometri Yöntemleri El Kitabı (*Handbook of flow cytometry methods*). Wiley-Liss, New York, 1993).

10 Örnek 1: Claudin 18A1 ve claudin 18A2 bağlantı değişkelerinin kanserde diagnostik ve terapötik hedef olarak tanımlanması

Claudin 18 geni, 4 hidrofob alanla bir yüzey membran molekülünü kodlar. Claudin 18, prediksyon programları (TMHMM, TMPred) ve bu familyanın
15 birçok üyesi için tanımlanan topolojiye göre hücre dışı konumları (konformasyon 1) Şekil 2'de gösterilen dört trans membran ve bunlarla birlikte iki hücre dışı EX1 ve EX 2 domaine sahiptir. Her iki hücre dışı epitop arasında konumlanan D3 domaini, literatürde claudin 18 ve bu familyanın diğer üyeleri için hücre içi olarak tanımlanmış olup alışlagelmiş prediksyon programlarında da bu şekilde
20 öngörülür. N ve C uçları hücre içindedir. Niimi ve çalışma arkadaşları (Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001), fare ve insan kaynaklı claudin 18 geninin selektif olarak akciğer dokusunda (claudin 18A1) ve mide dokusunda (claudin 18A2) ifadelendirilmiş olarak tanımlanan iki bağlantı değişkenini tanımlamıştır. Bu değişkenler, N ucunda farklılaşmaktadır.

25

Buluşa göre, Claudin 18A2 (SEQ ID NO:7) ve claudin 18A1 (SEQ ID NO:117) bağlantı değişkenleri ile bunların ayrı ayrı translasyon ürünlerinin (SEQ ID NO: 16 ve 118) tümörler açısından hangi derecede işaretleyici ve terapötik hedef yapısı olarak kullanılabileceği araştırılmıştır. Her iki değişkeni birbirinden ayırabilen,
30 A1 spesifik (SEQ ID NO: 109,110) veya A2 spesifik / SEQ ID NO: 107,108)

primer çiftlerin seçildiği niceliksel bir PCR oluşturulmuştur. A2 bağlantı değişkeni, ilaveten ikinci bir primer çift ile konvansiyonel bir PCR'de (SEQ ID NO: 39,40) test edilmiştir. A1 değişkeninin sadece sağlıklı akciğer dokusunda aktif olduğu belirtilmiştir. Ancak, buluşa göre, tarafımızca ulaşılan şaşırtıcı bir sonuç, A1 değişkeninin mide mukozasında da aktif olduğunu göstermiştir (Şekil 3). Mide ve akciğer, önemli derecede bir faaliyetin görüldüğü yegane normal dokulardır. Tüm diğer normal dokular, claudin A1 için negatif sonuç vermektedir. Tümörlerin incelenmesinde claudin A1'in birçok tümör dokusunda yoğun bir şekilde faal olduğu görülmüştür ki bu da şaşırtıcı bir sonuçtur. Özellikle yoğun bir ifadelendirme, mide, akciğer, pankreas, yemek borusu (şekil 3), kulak-burun-boğaz ve prostat tümörlerinde görülmektedir. Claudin A1'in kulak-burun-boğaz, prostat, pankreas ve yemek borusu tümörlerindeki ifadelendirme düzeyi, bunlara karşılık gelen normal dokulardaki düzeye oranla 100-10.000 kat daha fazladır. Claudin A2 bağlantı değişkenlerinin incelenmesi için bu transkriptin amplifikasyonuna spesifik olan oligonükleotitler kullanılmıştır (SEQ ID NO: 39, 40 veya 107, 108). İnceleme sonucunda A2 bağlantı değişkeninin incelenen 20 normal doku içinde sadece mide mukozasında ve çok az miktarda testis dokusunda ifadelendirildiği saptanmıştır (şekil 4). Değişken A1 gibi değişken A2'nin de bir çok tümörde faal olduğu tarafımızca saptanmıştır (şekil 4). Mide, pankreas, yemek borusu ve karaciğer tümörleri bu kapsamdadır. Sağlıklı akciğerde claudin 18A2'nin faal olduğuna ilişkin bir kanıt bulunmamış olmasına karşın akciğer tümörlerinden bir kısmında şaşırtıcı bir şekilde A2 bağlantı değişkeninin ifadelendirildiği tespit edilmiştir.

Tablo 1A. Claudin18A2'nin normal ve tümör dokularında ifadesi

Normal Doku	İfade
Beyin	-
Beyincik	-

Kalp kası	-
İskelet kası	-
Döl yatağı iç zarı	-
Mide	+++
Kolon	-
Pankreas	-
Böbrek	-
Karaciğer	-
Testis (Erbezleri)	+
Salgı bezi	-
Göğüs	-
Yumurtalık	-
Döl yatağı	-
Deri	-
Akciğer	-
Tiroit bezi	-
Lenf boğumları	-
Dalak	-
Tek çekirdekli periferik kan hücreleri	-
Yemek borusu	-
Tümör tipi	İfade
Kolon	-
Pankreas	++

Yemek borusu	++
Mide	+++
Akciğer	++
Göğüs	-
Yumurtalık	-
Döl yatağı iç zarı	İncelenmedi
Kulan burun boğaz	++
Böbrek	-
Prostat	-

Tablo 1B. Claudin18A1'in normal ve tümör dokularında ifadesi

Normal doku	İfade
Beyin	-
Beyincik	-
Kalp kası	-
Kas	-
Döl yatağı iç zarı	-
Mide	+++
Kolon	-
Pankreas	-
Böbrek	-
Karaciğer	-
Testis	+

Boyun altı bezi	-
Göğüs	-
Yumurtalık	-
Döl yatağı	-
Deri	-
Akciğer	+++
Tiroit bezi	-
Lenf boğumları	-
Dalak	-
Tek çekirdekli periferik kan hücreleri	-
Yemek borusu	-

Tümör tipi	İfade
Kolon	-
Pankreas	++
Yemek borusu	++
Mide	+++
Akciğer	++
Göğüs	+
Yumurtalık	İncelenmedi
Döl yatağı iç zarı	İncelenmedi
Kulak burun boğaz	++
Böbrek	-
Prostat	++

Konvansiyonel PCR yöntemi de bağımsız kontrol enstrümanı olarak niceliksel PCR araştırmasında alınan sonuçları teyit edici nitelikte olmuştur. Burada bağlantı değişkeni A2'nin spesifik amplifikasyonuna olanak veren oligonükleotitler (SEQ ID NO: 39,40) kullanılmıştır. Buluşa göre, mide tümörlerinin çoğunun ve test edilen pankreas tümörlerinin yarısının yoğun bir şekilde bu bağlantı değişkeninin ifadesini gösterdikleri kanıtlanmıştır (Şekil 1). Buna karşılık konvansiyonel PCR yöntemiyle diğer dokularda bir ifadelendirme olduğuna ilişkin bir kanıt getirilememiştir. Özellikle akciğer, karaciğer, kan, lenf boğumları, göğüs ve böbrek dokuları gibi önemli normal dokularda herhangi bir ifadelendirme olmamaktadır (Tablo 1). Burada, buluşa göre, bağlantı değişkenleri, üst gastrointestinal sistem, akciğer, kulak-burun-boğaz, prostat tümörleri ve bunların metastazları için yüksek derecede spesifik moleküler işaretçiler göstermektedir. Bu moleküler işaretçiler, buluşa göre tümör hücrelerinin kanıtlanması için kullanılabilir. Tümörlerin tespit edilmesi, buluşa göre, anılan oligonükleotitlerle (SEQ ID NO: 39,40, 107-110) yapılabilir. Oligonükleotit olarak özellikle en az birinin bağlayıcı koşullar altında transkriptin 180 baz çift uzunluğunda olan ve bağlantı değişkenlerinden biri (SEQ ID NO: 8) veya diğeri (SEQ ID NO: 119) için spesifik olan kısmına bağlanan primer çiftleri uygundur.

Bu gen ürünleri, toksisite bağlantılı organlarda yokluğunda herhangi bir yan etkinin beklenmediği, buna karşılık anılan kanser türlerindeki hücrelerde bunlara iyi bir bağlantı yapması ve hücreye zarar verici ilgili etkileri göstermesi beklenen cazip aktif terapötik hedef yapılarıdır.

Bu verilerin protein düzeyinde teyit edilmesi için claudin spesifik antikorlar veya bağışıklık serumları, hayvanların bağışıklaştırılması yoluyla üretilmiştir.

N uçlu hücre dışı domain EX1, dizilimde her iki A1 ve A2 bağlantı değişkenlerinde (A1 için SEQ ID NO:111 ve A2 için SEQ ID NO: 112) farklılaşmaktadır. C uçlu hücre dışı domain EX2, her iki değişken için benzeşiktir

(SEQ ID NO: 137). Şu ana kadar claudin 18'in hücre dışı domainlerine bağlanan hiçbir antikor tanımlanmamıştır. Şu ana kadar spesifik olarak A1 ve A2 değişkenlerini ayırt edebilen hiçbir antikor da tanımlanmış değildir. Buluşa göre, bağışıklaştırma için antikor üretimine yönelik olarak spesifik olan A1 veya A2
5 değişkenleri için olan, diğer bir deyişle her iki değişkende de bulunan hücre dışında konumlanmış peptit epiptoplar ve protein fragmanları seçilmiştir. Diğerleri yanında aşağıda belirtilen peptitler de bağışıklaştırma amaçlı olarak antikor üretimi için seçilmiştir:

10 SEQ ID NO: 17: DQWSTQDLYN (N uçlu hücre dışı domain, A2 spesifik, bağlantı glikosilasyondan bağımsız)

SEQ ID NO: 18: NNPVTAVFNYQ (N uçlu hücre dışı domain, A2 spesifik, bağlantı esas itibariyle glikosile olmayan forma, N37)

15 SEQ ID NO: 113: STQDLYNNPVTAVF (N uçlu hücre dışı domain, A2 spesifik, bağlantı sadece glikosile olmayan forma, N37)

20 SEQ ID NO: 114: DMWSTQDLYDNP (N uçlu hücre dışı domain, A1 spesifik)

SEQ ID NO: 115: CRPYFTILGLPA (N uçlu hücre dışı domain, esas itibariyle A1 için spesifik)

25 SEQ ID NO: 116: TNFWMSTANMYTG (C uçlu hücre dışı domain, A1 ve A2'yi tanıır)

Tarafımızca diğerleri yanında seçimlik olarak bağlantı değişkeni claudin 18A1'in N uçlu domainlerini tanıyan, ancak A2 değişkenini (şekil 8) tanımayan antikorlar
30 da üretilebilmiştir. Bağışıklaştırma için her iki bağlantı değişkenlerinde benzeşik

olan C uçlu hücre dışı domainlerde bulunan epitopları kullanarak her iki değişkeni tanıyan antikorları da üretmeyi başardık (Şekil 7).

Örnek olarak SEQ ID NO: 17 ile bağışıklık yapılarak üretilen bir A2'ye spesifik antikorla ilgili veriler gösterilmiştir. Spesifik antikor, çeşitli fiksasyon koşullarında imunoflorışıl incelemesi için kullanılır. İlgili protein, RT PCR pozitif ve negatif hücre dizilerinin kıyaslamalı boyanması ile kanıtlanabilir uygun bir miktarda spesifik olarak, diğerleri yanında pozitif olarak tiplendirilmiş mide tümörü, yemek borusu tümörü ve pankreas tümörü hücre dizilerinde belirlenebilir durumdadır (Şekil 5). Endojen protein, membran konumlu olup membran üzerinde büyük fokal agregatlar oluşturur (Şekil 5). Bu antikorla insan dokularında immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Bu proteinin seçimlik doku dağıtımı da tarafımızca teyit edilmiştir. Çok çeşitli normal dokuları kapsayan geniş kapsamlı bir yelpazede doku incelemesi yapılmış, karaciğer, akciğer, böbrek ve kolon için açıklandığı gibi hemen hemen hiçbirinde claudin 18A2 proteininin varlığı kanıtlanamamıştır. Bu proteinin sadece normal mide dokusunda aktive olduğunu tespit ettik (Şekil 2). Şaşırtıcı bir şekilde claudin 18'in A2 değişkeninin mide mukozasının farklılaşmış hücrelerinde kanıtlanabilir olduğunu, ancak kök hücrelerinde kanıtlanabilir olmadığını gördük. Farklılaşmış mide mukozası hücreleri, sürekli yenilenen hücrelerdir. Tüm mide epitelyumu fizyolojik olarak mide kök hücrelerinden kaynaklı bir yenilenme ile sürekli olarak ikame edilir. Bu, mide mukozasının vazgeçilmez hücre popülasyonunu olarak mide kök hücrelerinin, tüm diğer sağlıklı organlarda olduğu gibi, A2 değişkenini taşımadıklarını ve bu nedenle bu hücrelerin spesifik olarak A2 değişkenine yönlendirilmiş bir madde tarafından saldırıya uğrama ihtimalleri olmadığını buluş kapsamında kanıtlamış olmamız nedeniyle A2 değişkeninin terapötik hedef yapısı olarak kullanılma niteliğini destekler. Bir dizi insan tümöründe, özellikle daha önce RT PCR incelemesinde dikkatimizi çeken mide, yemek borusu ve akciğer tümörlerinde bu antikor vasıtasıyla claudin 18'in A2 değişkeninin varlığını kanıtladık (Şekil 13). Buluşa göre bu tümörler terapötik yaklaşıma açıktır.

Yukarıda tanımlanan antikor, bunun yanı sıra protein kanıtına yönelik olarak western blotlamaya tabi tutulmuştur. Protein, beklentiyle uyumlu şekilde, sadece A1 değişkeninin aktive olduğu akciğer dahil olmak üzere mide dışında başka hiçbir normal dokuda tespit edilmemiştir (Şekil 9). Hastalardan alınan mide tümörleri ve bitişik normal mide dokularının kıyaslamalı boyama işleminde 5 şaşırtıcı bir şekilde bu proteinin, claudin 18A2 tespit edilen tüm mide tümörlerinde daha az kitle ağırlığına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 10, solda). Bir seri deney sonucunda, buluşa göre, normal mide dokusu lizatının deglikosile edici amil PNGase F ile işleme tabi tutulduğunda bu seviyede bir gruhun 10 oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 10, sağda). Tüm normal mide dokularında A2 değişkeninin sadece glikosile formu kanıtlanabiliyorken, aynı A2 incelenen mide tümörlerinin % 60'ından fazlasında ve sadece deglikosile formda kanıtlanmaktadır. Claudin 18'in A2 değişkeninin normal akciğerde protein seviyesinde tespit edilmemesine karşın daha önce niceliksel RT PCR işleminde de 15 gösterildiği gibi akciğer tümörlerinde bulunmaktadır. Burada tespit edilen de sadece deglikosile değişkendir (Şekil 11).

Claudin 18'in kendisi, midenin (değişken A2) veya akciğer ve midenin (değişken A1) yüksek selektif bir farklılaşma antijenidir. Elde ettiğimiz veriler, 20 glikosilasyon mekanizmasında tümörle bağlantılı meydana gelen değişmelerden açıkça etkilendiğini ve tümörlerde A2 değişkeninin deglikosile olan özel bir formunun oluştuğunu göstermektedir. PNGase F işleminin sonuçları claudin 18A2'nin tümör ve normal dokularda N glikosilasyon özelliği açısından farklılaştığını göstermektedir.

25

Bir epitopun glikosilasyonu, bu epitop için spesifik olan bir antikorun bağlanmasını önleyebilir ve mevcut somut durumda böyle bir antikorun normal dokulardaki claudin 18A2'ye değil de özel olarak kanser hücrelerindeki glisolie olmayan formuna bağlanmasını destekliyor olabilir. Bu nokta, özel olarak 30 glikosile olmayan epitoplara bağlanan, buluşa göre antikorların üretilmesi için

imunojen seçiminde dikkate alınmıştır. Buluşa göre, Claudin 18A2'de tümör ve normal dokularda farklı glikosile şekilde bulunabilen çeşitli bölgeler tespit ettik. Claudin 18A2 için potansiyel glikosilasyon noktaları olarak, diğerleri yanında, claudin 18A2'nin 37, 38, 45, 116, 141, 146, 205 amino asitlerini kapsayan

5 bölgeleri tespit ettik (Şekil 2 altta). Buluşa göre, tümör hücreleri ve normal dokular, bu pozisyonların birinde veya birkaçında farklı bir glikosilasyon ile farklılaşmaktadır. Bu alanların çoğu, klasik anlamda glikosilasyon noktalarını temsil etmemekte, ancak nadir durumlarda glikosile de olabilen asparagin, serin ve treonin içermektedir (Prediksiyon, Şekil 2 altta). Claudin 18'in her iki

10 değişkeni, D3 domaininde literatürde ve ilgili yaygın olarak kullanılan prediksiyon algoritmalarında hücre içi olarak bilinen tek bir glikosilasyon motifine sahiptir. Ancak yapısal olarak Claudin 18'e benzeyen tetraspanin, yani PMP22'de PMP 22'nin hidrofor 2 ve 3 membran domainlerinin tamamıyla hücre membranı içinden geçmediği, ancak sadece kısmi olarak plazma membranına

15 girdiğini kanıtlamak mümkün olmuştur (Taylor et al., J Neurosc. Res. 62:15-27, 2000). Bu nedenle PMP22'de iki dış trans membran domainleri arasındaki tüm alan hücre dışında konumlanmıştır.

Claudin 18A2 için bu tür bir topoloji olasılığından yola çıkarak bir hipotez

20 oluşturduk ve kontrol ettik. Bunun için her birinde EX1, EX2 veya D3 domainlerinden birinde (His veya HA Tag olarak) bir işaretleyici dizilim taşıyan 3 yapı oluşturduk (Şekil 15, üstte). Bunları hücre dizilerinde transfeksiyona tabi tuttuk ve daha sonra bu işaretçi dizilimlere karşı yönlendirilen bir antikorun permeabilite olmayan hücrelere bağlanıp bağlanmadığını test ettik ki bu, proteinin

25 ilgili alanının topolojik açıdan hücre dışı olmasını gerektirmektedir. Moleküldeki üç alanın hepsinin akış zitometrisinde hücre dışı olarak ölçülmüş olması nedeniyle (şekil 15 altta) claudin 18A2'nin iki trans membran domain ve hücre dışında konumlu büyük bir domainli konformasyon içinde bulunabileceğini teyit ettik (Şekil 2, Konformasyon 2). Bu konformasyon, biyokimyasal ve terapötik açıdan

önemlidir, çünkü terapötik antikorlar (SEQ ID NO: 142,143) için ilave bağlantı noktaları içermektedir.

5 Buluşa göre ve tercihen, claudin 18A2'nin glikosile olan ve glikosile olmayan değişkenlerini ayırt edebilen antikorlar üretilebilir. Bunlar, tümör hücrelerine özellikle yüksek spesifitesi olan antikorlardır. Glikosilasyona spesifik antikorların üretiminde glikosilasyon domainleri yanında bu farklı konformasyon opsiyonlarını da dikkate aldık.

10 Claudin 18A2'nin D3 bölgesi protein fragmanları, tercihen hayvanların bağışıklştırılması için uygundur, ancak sadece bu işleme münhasır değildir. İki antikor, mAB1 ve mAB2, bu konuda örnek olarak gösterilmektedir (Şekil 17). Bu antikorların claudin 18'in A1 veya A2 değişkenini ifade eden hücrelere bağlanma özelliklerini inceledik. Claudin 18A2'nin hücre yüzeyindeki antikorlar için 15 yaklaşılr olduğunu gösterdik. Buluşa göre, bu tür antikorlar, A2 değişkenine spesifik olup A1 değişkenine bağlanmamaktadır (Şekil 17). Ex1 ve Ex2 hücre dışı domain alanlarının içine ayrı ayrı kısa yabancı dizilimler yerleştirdik (Şekil 43). mAB1 örnek olarak alınarak antikorum bağlanım özelliklerinin bundan etkilenmediği ve asıl epitopun D3 domaininde bulunduğu gösterilmiştir. Üretilen 20 antikorlar, hem diyagnostik hem de terapötik amaçlı olarak kullanılabilir. Burada tanımlananlar gibi olan immo serumlar (SEQ ID NO: 17 peptite karşı), örneğin western blotlamada diyagnostik amaçla kullanılabilir.

Buluşa göre, bu bölgelerden en az birini içeren peptitlerle (örneğin peptit SEQ ID 25 NO: 113 (Şekil 6), peptit SEQ ID NO: 142-145) bağışıklştırma yoluyla glikosile epitopa hiç bağlanmayan antikorlar üretilebilir. Buluşa göre, bu tür antikorlar, spesifik olarak tümör hücreleri üzerindeki deglikosile epitoplara bağlanır. Bu pozisyonlardan birinde normal dokulara kıyasla eksik olan glikosilasyon, tümör hücrelerinde endojen ve ikincil bir deglikosilasyona bağlı olabilir. Bu tür bir 30 deglikosilasyon, ilgili aminoasidin Asn (N)→ Asp (D) transformasyonu ile

bağlantılıdır. Bu nedenle bu tür tümörle bağlantılı değişmiş değişkenlere karşı antikor üretilmesi için Asn (N) amino asidinin claudin 18A2'nin 37, 38,45, 116, 141, 146, 205 pozisyonlarından en az birinde Asp (D) ile ikame edildiği, buluşa göre claudin 18A2 türevli peptitler kullanılabilir (örneğin SEQ ID NO: 146-150).

- 5 Tümör hücrelerine yüksek derecede selektif olmaları nedeniyle bu tür antikorlar, özellikle terapötik amaçlarla kullanılabilir. Üretilen antikorlar, doğrudan kimera nitelikli veya insanileştirilmiş rekombinan antikorların kullanımı için de kullanılabilir. Bu, doğrudan tavşanlardan alınan antikorlarla da yapılabilir (bu konuda bkz. J Biol Chem. 2000 May 5;275(18):13668-76 von Rader C, Ritter G,
- 10 Nathan S, Elia M, Gout I, Jungbluth AA, Cohen LS, Welt S, Old LJ, Barbas CF 3rd. Terapötik insan antikor üretilmesi için yeni bir kaynak olarak tavşan antikor dağarcığı ("*The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies*"). Bunun için bağışıklatırılmış hayvanlardan lenfosit alınarak muhafaza edilmiştir. 1-47 aminoasitler (SEQ ID NO :19 ve 120),
- 15 aşılama veya antijenlere spesifik T lenfositlerin adoptif transferi gibi immunoterapötik yöntemler için de özellikle yararlı epitop sağlar.

DİZİ LİSTESİ

	<110> Ganymed Pharmaceuticals AG	
5	<120> Tümörlerde diferansiyel olarak ifade edilen gen ürünleri ve kullanımları	
	<130> 342-23 EPT1	
	<150> DE 10 2004 024 617.3	
	<151> 2004-05-18	
	<160> 32	
10	<170> PatentIn versiyonu 3.1	
	<210> 7	
	<211> 786	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 7	
	atgggcaatgga ctgcaatctca gggcttggga ttgttggttt taattatttg gattggagga	60
	ttcatctctg ccaattgcat gggcaagtgg agggcacaag acttctacaa caacacagca	120
	aaagctgttt caaatatca ggggtgtgg ttgtctgttg tctggagag ctctgggttc	180
	acacattaac gggctatctt ccaattgata ttgattctatg caatcttcaa ggcattggga	240
	ggcctaatga ttgttaggat ttgtctgggt acattatgac ttatggata catctttgac	300
	ttgcaatgaa ttggataga caggaatggg gattctacaa aagcaaacat gacattgac	360
	tttccggaca ttgtcaatga ctcaagttct ttgtgcaattg ctggagtgta ttgtttatga	420
	tttatgtggt ttgtctactt ctggatggaa aaggtatcct ttctctctca ctatggtggg	480

	atgggtggaga atgttcaaac aaatataaca attatgttga atgtgtttat aggttgggtt	540
	gttgaagaaa taactatcat tgggtgtgtg atgattggga tggattgggt gggattggga	600
	caatcagaaa aaactatata aggtgtttat tttctctctt caagcaaatg ttttgcctac	660
	aaatctggag gatttaagga caactatga ttgtgtttaa aaactatata aaactatata	720
	tatgtatggag gttgtctaac aggtgacag gtactatct atctctctaa gaaatctat	780
	actaa	785
	<210> 8	
	<211> 180	
5	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
	ttatcaaaa tgggtgtgt tgggtatag ggttgggtt tgggtttt actatttgg	60
	attggggga taattgtgt caattgatt gactatgga gaactaaga attctatga	120
	aaactatga caattgttt caactatga ggtgttga gttcttgtt caagagagga	180
	<210> 16	
10	<211> 261	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 16	
	Met Ala Val Thr Ala Tyr Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile	
	5 10 15	
	Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Tyr Met Asp Gln Trp Ser Thr	
	20 25 30	
	Ile Asp Leu Tyr Gln Asn Phe Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly	
	35 40 45	
	Leu Trp Arg Ser Tyr Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Gln Cys Arg	
	50 55 60	

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Phe Ala Met Leu Glu Ala Val Arg
 81 90 95 99

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
 99 103 107 111 115

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Lys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Val
 115 119 123 127

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
 119 123 127 131

Gly Leu Tyr Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 135 139 143 147

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly
 147 151 155 159

Met Val Glu Ser Val Gly Thr Asn Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 159 163 167 171

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Ser Met
 169 173 177 181

Lys Ile Ala Lys Arg Gly Leu Ala Thr Glu Val Thr Asn Tyr Lys Ala
 185 189 193 197

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Phe Gly Gly
 199 203 207 211

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 219 223 227 231 235 239

Thr Asn Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asn Glu Val Glu Ser Tyr Phe Ser
 239 243 247 251

Lys His Asn Tyr Val
 259

<210> 17

<211> 10

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17
 Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn
 5 10
 <210> 18
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Glu
 5 10
 <210> 19
 10 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Met Ala Val Thr Ala Tyr Gln Gly Ser Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
 5 10 15
 Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Tyr Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20 25 30
 Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Glu
 35 40 45
 15 <210> 39
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Yapay dizi
 <220>
 20 <223> Yapay dizi açıklaması: Oligonükleotit
 <400> 39
 gggtcgtggt ttactgatt gggattgc 28
 <210> 40
 <211> 27

	<212> DNA	
	<213> Yapay dizi	
	<220>	
	<223> Yapay dizi açıklaması: Oligonükleotit	
5	<400> 40	
	cggcctttgta gttgggttct tctgggtg	27
	<210> 107	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Yapay dizi	
	<220>	
	<223> Yapay dizi açıklaması: Oligonükleotit	
	<400> 107	
	tgttttcaac taccaggggc	20
15	<210> 108	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Yapay dizi	
	<220>	
20	<223> Yapay dizi açıklaması: Oligonükleotit	
	<400> 108	
	tgttggtttt ggcagagtcc	20
	<210> 109	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> Yapay dizi	
	<220>	
	<223> Yapay dizi açıklaması: Oligonükleotit	
	<400> 109	
30	gaggcagagt tcaggttca ccga	24

<210> 110
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Yapay dizi
 5 <220>
 <223> Yapay dizi açıklaması: Oligonükleotit
 <400> 110
 tgttggttt ggcagagtc 20
 <210> 111
 10 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 111
 Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val
 1 5 10 15
 Thr Ser Val Phe Gln Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Asn Gln
 20 25 30
 Ser Ser Gly Phe Thr Gln Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu
 35 40 45
 Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 50 55
 15 <210> 112
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val
 1 5 10 15
 Phe Asp Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Ser
 20 25 30
 20 Phe Thr Gln Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met

	35	40	45
	Leu Glu Ala Val Asp		
	50		
	<210> 113		
	<211> 14		
5	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 113		
	Ser Thr Val Asp Leu Tyr Asn Asn Val Val Thr Ala Val Thr		
	1 5 10		
	<210> 114		
10	<211> 12		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 114		
	Asp Met Trp Ser Thr Glu Asp Leu Tyr Asp Asn Pro		
	1 5 10		
15	<210> 115		
	<211> 12		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 115		
20	Tyr Arg Thr Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala		
	1 5 10		
	<210> 116		
	<211> 13		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 116		
	Thr Asn Ser Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly		
	1 5 10		

	<210> 117	
	<211> 816	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 117	
	gcaaggatca agtacaacac cacatgaaa gtagtagggt tccctctgtc catctcggg	60
	ctggccaggt tctctggggc taccggcata gacatctga gacatcagga cactctangtc	120
	tacccatgta cctcagtggt ccagtcacaa gggctctggc ggaatctcat gaggacaggt	180
	tcaggcttca ccaactgag ggcctatttc acctctctgg gactctcaga catctctgag	240
	gtagtgagag cactgataat cgtaggcata gctctgggtg cacttggaat cctgtgtatcc	300
	atctcttgcc tcaatgcat ctgacttggc agcatctagg cctctctcaa agccacacat	360
	ccactgacat cccagatcat gctcattgtc ccaagtcttc gtctcactgc tggagtgtct	420
	gtgtctgcca acatcttgtt cactaacctc tggatctcca caactaacat gtacacgggc	480
	atggttggg tggctcagac tcttcagccc aggtacacat tctgtccaga cctgtctcgt	540
	tgtagatcca cgggaaggtt cacaataat agagatgaca taatctgcat cgtctacccg	600
	ggctggaac cagaaqaaa caactacaaa gacgtatctt acatagcata aggcacacgt	660
	cttaactaaa agccaggagg cctcaaggac agaatgggt tggagtcaca caacaaaaa	720
	aaqacatat ccatcaagg tgcctcaca caacacaga taatactta tctctccag	780
	tcagctatg cgtcctgttc caggactct cagcat	816
10	<210> 118	
	<211> 261	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	

<400> 118

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

Gly Ser Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
 20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asp Pro Val Thr Ser Val Pro Gln Tyr Gln Gly
 35 40 45

Ileu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Gln Tyr Arg
 50 55 60

Tyr Tyr Thr Thr Thr Thr Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80

Ala Leu Ser Ile Val Gly Ile Val Thr Gly Ala Ile Gly Leu Ile Val
 85 90 95

Leu Ile Pro Ala Leu Tyr Cys Ile Arg Thr Gly Ser Met Gln Asp Ser

100 115 130
 Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
 115 120 125
 Gly Leu Lys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140
 Thr Asp Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160
 Met Val Gly Ser Val His Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 165 170 175
 Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180 185 190
 Lys Ile Ala Lys Arg Gly Leu Ala Phe Gly His Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Asn Gly Gly
 210 215 220
 Ile Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Glu Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255
 Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 119

<211> 227

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 119

```

jettgggtta ttttcaatca caaatggaaa gttatggagt tttctctgtc zactctggag      60
ctggcgggat gcatggggaa caacgggagt gacatattca gacatongga catgtacgac    120
aatccttca cttctgtgtt ttatgtatga gggatctga qaxatggctt ggggacaa      180
tcaagctta caaatgga gacatattt accatctta caatctt

```

<210> 120

<211> 69

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

```

Met Ser Thr Thr Thr Tyr Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu      1
      5              10              15
Gly Leu Ala Gly Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr      21
      26              31              36
Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Gln Gly      42
      47              52              57
Leu Trp Asn Ser Cys Val Asn Gln Ser Ser Gly Thr Thr Gln Cys Arg      63
      68              73              78
Pro Tyr Phe Thr Ile
      83

```

<210> 137

10

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

```

Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr      1
      5              10              15
Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Lys Phe Gly      21
      26              31              36

```

15

<210> 142

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Leu Lys Lys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
20 25 30

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
35 40 45

Gly Leu Lys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Val
50 55 60

Leu Asn Phe Thr Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
65 70 75 80

Met Val Gly Thr Val Glu Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
85 90 95

Val Gly Thr Val Ala Gly Gly Leu Thr Asn Thr Gly Gly Val Met Met
100 105 110

Glu Ile Ala Lys
115

<210> 143

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Asn Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr
1 5 10 15

Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
20

<210> 144

<211> 8

5

10

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 144
 Ala Lys Ala Asp Met Thr Leu Thr

 5 <210> 145
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 145
 Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asp Met Thr Leu Thr Ser Gly
 10 5 10
 <210> 146
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 146
 Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asp Met Thr Leu Thr Ser Gly
 5 10
 <210> 147
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 147
 Ser Ala Lys Ala Asp Met Thr Leu Thr
 1 5
 <210> 148
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 148
 Ala Lys Ala Asp Met Thr Leu Thr Leu
 1

<210> 149

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 149

Asp Glu Trp Ser Thr Glu Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ala Val
1 5 10 15

Pro Asn Tyr Glu Gly Leu Trp Ala Leu Pys Val Arg His Ser Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Glu Tyr Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met
35 40 45

Leu Glu Ala Val Arg
50

<210> 150

<211> 14

<212> PRT

10

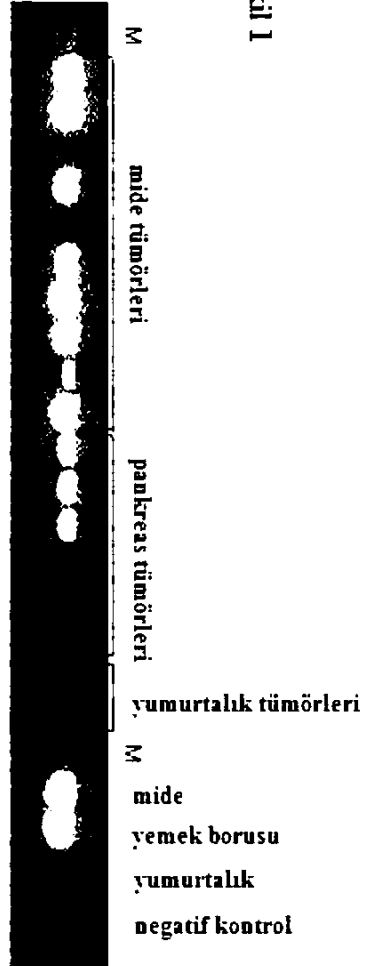
<213> Homo sapiens

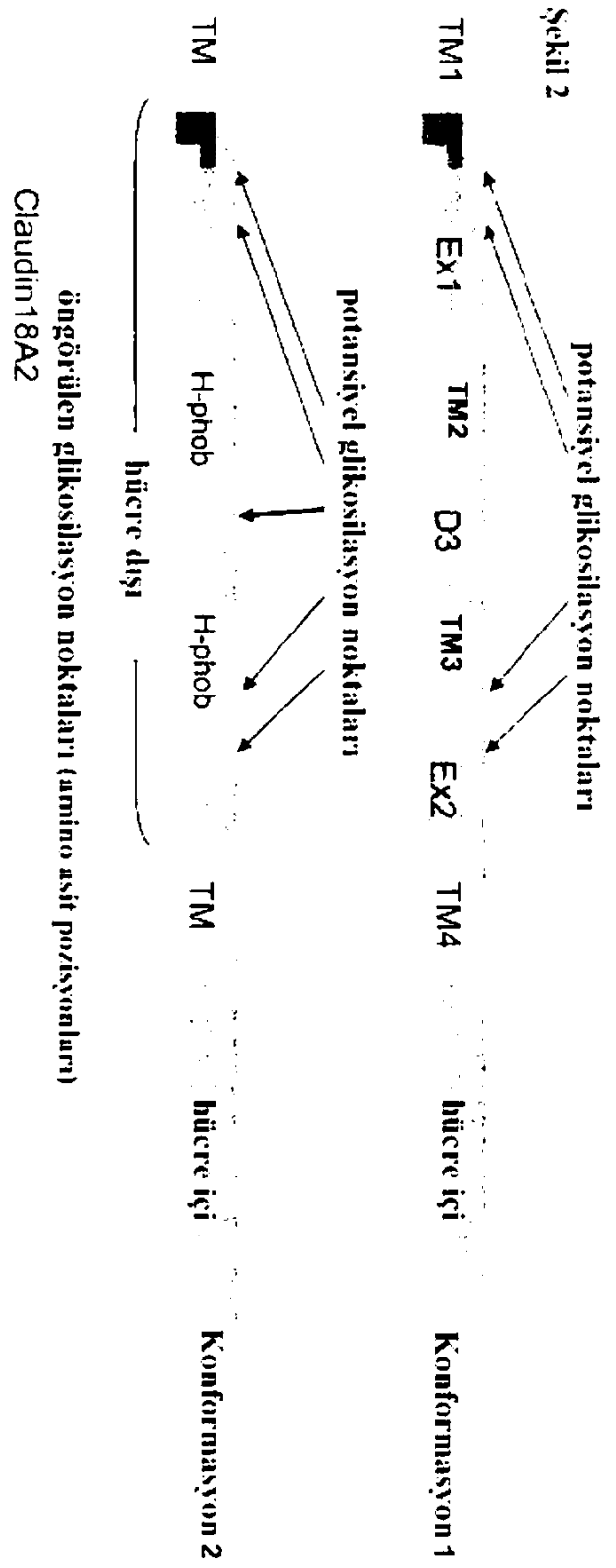
<400> 150

Leu Thr Glu Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
1 5 10

11

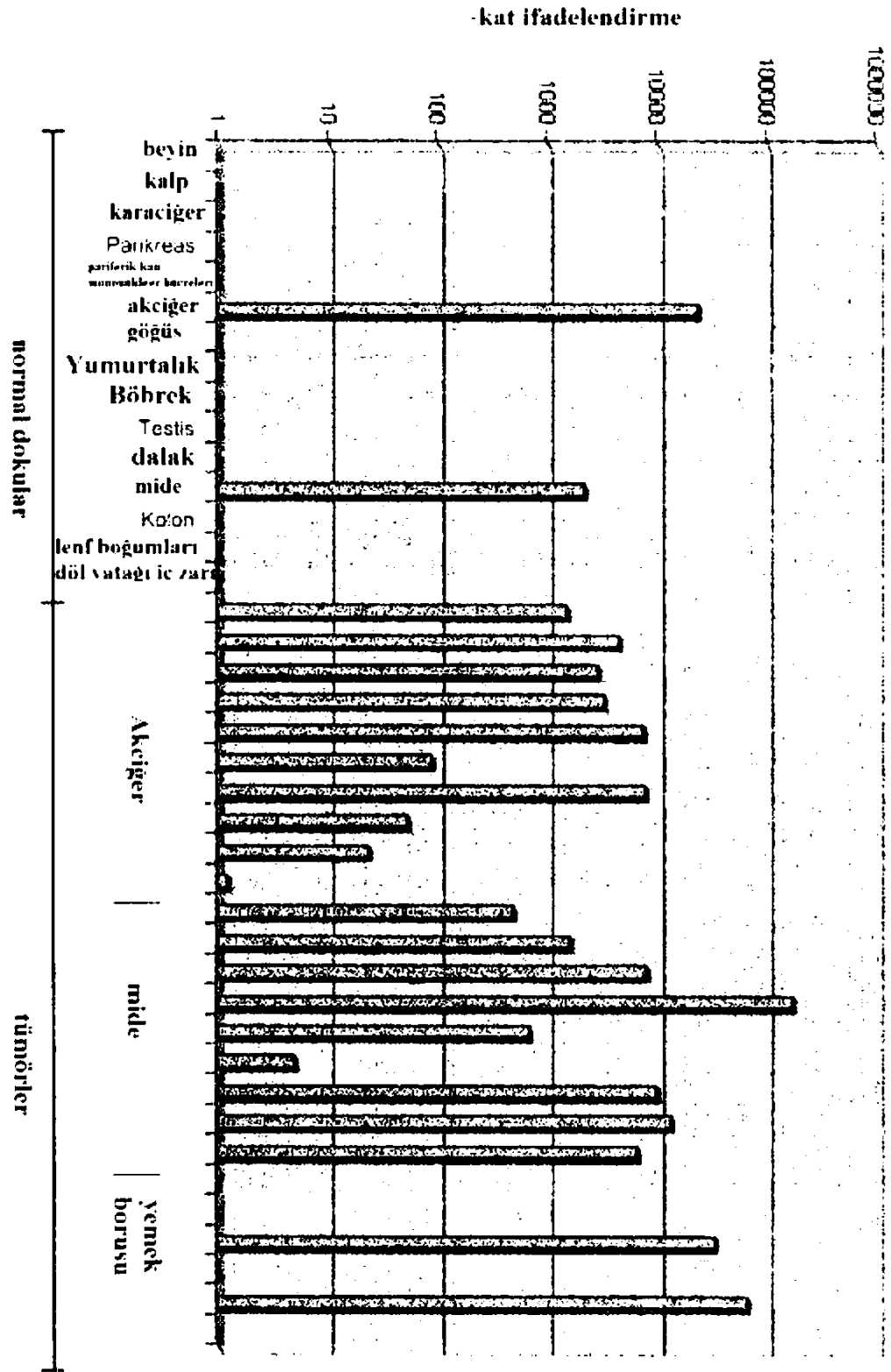
Şekil 1

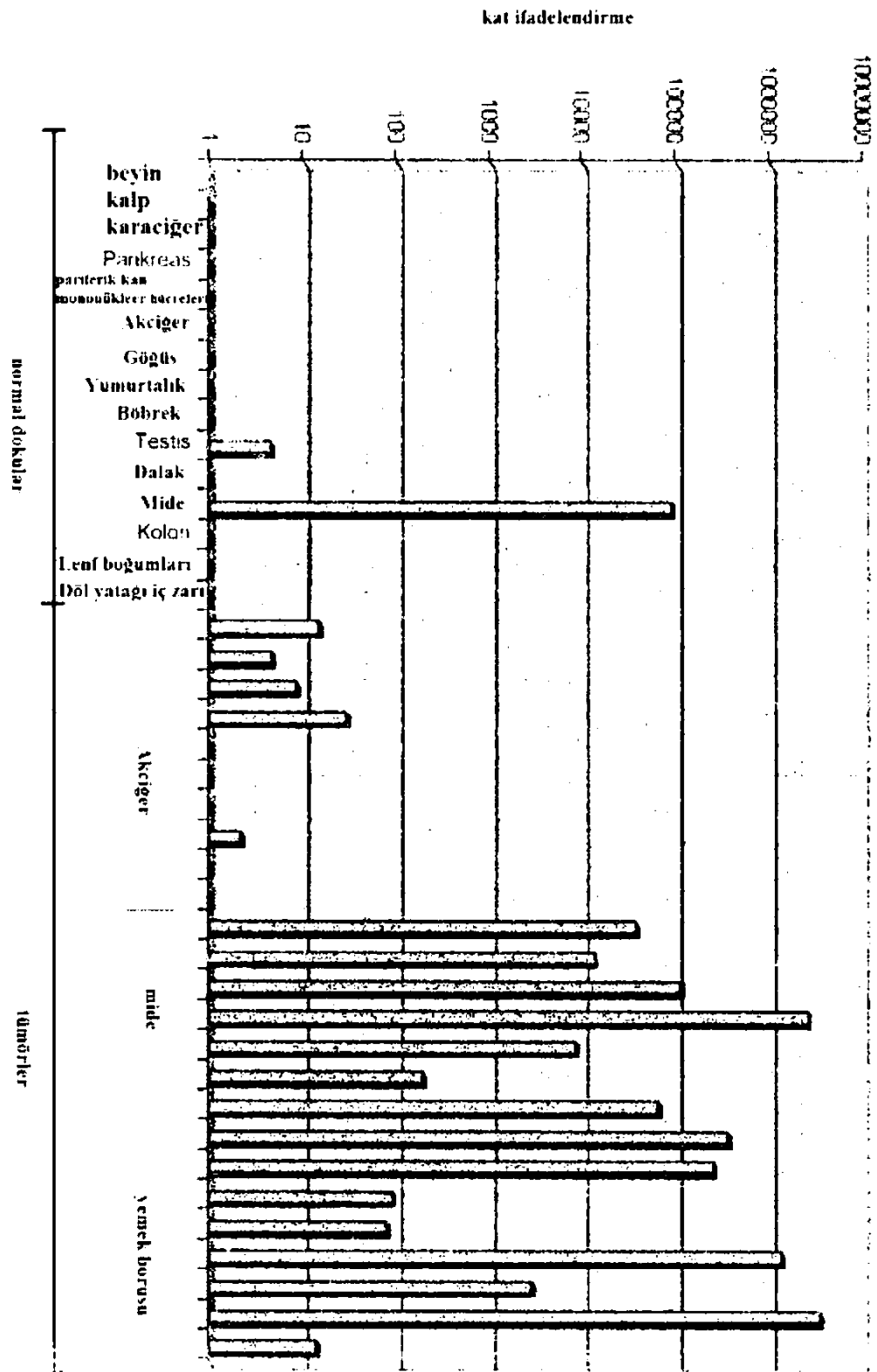




Seq Vd	Pozisyon	Glikosilasyon noktalarının derece listesi	Sonuç
Dizilim	37	0.7219 (9/9)	++
Dizilim	38	0.6502 (8/9)	+
Dizilim	45	0.6026 (8/9)	+
Dizilim	116	0.5713 (7/9)	+
Dizilim	141	0.6348 (7/9)	+
Dizilim	146	0.5187 (6/9)	+
Dizilim	153	0.4696 (5/9)	-
Dizilim	205	0.6011 (8/9)	+
Dizilim	234	0.3960 (8/9)	-
Dizilim	237	0.4602 (6/9)	-

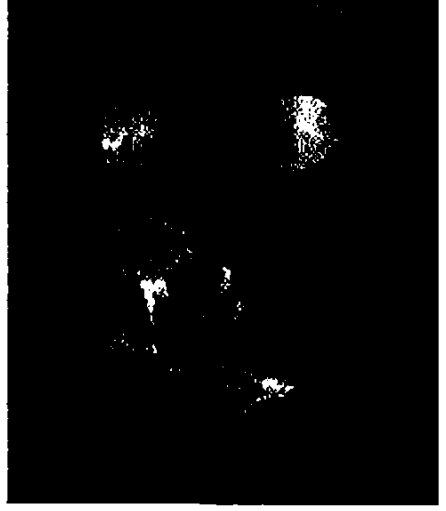
Şekil 3



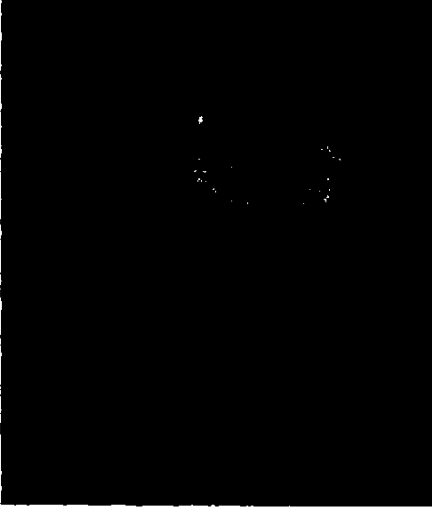


Şekil 4

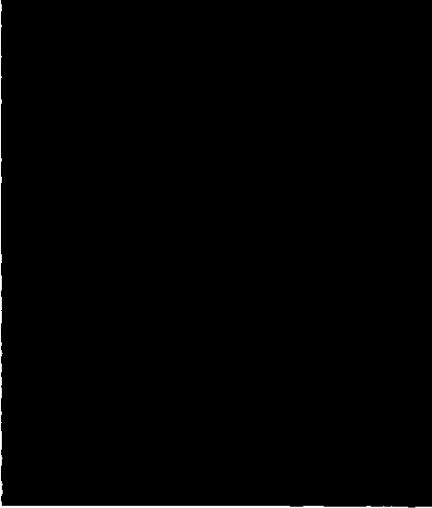
Şekil 5A



Şekil 5B



Şekil 5C



Şekil 5D





Şekil 6A

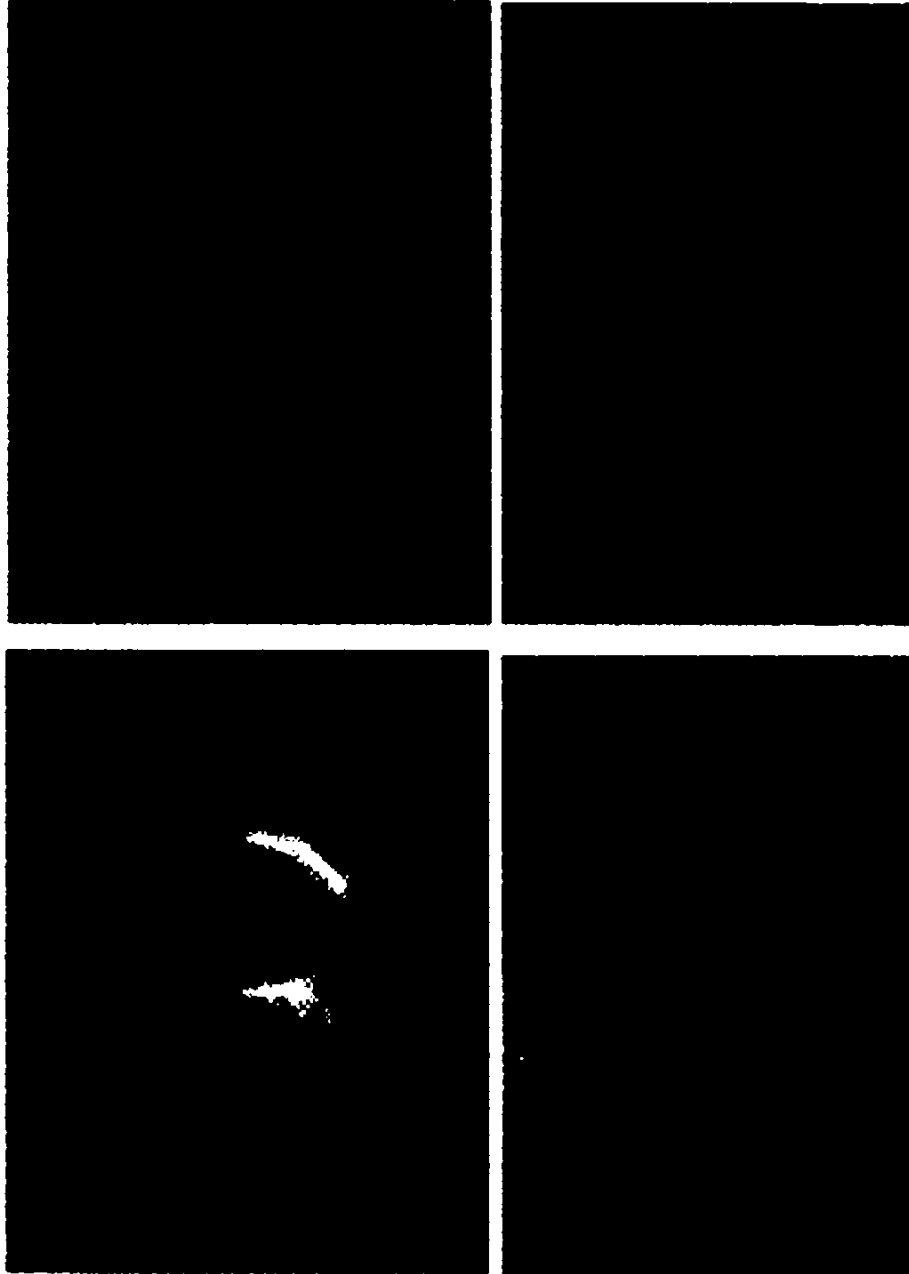


Şekil 6B

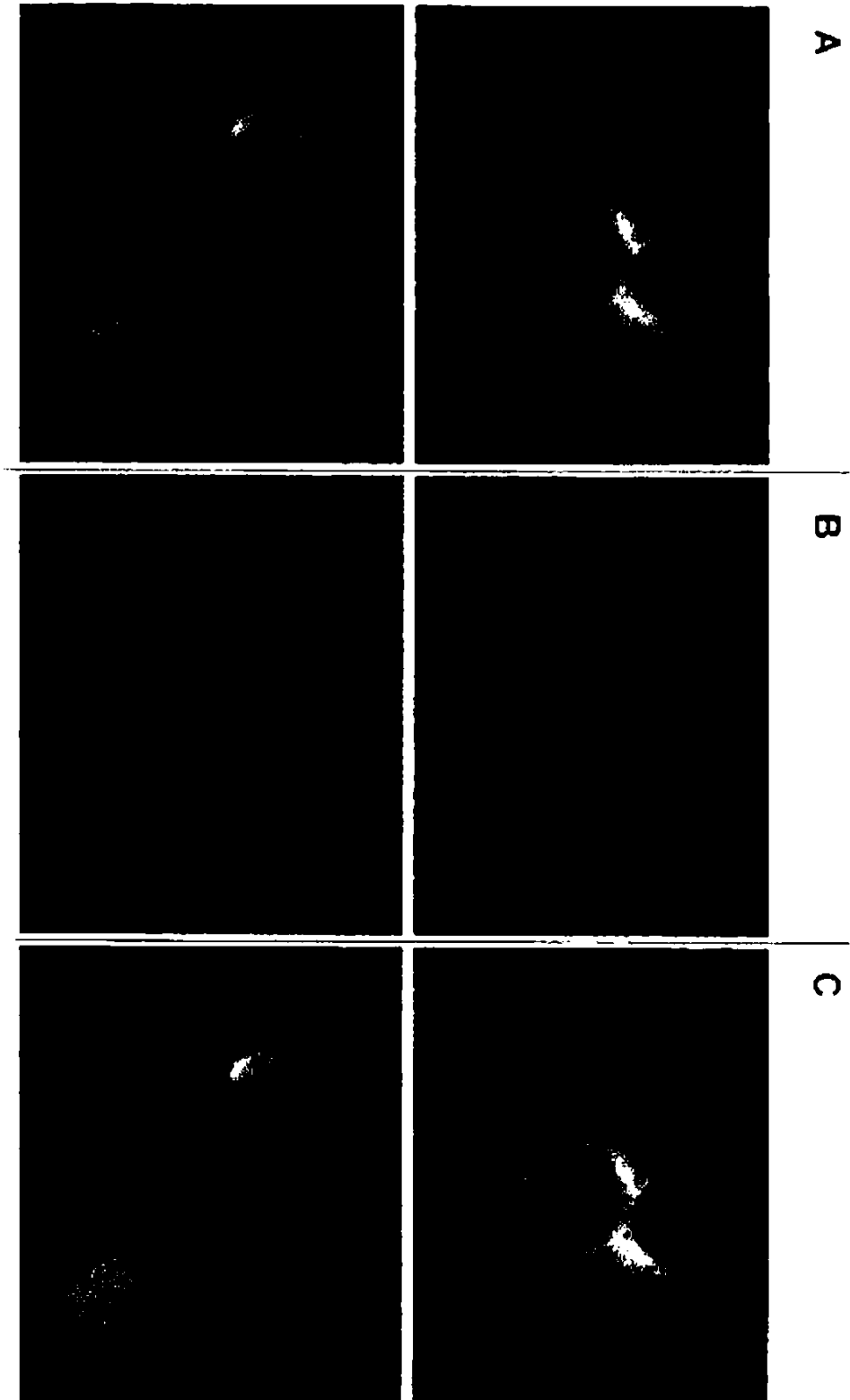


Şekil 6C

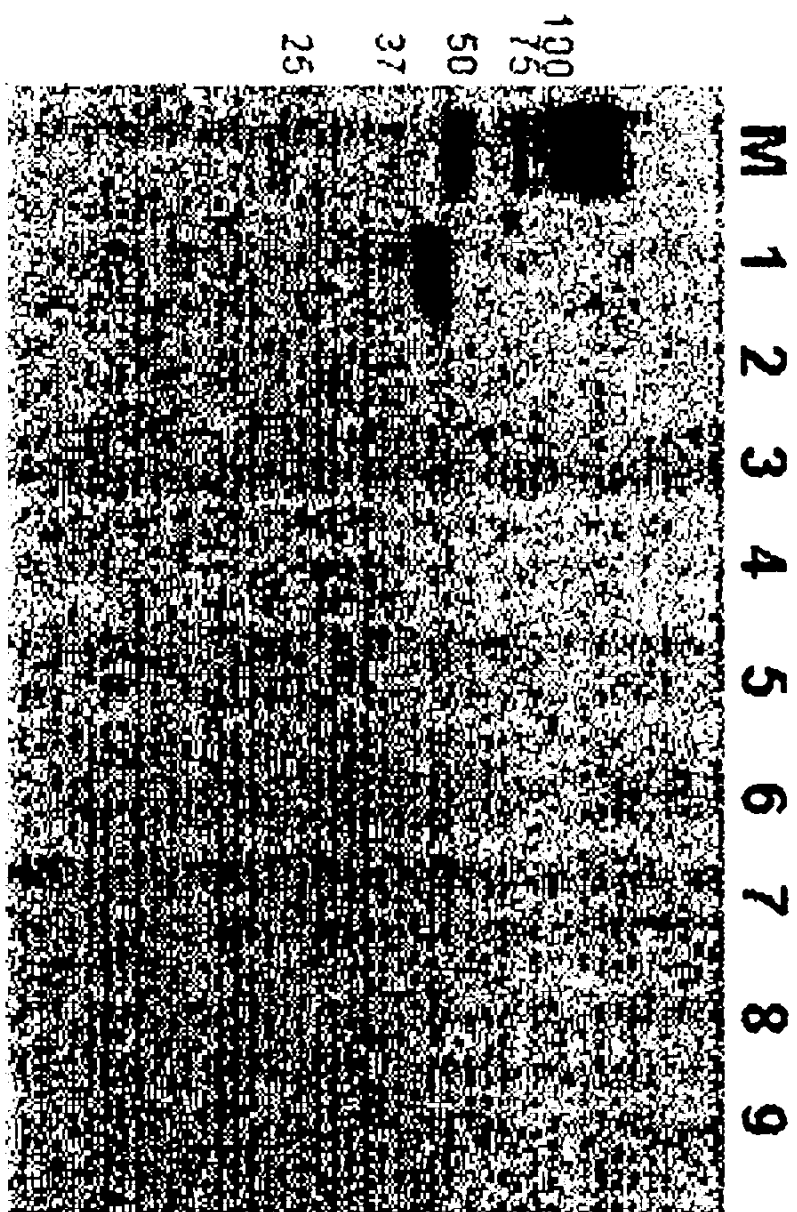
Şekil 7



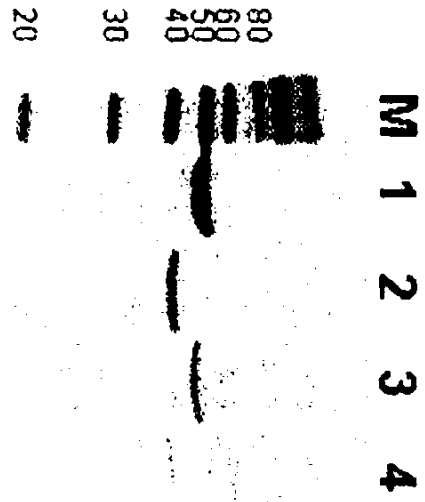
Şekil 8



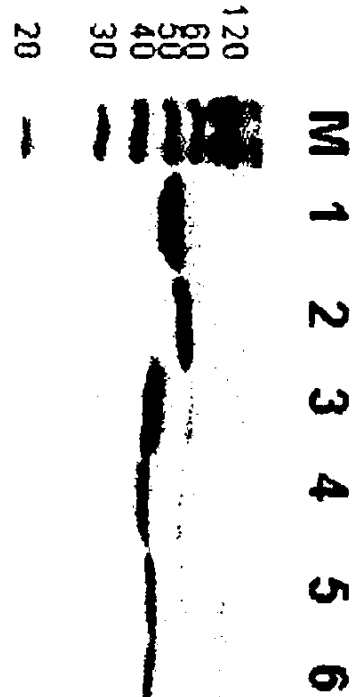
Şekil 9



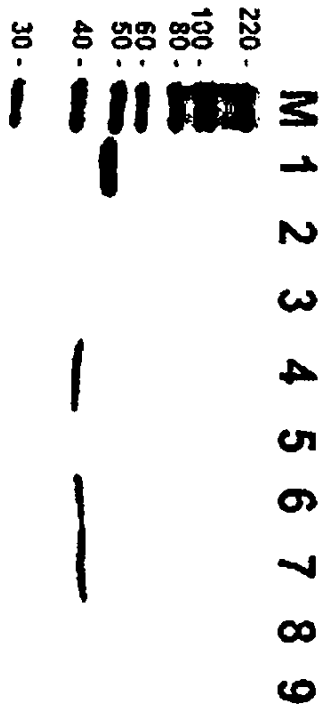
Şekil 10A



Şekil 10B



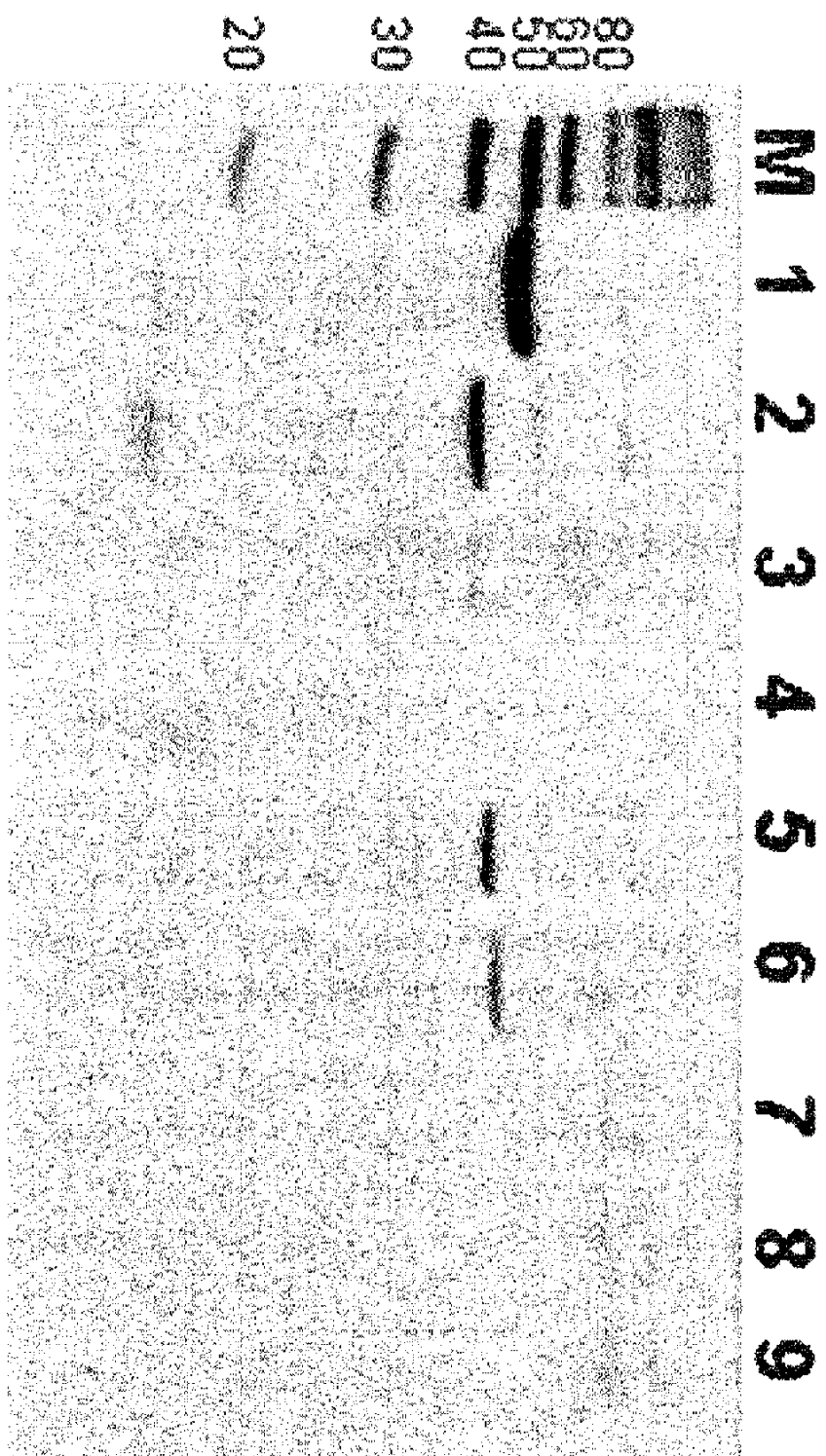
Şekil 10C



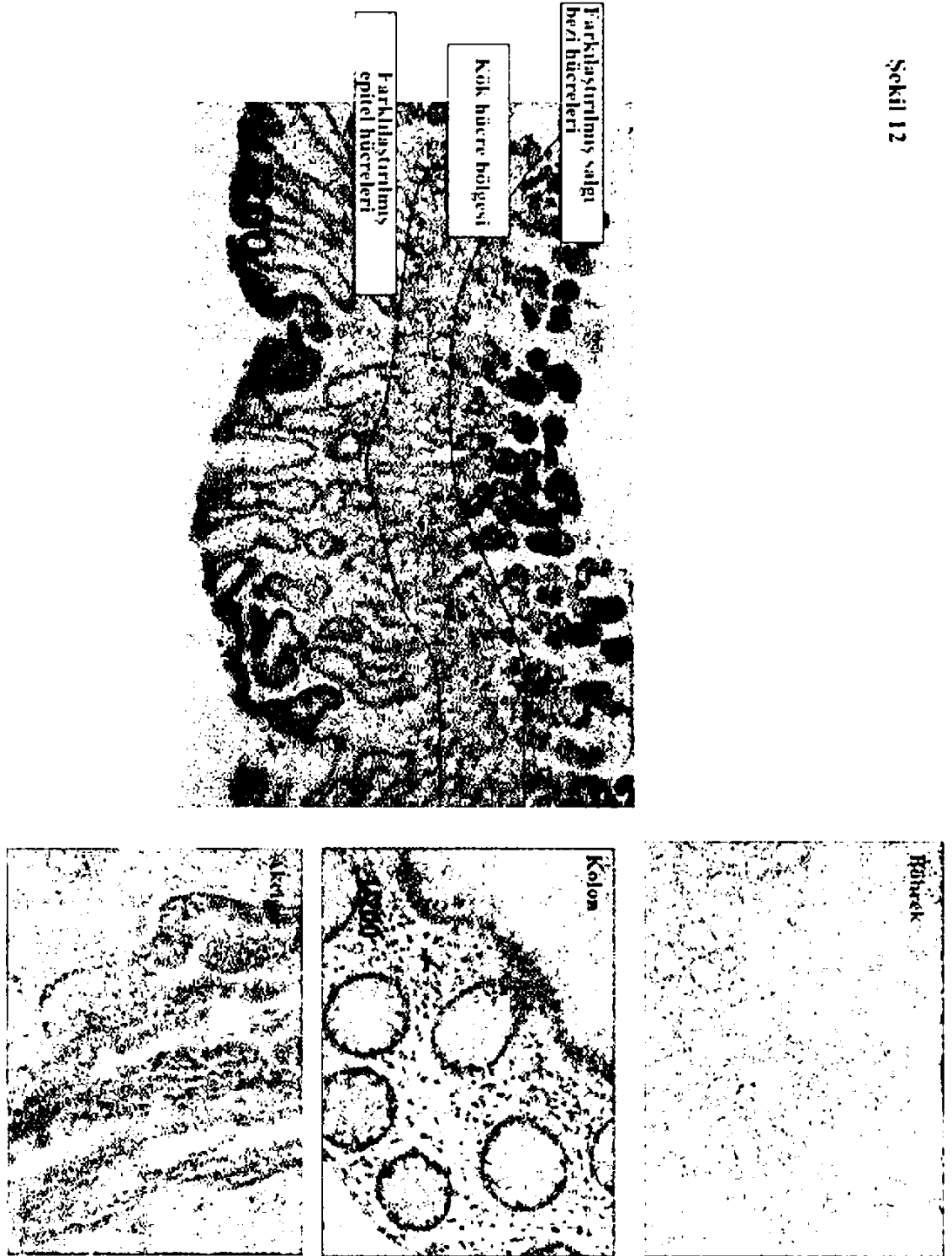
Şekil 10D

İlçere dizilerinin dokü spesifitesi	pozitif / test edilmiş hücre dizileri
Mide	4 / 5
Yemek borusu	1 / 3
Akciğer	2 / 5
Pankreas	4 / 5
Göğüs	1 / 4
Kolon	1 / 3
Böbrek	0 / 1
Deri	0 / 1
Yumurtalık	1 / 2
Karaciğer	0 / 1

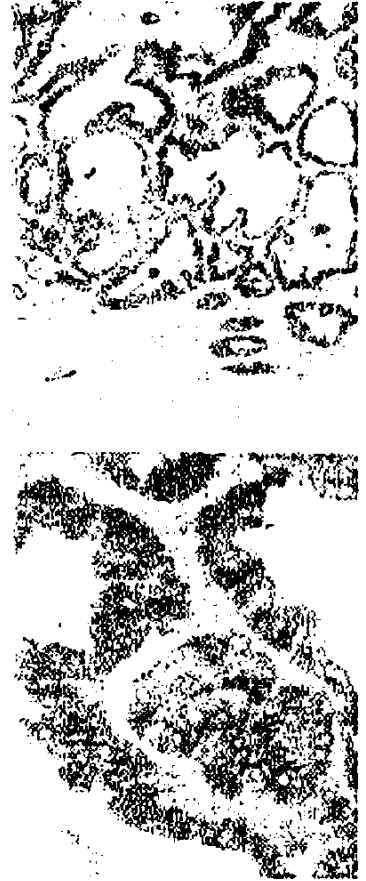
Şekil 11



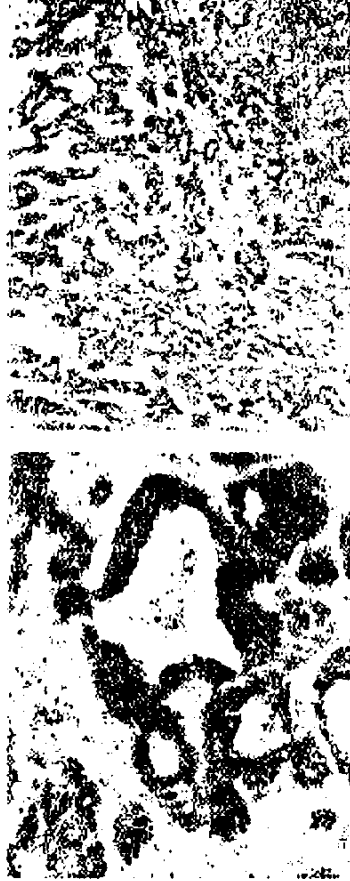
Şekil 12



Şekil 13A



Şekil 13B



Şekil 13C



Şekil 13D

Doku	Tümör	
	Tümör tipi	Pozitif / Toplam
Mide	AdenoCa	9/10
Akciğer	AdenoCa	11/12
Akciğer	SCC	0/2
Yemek borusu	AdenoCa	5/5
Yemek borusu	SCC	0/3
Prostat		1/3
Göğüs		1/3
Böbrek	RCC	0/3
Kolon		0/3
Beyin	Glioblastom	0/3

Şekil 14

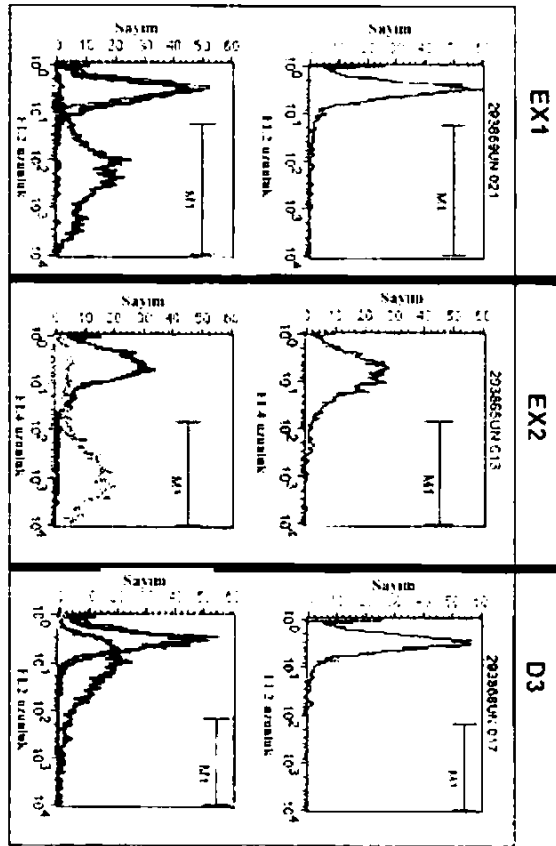
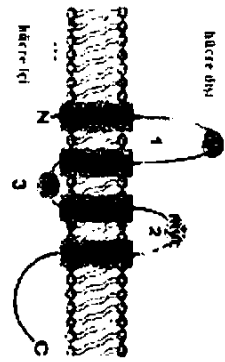
[illegible]

```

-----
#130  TGGAGCTTCA TGGAAATGCAQ GGGGCTATTG accatccctgg gacttcc
#131  MSTTTGQVVAFLLSILGLAGCTAATGMDMASTQDLYLNPMVSVFQYEGLWRSCTVPQSSGFTTECRPYFTI
#132  NMLVTNFWMTIANMYTGMGDMVQTVQTRTFU
#133  alrwgplvlgagllveifalkci rigmedsakanmt itaqimf:vsdicaiaqvavfannlvtntfwnet
#134  anrytcmgmvgqvqtrvtfgaalfvewvaggltl lggvrmelac
#135  rigmedsakanmt itaqimfiya
#136  Akaamt11
#137  Medsakanmt11ag
#138  Medsakanmt11ag
#139  Akaamt11
#140  Akaamt11
#141  DQWSTQDLYLNMTAVENYQGLWASCTVRESGFTTECRPYFTI LMLPAMI QAVK
#142  STQDLYDNPTAVP
-----

```

Şekil 15

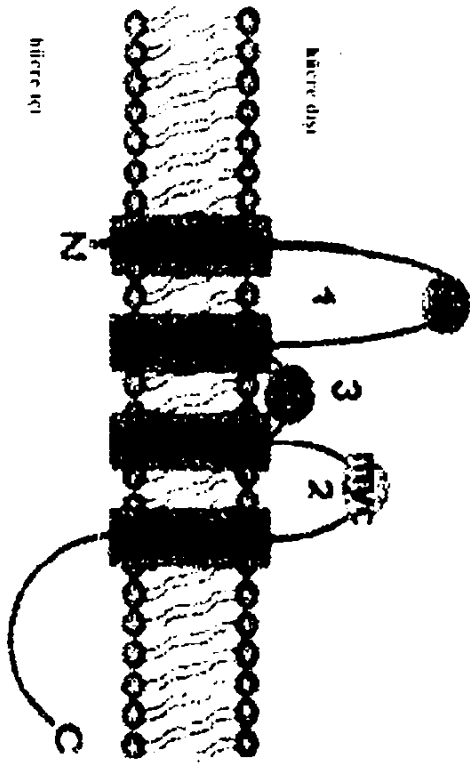


Kontrol

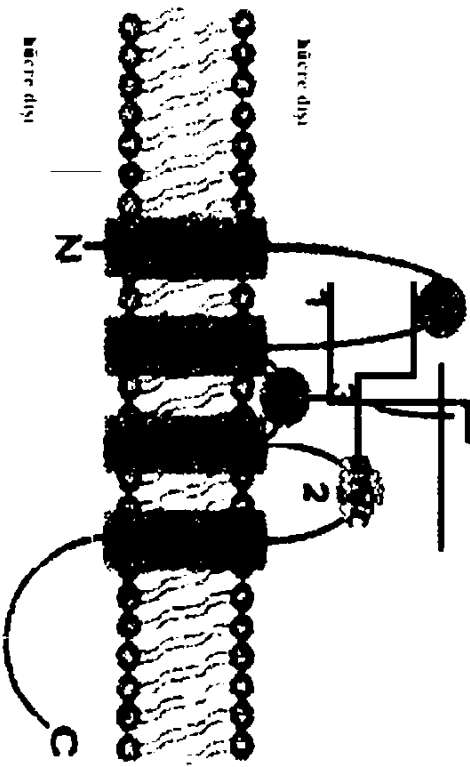
İranfektif edilmiş
hücreler

Şekil 16

kanser



normal doku



Şekil 17

