

ÖZET

ONKASTATİN M RESEPTÖRÜ ANTİJENİ BAĞLAYICI PROTEİNLER

5 Mevcut buluş, anti-onkosfatin M reseptörü- β (OSMR)
antijen bağlayıcı proteinlerini, örneğin bunun antikorlarını
ve fonksiyonel fragmanlarını, türevlerini, muteinlerini ve
varyantlarını sağlar. OSMR antijeni bağlayıcı proteinleri,
OSMR ve/veya IL-31'in OSMR'ye bağlanmasına müdahale eder.
10 Bazı uygulamalarda anti-OSMR antijen bağlayıcı proteinleri,
OSMR ile ilişkili hastalıklar ve bozuklukların
araştırılmasında yararlı araçlardır ve OSMR ve OSMR ve/veya
IL-31'in OSMR'ye bağlanması ile ilişkili hastalıklar ve
bozuklukların tedavi edilmesine yönelik yöntemlerde
15 özellikle yararlıdır.

İSTEMLER

1. Bir onkastatin M reseptörü (OSMR) antijen bağlayıcı proteini olup, özelliği; söz konusu antijen bağlayıcı proteinin
5 bir antikör olması ve söz konusu antikörün,
SEQ ID NO:31'de belirtilen sekansa sahip bir hafif zincir tamamlayıcılık belirleme bölgesi 1'i (LCDR1); SEQ ID NO:34'te belirtilen sekansa sahip bir hafif zincir tamamlayıcılık belirleme bölgesi 2'yi (LCDR2) ve SEQ ID NO:37'de belirtilen
10 sekansa sahip bir hafif zincir tamamlayıcılık belirleme bölgesi 3'ü (LCDR3) içeren bir hafif zincir değişken domeni ve
SEQ ID NO:13'te belirtilen sekansa sahip bir ağır zincir tamamlayıcılık belirleme bölgesi 1'i (HCDR1); SEQ ID NO:16'da belirtilen sekansa sahip bir ağır zincir tamamlayıcılık belirleme bölgesi 2 (HCDR2) ve SEQ ID NO:19'da belirtilen
15 sekansa sahip bir ağır zincir tamamlayıcılık belirleme bölgesi 3'ü (HCDR3) içeren bir ağır zincir değişken domenini içermesi ve söz konusu antikörün, insan onkostatin M (OSM) ve insan interlökin 31'in insan OSMR'ye bağlanmasını inhibe etmesi ve
20 söz konusu antikörün, insan OSMR ifade eden hücrelerde insan OSM aracılı ve insan interlökin 31 aracılı OSMR sinyallemesini azaltmasıdır.
2. İstem 1'e göre antikör olup, özelliği; hafif zincir değişken domeninin SEQ ID NO:28'de belirtilen amino asit
25 sekansını içermesidir.
3. İstem 1'e veya İstem 2'ye göre antikör olup, özelliği; ağır zincir değişken domeninin SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansını içermesidir.
4. İstem 1 ila 3'ten herhangi birine göre bir hafif zincir
30 veya bir ağır zincir içeren antikör olup, özelliği; söz konusu hafif zincir, SEQ ID NO:25'te belirtilen amino asit sekansını içermesidir.
5. İstem 4'e göre antikör olup, özelliği; antikörün bir monoklonal antikör olmasıdır.
- 35 6. İstem 5'e veya İstem 4'e göre antikör olup, özelliği;

antikorun bir insan antikoru olmasıdır.

7. İstem 1 ile 6'dan herhangi birine göre antikor olup, özelliği; söz konusu antikorun insan OSMR'ye 1×10^{-9} M'den daha az veya 1×10^{-9} M'ye eşit bir afinite ile bağlanmasıdır.

5 8. İstem 1 ile 7'den herhangi birine göre antikoru içeren bir farmasötik bileşim olup, özelliği; farmasötik olarak etkili bir seyreltici, taşıyıcı, çözüldürücü, emülsifiye edici madde, koruyucu ve/veya adjuvan içermesidir.

10 9. İstem 1 ile 7'den herhangi birine göre bir antikor veya İstem 8'e göre bileşim olup, özelliği; bir otoimmün bozukluğun, bir inflamatuvar bozukluğun veya hücre dışı matris birikmesi veya yeniden modellemesi ile ilişkili bir bozukluğun tedavisinde kullanılmaya yönelik olmasıdır.

15 10. İstem 9'a göre kullanılmaya yönelik antikor veya bileşim olup, özelliği; söz konusu otoimmün bozukluğun, inflamatuvar bozukluğun veya hücre dışı matris birikmesi veya yeniden modellemesi ile ilişkili bir bozukluğun fibroz, kıkırdak yıkımı, artrit, romatoid artrit, skleroderma, skleroderma ile ilişkili interstisyel akciğer hastalığı, idyopatik pulmoner fibroz, 20 siroz, psoriyazis, atopik dermatit, sistemik kutanöz amiyeloitoz, primer kutanöz amiloidoz, inflamasyon, prurit, prurigo nodularis ve ağrı olmasıdır.

25 11. İstem 9'a veya İstem 10'a göre kullanılmaya yönelik antikor veya bileşim olup, özelliği; söz konusu antikor veya bileşimin intravenöz aktarım veya subkutanöz aktarım yoluyla uygulanmasıdır.

12. İzole edilmiş bir nükleik asit olup, özelliği; İstem 1 ile 7'den herhangi birine göre bir antikoru kodlamasıdır.

30 13. Bir ifade vektörü olup, özelliği; İstem 12'ye göre izole edilmiş nükleik asit içermesidir.

14. Bir rekombinant konak hücre olup, özelliği; bir promotöre işlevsel olarak bağlı İstem 12'ye göre izole edilmiş bir nükleik asit içermesidir.

35 15. Bir onkastatin M reseptörü (OSMR) antijen bağlayıcı proteini oluşturmaya yönelik bir yöntem olup, özelliği; söz

konusu antijen bağlayıcı proteinin bir antikor olması ve söz konusu antikorun aşağıdakileri içermesidir:

a) İstem 14'e göre bir rekombinant konak hücresinin kültürlenmesi ve

5 b) antikorun söz konusu kültürden izole edilmesi.

TARİFNAME

ONKASTATİN M RESEPTÖRÜ ANTİJENİ BAĞLAYICI PROTEİNLER

5 BULUŞUN ARKAPLANI

Onkostatin M (OSM) VE interlökin-31 (IL-31), IL-6 üst familyasının üyeleridir ve bir reseptör alt birimi olan onkastatin M reseptörü- β 'yı (OSMR) paylaşır (Dillon ve diğ., Nat. Immunol. 5(7): 752-60, 2004). IL-31 dışında bu familyanın üyelerinin tümü, multimerik reseptör komplekslerinde glikoprotein 130 (gp130) ortak zincirini paylaşır. OSM, OSMR ve gp130 içeren bir heterodimerik reseptör kompleksi aracılığıyla sinyal gönderirken, IL-31, OSMR ile birlikte gp130 benzeri bir reseptör olan IL-31R'yi kullanır (yukarıda yer alan Dillon ve diğ.; Dreuw ve diğ., J. Biol. Chem. 279(34): 36112-20, 2004). Genel olarak OSMR ve gp130, dokular ve hücre tipleri üstünde her yerde bulunabilen (ubikuitöz) şekilde uygun bir şekilde ifade edilir ve çeşitli uyarma koşulları altında indüklenebilir. IL-31R ifadesinin, nispeten daha kısıtlı ve sıkı bir şekilde regüle edildiği görülür. İnsanlarda ve benzer şekilde farelerde, IL-31R mRNA ifadesi, trake, iskelet kası, timus ve kemik iliği gibi dokularda düşük seviyelerde saptanabilir (yukarıda yer alan Dillon ve diğ.,). İfade seviyesi tamamen farklı olmasına rağmen, IL-31R ve OSMR'nin her ikisi de deri ve bağırsak epitel hücreleri de dahil olmak üzere çok sayıda doku üzerinde birlikte ifade edilir ve bu dokuların, IL-31'e yanıt vermesi gerektiğini düşündürmektedir (yukarıda yer alan Dillen ve diğ.; Dambacher ve diğ., Gut 56(9): 1257-65, 2007). OSMR, akciğerde epitelyal hücreler üzerinde yapısal olarak ifade edilirken, IL-31R ifadesi, akciğer dokularında göz ardı edilebilir şekilde düşük seviyelerdedir, ancak çeşitli solunum yolu sinamasi yöntemlerinin ardından yukarı regüle edilir (yukarıda yer alan Dillon ve diğ.; Jawa ve diğ., J. Interferon Cytokine Res. 28(4): 207-19, 2008).

Esas olarak T lenfositleri, makrofajlar ve nötrofiller

tarafından salgılanan OSM ve IL-31'in her ikisi de, inflamasyon içeren çeşitli hastalık durumlarında yukarı regüle edilir. OSM, kemik oluşumu, kolesterol alımı, ağrı ve inflamasyon dahil olmak üzere farklı biyolojik rollerde yer almaktadır (Cawston ve diğ.,
5 Arthritis Rheum. 41 (10): 1760-71, 1998; Hasegawa ve diğ., Rheumatology (Oxford) 38(7): 612-7, 1999; Levy ve diğ., J. Hepatol. 32(2): 218-26, 2000; Manicourt ve diğ., Arthritis Rheum. 43(2): 281-8, 2000; de Hooge ve diğ., Am J. Pathol. 160(5): 1733-43, 2002; Luzina ve diğ., Arthritis Rheum 48(8):
10 2262-74, 2003; Morikawa ve diğ., J. Neurosci. 24(8): 1941-7, 2004; Kong ve diğ., J. Lipid Res. 46(6): 1163-71, 2005). OSM'nin çeşitli bağlamlarda hücre dışı matrisin (ECM) güçlü bir modülatörü olduğu görülmüştür ve bu da OSM'nin, fibrozis (ECM fazlası) ve kıkırdak yıkımı (ECM'nin bozulması) dahil olmak
15 üzere karışık görünen patolojik sonuçlara aracılık edebileceğini düşündürmektedir. Doku tipine ve çevresel ortama bağlı olarak, bu etkilerin her ikisi de, OSM aşırı olarak ifade edildiğinde veya ekzojen olarak farelerin akciğerlerine veya eklemlerine uygulandığında gözlenmiştir (Richards et al, Biochem. Soc.
20 Trans. 30(2): 107-11, 2002; Hui ve diğ., Arthritis Rheum. 48(12): 3404-18, 2003; Rowan ve diğ., Am. J. Pathol. 162(6): 1975-84, 2003). Ek olarak OSM'nin, daha önce bu tür sonuçların mevcut olduğu insan patolojilerinde yukarı regüle olduğu görülmüştür (yukarıda yer alan Cawston ve diğ.; yukarıda yer alan Hasegawa
25 ve diğ.; yukarıda yer alan Levy ve diğ.; yukarıda yer alan Manicourt ve diğ.; yukarıda yer alan Luzina ve diğ.). Lokal olarak etkili bir sitokin olan OSM, romatoid artritli (RA) hastaların sinoviyal sıvısında (yukarıda yer alan Cawston v.d.; yukarıda yer alan Manicourt v.d.), skleroderma ile ilişkili
30 interstisyel akciğer hastalığı ve idiopatik pulmoner fibrozisi (İPF) olan hastaların bronşeoalevoler lavaj (BAL) sıvısında (yukarıda yer alan Luzina v.d.) ve siroz hastalarının karaciğerlerinde (yukarıda yer alan Levy v.d.) yukarı doğru regüle edilir . OSM'nin ECM üzerindeki önerilen etkisi, kısmen
35 matris metalloproteinazlar (MMP'ler) ve MMP'lerin doku

inhibitörleri (TIMP'ler) arasındaki dengeyi değiştirebilme yeteneğine atfedilebilir. TIMP'ler, MMP'lere, MMP proteolitik aktivitesinde bir kayba yol açan 1:1 oranında yüksek bir afinite ile bağlanır. TIMP-1 ve TIMP-3'in, daha önce OSM tarafından farklı şekilde regüle edildiği ve sonuç olarak TIMP-1'de bir artışa ve TIMP-3'te bir azalmaya neden olduğu görülmüştür (Gatsios ve diğ., Eur. J. Biochem. 241(1): 56-63, 1996). Hücre dışı matris bileşenlerinin sindiriminin regüle edilmesine ek olarak, MMP'ler güçlü bir pro-fibrotik sitokin olan TGF- β dahil olmak üzere çok sayıda proteinin bölünmesinde ve ardından aktive edilmesinde de rol oynar (Leask ve diğ., FASEB J. 18(7): 816-27, 2004). OSM'nin aynı zamanda tip I kollajenin transkripsiyonunu doğrudan *in vitro*indükleyebildiği bildirilmiştir (Hasegawa ve diğ., J. Rheumatol. 25(2): 308-13, 1998).

OSM ve IL-31'in her ikisi de proriasis ve atopik dermatitli hastaların derisinde bulunmuştur ve OSMR ve IL-31R'de bulunan mutasyonlar, sistemik kutanöz amiloidozis ile ilişkilendirilmiştir. IL-31'in sistem çapındaki transgenik aşırı ifadesi, farelerin derisinde kaşıntılı bir inflamasyon tepkisi indüklemiştir. OSM ve IL-31'in her ikisi de, bunların nosiseptif ve kaşıntılı yanıtları desteklediği öne sürülen nöronlar üzerinde OSMR aracılığıyla sinyal verir.

Toplu olarak, insan hastalıkları ve OSM ve IL-31'in, en azından inflamasyon, hücre dışı matris yeniden modelleme, ağrı ve pruritis dahil olmak üzere çeşitli patolojileri destekleme yeteneğini ile olan bağlantılar, OSMR'nin bloke edilmesinin OSMR ile ilişkili birçok hastalık ve bozuklukta terapötik müdahale için yararlı bir hedef olduğunu öne sürmektedir.

US2006171951 yayınında, onkostatin M reseptörüne yönelik antikörler açıklanmıştır.

Diveu ve diğ. 2004, Eur. Cytokine Netw., 15(4): 291-302 yayınında, GP130 benzeri (GPL) reseptörün uzun isoformunun baskın ifadesinin, interlökin-31 sinyalleme için gerek olduğu açıklanmıştır.

Jalal ve diğ. 2010, J Interferon Cytokine Res., 30(12): 865-73
yayınında, inflamasyon ve gp130'un dahil olduğu diğer
hastalıkların patogeneğinde gp130'un rolü açıklanmıştır.

Repovic ve diğ. 2003, Oncogene., 22(50): 8117-24 yayınında,
5 astroglıyom hücrelerinde vasküler endotelyal büyüme faktörü
ekspresyonunun onkostatin-M indüksiyonu açıklanmıştır.

Rudikoff ve diğ. 1982, Proc Natl Acad Sci U S A., 79(6): 1979-
83 yayınında, tek amino asit ornatmalarının antıgen bağlanma
özgüllüğünü değıştırebıleceğı açıklanmıştır.

10 Panka ve diğ., PNAS. 1988, 85(9): 3080-3084 yayınında, değışken
bölge çerçeve farklılıklarının, varyant anti-dıgoksin
antıkorlarının düşük veya yüksek afınitesine neden olabileceğı
açıklanmıştır.

MEVCUT BULUŞUN ÖZETİ

15 Mevcut buluş, bir onkastatin M reseptörü (OSMR) antıjen
bağlayıcı proteini sağlar ve burada söz konusu antıjen bağlayıcı
protein bir antıkor olup, söz konusu antıkor aşağıdakileri
ıçerir:

SEQ ID NO:31'de belirtilen sekansa sahip bir hafif zincir
20 tamamlayıcılık belirleme bölgesi 1'i (LCDR1); SEQ ID NO:34'te
belirtilen sekansa sahip bir hafif zincir tamamlayıcılık
belirleme bölgesi 2'yi (LCDR2) ve SEQ ID NO:37'de belirtilen
sekansa sahip bir hafif zincir tamamlayıcılık belirleme bölgesi
3'ü (LCDR3) ıçeren bir hafif zincir değışken domeni ve

25 SEQ ID NO:13'te belirtilen sekansa sahip bir ağır zincir
tamamlayıcılık belirleme bölgesi 1'i (HCDR1); SEQ ID NO:16'da
belirtilen sekansa sahip bir ağır zincir tamamlayıcılık
belirleme bölgesi 2'yi (HCDR2) ve SEQ ID NO:19'da belirtilen
sekansa sahip bir ağır zincir tamamlayıcılık belirleme bölgesi
30 3'ü (HCDR3) ıçeren bir ağır zincir değışken domeni ve burada söz
konusu antıkor, insan onkostatin M (OSM) ve insan interlökin
31'in insan OSMR'ye bağlanmasını inhıbe eder ve söz konusu
antıkor, insan OSMR ifade eden hücrelerde insan OSM aracılı ve
insan interlökin 31 aracılı OSMR sinyallemesini azaltır.

35 Mevcut buluş ayrıca, buluşun antıkorunu ıçeren bir farmasötik

bileşim sağlar.

Mevcut buluş ayrıca, buluşun antikoru kodlayan izole edilmiş bir nükleik asit sağlar.

5 Buluş ayrıca, buluşun izole edilmiş nükleik asidini içeren bir ekspresyon vektörü sağlar.

Buluş ayrıca, buluşun izole nükleik asidini içeren bir rekombinant konak hücre sağlar.

Mevcut buluş ayrıca, onkastatin M reseptörüne (OSMR) bağlanan bir antikoru oluşturulmasına yönelik bir yöntem sağlamakta
10 olup, söz konusu yöntem aşağıdakileri içerir:

a) buluşun rekombinant konak hücresinin kültürlenmesi ve

b) antikoru söz konusu kültürden izole edilmesi.

Mevcut buluş, ticari üretime ve insanlarda terapötik kullanıma uygun özelliklere sahip anti-OSMR antijeni bağlayıcı proteinler,
15 örneğin antikorlar ve bunların fonksiyonel fragmanlarını sağlar.

Anti-OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, OSMR ile ilişkili, özellikle OSM veya IL-31'in OSMR'ye bağlanması ile ilişkili hastalıkların ve bozukların tedavi edilmesine yönelik yöntemlerde yararlıdır. Burada, OSMR'yi yüksek afinite ile
20 bağlayan ve OSM ve/veya IL-31'in OSMR'ye bağlanmasını etkili bir şekilde engelleyen OSMR bağlayıcı proteinler sağlanmıştır.

Mevcut buluş ayrıca, a) SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 veya SEQ ID NO:29'da belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir hafif zincir değişken domeni;

25 b) SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 veya SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir ağır zincir değişken domeni; veya c) a)'nın hafif zincir değişken domeni veya b)'nin ağır zincir değişken domenini içeren bir OSMR antijeni bağlayıcı protein sağlar.

30 Mevcut buluşun tercih edilen antijen bağlayıcı proteinler arasında, SEQ ID NO:27'de belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir hafif zincir değişken domeni ve SEQ ID NO:9'da belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir ağır
35 zincir değişken domeni içerenler; SEQ ID NO:28'de belirtilen

amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir hafif zincir değişken domen ve SEQ ID NO:10'da belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir ağır zincir değişken domeni içerenler; ve

5 SEQ ID NO:29'da belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir hafif zincir değişken domeni ve SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir ağır zincir değişken domeni içerenler bulunur.

10 SEQ ID NO:9 ile yukarıda tanımlanan şekilde sekans ilişkisine sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:9'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerebilir. Böyle uygulamalarda ağır

15 zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:53'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

SEQ ID NO:10 ile yukarıda tanımlanan şekilde sekans ilişkisine sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:10'da pozisyon 73'e

20 karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerebilir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

Mevcut buluş ayrıca, a) SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 veya SEQ ID

25 NO:29'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasını içeren bir hafif zincir değişken domeni; b) SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 veya SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya

30 ornatmasını içeren bir ağır zincir değişken domeni; veya c) a)'nın hafif zincir değişken domeni ve b)'nin ağır zincir değişken domenini içeren bir OSMR antijeni bağlayıcı protein sağlar.

Buluşun tercih edilen antijen bağlayıcı proteinleri arasında,

35 SEQ ID NO:27'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on

veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir hafif zincir değişken domeni ve SEQ ID NO:9'da belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren proteinler; SEQ ID NO:28'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir hafif zincir değişken domeni ve SEQ ID NO:10'da belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren proteinler; ve bir hafif zincir değişken domeni SEQ ID NO:29'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip ve SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren proteinler bulunur. SEQ ID NO:9 ile yukarıda tanımlanan şekilde sekans ilişkisine sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:9'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerebilir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:53'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

SEQ ID NO:10 ile yukarıda tanımlanan şekilde sekans ilişkisine sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:10'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerebilir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

Mevcut buluş ayrıca, a) SEQ ID NO:30'da belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:33'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ ID NO:36'da belirtilen LCDR3

sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3; b) SEQ ID NO:31'de belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:34'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ ID NO:37'de belirtilen LCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3; veya c) SEQ ID NO:32'de belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:35'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ ID NO:38'de belirtilen LCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3 içeren bir hafif zincir değişken domenine ve d) SEQ ID NO:12'de belirtilen HCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:15'te belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve SEQ ID NO:18'de belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR3; e) SEQ ID NO:13'te belirtilen HCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:16'da belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve SEQ ID NO:19'da belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR3; veya f) SEQ ID NO:14'te belirtilen HCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:17'de belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve SEQ ID NO:20'de belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR3 içeren bir ağır zincir değişken domenine sahip bir OSMR antijeni bağlayıcı proteini sağlar.

Yukarıda bahsedilen buluşun tercih edilen OSMR antijeni

bağlayıcı proteinler arasında, a)'nın bir hafif zincir değişken domenini ve d)'nin bir ağır zincir değişken domenini içeren proteinler; b)'nin bir hafif zincir değişken domenini ve e)'nin bir ağır zincir değişken domenini içeren proteinler; ve c)'nin bir hafif zincir değişken domeni ve f)'nin bir ağır zincir değişken domenini içeren proteinler bulunur.

a)'nın hafif zincir değişken domenini ve d)'nin ağır zincir değişken domenini içeren OSMR antiijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:9'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içeren bir ağır zincir değişken domeni içerir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:53'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

b)'nin hafif zincir değişken domenini ve d)'nin ağır zincir değişken domenini içeren OSMR antiijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:10'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içeren bir ağır zincir değişken domeni içerir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

Mevcut buluşun OSMR antiijeni bağlayıcı proteini, 1×10^{-10} M'den daha az veya 1×10^{-10} M'ye eşit bir afinite ile insan OSMR'ye bağlanır.

Mevcut buluşun OSMR antiijeni bağlayıcı proteini, insan OSM'nin insan OSMR'ye ve/veya insan IL-31'in insan OSMR'ye bağlanmasını inhibe eder.

Mevcut buluşun OSMR antiijeni bağlayıcı proteini, insan OSMR ifade eden hücrelerde insan OSM aracılı ve/veya insan IL-31 aracılı OSMR sinyallemesini azaltır.

Mevcut buluşun OSMR antiijeni bağlayıcı proteini, sinomolgus maymunu OSMR ifade eden hücrelerde insan OSM aracılı ve/veya IL-31 aracılı OSMR sinyallemesini azaltır.

Mevcut buluşun OSMR antiijeni bağlayıcı proteini, bir antikor, örneğin bir insan antikorudur. Mevcut buluşun tercih edilen antikorları arasında, SEQ ID NO:24'te belirtilen amino asit

sekansına sahip bir hafif zincir ve SEQ ID NO:6'da belirtilen amino asit sekansına sahip bir ağır zincir içeren antikorlar; SEQ ID NO:25'te belirtilen amino asit sekansına sahip bir hafif zincir ve SEQ ID NO:7'de belirtilen amino asit sekansına sahip bir ağır zincir içeren antikorlar; ve SEQ ID NO:26'da belirtilen amino asit sekansına sahip bir hafif zincir ve SEQ ID NO:8'de belirtilen amino asit sekansına sahip bir ağır zincir içeren antikorlar bulunur.

İlave antikorlar arasında, SEQ ID NO:24'te belirtilen amino asit sekansına sahip bir hafif zincir ve SEQ ID NO:50'de belirtilen amino asit sekansına sahip bir ağır zincir içeren antikorlar; SEQ ID NO:25'te belirtilen amino asit sekansına sahip bir hafif zincir ve SEQ ID NO:51'de belirtilen amino asit sekansına sahip bir ağır zincir içeren antikorlar; ve SEQ ID NO:26'da belirtilen amino asit sekansına sahip bir hafif zincir ve SEQ ID NO:52'de belirtilen amino asit sekansına sahip bir ağır zincir içeren antikorlar bulunur.

Mevcut buluş, bir OSMR antijeni bağlayıcı proteinin bir veya daha fazla polipeptit bileşenini, örneğin bir antikör hafif zinciri veya antikör ağır zincirini kodlayan nükleik asitler veya izole edilmiş nükleik asitler sağlar. Tercih edilen uygulamalarda nükleik asit, aşağıdakileri içeren bir polipeptidi kodlar:

a) SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 veya SEQ ID NO:29'da belirtilen amino asit sekansına en az %95 özdeş bir hafif zincir değişken domeni;

b) SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 veya SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansına en az %95 özdeş bir ağır zincir değişken domeni;

c) SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 veya SEQ ID NO:29'da belirtilen amino asit sekansından en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir hafif zincir değişken domeni;

d) SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 veya SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansından en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir ağır zincir değişken domeni;

e) aşağıdakileri içeren bir hafif zincir değişken domeni:

i) SEQ ID NO:30'da belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:33'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ ID NO:36'da belirtilen LCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3;

ii) SEQ ID NO:31'de belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:34'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ ID NO:37'de belirtilen LCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3; veya

iii) SEQ ID NO:32'de belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:35'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ ID NO:38'de belirtilen LCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3; veya

f) aşağıdakileri içeren bir ağır zincir değişken domeni:

i) SEQ ID NO:12'de belirtilen HCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:15'te belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve SEQ ID NO:18'de belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR3;

ii) SEQ ID NO:13'te belirtilen HCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:16'da belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve

SEQ ID NO:19'da belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR3; veya

iii) SEQ ID NO:14'te belirtilen HCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:17'de belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve SEQ ID NO:20'de belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR3.

Belirli uygulamalarda nükleik asit veya izole edilmiş nükleik asit, SEQ ID NO:53 veya SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansını içeren bir polipeptidi kodlar.

Belirli uygulamalarda nükleik asit veya izole edilmiş nükleik asit, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 veya SEQ ID NO:52'te belirtilen amino asit sekansını içeren bir polipeptidi kodlar.

Buluşun belirli uygulamalarında nükleik asit veya izole edilmiş nükleik asit, bir antikor hafif zincirini kodlar ve SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 veya SEQ ID NO:23'te belirtilen nükleotit sekansına en az %80, en az %90, en az %95 veya 100% özdeştir. Dokuzuncu görünümün diğer uygulamalarında nükleik asit veya izole edilmiş nükleik asit, bir antikor ağır zincirini kodlar ve SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 veya SEQ ID NO:5'te belirtilen nükleotit sekansına en az %80, en az %90, en az %95 veya 100% özdeştir.

Belirli uygulamalarda ağır zincir, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 veya SEQ ID NO:49'da belirtilen bir nükleotit sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanır.

Mevcut buluş, buluşun bir veya daha fazla nükleik asidini veya izole edilmiş nükleik asidini içeren bir ekspresyon vektörü sağlar. Belirli uygulamalarda ifade vektörleri, bir antikor hafif zinciri veya bir ağır zinciri veya bir antikor hafif zinciri ve bir ağır zincirin her ikisini de sağlar.

Mevcut buluş ayrıca, buluşun bir veya daha fazla ekspresyon vektörünü içeren rekombinant konakçı hücreler de dahil olmak üzere buluşun bir veya daha fazla nükleik asidini veya izole

edilmiş nükleik asidini içeren, isteğe göre bir promotöre işlevsel olarak bağlı bir rekombinant konakçı hücre sağlar. Tercih edilen uygulamalarda rekombinant konak hücre, OSMR'yi bağlayan bir antikör salgılar. Tercih edilen konak hücreler, CHO

5 hücre hatları dahil olmak üzere memeli konak hücrelerdir. Mevcut buluş, bir otoimmün bozukluğu, bir inflamatuvar bozukluk veya hücre dışı matris birikmesi veya yeniden modellemesi ile ilişkili bir bozukluğun tedavi edilmesine yönelik yöntemler sağlar ve söz konusu yöntem, buluşun herhangi bir OSMR antijeni

10 bağlayıcı proteinin terapötik olarak etkili bir miktarının ihtiyacı olan bir hastaya uygulamasını içerir. Tercih edilen uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, SEQ ID NO:27'de belirtilen amino asit sekansının bir hafif zincir değişken domenini ve SEQ ID NO:9'da belirtilen amino asit sekansının bir

15 ağır zincir değişken domenini içeren bir antikör (örneğin, Ab1), SEQ ID NO:28'de belirtilen amino asit sekansının bir hafif zincir değişken domenini ve SEQ ID NO:10'da belirtilen amino asit sekansının bir ağır zincir değişken domenini içeren bir antikör (örneğin, Ab2) veya SEQ ID NO:29'da belirtilen amino asit

20 sekansının bir hafif zincir değişken domenini ve SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansının bir ağır zincir değişken domenini içeren bir antikördür (örneğin, Ab3). Belirli uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, SEQ ID NO:27'de belirtilen amino asit sekansının bir hafif zincir değişken

25 domenini ve SEQ ID NO:53'te belirtilen amino asit sekansının bir ağır zincir değişken domenini içeren bir antikör veya SEQ ID NO:28'de belirtilen amino asit sekansının bir hafif zincir değişken domenini ve SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansının bir ağır zincir değişken domenini içeren bir

30 antikördür. Tercih edilen uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, OSM'nin OSMR'ye veya IL-31'in OSMR'ye bağlanmasını inhibe eder. Özellikle tercih edilen uygulamalarda otoimmün bozukluk, inflamatuvar bozukluk veya hücre dışı matris birikmesi veya

35 yeniden modellemesi ile ilişkili bir bozukluk, fibroz, kıkırdak

yıkımı, artrit, romatoid artrit, skleroderma, skleroderma ile ilişkili interstisyel akciğer hastalığı, idyopatik pulmoner fibroz, siroz, psoriyazis, atopik dermatit, sistemik kutanöz amiyeloitoz, primer kutanöz amiloidoz, inflamasyon, pruritik inflamasyon, prurigo nodularis ve ağrıdır.

Mevcut buluş, buluşun rekombinant bir konak hücresinin kültürlenmesi ve söz konusu kültürden OSMR antiijeni bağlayıcı proteinin izole edilmesi ile buluşun bir OSMR antiijeni bağlayıcı proteininin oluşturulmasına yönelik bir yöntem sağlar.

10 Mevcut buluş ayrıca, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir antikor ile çapraz rekabet eden buluşun OSMR antiijeni bağlayıcı proteinlerini sağlar:

a) SEQ ID:24'te belirtilen amino asit sekansını içeren bir hafif zinciri ve SEQ ID NO:6'da belirtilen amino asit sekansını içeren

15 bir ağır zinciri içeren bir antikor;

b) SEQ ID:25'te belirtilen amino asit sekansını içeren bir hafif zinciri ve SEQ ID NO:7'de belirtilen amino asit sekansını içeren bir ağır zinciri içeren bir antikor; ve

20 c) SEQ ID:26'da belirtilen amino asit sekansını içeren bir hafif zinciri ve SEQ ID NO:8'da belirtilen amino asit sekansını içeren bir ağır zinciri içeren bir antikor.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Burada yer alan bölüm başlıkları sadece düzenleme amaçlı olup, tarif edilen konuyu sınırlayıcı olarak anlaşılmamalıdır.

25 Rekombinant DNA, oligonükleotit sentezi, doku kültürü ve transformasyonu, protein saflaştırması vb. için standart teknikler kullanılabilir. Enzimatik reaksiyonlar ve saflaştırma teknikleri, üreticinin tarifnamesine göre veya yaygın olarak teknikte gerçekleştirilen şekilde veya burada tarif edilen

30 şekilde gerçekleştirilebilir. Aşağıda yer alan prosedürler ve teknikler genel olarak teknikte iyi bilinen ve mevcut tarifnamede belirtilen geleneksel yöntemlere göre ve burada yer alan çeşitli genel ve daha spesifik referanslarda tarif edilen şekilde gerçekleştirilir. Bkz. örn., Sambrook ve diğ., 2001,

35 *Molecular Cloning: A Laboratory Manuel*, 3. baskı, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, N.Y. Spesifik tanımlar yapılmadığı sürece, burada tarif edilen analitik kimya, organik kimya ve tıbbi ve farmasötik kimya ile bağlantılı olarak kullanılan adlandırmalar ve laboratuvar prosedürleri ve teknikleri, teknikte iyi bilinir ve yaygın olarak kullanılır. Kimyasal sentezler, kimyasal analizler, farmasötik preparatlar, formülasyonlar ve hastalara ilaç verilmesi ve hastaların tedavisi için standart teknikler kullanılabilir.

OSMR

10 Burada tarif edilen antijen bağlayıcı proteinler, OSMR'ye bağlanır. OSM ve IL-31, OSMR aracılığıyla sinyal gönderir. OSMR, tip I sitokin reseptör familyasının bir üyesidir. OSMR, tip II OSMR'yi oluşturmak üzere glikoprotein 130 (aynı zamanda gp130, interlökin 6 sinyal transdüktörü (IL6ST), IL6-beta veya CD130) ile heterodimerize olur. OSMR ayrıca, IL-31 reseptörü oluşturmak üzere IL-31 reseptörü A (IL31RA) ile heterodimerize olur ve böylece OSM ve IL-31 ile indüklenen sinyalleme olaylarını iletir. Örnek niteliğindeki uygulamalar bir OSMR antijeni bağlayıcı protein, OSM'yi bağlar ve OSMR'yi ifade eden hücrelerde OSM ve/veya IL-31 aracılı sinyalleme önler.

İnsan OSMR sekansları teknikte bilinir. Çeşitli görünümelerde insan OSMR protein sekansları, GenBank Erişim No. AAI25210, AAI25211, NP_003990 ve EAW55976'da sağlanır. Örnek niteliğinde bir insan OSMR amino asit sekansı (SEQ ID NO:1), Tablo 1'de sağlanmıştır. Protein, birkaç domenden oluşur: Memeli hücrelerinde proteinin işlenmesi sırasında bölünebilen sinyal sekansına karşılık gelen amino asitler 1-27, hücre dışı domene karşılık gelen amino asitler 28-740 ve transmembran domene karşılık gelen amino asitler 741-761. Tercih edilen uygulamalarda burada tarif edilen antijen bağlayıcı proteinler, OSMR'nin hücre dışı domenine bağlanır ve OSM ve/veya IL-31'in OSMR ile etkileşime girmesini önler.

İnsan OSM sekansları teknikte bilinir. Çeşitli görünümelerde insan OSM protein sekansları, GenBank Erişim No. CAG30420, CAG46504, NP_065391, P13725, AAC05173, EAW59864 ve AAH11589'da

sağlanır. Örnek niteliğinde bir insan OSM amino asit sekansı (SEQ ID NO:39), Tablo 1'de sağlanmıştır. Sinyal sekansına karşılık gelen amino asitleri 1-25; matür proteine karşılık gelen amino asitler 26-220 ve propeptit sekansına karşılık gelen amino asitler 221-252.

İnsan IL-31 sekansları teknikte bilinir. Çeşitli görünümelerde insan IL-31 protein sekansları, GenBank Erişim No. NP_001014358, AAS86448, AAI32999, AAI33001, Q6EBC2 ve EAW98310'da sağlanır. Örnek niteliğinde bir insan IL-31 amino asit sekansı (SEQ ID NO:41), Tablo 1'de sağlanmıştır. Varsayılan sinyal sekansına karşılık gelen amino asitler 1-23.

İnsan IL31RA sekansları teknikte bilinir. Çeşitli görünümelerde insan IL31RA protein sekansları, GenBank Erişim No. AAS86447, NP_001229567 ve CBL94051'de sağlanır. Örnek niteliğinde bir insan IL31RA (v4, izoform 3) amino asit sekansı (SEQ ID NO:43), Tablo 1'de sağlanmıştır. Sinyal sekansına karşılık amino asitler 1-32; ve transmembran sekanslarına karşılık gelen amino asitler 533-553.

İnsan gp130 sekansları teknikte bilinir. Çeşitli görünümelerde insan gp130 protein sekansları, GenBank Erişim No. AAI17403, AAI17405, EAW54936, NP_002175, ABK41905 ve AAA59155'da sağlanır. Örnek niteliğinde bir insan gp130 amino asit sekansı (SEQ ID NO:45), Tablo 1'de sağlanmıştır. Protein, birkaç domenden oluşur: Sinyal sekansına karşılık gelen amino asitler 1-22, hücre dışı domene karşılık gelen amino asitler 23-619; transmembran domene karşılık gelen amino asitler 620-641 ve sitoplazmik domene karşılık gelen amino asitler 642-918.

Tablo 1

İnsan OSMR amino asit sekansı (SEQ ID NO:1)

MALFAVFQTTFFLTLLSLRTYQSEVLAERLPLTPVSLKVSTNSTRQSLHLQWTVHNL
YHQELKMVFQIQISRIETSNVIWVGNYSTTVKWNQVLHWSWESELPLECATHFVRIKS
LVDDAKFPEPNFWSNWSSWEEVSVQDSTGQDILFVFPKDKLVEEGTNVTICYVSRNIQ
NNVSCYLEGKQIHGEQLDPHVTAFNLNSVPEFIRNKGNTIYCEASQGNVSEGMKGIVLF
VSKVLEFPKDFESCETEDFKTLHCTWDPGTDALGWSKQPSQSYTLFESESGEKKLCTH
KNWCNWQITQDSQETYNFTLIAENYLKRKSVNILENLTHRVYLMNPFVNFENVNAT
NAIMTWKVHSIRNNFTYLCQIELHGEKGMMQYNVSIKVNGEYFLSELEPATEYMARV
RCADASHFWKWSEWSGQNFTTLEAAPSEAPDVWRIVSLEPGNHTVTLFWKPLSKLHA
NGKILFYNVVVENLDKPSSSELHSIPAPANSTKLILDRCSYQICVIANNVSGASPASVIVI
SADPENKEVEEERAGTEGGFSLSWKPQPGDVIGYVVDWCDHTQDVLGDFQWKNVG
PNTTSTVISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIACILEKKTGYSQELAPSDNPHVLVDTLTS
HSFTLSWKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSKARQCHPRFEKAVLSDGSECCKYKIDNPEE
KALIVDNLKPESFYEFFITPFTSAGEGPSATFTKVTPDEHSSMLIHILLPMVFCVLLIMV
MCYLKSQWIKETCYPDIPDPYKSSILSLIKFKENPHLIIMNVSDCIPDAIEVVSKPEGTKI
QFLGTRKSLTETELTKPNLYLLPTEKNHSGPGPCICFENLTYNQAASDSGSCGHVPVS
PKAPSMGLMTSPENVLKALEKNYMNSLGEIPAGETSLNYVSQLASPMFGDKDSLPTN
PVEAPHCSYKMQMAVSLRLALPPPTENSSLSITLLDPGEHYC

İnsan OSM amino asit sekansı (SEQ ID NO:39)

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLID
PYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFFSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQR
LPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNIYCMACQLLDNSDTAEPTKAGRGASQ
PPTPTPASDAFQRKLEGCRLHGYIREFMHHSVGRVFSKWGESPNRSRRHSPIHQALRKG
VRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR

İnsan IL-31 amino asit sekansı (SEQ ID NO:41)

MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHITLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKDVVE
EKGVLVSQNYTLPCLSFDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIHQLDNKSVIDEIEHILDKLIFQDA
PETNISVPTDTHECKRFILTISQQFSECMDLALKSLTSGAQQATT

İnsan IL31RA amino asit sekansı (SEQ ID NO:43)

MKLSPQPSCVNLGMMWTWALWMLPSLCKFSLAALPAKPENISCVYYRKNLTCTWS
PGKETSQYTVKRTYAFGEKHDNCTTNSSTSENRASCSFELPRITIPDNYTIEVEAENG
DGVKSHMTYWRLENIakteppkiFRVKPVLGIKRMIEWIKPELAPVSSDLKYTLRFR
TVNSTSWMEVNFakNRKDKNQTYNLTGLQPFTEYVIALRCAVKESKFWSDWSQEK
GMTEEEAPCGLELWRVLKPAEADGRRPVRLWKKARGAPVLEKTLGYNIWYYPESN
TNLTETMNTTNQQLHLGGESFWVSMISYNSLGKSPVATLRIPAIQEKSFQCIQVMQA
CVAEDQLVVKWQSSALDVNTWMIWFDPVDSEPTLSWESVSQATNWTIQQDKLKP
FWCYNISVYPMLHDKVGEPIYQAYAKEGVPSEGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSER
KGHCNYTIFYQAEggKGFSKTVNSSILQYGLESKRKTSYIVQVMASTSAGGTNGTSIN
FKTLSFSVFEIILITSLIGGGLILILITVAYGLKKPNKLTHLCWPTVPNPAESSIATWHGD
DFKDKLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKLVIDKLVVNFGNVLQEIFTDEARTGQEN
NLGGEKNGTRILSSCPTSI

İnsan gp130 amino asit sekansı (SEQ ID NO:45)

MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPGgyISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYF
HVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNLTFGQLEQNVYGI
THISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKR
DTPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTSDIHNFDPVYKVKPNPPHNLVINSE
ELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEY
VFRIRCMKEDGKGYSWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFYKIDPSHTQGYRTVQLVWK
TLPPFEANGKILDYEVTLTRWKSILQNYTVNATKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKS
DAAVLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWVEWTPRESVKKYILEWCVLSDKAP
CTTDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGP
TVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETA VNVDSSHTEYTLSS
LTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGLVF
CFNKRDLIKKHWPVNPDPSPKSHIAQWSPHTPPRIHNFNSKDQMYSDSNFTDVSVEIV
ANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTV
QYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYF
KQNCsqIHESPDISHIFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDIHSQSCGSGQMCMFQEVSA
ADAFGPGTEGQVERFETVGM EAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ

Mevcut buluşun belirli uygulamalarda, yüksek afinite ile bağlanan ve sinomolgus maymunu OSM ve/veya IL-31'in sinomolgus maymunu OSMR ile etkileşime girmesini engelleyenler dahil olmak üzere burada tarif edilen antijen bağlayıcı proteinler, insan ve sinomolgus maymun OSMR'nin her ikisini de yüksek afinite ile bağlar. Bu özellikler, insan olmayan primatlarda bilgilendirici toksikoloji çalışmalarına olanak sağlar.

Bir Rhesus makakı (*Macaca mulatta*) OSMR protein sekansı teknikte bilinir ve GenBank Erişim No. XP_001083745'te sağlanır. Örnek niteliğinde bir sinomolgus maymunu (*Macaca fascicularis*) OSMR amino asit sekansı (SEQ ID NO:2), Tablo 2'de sağlanmıştır.

Protein, birkaç domenden oluşur: Memeli hücrelerinde proteinin işlenmesi sırasında bölünebilen sinyal sekansına karşılık gelen amino asitler 1-27, hücre dışı domene karşılık gelen amino asitler 28-737 ve transmembran domene karşılık gelen amino asitler 738-757. Tercih edilen uygulamalarda burada tarif edilen antijen bağlayıcı proteinler, OSMR'nin hücre dışı domenine bağlanır ve OSM ve/veya IL-31'in OSMR ile etkileşime girmesini önler.

Bir Rhesus makakı (*Macaca mulatta*) OSM protein sekansı teknikte bilinir ve GenBank Erişim No. NP_001181403'te sağlanır. Örnek niteliğinde bir sinomolgus maymunu (*Macaca fascicularis*) OSM amino asit sekansı (SEQ ID NO:40), Tablo 2'de sağlanmıştır.

Matür sinomolgus OSM'ye karşılık gelen amino asitler 1-196.

Bir Rhesus makakı (*Macaca mulatta*) IL-31 protein sekansı teknikte bilinir ve GenBank Erişim No. XP_001096743'te sağlanır. Örnek niteliğinde bir sinomolgus maymunu (*Macaca fascicularis*) IL-31 amino asit sekansı (SEQ ID NO:42), Tablo 2'de sağlanmıştır.

Bu sekans, matür sinomolgus maymunu IL-31'i temsil eder.

Örnek niteliğinde bir sinomolgus maymunu (*Macaca fascicularis*) IL31RA amino asit sekansı (SEQ ID NO:44), Tablo 2'de sağlanmıştır. Sinyal sekansına karşılık amino asitler 1-19; ve transmembran domene karşılık gelen amino asitler 520-540.

Bir Rhesus makakı (*Macaca mulatto*) gp130 protein sekansı teknikte bilinir ve GenBank Erişim No. NP_001252920'de sağlanır.

Örnek niteliğinde bir sinomolgus maymunu (*Macaca fascicularis*) gp130 amino asit sekansı (SEQ ID NO:46), Tablo 2'de sağlanmıştır.

Protein, birkaç domenden oluşur: Sinyal sekansına karşılık gelen amino asitler 1-22, hücre dışı domene karşılık gelen amino asitler 23-619; transmembran domene karşılık gelen amino asitler 620-641 ve sitoplazmik domene karşılık gelen amino asitler 642-918.

Tablo 2

Sinomolgus maymunu OSMR amino asit sekansı (SEQ ID NO:2)

MALFVVFQTTFFLILLSLRTYQSEVLAERLPLTPVSLKVSTNSIHQSLHLQWTVHNL
PYHQELKMFVFIQISRIETSNVWVGNYSTPVKWNQVLHWSWESELPLECATHFVRIKS
VIDDASFPEPNFWSNWSSWEEVSVQDYLGRGTLFVFPKDKLVEEGSNVTICYVSRNIQ
NNVSCYLEGKQIHGEQLDPHVTAFNLNSVPFIRNRGTNIYCEASQGNVSKGIEGIVLFV
SKVLEEPKDFSCESQDFKTLICTWDPGTDALGWSKQPSQSYTLFESFSGEKKLCTHK
NWCNWQITQDSQEMYNFTLIAENYLRKRSVNILFNLTHRVYLMNPFSVNFENVNATN
AIMTWKVHSMRNNFTYLCQIELHGEGKMMQYDVSINVNGEYFLSELEPATEYMARV
RCADASHFWKWTEWSGQNFTTLEAAPSEAPDVWRSVNSEPGNIITVTLFWKPLSKLH
ANGKILFYNVVVENLDKPSRSELRSIPAPANSTKLILDRCYQICVTANNSVGASPASII
VISADPENKEVEEERAGTEGGFSLSWKPQPGDVIGYVVDWC DHPQDVLQWKNVGPN
TTSTVISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIACLLEKKTGYSQELAPSDNPHVLVDMLTSH
SFTLSWKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSKARQCHPRFQKAVLSDGSECCRYKIDNPEEK
ALIVDNLKPESFYEFFVTPFTSAGEGPNATFTKVTTPEIHSSMLIRILLPMVFCVLLMIV
CYLKSQWIKETCYPDIPDPYKSSILSLIKFKENPHLTIMNVSDCIPDAIEVVSKEGKTIQ
LLGTRKSLTETELTKPNYLYLLPTEKNHSGPGPCICFENFTYNQAASDAGSCGHVPVPP
KAPPSMLGLMTSPENVLKALEKNYMNSLGEVPAGETSLNYVSQLASPMMSGDKDSLPT
NPVEPPHICSEYKMQMAVPLRLALPPPTENSSSLSSITLLDPGEHYR

Sinomolgus maymunu OSM amino asit sekansı (SEQ ID NO:40)

AAMGSCSKEYRMILLGQLQKQTDLMQDTSRIIDPYIRIQGLDIPKIREHCRES
PGAFPS EETLRGLGRRGFLQTLNATLGRILHRLADLEQHLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARP
NVLGLRNNVYCMAQLLDNSDMTEPTKAGRGTPQPPTPTPTSDVFQRKLEGCSFLRGY
HREMHISVGRVFSKWGESPNRSRR

Sinomolgus maymunu IL-31 amino asit sekansı (SEQ ID NO:42)

TLPVHFLQPSDIQKIVEELQSLSKMLIKDVKEDKGVLVSQNYTLPCITPDAQPPNIIHSP
AIRAYLKTI RQLDNKSVIDEIIHLDKLIFQDAPETNISVPTDTHECKRFILTISQQFSECM
DLALKSLTSGAQQATT

Sinomolgus maymunu IL31RA amino asit sekansı (SEQ ID NO:44)

MMWTWALWMFPLICKFGLAALPAKPENISCVYYRKNLTCTWSPGKETSYTQYTAK
RTYAFGKKHDNCTTSSSTSENRASCSFFLPRITIPDNYTIEVEAENG DGVIKSDMTCWR
LEDIAKTEPPEIFSVKPVLGIKRMIRIEWIKPELAPVSSDLKYALRFTVNSTSWMEVNF
AKNRKDTNQTYNLMGLQAFTEYVVALRCVAVKESKFWSDWSQEKMGMTREEAPCGL
ELWRVLKPTEVDGRRPVRLWKKARGAPVLEKTLGYNIWYFPENNTNLTETVNTTN
QQLELHLGGESYWVSMISYNSLGKSPVTTLRIPA IQEKSFRICIEVMQACLAEDQLVVK
WQSSALDVNTWMI EWFPDMDSEHPTLSWESVSQATNWTIQQDKLKPFWCYNISVYP
MLHDKVGEPYSIQAYAKEGIPSKGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSERKGHICNYTIFY
QAEGGTGFSKTVNSSILQYGLLESLKRKTSYTVRVMAS TSAGGINGTSINFKTLSFSVFEI
ILITSLIGGGLLILHLTVAYGLKKPNKLTHLCWPSVPNPAESSIATWRGDDFKDKILNK
ESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKLVIDKSVNFGNVLQEMFTDEARTGQENNLGGEKNE
NRILSSCPTS

Sinomolgus maymunu gp130 amino asit sekansı (SEQ ID NO:46)

MLTLQTWVVQALFIFLTTESIGELLDP CGYISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYFII
VNANYIVWKTNHFIPKEQYTHNRTASSVTFTDISSINQLTCNMLTFGQLEQNVYGITH
SGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWNRGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDT
PTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELS
SILKLTWTNPSIKSVIRLKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVF
RICCMKEDGKGYWSDWSEEANGITYEDRPSKAPSEFWYKIDPSHAQGYRTVQLMWKT
LPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNDTKLTVNLTNDRYVATLTARNLVGKSD
AAVLTI PACDFQATHPVMDLKAFFKDNMLWVEWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCI
ADWQQEDGTVHRTHLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTV
RTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTHIGNETAVNVDSSHTEYTLSSITS
DTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTTLGVLCFN
KRDLIKHIWPNVPDPSPKSHIAQWSPHTPPRHNFSSKDQMYSDGNFTDVSVEIEAND
KKPFEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSDENESSQNTSSSTVQYST
VVHISGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDIQLVDHVDGSDDILPRQQYFKQNC
SQHESSPDISHIFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGEMKMFQEVSAADPEG
PGTEGQVERFETIGMEAAIDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ

OSMR antijeni bağlayıcı Proteinler

Mevcut buluş, OSMR'yi spesifik olarak bağlayan antijen bağlayıcı proteinler sağlar. Antijen bağlayıcı proteinlerin uygulamaları, OSMR'yi spesifik olarak bağlayan peptitleri ve/veya polipeptitleri içerir. Bu peptitler veya polipeptitler, isteğe göre bir veya daha fazla translasyon sonrası modifikasyonlarını içerebilir. Antijen bağlayıcı proteinlerin uygulamaları, OSMR'yi spesifik olarak bağlayan, burada çeşitli şekilde tanımlanan antikorları ve antikor fragmanlarını içerir. Bunlar arasında, OSM ve/veya IL-31'in OSMR'ye bağlanmasını veya aktive etmesini inhibe edenler dahil olmak üzere insan OSMR'yi spesifik olarak bağlayan antikorlar bulunur.

Buluşun antijen bağlayıcı proteinleri, OSMR'ye spesifik olarak bağlanır. Burada kullanıldığı şekliyle "spesifik olarak bağlar" ifadesi, antijen bağlayıcı proteinin, diğer proteinlerden ziyade tercihen OSMR'yi bağladığı anlamına gelir. Bazı uygulamalarda "spesifik olarak bağlar" ifadesi, OSMR antijeni bağlayıcı proteinin, diğer proteinlere göre daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu anlamına gelir. OSMR'ye spesifik olarak bağlanan OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, insan OSMR için 1×10^{-7} M'den daha az veya 1×10^{-7} M'ye eşit, 2×10^{-7} M'den daha az veya 2×10^{-7} M'ye eşit, 3×10^{-7} M'den daha az veya 3×10^{-7} M'ye eşit,

4 x 10⁻⁷ M'den daha az veya 4 x 10⁻⁷ M'ye eşit, 5 x 10⁻⁷ M'den daha
 az veya 4 x 10⁻⁷ M'ye eşit, 6 x 10⁻⁷ M'den daha az veya 6 x 10⁻⁷
 M'ye eşit, 7 x 10⁻⁷ M'den daha az veya 7 x 10⁻⁷ M'ye eşit, 8 x
 10⁻⁷ M'den daha az veya 8 x 10⁻⁷ M'ye eşit, 9 x 10⁻⁷ M'den daha az
 5 veya 9 x 10⁻⁷ M'ye eşit, 1 x 10⁻⁸ M'den daha az veya 1 x 10⁻⁸ M'ye
 eşit, 2 x 10⁻⁸ M'den daha az veya 2 x 10⁻⁸ M'ye eşit, 3 x 10⁻⁸
 M'den daha az veya 3 x 10⁻⁸ M'ye eşit, 4 x 10⁻⁸ M'den daha az veya
 4 x 10⁻⁸ M'ye eşit, 5 x 10⁻⁸ M'den daha az veya 5 x 10⁻⁸ M'ye eşit,
 6 x 10⁻⁸ M'den daha az veya 6 x 10⁻⁸ M'ye eşit, 7 x 10⁻⁸ M'den
 10 daha az veya 7 x 10⁻⁸ M'ye eşit, 8 x 10⁻⁸ M'den daha az veya 8 x
 10⁻⁸ M'ye eşit, 9 x 10⁻⁸ M'den daha az veya 9 x 10⁻⁸ M'ye eşit, 1
 x 10⁻⁹ M'den daha az veya 1 x 10⁻⁹ M'ye eşit, 2 x 10⁻⁹ M'den daha
 az veya 2 x 10⁻⁹ M'ye eşit, 3 x 10⁻⁹ M'den daha az veya 3 x 10⁻⁹
 M'ye eşit, 4 x 10⁻⁹ M'den daha az veya 4 x 10⁻⁹ M'ye eşit, 5 x
 15 10⁻⁹ M'den daha az veya 5 x 10⁻⁹ M'ye eşit, 6 x 10⁻⁹ M'den daha
 az veya 6 x 10⁻⁹ M'ye eşit, 7 x 10⁻⁹ M'den daha az veya 7 x 10⁻⁹
 M'ye eşit, 8 x 10⁻⁹ M'den daha az veya 8 x 10⁻⁹ M'ye eşit, 9 x
 10⁻⁹ M'den daha az veya 9 x 10⁻⁹ M'ye eşit, 1 x 10⁻¹⁰ M'den daha
 az veya 1 x 10⁻¹⁰ M'ye eşit, 2 x 10⁻¹⁰ M'den daha az veya 2 x 10⁻
 20 10 M'ye eşit, 3 x 10⁻¹⁰ M'den daha az veya 3 x 10⁻¹⁰ M'ye eşit, 4
 x 10⁻¹⁰ M'den daha az veya 4 x 10⁻¹⁰ M'ye eşit, 5 x 10⁻¹⁰ M'den
 daha az veya 5 x 10⁻¹⁰ M'ye eşit, 6 x 10⁻¹⁰ M'den daha az veya 6
 x 10⁻¹⁰ M'ye eşit, 7 x 10⁻¹⁰ M'den daha az veya 7 x 10⁻¹⁰ M'ye eşit,
 8 x 10⁻¹⁰ M'den daha az veya 8 x 10⁻¹⁰ M'ye eşit, 9 x 10⁻¹⁰ M'den
 25 daha az veya 9 x 10⁻¹⁰ M'ye eşit, 1 x 10⁻¹¹ M'den daha az veya 1
 x 10⁻¹¹ M'ye eşit, 2 x 10⁻¹¹ M'den daha az veya 2 x 10⁻¹¹ M'ye eşit,
 3 x 10⁻¹¹ M'den daha az veya 3 x 10⁻¹¹ M'ye eşit, 4 x 10⁻¹¹ M'den
 daha az veya 4 x 10⁻¹¹ M'ye eşit, 5 x 10⁻¹¹ M'den daha az veya 5
 x 10⁻¹¹ M'ye eşit, 6 x 10⁻¹¹ M'den daha az veya 6 x 10⁻¹¹ M'ye eşit,
 30 7 x 10⁻¹¹ M'den daha az veya 7 x 10⁻¹¹ M'ye eşit, 8 x 10⁻¹¹ M'den
 daha az veya 8 x 10⁻¹¹ M'ye eşit, 9 x 10⁻¹¹ M'den daha az veya 9
 x 10⁻¹¹ M'ye eşit, 1 x 10⁻¹² M'den daha az veya 1 x 10⁻¹² M'ye eşit,
 2 x 10⁻¹² M'den daha az veya 2 x 10⁻¹² M'ye eşit, 3 x 10⁻¹² M'den
 daha az veya 3 x 10⁻¹² M'ye eşit, 4 x 10⁻¹² M'den daha az veya 4
 35 x 10⁻¹² M'ye eşit, 5 x 10⁻¹² M'den daha az veya 5 x 10⁻¹² M'ye eşit,

6×10^{-12} M'den daha az veya 6×10^{-12} M'ye eşit, 7×10^{-12} M'den daha az veya 7×10^{-12} M'ye eşit, 8×10^{-12} M'den daha az veya 8×10^{-12} M'ye eşit veya 9×10^{-12} M'den daha az veya 9×10^{-12} M'ye eşit bir bağlanma afinitesine sahip olabilir.

5 Bir antijen bağlayıcı proteinin bağlanma afinitesinin ölçülmesine yönelik yöntemler, teknikte iyi bilinir. Afinite belirlemeye yönelik yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında, Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) (Morton ve Myszka "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors" *Methods in Enzymology* (1998) 295, 268-294), Biyo-Tabaka İnterferometre (Girişimölçer), (Abdiche ve diğ. "Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the Octet" *Analytical Biochemistry* (2008) 377, 209-217), Kinetik

10 Dışlama Testi (KinExA) (Darling ve Brault "Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions" *Assay and Drug Dev Tech* (2004) 2, 647-657), izotermal kalorimetrisi (Pierce ve diğ. "Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions" *Methods* (1999) 19, 213-221) ve

15 analitik ultrasantrifügasyon (Lebowitz ve diğ. "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review" *Protein Science* (2002), 11:2067-2079) bulunur. Örnek 5, örnek niteliğinde afinite belirleme yöntemleri sağlar.

Burada yer alan OSMR bağlayıcı proteinlerin çeşitli

25 uygulamalarına referans yapıldığında, bunların OSMR bağlayıcı fragmanlarını da kapsadığı anlaşılır. Bir OSMR bağlayıcı fragman, OSMR'ye spesifik olarak bağlanma kabiliyetini koruyan burada tarif edilen antikor fragmanları veya domenlerinden herhangi birini içerir. OSMR bağlayıcı fragman, burada tarif

30 edilen iskelelerden herhangi birinde olabilir.

Belirli terapötik uygulamalarda bir OSMR antijeni bağlayıcı proteini, OSM ve/veya IL-31'in OSMR'ye bağlanmasını inhibe eder ve/veya örneğin OSM ve/Veya IL-31 aracılı sinyalleme gibi OSM ve/veya IL-31'in OSMR'ye bağlanması ile ilişkili bir veya daha

35 fazla biyolojik aktiviteyi inhibe eder. Bu antijen bağlayıcı

proteinlerin "nötrleştirici" olduğu söylenir. Belirli uygulamalarda nötrleştirici OSMR antijeni bağlayıcı protein, OSMR'yi spesifik olarak bağlar ve OSM'nin veya IL-31'in OSMR'ye bağlanmasını %10 ile %100 arasında herhangi bir oranda, en az

5 yaklaşık %20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,

10 97, 98, 99 veya daha yüksek bir oranda inhibe eder.

Örneğin, OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, antijen bağlayıcı proteinin OSM'nin ve/veya IL-31'in OSMR'ye bağlanmasını engelleme kabiliyetinin belirlenmesiyle, örneğin sırasıyla Örnek 2 ve 3'te yer alan insan ve sinomolgus OSMR engelleyici testler

15 ile nötrleştirme kabiliyeti bakımından test edilebilir. Alternatif olarak OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, OSM ve/veya IL-31 aracılı biyolojik işlevi ölçen bir analizde, OSMR antijeni bağlayıcı proteinin varlığının etkisini ölçen bir testte nötrleştirici nötrleştirme kabiliyeti bakımından test

20 edilebilir. Örneğin, OSM'nin, kültürlenmiş sığır aortik endotelyal hücrelerinde plazminojen aktivatör aktivitesinin uyarılması, IL-6 ifadesinin insan endotelyal hücrelerinde regülasyonu ve HepG2 hücrelerinde LDL alımı ve hücre yüzeyi LDL reseptörlerinin yukarı regülasyonunun uyarılması gibi bir

25 biyolojik yanıt indükleme kabiliyeti. Alternatif olarak, IL-31'in deride inflamasyonu indükleme kabiliyeti.

Antijen bağlayıcı proteinlerin uygulamaları, burada çeşitli şekilde tanımlanmış, bir veya daha fazla tamamlayıcılık belirleme bölgesine (CDR'ler) sahip bir iskele yapısını içerir.

30 Uygulamalar ayrıca, ağır veya hafif bir veya daha fazla antikör değişken domenine sahip bir iskele yapısını içeren antijen bağlayıcı proteinleri içerir. Uygulamalar arasında Ab1 Hafif Zincir Değişken Domeni (LCv), Ab2 LCv ve Ab3 LCv (sırasıyla SEQ ID NO:27-29) arasından seçilen bir hafif zincir değişken domeni

35 ve/veya Ab1 Ağır Zincir Değişken Domeni (HCv), Ab2 HCv ve Ab3

HCv (sırasıyla SEQ ID NO:9-11) arasından seçilen bir ağır zincir değişken domeni ve bunların fragmanlarını, türevlerini, muteinlerini ve varyantlarını içeren antikorlar bulunur.

SEQ ID NO: 9'un örnek niteliğinde bir ağır zincir değişken domen varyantı, SEQ ID NO:9'da yer alan pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerir. SEQ ID NO:53'te belirtilen amino asit sekansı, SEQ ID NO:9'un bir ağır zincir değişken domen varyantına bir örnektir.

10 SEQ ID NO: 10'un örnek niteliğinde bir ağır zincir değişken domen varyantı, SEQ ID NO:10'da yer alan pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerir. SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansı, SEQ ID NO:10'un bir ağır zincir değişken domen varyantına bir
15 örnektir.

Ab1 LCv içeren örnek niteliğinde bir hafif zincir, SEQ ID NO:24'te belirtilen amino asit sekansını içeren bir hafif zincirdir.

Ab2 LCv içeren örnek niteliğinde bir hafif zincir, SEQ ID
20 NO:25'te belirtilen amino asit sekansını içeren bir hafif zincirdir.

Ab3 LCv içeren örnek niteliğinde bir hafif zincir, SEQ ID NO:26'da belirtilen amino asit sekansını içeren bir hafif zincirdir.

25 Ab1 HCv içeren örnek niteliğinde bir ağır zincir, SEQ ID NO:6'da belirtilen amino asit sekansını içeren bir ağır zincirdir.

Bir Ab1 HCv varyantı içeren örnek niteliğinde bir ağır zincir, SEQ ID NO:50'de belirtilen amino asit sekansını içeren bir ağır zincirdir.

30 Ab2 HCv içeren örnek niteliğinde bir ağır zincir, SEQ ID NO:7'de belirtilen amino asit sekansını içeren bir ağır zincirdir.

Bir Ab2 HCv varyantı içeren örnek niteliğinde bir ağır zincir, SEQ ID NO:51'de belirtilen amino asit sekansını içeren bir ağır zincirdir.

35 Ab3 HCv içeren örnek niteliğinde bir ağır zincir, SEQ ID NO:8'de

belirtilen amino asit sekansını içeren bir ağır zincirdir.

Bir Ab3 HCv varyantı içeren örnek niteliğinde bir ağır zincir, SEQ ID NO:52'de belirtilen amino asit sekansını içeren bir ağır zincirdir.

5 İskelelerin ilave örnekleri arasında, bunlarla sınırlı kalmamak üzere, fibronektin, neokarzinostatin CBM4-2, libokalinler, T hücre reseptörü, protein A domeni (protein Z), Im9, TPR proteinleri, çinko parmağı domenleri, pVIII, kuş pankreatik polipeptidi, GCN4, WW domeni Src homoloji domeni 3, PDZ
10 domenleri, TEM-1 beta-laktamaz, tiyoredoksin, stafilokokal nükleaz, PHD parmağı domenleri, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, ekotin, LACI-D1, LDTI, MTI-II, akrep toksinleri, böcek defensin A peptidi, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, sitokrom b-562, Ldl reseptör domenleri, gamma-kristalin, ubikuitin, transferrin ve/veya C tip
15 lektin benzeri domenler bulunur. Antikor olmayan iskeleler ve bunların terapötik madde olarak kullanılmaları, Gebauer ve Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255 (2009) ve Binz ve diğ., *Nat. Biotech.*, 23(10): 1257-68 (2005) yayınında değerlendirilmiştir.

20 Buluşun görünüşleri arasında, aşağıdaki değişken domenleri içeren antikorlar bulunur: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:9), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:10), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:29/SEQ ID NO:11) ve bunların kombinasyonları ve aynı zamanda bunların fragmanları,
25 türevleri, muteinleri ve varyantları.

Ayrıca aşağıdaki değişken domenleri içeren antikorlar da bulunur: SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:53; ve SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:54.

Mevcut buluşun örnek niteliğindeki antikorları arasında Ab1 (SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:6), Ab2 (SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:7) ve Ab3
30 (SEQ ID NO:26/SEQ ID NO:8) bulunur.

İlave örnek niteliğindeki antikorlar arasında SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:51; ve SEQ ID NO:26/SEQ ID NO:52 bulunur.

Bir antikor hafif veya ağır zincirin her bir değişken domeni,
35 tipik olarak üç CDR içerir. Ağır zincir değişken domeni, bir

ağır zincir CDR1 (HCDR1), bir ağır zincir CDR2 (HCDR2) ve bir ağır zincir CDR3 (HCDR3) içerir. Hafif zincir değişken domeni, bir hafif zincir CDR1 (LCDR1), bir hafif zincir CDR2 (LCDR2), ve bir hafif zincir CDR3 (LCDR3) içerir. Belirli uygulamalarda bir antijen bağlayıcı protein, burada tarif edilen tercih edilen değişken domenleri içerisinde bulunan bir veya daha fazla CDR içerir.

CDR örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, aşağıdakiler bulunur:

- 10 Ab1 LCv'nin CDR'leri: LCDR1 (SEQ ID NO:30), LCDR2 (SEQ ID NO:33) ve LCDR3 (SEQ ID NO:36);
Ab2 LCv'nin CDR'leri: LCDR1 (SEQ ID NO:31), LCDR2 (SEQ ID NO:34) ve LCDR3 (SEQ ID NO:37);
Ab3 LCv'nin CDR'leri: LCDR1 (SEQ ID NO:32), LCDR2 (SEQ ID NO:35) ve LCDR3 (SEQ ID NO:38);
15 Ab1 HCv'nin CDR'leri: HCDR1 (SEQ ID NO:12), HCDR2 (SEQ ID NO:15) ve HCDR3 (SEQ ID NO:18);
Ab2 HCv'nin CDR'leri: HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:16) ve HCDR3 (SEQ ID NO:19); ve
20 Ab3 HCv'nin CDR'leri: HCDR1 (SEQ ID NO:14), HCDR2 (SEQ ID NO:17) ve HCDR3 (SEQ ID NO:20).

Bazı uygulamalarda antijen bağlayıcı protein aşağıdakileri içerir: A) SEQ ID NO:30, 31 ve 32'den oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:33, 34 ve 35'ten oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansına sahip bir LCDR2 içeren bir polipeptit, örneğin bir hafif zincir; ve/veya SEQ ID NO:36, 37 ve 38'den oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansına sahip bir LCDR3 içeren bir polipeptit, örneğin bir hafif zincir; ve/veya B) SEQ ID NO:12, 13 ve 14'ten oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:15, 16 ve 17'den oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansına sahip bir HCDR2; ve/veya SEQ ID NO:18, 19 ve 20'den oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansına sahip bir HCDR3 içeren bir polipeptit, örneğin bir ağır zincir.

35 Belirli uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, A) Ab1 LCv, Ab2

LCv ve Ab3 LCv'nin herhangi birinin LCDR1, LCDR2 ve LCDR3'ünü içeren bir hafif zincir amino asit sekansı ve B) Ab1 HCv, Ab2 HCv ve Ab3 HCv'nin herhangi birinin HCDR1, HCDR2 ve HCDR3'ünü içeren bir ağır zincir amino asit sekansını içerir.

5 Belirli uygulamalarda CDR'ler, burada belirtilen örnek niteliğinde bir CDR'den en fazla bir, en fazla iki, en fazla üç, en fazla dört, en fazla beş veya en fazla altı amino asit eklemesi, silmesi veya ornatması içerir.

10 Buluşun görünüşleri arasında, SEQ ID NO:27, 28 ve 29'dan oluşan gruptan seçilen bir hafif zincir değişken domeni içeren antikorlar bulunur. Buluşun görünüşleri arasında, SEQ ID NO:9, 10 ve 11'den oluşan gruptan seçilen bir ağır zincir değişken domeni içeren antikorlar bulunur. Buluşun diğer görünüşleri arasında, A) SEQ ID NO:27, 28 ve 29'dan oluşan gruptan seçilen
15 bir hafif zincir değişken domeni ve B) SEQ ID NO:9, 10 ve 11'den oluşan gruptan seçilen ağır zincir değişken domeni içeren antikorlar bulunur.

Buluşun antikorları, teknikte bilinen herhangi bir sabit bölge içerebilir. Hafif zincir sabit bölgesi, örneğin, bir kappa veya
20 lambda tipi hafif zincir sabit bölgesi, örneğin bir insan kappa veya lambda tipi hafif zincir sabit bölgesi olabilir. Ağır zincir sabit bölgesi, örneğin bir alfa, delta, epsilon, gamma veya mu tipi ağır zincir sabit bölgesi, örneğin bir insan alfa, delta, epsilon, gamma veya mu tipi ağır zincir sabit bölgesi olabilir.
25 Bir uygulamada hafif ve ağır zincir sabit bölgesi, doğal olarak oluşan bir sabit bölgenin bir fragmanı, türevi, varyantı veya muteinidir.

Mevcut buluşun görünüşleri arasında, en fazla bir, en fazla iki, en fazla üç, en fazla dört, en fazla beş, en fazla altı, en fazla yedi, en fazla sekiz, en fazla nin veya en fazla on amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip SEQ ID NO:27, 28 ve
30 29'dan oluşan gruptan seçilen bir hafif zincir değişken bölgesi içeren antikorlar bulunur. Mevcut buluşun görünüşleri arasında, en fazla bir, en fazla iki, en fazla üç, en fazla dört, en fazla beş, en fazla altı, en fazla yedi, en fazla sekiz, en fazla nin
35

veya en fazla on amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip SEQ ID NO:9, 10 ve 11'den oluşan gruptan seçilen bir ağır zincir değişken bölgesi içeren antikorlar bulunur. Mevcut buluşun başka görünüşleri arasında, A) en fazla bir, en fazla iki, en fazla üç, en fazla dört, en fazla beş, en fazla altı, en fazla yedi, en fazla sekiz, en fazla nin veya en fazla on amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip SEQ ID NO:27, 28 ve 29'dan oluşan gruptan seçilen bir hafif zincir değişken bölgesi ve B) en fazla bir, en fazla iki, en fazla üç, en fazla dört, en fazla beş, en fazla altı, en fazla yedi, en fazla sekiz, en fazla nin veya en fazla on amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip SEQ ID NO:9, 10, ve 11'den oluşan gruptan seçilen bir ağır zincir değişken bölgesi içeren antikorlar bulunur.

15 Bir varyasyonda antijen bağlayıcı protein, SEQ ID NO:27, 28 ve 29'dan oluşan gruptan seçilen amino asit sekansının bir hafif zincir değişken bölgesine en az %80, en az %81, en az %82, en az %83, en az %84, en az %85, en az %86, en az %87, en az %88, en az %89, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 özdeş olan bir amino asit sekansını içerir. Başka bir varyasyonda antijen bağlayıcı protein, SEQ ID NO:9, 10 ve 11'dan oluşan gruptan seçilen amino asit sekansının bir ağır zincir değişken bölgesine en az %80, en az %81, en az %82, en az %83, en az %84, en az %85, en az %86, en az %87, en az %88, en az %89, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 özdeş olan bir amino asit sekansını içerir. Yine başka bir uygulama antijen bağlayıcı protein, A) SEQ ID NO:27, 28 ve 29'dan oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansının bir hafif zincir değişken bölgesine en az %80, en az %81, en az %82, en az %83, en az %84, en az %85, en az %86, en az %87, en az %88, en az %89, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 özdeş bir amino asit sekansı ve B) SEQ ID NO:9, 10 ve 11'den gruptan seçilen bir amino asit

sekansının bir ağır zincir değişken bölgesine bir amino asit sekans olan is en az %80, en az %81, en az %82, en az %83, en az %84, en az %85, en az %86, en az %87, en az %88, en az %89, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 özdeş bir amino asit sekansını içerir.

SEQ ID NO:9 ile yukarıda tanımlanan şekilde sekans ilişkisine sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:9'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerebilir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:53'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

SEQ ID NO:10 ile yukarıda tanımlanan şekilde sekans ilişkisine sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:10'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerebilir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

Belirli uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, bir hafif zincir ve/veya ağır zincir CDR3 içerir. Bazı uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, SEQ ID NOS:36, 37, 38, 18, 19 ve 20'de belirtilen sekans grubundan seçilen bir amino asit sekansı içerir. Belirli uygulamalarda söz konusu amino asit sekansı, SEQ ID NO:36, 37, 38, 18, 19 ve 20'de belirtilen bir örnek niteliğinde sekanstan en fazla bir, en fazla iki, en fazla üç, en fazla dört, en fazla beş veya en fazla altı amino asit eklemesi, silmesi veya ornatması içerir. Dolayısıyla mevcut buluşun uygulamaları, SEQ ID NO:36, 37, 38, 18, 19 ve 20'de belirtilen sekans grubundan seçilen bir amino asit sekansına en az %80, en az %81, en az %82, en az %83, en az %84, en az %85, en az %86, en az %87, en az %88, en az %89, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 özdeş olan bir amino asit

sekansı içerir.

Belirli uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, bir hafif zincir ve/veya ağır zincir CDR2 içerir. Bazı uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, SEQ ID NOS:33, 34, 35, 15, 16 ve 17'de belirtilen sekans grubundan seçilen bir amino asit sekansı içerir. Belirli uygulamalarda söz konusu amino asit sekansı, SEQ ID NO:33, 34, 35, 15, 16 ve 17'de belirtilen bir örnek niteliğinde sekanstan en fazla bir, en fazla iki, en fazla üç, en fazla dört, en fazla beş veya en fazla altı amino asit eklemesi, silmesi veya ornatması içerir. Dolayısıyla mevcut buluşun uygulamaları, SEQ ID NO:33, 34, 35, 15, 16 ve 17'de belirtilen sekans grubundan seçilen bir amino asit sekansına en az %80, en az %81, en az %82, en az %83, en az %84, en az %85, en az %86, en az %87, en az %88, en az %89, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 özdeş olan bir amino asit sekansı içerir.

Belirli uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, bir hafif zincir ve/veya ağır zincir CDR1 içerir. Bazı uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, SEQ ID NOS:30, 31, 32, 12, 13 ve 14'de belirtilen sekans grubundan seçilen bir amino asit sekansı içerir. Belirli uygulamalarda söz konusu amino asit sekansı, SEQ ID NO:30, 31, 32, 12, 13 ve 14'te belirtilen bir örnek niteliğinde sekanstan en fazla bir, en fazla iki, en fazla üç, en fazla dört, en fazla beş veya en fazla altı amino asit eklemesi, silmesi veya ornatması içerir. Dolayısıyla mevcut buluşun uygulamaları, SEQ ID NO:30, 31, 32, 12, 13 ve 14'te belirtilen sekans grubundan seçilen bir amino asit sekansına en az %80, en az %81, en az %82, en az %83, en az %84, en az %85, en az %86, en az %87, en az %88, en az %89, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 özdeş olan bir amino asit sekansı içerir.

Mevcut buluşun antijen bağlayıcı proteinleri, sırasıyla insan ve monoklonal antikorları, bispesifik antikorları, diakorlar,

minikorlar, domen antikorları, sentetik antikorları (bazen "antikor mimetikleri" olarak da adlandırılır), kimerik antikorları, antikor füzyonları (bazen "antikor konjüгатları" olarak da adlandırılır) ve bunların fragmanları dahil olmak üzere geleneksel antikorların iskelelerini içerir. Çeşitli CDR kombinasyonları dahil olmak üzere yukarıda tarif edilen CDR'ler, aşağıdaki iskelelerin herhangi birine aşılabilir.

Burada kullanıldığı şekliyle "antikor" terimi, yukarıda çeşitli şekilde tarif edilen bir antijene spesifik olarak bağlanan bir veya daha fazla polipeptit zincirini içeren monomerik veya multimerik proteinlerin çeşitli formlarını ifade eder. Belirli uygulamalarda antikorları, rekombinant DNA teknikleriyle üretilir. İlave uygulamalarda antikorlar, doğal olarak oluşan antikorların enzimatik veya kimyasal bölünme ile üretilir. Başka bir uygulamada söz konusu antikor, a) bir insan antikor; b) bir insanlaştırılmış antikor; c) bir kimerik antikor; d) bir monoklonal antikor; e) bir poliklonal antikor; f) bir rekombinant antikor; g) bir antijen bağlayıcı fragmanı; h) bir tek zincirli antikor; i) bir diyakor; j) bir triakor (triabody), k) bir tetrakor (tetrabody), l) bir Fab fragmanı; m) bir F(ab')₂ fragmanı, n) bir IgA antikor, o) bir IgD antikor, p) bir IgE antikor, q) bir IgG1 antikor, r) bir IgG2 antikor, s) bir IgG3 antikor, t) bir IgG4 antikor ve u) bir IgM antikorundan oluşan gruptan seçilir.

Bir değişken bölge veya domen, bir çerçeve bölgesi (belirtilen çerçeve bölgeleri FR1, FR2, FR3 ve FR4) içine gömülmüş en az üç ağır veya hafif zincir CDR içerir. Kabat ve diğ., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Geleneksel antikor yapısal birimleri, tipik olarak bir tetramer içerir. Her bir tetramer, tipik olarak iki özdeş çift polipeptit zincirinden oluşan ve her çift, bir "hafif" ve bir "ağır" zincire sahiptir. Her bir zincirin amino uç kısmı, esas olarak antijen tanımadan sorumlu yaklaşık 100 ila 110 veya daha fazla amino asitlik bir değişken bölgeyi içerir.

Her bir zincirin karboksi uç kısmı, öncelikli olarak efektör

fonksiyonundan sorumlu bir sabit bölgeyi tanımlar. İnsan hafif zincirler, kappa veya lambda hafif zincirleri olarak sınıflandırılır. Ağır zincirler mu, delta, gamma, alfa veya epsilon olarak sınıflandırılır ve antikorun izotipini sırasıyla 5 IgM, IgD, IgG, IgA ve IgE olarak tanımlar. IgG, bunlarla sınırlı olmamak üzere IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 dahil birkaç alt sınıfa sahiptir. IgM, bunlarla sınırlı olmamak üzere IgM1 ve IgM2 dahil alt sınıflara sahiptir. Mevcut buluşun uygulamaları arasında, antikorun, buluşun antijen bağlayıcı proteinlerinin bir değişken 10 domenini veya CDR'sini içeren tüm sınıfları ve alt sınıfları bulunur.

Örneğin develerde ve lamalarda bulunan doğal olarak oluşan bazı antikorlar, iki ağır zincirden oluşan dimerlerdir ve hiç hafif zincir içermez. Mevcut buluş, OSMR'ye bağlanabilen, iki ağır 15 zincirden oluşan dimerik antikorları ve bunların fragmanlarını kapsar.

Ağır ve hafif zincirlerin değişken bölgeleri tipik olarak üç aşırı değişken bölge ile, başka bir deyişle tamamlayıcılık belirleme bölgeler veya CDR'ler ile birleştirilen nispeten 20 korunmuş çerçeve bölgeleri ile aynı genel yapıyı sergiler. CDR'ler, birincil olarak antijen tanıma ve bağlamadan sorumludur. Her bir çiftin iki zincirinden gelen CDR'ler, çerçeve bölgeleri ile hizalanır ve böylece spesifik bir epitopa bağlanır. N ucundan C ucuna kadar hafif ve ağır zincirin her 25 ikisi FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 ve FR4 domenlerini oluşturur. Amino asitlerin her bir domene atanması, Kabat tanımlamalarına uygundur.

CDR'ler, antijen bağlanması için ana yüzey temas noktalarını oluşturur. CDR3 veya hafif zincir ve özellikle ağır zincirin 30 CDR3'ü, hafif ve ağır zincir değişken bölgelerindeki antijen bağlanmasında en önemli determinantları oluşturabilir. Bazı antikorlarda ağır zincir CDR3, antijen ve antikor arasındaki ana temas alanını oluşturduğu görülür. Sadece CDR3'ün değiştiği in vitro seçim şemaları, bir antikorun bağlanma özelliklerini 35 değiştirmek ve hangi kalıntıların bir antijenin bağlanmasına

katkıda bulunduğunu belirlemek için kullanılabilir.

Doğal olarak oluşan antikörler tipik olarak, antikoru protein salgılaması için hücresel yolağa yönlendiren ve tipik olarak matür antikorda bulunmayan bir sinyal sekansını içerir. Buluşun bir antikörünü kodlayan bir polinükleotit, aşağıda tarif edildiği gibi doğal olarak oluşan bir sinyal sekansını veya heterolog bir sinyal sekansını kodlayabilir.

Bir uygulamada antijen bağlayıcı protein, burada tarif edilen bir ila altı örnek niteliğindeki CDR içeren bir antikordur. Buluşun antikörleri, IgM, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 dahil), IgD, IgA veya IgE antikoru dahil olmak üzere herhangi bir tipte olabilir. Spesifik bir uygulamada antijen bağlayıcı protein, bir IgG tip antikör, örneğin bir IgG1 antikörüdür.

Bazı uygulamalarda, örneğin söz konusu antijen bağlayıcı proteinin bütün ağır ve hafif zincirlere sahip bir antikör olması durumunda, CDR'lerin tümü aynı türden, örneğin insandan elde edilir. Alternatif olarak, örneğin antijen bağlayıcı proteinin yukarıda belirtilen sekanslardan altı CDR'den daha azını içermesi durumunda, ilave CDR'ler, diğer türlerden elde edilebilir veya örnek niteliğindeki sekanslarda belirtilenlerden farklı insan CDR'leri olabilir. Örneğin, burada tanımlanan uygun sekanslardan HCDR3 ve LCDR3 bölgeleri, alternatif türlerden veya farklı insan antikör sekanslarından veya bunların kombinasyonlarından isteğe göre seçilen HCDR1, HCDR2, LCDR1 ve LCDR2 ile kullanılabilir. Örneğin buluşun CDR'leri, ticari olarak ilgili kimerik ve insanlaştırılmış antikörlerin CDR bölgelerinin yerini alabilir.

Spesifik uygulamalarda, insan bileşenleri olan antijen bağlayıcı proteinlerin iskele bileşenleri kullanılır. Ancak bazı uygulamalarda söz konusu iskele bileşenler, farklı türlerden bir karışım olabilir. Bu şekilde antijen bağlayıcı proteinin bir antikör olması durumunda, söz konusu antikör bir kimerik antikör ve/veya insanlaştırılmış antikör olabilir. Genel olarak "kimerik antikörler" ve "insanlaştırılmış antikörler", birden fazla türden bölgeleri birleştiren antikörleri ifade eder. Örneğin

"kimerik antikorlar" geleneksel olarak bir fareden (veya bazı durumlarda sıçandan) değişken bölge(ler) veya bir insandan sabit bölge(ler) içerir.

"insanlaştırılmış antikorlar" genellikle, insan antikorlarında bulunan sekanslar için değişken domen çerçeve bölgeleri değiştirilmiş insan olmayan antikorları ifade eder.

Genel olarak insanlaştırılmış bir antikorda, bir veya daha fazla CDR dışında tüm antikor, bir insan kökenli polinükleotit tarafından kodlanır ve bir veya daha fazla CDR'de olması dışında

böyle bir antikora özdeştir. Bir kısmı veya tamamı insan olmayan bir organizmadan gelen nükleik asitler tarafından kodlanan ve özgüllüğü aşıl原因 CDR'ler tarafından belirlenen CDR'ler, bir antikor oluşturmak üzere bir insan antikor değişken bölgesinin beta-yaprak çerçevesine aşıl原因. Bu tür antikorların

oluşturulması, WO 92/11018, Jones 1986, *Nature* 321:522-525, Verhoeven ve diğ., 1988, *Science* 239:1534-1536 yayınında tarif edilir. İnsanlaştırılmış antikorlar ayrıca, genetiği değiştirilmiş bir bağışıklık sistemine sahip fareler kullanılarak da oluşturulabilir (Roque ve diğ., 2004,

Biotechnol. Prog. 20:639-654). Burada tarif edilen örnek niteliğindeki uygulamalarda, tanımlanan CDR'ler, insan kökenlidir ve bu nedenle bu bağlamda hem insanlaştırılmış ve kimerik antikorlar bazı insan olmayan CDR'leri içerir; örneğin farklı bir tür kökenden başka bir veya daha fazla CDR bölgesine sahip HCDR3 ve LCDR3 bölgelerini içeren insanlaştırılmış antikorlar oluşturulabilir.

Bir uygulamada OSMR antijeni bağlayıcı protein, multispesifik bir antikor ve özellikle "diakorlar" olarak da adlandırılan bispesifik bir antikordur. Bunlar, tek bir antijen üzerinde iki

veya daha fazla farklı antijene veya farklı epitoplara bağlanan antikorlardır. Belirli uygulamalarda bir bispesifik antikor, OSMR'yi ve bir insan efektör hücresi (örn. T hücresi) üzerinde bir antijeni bağlar. Bu antikorlar, bir efektör hücre yanıtının OSMR ifade eden hücrelere, örneğin OSMR ifade eden bir tümör

hücresine karşı hedeflenmesinde faydalıdır. Tercih edilen

uygulamalarda insan efektör hücre antijeni, CD3'tür. U.S. Pat. No. 7,235,641. Bispesifik antikorların yapılmasına yönelik yöntemler teknikte bilinir. Bu yöntem, örneğin bir hücrede birlikte ifade edildiğinde ağır zincirlerin heterodimer oluşumunu kolaylaştıran "topuzlar" ve "delikler" oluşturmak için ağır zincirlerin Fc kısmının tasarlanmasını içerir. U.S. 7,695,963. Başka bir yöntem ise ağır zincirin Fc kısmının tasarlanmasını içerir; ancak söz konusu yöntemde, bir hücrede birlikte ifade edildiğinde ağır zincirlerin homodimer oluşumunu zorlaştırırken heterodimer oluşumunu desteklemek için elektrostatik yönlendirme kullanılır. WO 09/089.004.

Bir uygulamada OSMR antijeni bağlayıcı protein, bir minikordur. Minikorlar, bir CH3 domenine birleştirilmiş bir scFv içeren küçültülmüş antikor benzeri proteinlerdir (Hu ve diğ., 1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061).

Bir uygulamada OSMR antijeni bağlayıcı protein, bir domen antikorudur, bkz. örn. U.S. Patent No. 6,248,516. Domen antikorları (dAb'ler), antikorların fonksiyonel bağlanma domenleridir ve insan antikorlarının ağır (VH) veya hafif (VL) zincirlerinin değişken bölgelerine karşılık gelir. dAB'ler, yaklaşık 13 kDa'lık bir moleküler ağırlığa veya tam bir antikoron onda birinden daha az bir moleküler ağırlığa sahiptir. dAB'ler, bakteri, maya ve memeli hücre sistemleri dahil çeşitli konaklarda iyi ifade edilir. Ek olarak dAb'ler, oldukça stabildir ve dondurarak kurutma veya ısı denatürasyonu gibi zorlu koşullara maruz kaldıktan sonra bile aktivitesi korur. Bkz. örn. US Patent 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; US Seri No. 2004/0110941; Avrupa Patenti 0368684; US Patent 6,696,245, WO04/058821, WO04/003019 ve WO03/002609.

Bir uygulamada OSMR antijeni bağlayıcı proteini, bir antikor fragmanıdır, başka bir deyişle, OSMR'ye bağlanma özgülüğünü koruyan, burada belirtilen antikorlardan herhangi birinin bir fragmanıdır. Çeşitli uygulamalarda antikor bağlayıcı proteinler, bunlarla sınırlı olmamak üzere, bir F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv veya tek zincirli Fv fragmanlarını içerir. Burada ifade edilen

şekilde bir antikor, en azından, bir veya daha fazla CDR gibi bir hafif ya da ağır zincir değişken bölgesinin tamamını veya bir kısmını içeren OSMR'ye spesifik olarak bağlanabilen bir polipeptidi içerir.

5 OSMR bağlayıcı antikor fragmanlarının diğer örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, (i) VL, VH, CL ve CH1 domenlerinden oluşan Fab fragmanı, (ii) VH ve CH1 domenlerinden oluşan Fd fragmanı, (iii) bir tek antikorum VL ve VH domenlerinden oluşan Fv fragmanı; (iv) tek bir değişkenden
10 oluşan dAb fragmanı (Ward ve diğ., 1989, *Nature* 341:544-546), (v) izole edilmiş CDR bölgeleri, (vi) F(ab')₂ fragmanları, bağlantılı iki Fab fragmanı içeren bir bivalent fragman (vii) bir VH domeni ve bir VL domeninin, iki domenin bir antijen bağlanma alanı oluşturmak üzere birleşmesini sağlayan bir peptit
15 bağlayıcı ile bağlandığı tek zincirli Fv molekülleri (scFv), (Bird ve diğ., 1988, *Science* 242:423-426, Huston ve diğ., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883), (viii) bispesifik tek zincirli Fv dimerleri (PCT/US92/09965) ve (ix) gen füzyonları ile oluşturulan "diakorlar" veya "trikorlar",
20 multivalent ve multispesifik fragmanlar (Tomlinson et. al., 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; WO94/13804; Holliger ve diğ., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448) bulunur. Antikor fragmanları modifiye edilebilir. Örneğin moleküller, VH ve VL domenlerini bağlayan disülfid köprülerin dahil edilmesiyle
25 stabilize edilebilir (Reiter ve diğ., 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245). Mevcut buluşun görünümleri arasında, bu fragmanların CDR olmayan bileşenlerinin insan sekansları olduğu uygulamalar bulunur.

Bir uygulamada OSMR antijeni bağlayıcı protein, tamamen insan
30 antikordur. Yukarıda belirtildiği şekliyle bu uygulamada, spesifik yapılar, CDR bölgelerini içerecek şekilde tasvir edilen tam ağır ve hafif zincirleri içerir. İlave uygulamalarda, buluşun bir veya daha fazla CDR'si ile birlikte diğer insan antikorlarından elde edilen diğer CDR'ler, çerçeve bölgeleri, J
35 ve D bölgeleri, sabit bölgeler ve benzerleri kullanılır. Örneğin

buluşun CDR'leri, herhangi bir sayıda insan antikorunun, özellikle ticari olarak ilgili antikorların CDR'leri değiştirilebilir.

5 Tek zincirli antikorlar, bir amino asit köprüsü (kısaca peptit bağlayıcı) aracılığıyla ağır ve hafif zincir değişken domeninin (Fv bölgesi) bağlanmasıyla oluşturulabilir ve tek bir polipeptid zinciri ortaya çıkar. Bu tek zincirli Fv'ler (scFv'ler), bir peptit bağlayıcıyı kodlayan DNA'nın iki değişken domen polipeptitlerine (VL ve VH) KAYNAŞTIRILMASIYLA HAZIRLANMIŞTIR. Ortaya
10 çıkan polipeptitler, antijen bağlayıcı monomerleri oluşturmak için kendileri üzerine katlanabilir veya iki değişken domen arasındaki esnek bir bağlayıcının uzunluğuna bağları olarak multimerler (örn. dimerler, trimerler veya tetramerler) oluşturabilir (Kortt ve diğ., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt ve diğ., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Farklı VL ve VH içeren polipeptitleri birleştirilerek farklı epitoplara bağlanan multimerik scFv'ler oluşturulabilir (Kriangkum ve diğ., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Tek zincirli antikorların oluşturulması için geliştirilen teknikler arasında U.S. Patent No. 4,946,778;
15 Bird, 1988, Science 242:423; Huston ve diğ., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward ve diğ., 1989, Nature 334:544, de Graaf ve diğ., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87 yayınlarında tarif edilen teknikler bulunur. Burada sağlanan antikorlardan türetilen tek zincirli antikorlar (Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:9), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:10) ve Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:29/SEQ ID NO:11) değişken domen kombinasyonlarını içeren scFv'ler dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere) ve bunların kombinasyonları mevcut buluşun kapsamı dahilindedir. Örnek niteliğindeki tek zincirli
25 antikorlar arasında, değişken domen kombinasyonları SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:53 ve SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:54 bulunur.

Bir uygulamada OSMR antijeni bağlayıcı protein, bir antikor füzyon proteindir (burada bazen "antikor konjüгатı" olarak da adlandırılır). Konjüгат partneri, proteinli veya proteinsiz
35 olabilir; proteinli olanlar genellikle antijen bağlayıcı protein

ve konjüгат partneri üzerindeki fonksiyonel gruplar kullanılarak oluşturulur. Belirli uygulamalarda antikor, proteinli olmayan bir kimyasala (ilaca) konjüge edilir ve bir antikor ilaç konjüгатı oluşturulur.

- 5 Bir uygulamada OSMR antijeni bağlayıcı protein, "sentetik antikorlar" olarak da adlandırılan bir antikor analogudur. Örneğin çeşitli çalışmalarda, alternatif protein iskeleleri veya aşılana CDR'lere sahip yapay iskeleler kullanılır. Bu iskeleler, bunlarla sınırlı kalmamak üzere, bağlayıcı proteinin
- 10 üç boyutlu yapısını stabilize etmek üzere uygulanan mutasyonları ve aynı zamanda örneğin biyouyumlu polimerlerden oluşan tamamen sentetik iskeleleri içerir. Bkz. örn. Korndorfer ve diğ., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Cilt 53, Sayı 1:121-129. Roque ve diğ., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Ek
- 15 olarak peptit antikor mimetikleri ("PAM'ler") ve ayrıca bir iskele olarak fibroneksiyon bileşenlerinin kullanıldığı antikor mimetiklerine dayalı çalışma kullanılabilir.
- Burada kullanıldığı şekliyle "protein" terimi ile proteinler, polipeptitler, oligopeptitler ve peptitler içeren, kovalent
- 20 olarak bağlı en az iki amino asit kastedilir. Bazı uygulamalarda, kovalent olarak bağlı iki veya daha fazla amino asit, bir peptit bağı ile bağlanır. Protein, örneğin proteinin aşağıda açıklanan şekilde ifade sistemlerinin ve konak hücrelerinin kullanılmasıyla rekombinant olarak oluşturulması durumunda doğal
- 25 olarak oluşan amino asitlerden ve peptit bağlarından oluşabilir. Alternatif olarak protein, proteaza veya diğer fizyolojik ve/veya saklama koşullarına direnç gösterebilen sentetik amino asitleri (örn. homofenilalanin, sitrullin, ornitin ve norlösin) veya peptidomimetik yapıları, başka bir deyişle "peptit veya
- 30 protein analogları", örneğin peptoidler (bkz. Simon ve diğ., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9367) içerebilir. Bu sentetik amino asitler, özellikle antijen bağlayıcı proteinin, teknikte iyi bilinen geleneksel yöntemler yoluyla *in vitro* sentezlenmesi durumunda dahil edilebilir. Bunlara ek olarak,
- 35 peptidomimetik, sentetik ve doğal olarak oluşan

kalıntılar/yapılardan oluşan herhangi bir kombinasyon da kullanılabilir. "Amino asit" ayrıca, prolin ve hidroksprolin gibi imino asit kalıntılarını içerir. Amino asit "R grubu" veya "yan zinciri", (L) veya (S) konfigürasyonuna sahip olabilir.

5 Spesifik bir uygulamada amino asitler, (L) veya (S) konfigürasyonuna sahiptir.

Belirli görünümelerde mevcut buluş, rekombinant antijen bağlayıcı proteinler sağlar ve söz konusu antijen bağlayıcı protein, OSMR'yi ve bazı uygulamalarda rekombinant bir insan OSMR'yi veya

10 bunun bir kısmını bağlayan bir antikordur. Bu bağlamda bir "rekombinant protein" teknikte bilinen her türlü teknik ve yöntem kullanılarak, başka bir deyişle burada tarif edilen şekilde rekombinant bir nükleik asidin ifadesi yoluyla, rekombinant teknikler kullanılarak oluşturulmuş herhangi bir

15 proteindir. Rekombinant proteinlerin üretilmesine yönelik yöntemler ve teknikler, teknikte iyi bilinir. Buluşun uygulamaları arasında rekombinant antikor bağlayıcı proteinler bulunur ve antijen bağlayıcı protein, yabancı tip OSMR ve bunun varyantlarını bağlayan bir antikordur.

20 "Esas olarak ...den/dan oluşan" ifadesi, amino asit sekansının SEQ ID NO: sekansında belirtilenlere göre yaklaşık %1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 veya %15 oranında değişebildiğini ve biyolojik aktivitesini hala koruyabildiğini ifade eder.

25 Bazı uygulamalarda buluşun antijen bağlayıcı proteinleri, izole edilmiş proteinler veya büyük ölçüde saf proteinlerdir. "İzole edilmiş" bir protein, normalde doğal haliyle birleştiği materyalin en azından bir kısmını, örneğin belirli bir numune toplam proteinin ağırlıkça en az yaklaşık %5'ini veya en az

30 yaklaşık %50'sini oluşturan bir kısmını beraberinde getirir. İzole edilmiş proteinin, koşullara bağlı olarak toplam protein içeriğinin ağırlıkça % 5 ila 99,9'unu oluşturabildiği anlaşılmalıdır. Örneğin protein, indüklenabilir bir promotör veya yüksek ifade promotörünün kullanılması yoluyla önemli

35 ölçüde yüksek konsantrasyonda oluşturulabilir ve böylece

protein, yüksek konsantrasyon seviyelerinde oluşturulabilir. Tanım, teknikte bilinen çok çeşitli organizma ve/veya konak hücrede bir antijen bağlayıcı proteinin üretilmesini içerir. Amino asit sekansları söz konusu olduğunda sekans özdeşliği ve/veya benzerliği, tercihen varsayılan ayarlar kullanılarak bunlarla sınırlı olmamak üzere Smith ve Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482 yayınında yer alan lokal sekans özdeşliği algoritması, Needleman ve Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443 yayınında yer alan sekans özdeşliği hizalama algoritması, Pearson ve Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444 yayınında yer alan benzerlik arama metodu, bu algoritmaların bilgisayarlı uygulamaları (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.'te GAP, BESTFIT, FASTA ve TFASTA), Devereux ve diğ., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395 yayınında tarif edilen En İyi Uyum sekans programı dahil teknikte bilinen standart teknikler kullanılarak veya kontrol yoluyla belirlenir. Tercihen özdeşlik yüzdesi, aşağıdaki parametreler baz alınarak FastDB ile hesaplanır: 1 puanlık uyumsuzluk cezası; 1 puanlık boşluk cezası; 0,33 puanlık boşluk büyüklüğü cezası ve 30 puanlık birleşme cezası, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, s. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc. PILEUP, yararlı bir algoritma örneğidir. PILEUP, progresif, çift yönlü hizalamalar kullanarak bir grup ilgili sekanstan çoklu bir sekans hizalaması oluşturur. Ayrıca hizalamayı oluşturmak için kullanılan kümeleme ilişkilerini gösteren bir ağaç da çizebilir. PILEUP, Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 yayınında yer alan progresif hizalama metodunu kullanır; söz konusu metot, Higgins ve Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153 yayınında tarif edilene benzerdir. Yararlı PILEUP parametrelerine 3,00'lık bir varsayılan boşluk ağırlığı , 0,10'luk bir varsayılan boşluk uzunluğu ağırlığı ve ağırlıklı uç boşlukları dahildir. Başka bir yararlı algoritma örneği ise BLAST algoritmasıdır ve Altschul ve diğ., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul ve

diğ., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 ve Karin ve diğ., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787 yayınlarında tarif edilmiştir. Özellikle yararlı bir BLAST programı, Altschul ve diğ., 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480 yayınından elde edilen WU-BLAST-2 programıdır. WU-BLAST-2, çoğu varsayılan değerlere ayarlanmış birkaç arama parametresi kullanır. Aşağıdaki değerler ile ayarlanabilir parametreler sağlanır: çakışma aralığı=1, çakışma fraksiyonu=0,125, kelime eşiği (T)=II. HSP S ve HSP S2 parametreleri dinamik değerlerdir ve ilgili sekansın bileşimine ve ilgili sekansın arandığı ilgili veri tabanının bileşimine bağlı olarak program tarafından oluşturulur; ancak değerler, duyarlılığı arttırmak için ayarlanabilir.

Başka bir yararlı algoritma ise Altschul ve diğ., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 yayınında bildirildiği üzere boşluklu BLAST'tır. Boşluklu BLAST, BLOSUM-62 ornatım puanlarını kullanır; eşik T parametresi 9'a ayarlanır; boşluksuz uzantıları tetiklemek için iki vuruşlu yöntem, k değerinin boşluk uzunluklarına $10+k$ 'lık bir değer biçer; X_0 16'ya ve X_9 veritabanı arama aşaması için 40'a algoritmaların çıkış aşaması için 67'ye ayarlanır. Boşluklu hizalamalar, yaklaşık 22 bit'e karşılık gelen bir puan ile tetiklenir.

Genel olarak tek tek varyant CDR'ler arasındaki amino asit homolojisi, benzerliği veya özdeşliği, burada belirtilen sekanslara göre en az %80'dir ve daha tipik olarak en az %85, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 ve neredeyse %100'lük tercihen gittikçe artan homolojiler veya özdeşliklere sahiptir. Benzer bir şekilde burada tanımlanan bağlayıcı proteinlerin nükleik asit sekansına göre "nükleik asit sekans özdeşlik yüzdesi (%)", antijen bağlayıcı proteinin kodlama sekansında nükleotit kalıntılarına özdeş bir aday sekansta nükleotit kalıntıların yüzdesi olarak tanımlanır. Spesifik bir metotta, varsayılan parametrelere ayarlanmış, sırasıyla 1 ve 0,125'lik çakışma aralığı ve çakışma fraksiyonuna sahip WU-BLAST-2'nin BLASTN modülü kullanılır.

Genel olarak tek varyant CDR'lerini kodlayan nükleotit sekansları ve burada belirtilen nükleotit sekansları arasında arasındaki nükleik asit sekansı homolojisi, benzerliği veya özdeşliği, en az %80'dir ve daha tipik olarak en az %80, %81, %82, %83, %84, %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 ve neredeyse %100'lük tercihen gittikçe artan homolojiler veya özdeşliklere sahiptir.

Dolayısıyla bir "varyant CDR", buluşun ana CDR'sine belirtilen homolojiye, benzerliğe veya özdeşliğe sahiptir ve ana CDR'nin özgüllüğünün ve/veya aktivitesinin, bunlarla sınırlı olmamak üzere, en az %80, %81, %82, %83, %84, %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99'u dahil antikorun biyolojik fonksiyonunu paylaşır.

Bir amino asit sekansı varyasyonunun sunulması için alan veya bölge önceden belirlenirken, tek başına mutasyon önceden belirlenmez. Örneğin belirli bir alanda bir mutasyonunun performansını optimize etmek için, hedef kodon veya bölgede rastgele mutagenез gerçekleştirilebilir ve ifade edilen antijen bağlayıcı protein CDR varyantları, istenilen aktivitenin optimal kombinasyonu için taranabilir. Bilinen bir sekansa sahip DNA'da önceden belirlenmiş alanlarda ornatma mutasyonları oluşturmaya yönelik teknikler iyi bilinir ve M13 primer mutagenезi ve PCR mutagenезi bunlara örnektir. Mutantların taranması, OSMR bağlanması gibi antijen bağlayıcı protein aktivitelerine yönelik test kullanılarak gerçekleştirilir.

Amino asit ornatmaları tipik olarak tek kalıntılardır; yerleştirmeler genellikle yaklaşık bir (1) amino asit kalıntısından yaklaşık yirmi (20) amino asit kalıntısına kadardır; ancak, oldukça büyük yerleştirmeler de tolere edilebilir. Silmeler, yaklaşık bir (1) ile yaklaşık yirmi (20) amino asit kalıntısı arasında değişir, ancak bazı durumlarda silme daha büyük olabilir.

Ornatmalar, silmeler, yerleştirmeler veya bunların herhangi bir kombinasyonu, bir son türeve veya varyanta ulaşmak için kullanılabilir. Bu değişiklikler genel olarak, molekülün

değişmesini, özellikle antijen bağlayıcı proteininin immünojenikliğini veya özgüllüğünü en aza indirmek için birkaç amino asit üzerinde gerçekleştirilir. Ancak belirli koşullarda daha büyük değişiklikler tolere edilebilir. Korunumlu ornatmalar genellikle Tablo 3 olarak gösterilen aşağıdaki tabloya uygun olarak gerçekleştirilir.

Tablo 3

<u>Orijinal Kalıntı</u>	<u>Örnek Niteliğindeki</u>
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

- 10 Fonksiyonda veya immünolojik özdeşlikte önemli değişiklikler, Tablo 3'te gösterilenlerden daha az koruyucu olan ornatmaların seçilmesiyle gerçekleştirilir. Örneğin, değişim alanında polipeptit omurgasının yapısı, örneğin alfa-helikal veya beta-yaprak yapısı; hedef alanda molekülün yükü veya hidrofobikliği
- 15 veya yan zincirin kütleini daha büyük ölçüde etkileyen ornatmalar gerçekleştirilebilir. Genel olarak polipeptitlerin özelliklerinde en büyük değişiklikleri oluşturması beklenen ornatımlar, (a) bir hidrofilik kalıntının, örneğin seril veya tireonilin, bir hidrofobik kalıntı, örneğin lösil, izolösil,
- 20 fenilalanil, valil veya alanil için (veya tarafından) ornatıldığı; (b) bir sistein veya prolinin başka herhangi bir kalıntı için (veya tarafından) ornatıldığı; (c) elektropozitif

bir yan zincire sahip bir kalıntı, örneğin lizil, arginil veya histidilin, bir elektronegatif kalıntı, örneğin glutamil veya aspartil için (veya tarafından) ornatıldığı veya (d) hacimli bir yan zincire sahip bir kalıntının, örneğin fenilalaninin yan zinciri olmayan bir kalıntı, örneğin glisin için (veya tarafından) ornatıldığı ornatımlardır.

Varyantlar tipik olarak aynı niteliksel biyolojik aktiviteyi sergiler ve doğal olarak oluşan analog ile aynı immün yanıtını ortaya çıkarır; ancak varyantlar, ayrıca gerektiğinde antijen bağlayıcı proteinin/proteinlerin özelliklerini modifiye etmek için seçilir. Alternatif olarak varyant, antijen bağlayıcı proteinin biyolojik aktivitesinin değiştirileceği şekilde tasarlanabilir. Örneğin glikozilasyon alanları burada tartışıldığı gibi değiştirilebilir veya çıkarılabilir.

Mevcut buluşun kapsamı dahilindeki OSMR antikorlarının diğer türevleri arasında, diğer proteinler veya polipeptitler ile birlikte örneğin bir OSMR antikor polipeptidin N ucuna veya C ucuna kaynaştırılmış heterolog polipeptitler içeren rekombinant füzyon proteinlerinin ifadesi yoluyla OSMR antikorlarının kovalent veya agregat konjüгатları veya bunların fragmanları bulunur. Örneğin konjüge peptit, bir heterolog sinyal (veya lider) polipeptidi, örneğin maya alfa-faktör lideri veya bir epitop etiketi gibi bir peptit olabilir. OSMR antikoru içeren füzyon proteinleri, OSMR antikorunun saflaştırılmasını veya tanımlanmasını kolaylaştırmak üzere eklenen peptitler içerebilir (örneğin poly-His). Bir OSMR antikor polipeptidi ayrıca, Hopp ve diğ., *Bio/Technology* 6:1204, 1988 ve U.S. Patent 5,011,912 yayınlarında tarif edilen şekilde FLAG peptidine bağlanabilir. FLAG peptidi, yüksek oranda antijeniktir ve bir spesifik monoklonal antikoru (mAb) ters bir şekilde bağlı bir epitop sağlar ve böylece hızlı bir şekilde test yapılmasını sağlar ve ifade edilen rekombinant proteinin saflaştırılmasını kolaylaştırır. FLAG peptidinin belirli bir polipeptide kaynaştırıldığı füzyon proteinlerinin hazırlanması için yararlı ayıraçlar, ticari olarak temin edilebilir (Sigma, St. Louis,

MO).

Bir uygulamada bir oligomer, immüoglobulinlerden türetilmiş polipeptitler kullanılarak hazırlanır. Antikor türevli polipeptitlerin (Fc domeni dahil olmak üzere) çeşitli kısımlarına kaynaştırılmış belirli heterolog polipeptitleri içeren füzyon proteinlerinin hazırlanması, örneğin Ashkenazi ve diğ., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn ve diğ., 1990, Nature 344:677 ve Hollenbaugh ve diğ., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, s. 10.19.1-10.19.11 yayınlarında tarif edilmiştir.

Mevcut buluşun bir uygulamasında, bir antikorun OSMR bağlayıcı fragmanının bir antikorun Fc bölgesine kaynaştırılmasıyla oluşturulan iki füzyon proteinini içeren bir dimere yöneliktir. Dimer, örneğin füzyon proteinin kodlayan bir gen füzyonunun uygun bir ekspresyon vektörüne yerleştirilmesiyle, gen füzyonunun rekombinant ekspresyon vektörü ile dönüştürülmüş konak hücrelerde ifade edilmesiyle ve ifade edilen füzyon proteinin antikor molekülleri gibi toplanmasına izin verilmesiyle ve ardından bir dimer elde etmek üzere Fc parçaları arasında zincirler arası disülfid bağları oluşturulmasıyla oluşturulabilir.

Burada kullanıldığı şekliyle "Fc polipeptidi" terimi, bir antikorun Fc bölgesinden türetilen polipeptitlerin natif ve mutein formlarını içerir. Ayrıca dimerizasyonu destekleyen menteşe bölgesini içeren bu polipeptitlerin kesilmiş formlarını da içerir. Fc parçalarını içeren füzyon proteinleri (ve bunlardan oluşan oligomerler), Protein A veya Protein G kolonundan afinite kromatografisi yoluyla kolay bir saflaştırma avantajı sunar.

PCT başvurusu WO 93/10151 yayınında tarif edilen uygun bir Fc polipeptidi, menteşe bölgesinin N ucundan bir insan antikorunun Fc bölgesinin natif C ucuna uzanan tek zincirli bir polipeptittir. Bir başka Fc polipeptidi, U.S. Patent 5,457,035 ve Baum ve diğ., 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001 yayınında tarif edilen Fc muteinidir. Bu muteinin amino asit sekansı, WO

93/10151'de sunulan natif Fc sekansının amino asit sekansına, amino asit 19'un Feu'dan Ala'ya kadar değiştirilmiş, amino asit 20'nin Feu'dan Glu'ya kadar değiştirilmiş ve amino asit 22'nin Gly'den Ala'ya kadar değiştirilmiş olması dışına özdeştir.

5 Mutein, Fc reseptörleri için düşük afinite sergiler.

Başka uygulamalarda bir OSMR antikorumun ağır ve/veya hafif zincirlerinin değişken kısmı, bir antikor ağır ve/veya hafif zincirinin değişken kısmı için ornatılabilir.

Oligomerik OSMR antikor türevlerinin hazırlanmasına yönelik

10 başka yöntem ise bir lösün fermuarının kullanılmasını içerir. Lösün fermuarı domenleri, bulundukları proteinlerin oligomerizasyonunu destekleyen peptitlerdir. Lösün fermuarları başlangıçta birkaç DNA bağlayan proteinde tespit edilmiş (Landschulz ve diğ., *Science* 240:1759-64, 1988) ve daha sonra

15 çeşitli farklı proteinlerde bulunmuştur. Bilinen lösün fermuarları arasında doğal olarak oluşan peptitler ve bunların dimerize veya trimerize edici türevleri bulunur. Çözülebilir oligomerik proteinlerin üretilmesine yönelik lösün fermuar domenlerinin örnekleri, PCT başvuru WO 94/10308 yayınında tarif

20 edilmiştir ve sürfaktan protein D'den (SPD) türetilen lösün fermuarı, Hoppe ve diğ., 1994, *FEBS Letters* 344:191 yayınında tarif edilmiştir. Bir kaynaşık heterelog proteinin stabil trimerizasyonuna izin veren modifiye edilmiş bir lösün fermuarının kullanımı, Fanslow ve diğ., 1994, *Semin. Immunol.*

25 6:267-78 yayınında tarif edilmiştir. Bir yaklaşımda, bir lösün fermuarı peptidine kaynaşık OSMR antikor fragmanı veya türevi rekombinant füzyon proteinleri, uygun konak hücrelerde ifade edilir ve oluşan çözülebilir oligomerik OSMR antikor fragmanları veya türevleri, kültür süpernatantından geri kazanılır.

30 Antijen bağlayıcı proteinlerin kovalent modifikasyonu, mevcut buluşun kapsamı dahilindedir ve her zaman olmasa da genel olarak translasyon sonrası gerçekleştirilir. Örneğin, bir molekülde antijen bağlayıcı proteinin çeşitli tipte kovalent modifikasyonları, antijen bağlayıcı proteinin spesifik amino

35 asit kalıntılarının seçilen yan zincirlerle veya N veya C ucu

kalıntılarıyla reaksiyona girebilen bir organik türevlendirme ajanı ile reaksiyona sokulmasıyla gerçekleştirilebilir.

Sisteinil kalıntıları, karboksimetil veya karboksiamidometil türevlerinin verilmesi için kloroasetik asit veya kloroasetamid gibi α -haloasetatlar ile (ve ilgili aminler) yaygın olarak tepkimeye girer. Sisteinil kalıntıları ayrıca bromotrifloroaseton, α -bromo- β -(5-imidozöl)propiyonik asit, kloroasetil fosfat, N-alkilmaleimitler, 3-nitro-2-piridil disülfid, metil 2-piridil disülfid, p-kloromerküribenzoat, 2-kloromerküri-4-nitrofenol veya kloro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol ile tepkime yoluyla türevlenir.

Histidil kalıntıları, pH 5,5-7,0'de dietilpirokarbonat ile reaksiyon yoluyla türevlenir, çünkü bu ajan, histidil yan zinciri için nispeten özgüdür. Para-bromofenasil bromür de yararlıdır; reaksiyon, tercihen, pH 6,0'da 0,1M sodyum kakodilat içinde gerçekleştirilir.

Lizinil ve amino ucu kalıntıları, süksinik veya başka karboksilik asit anhidritleri ile reaksiyona sokulur. Bu ajanlar ile türevlendirme, lizinil kalıntılarının yükünü tersine çevirme etkisine sahiptir. Alfa amino içeren kalıntıların türevlendirilmesi için diğer uygun ayıraçlar arasında, imidoesterler örneğin metil pikolinimidat; piridoksal fosfat; piridoksal; kloroborohidrit; trinitrobenzensülfonik asit; O-metilisoüre; 2,4-pentandion ve glioksilat ile transaminaz katalizli reaksiyon bulunur.

Arginil kalıntıları, aralarında fenilglioksal, 2,3-bütandion, 1,2-sikloheksandion ve ninhidrinin bulunduğu bir veya birkaç geleneksel ayıraç ile reaksiyona sokularak modifiye edilir. Arginin kalıntılarının türevlendirilmesi, reaksiyonun, guanidin fonksiyonel grubunun yüksek pK_a 'sı nedeniyle alkali koşullarda yapılmasını gerektirir. Ayrıca bu ayıraçlar, arginin epsilon-amino grubunun yanı sıra lisin grupları ile reaksiyona girebilir.

Tirozil kalıntılarının spesifik modifikasyonu, özellikle aromatik diazonyum bileşikleri veya tetranitrometan ile özel

ilgi ile reaksiyona sokularak spektral etiketlerin tirozil kalıntılarına sokulmasıyla yapılabilir. En yaygın olarak, N-asetilimidizol ve tetranitrometan, sırasıyla O-asetil tirozil türleri ve 3-nitro türevlerini oluşturmak için kullanılır.

5 Tirozil kalıntıları, radyoimmünolojik testte kullanılmaya yönelik etiketli proteinler hazırlamak üzere ^{125}I veya ^{131}I kullanılarak iyotla işlenebilir ve bunun için yukarıda tarif edilen kloramin T yöntemi uygundur.

Karboksil yan grupları (aspartil veya glutamil), R ve R''nin

10 isteğe göre 1-sikloheksil-3-(2-morfolinil-4-etil) karbodiimid veya 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)karbodiimid gibi farklı alkil grupları olduğu karbodiimidler ($\text{R}'-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}''$) ile tepkime yoluyla seçici şekilde modifiye edilir. Ayrıca, aspartil ve glutamil kalıntıları, amonyum iyonları ile reaksiyona

15 sokularak asparaginil ve glutaminil kalıntılarına dönüştürülür. Bifonksiyonel ajanlarla gerçekleştirilen türevlendirme, çeşitli yöntemlerde kullanılmak üzere antijen bağlayıcı proteinlerinin suda çözünmeyen bir destek matrisine veya yüzeyine çapraz bağlanması için yararlıdır.

20 Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlama maddeleri arasında örneğin 1,1-bis(diazoasetil)-2-feniletan, glutaraldehit, N-hidroksisüksinimit esterler, örneğin, 4-azidosalisilik asitli esterler, disüksinimidil esterler, örneğin 3,3'-ditiyobis(süksinimidilpropiyonat) dahil olmak üzere

25 homobifonksiyonel imidoesterler ve bifonksiyonel maleimitler, örneğin bis-N-maleimido-1,8-oktan bulunur. Metil-3-[(p-azidofenil)ditiyo]propioimidat gibi türevleştirici maddeler, ışık varlığında çapraz bağlar oluşturabilen fotoaktivize edilebilir ara ürünleri verir. Alternatif olarak, U.S. Pat. No.

30 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537 ve 4,330,440 yayınlarında tarif edilen reaktif suda çözünmeyen matrisler, örneğin siyanojen bromit ile aktive edilmiş karbonhidratlar ve reaktif substratlar, protein immobilizasyonu için kullanılır.

35 Glutaminil ve asparaginil kalıntıları, sırasıyla ilgili glutamil

ve aspartil kalıntılarına sık sık deamide edilir. Alternatif olarak bu kalıntılar, hafif asidik koşullar altında deamide edilir. Bu kalıntıların her iki formu da, buluşun kapsamı dahilindedir.

- 5 Diğer modifikasyonlar arasında prolin ve lizinin hidroksilasyonu, seril veya treonil kalıntılarının hidroksil gruplarının fosforilasyonu, lizin, arginin ve histidin yan zincirlerinin alfa-amino gruplarının metilasyonu (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, s. 79-86), N ucu aminin asetilasyonu ve/veya C ucu karboksilik grubunun amitlenmesi bulunur.

- Mevcut buluşun kapsamı dahilinde olan antijen bağlayıcı proteinin başka bir tip kovalent modifikasyonu, proteinin 15 glikosilasyon desenini değiştirilmesini içerir. Teknikte bilindiği üzere glikozilasyon desenleri, protein sekansına (aşağıda tartışıldığı üzere belirli glikozilasyon amino asit kalıntılarının varlığı veya yokluğuna) veya proteinin üretildiği konak hücre veya organizmaya bağlı olabilir. Belirli ifade 20 sistemleri aşağıda tartışılmıştır.

Polipeptitlerin glikozilasyonu tipik olarak N bağlantılı veya O bağlantılıdır. N bağlantılı glikozilasyon, karbonhidrat parçasının bir asparagin kalıntısının yan zincirine bağlanması anlamına gelir.

- 25 Tripeptit sekansları asparagin-X-serin, asparagin-X-treonin (burada X prolin haricinde herhangi bir amino asittir), karbonhidrat grubunun asparagin yan zincirine enzimatik olarak eklenmesine yönelik tanıma sekanslarıdır. Bu nedenle, bir polipeptitte bu peptit sekanslarından herhangi birinin varlığı, 30 potansiyel bir glikozilasyon alanı oluşturur. O bağlantılı glikozilasyon, 5-hidroksiprolin veya 5-hidroksilizinin de kullanılmasına rağmen, N-asetilgalaktozam, galaktoz veya ksiloz şekerlerinden birinin, en yaygın olarak serin veya treonin olmak üzere bir hidroksiamino asidine bağlanmasını ifade eder.

- 35 Glikozilasyon pozisyonlarının antijen bağlayıcı proteine

eklenmesi, (N bağlantılı glikozilasyon pozisyonları için) yukarıda tarif edilen tripeptit sekanslarının bir veya daha fazlasını içerecek şekilde amino asit sekansının değiştirilmesi yoluyla uygun şekilde gerçekleştirilebilir. Bu değişiklik, 5 başlangıç sekansına (O bağlantılı glikozilasyon bölgelerine yönelik) bir veya daha fazla serin veya treonin kalıntısının eklenmesi veya bunlar tarafından ornatılması ile gerçekleştirilebilir. Kolaylık olması için antijen bağlayıcı protein amino asit sekansı tercihen, DNA düzeyinde değişiklikler 10 yoluyla, özellikle hedef polipeptidi kodlayan DNA'nın önceden seçilen bazlarda mutasyona uğratılmasıyla ve böylece istenen amino asitlere dönüştürülecek kodonlar üretilmesiyle değiştirilir.

Antijen bağlayıcı protein üzerinde karbonhidrat parçalarının 15 sayısını arttırmamanın bir başka yolu ise, glikozitlerin proteine kimyasal veya enzimatik olarak kenetlenmesidir. Bu prosedürler, N ve O bağlantılı glikozilasyon için glikozilasyon kabiliyetlerine sahip bir konak hücrede proteinin üretilmesini gerektirmemesi bakımından avantajlıdır. Kullanılan kenetleme 20 yoluna bağlı olarak şeker(ler), (a) arginin ve histidin, (b) serbest karboksil gruplarına, (c) örneğin sisteininkiler gibi serbest sülfhidril gruplarına, (d) serin, treonin veya hidroksiprolininkiler gibi serbest hidroksil gruplarına, (e) fenilalanin, tirozin veya triptofan gibi aromatik kalıntılara veya 25 (f) glutamininin amit grubuna eklenebilir. Bu yöntemler, 11 Eylül 1987'de yayınlanan WO 87/05330 yayınında Aplin ve Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, s. 259-306 yayınında tarif edilir. Başlangıç antijen bağlayıcı protein üzerinde bulunan karbonhidrat parçalarının kaldırılması, kimyasal olarak veya 30 enzimatik olarak gerçekleştirilebilir. Kimyasal deglikozilasyon, proteinin, triflorometansülfonik asit bileşiğine veya eşdeğer bir bileşiğe maruz bırakılmasını gerektirir. Bu muamele, bağlayıcı şeker (N-asetilglukosamin veya N-asetilgalaktosamin) dışında çoğu şekerin veya tüm şekerlerin 35 parçalanmasıyla sonuçlanırken polipeptit bozulmadan kalır.

Kimyasal deglikozilasyon, Hakimuddin ve diğ., 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 ve Edge ve diğ., 1981, *Anal. Biochem.* 118:131 yayınında tarif edilir. Karbonhidrat parçalarının polipeptitler üzerinde enzimatik bölünmesi, Thotakura ve diğ., 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350 yayınında tarif edilen şekilde çeşitli endo ve ekzo-glikozidazlar kullanılarak elde edilebilir. Potansiyel glikozilasyon alanlarındaki glikolizasyon, Duskin ve diğ., 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105 tarafından tarif edilen şekilde tunikamisin bileşiğinin kullanılmasıyla önlenabilir.

10 Tunikamisin, protein-N-glikozit bağlarının oluşmasını bloke eder.

Antijen bağlayıcı proteinin başka bir tip kovalent modifikasyonu, U.S. Pat. No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 veya 4,179,337 yayınlarında belirtilen

15 şekilde antijen bağlayıcı proteinin bunlarla sınırlı olmamak üzere polietilen glikol, polipropilen glikol veya polioksialkilenler gibi çeşitli polioller dahil olmak üzere proteinli olmayan çeşitli polimerlere bağlanmasını içerir. Ek olarak teknikte bilindiği üzere amino asit ornatmaları, PEG gibi

20 polimerlerin eklenmesini kolaylaştırmak üzere antijen bağlayıcı protein içindeki çeşitli pozisyonlarda gerçekleştirilebilir.

Bazı uygulamalarda buluşun antijen bağlayıcı proteinlerinin kovalent modifikasyonu, bir veya daha fazla etiketin eklenmesini içerir.

25 "Etiketleme grubu" terim, saptanabilir herhangi bir etiket anlamına gelir. Uygun etiketleme grupları örnekleri arasında, bunlarla sınırlı kalmamak üzere, radyoizotoplar veya radyonüklitler (örneğin, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), floresan gruplar (örneğin, FITC, rodamin, lanthanit

30 fosforlar), enzimatik gruplar (örneğin, yaban turpu peroksidaz, β -galaktosidaz, lusiferaz, alkalın fosfataz), kemilüminesan gruplar, biyotinil gruplar veya sekonder bir raportör tarafından tanınan önceden belirlenmiş polipeptit epitopları (örneğin, lösin fermuar çifti sekansları, sekonder antikorlar için bağlanma

35 bölgeleri, metal bağlanma domenleri, epitop etiketler) bulunur.

Bazı uygulamalarda etiketleme grubu, potansiyel sterik engellemeyi azaltmak için çeşitli uzunluklarda aralayıcı kollar vasıtasıyla antijen bağlayıcı proteine bağlanır. Proteinleri etiketlemeye yönelik çeşitli yöntemler teknikte bilinir ve mevcut buluşun gerçekleştirilmesinde kullanılabilir.

Genel olarak etiketler, tespit edilecekleri teste bağlı olarak çok çeşitli sınıflara ayrılır: a) radyoaktif veya ağır izotoplar olabilen izotopik etiketler; b) manyetik etiketler (örneğin, manyetik partiküller); c) redoks aktif parçalar; d) optik boyalar; enzimatik gruplar (örneğin yaban turpu peroksidaz, β -galaktosidaz, lusiferaz, alkalın fosfataz), e) biyotinil gruplar ve f) sekonder bir raportör tarafından tanınan önceden belirlenmiş polipeptit epitopları (örneğin, lösin fermuar çifti sekansları, sekonder antikorlar için bağlanma bölgeleri, metal bağlanma domenleri, epitop etiketler). Bazı uygulamalarda etiketleme grubu, potansiyel sterik engellemeyi azaltmak için çeşitli uzunluklarda aralayıcı kollar vasıtasıyla antijen bağlayıcı proteine bağlanır. Proteinleri etiketlemeye yönelik çeşitli yöntemler teknikte bilinir ve mevcut buluşun gerçekleştirilmesinde kullanılabilir.

Spesifik etiketler arasında bunlarla sınırlı olmamak üzere kromoforlar, fosforlar ve floroforlar dahil olmak üzere optik boyalar bulunur ve birçok durumda sonuncusu spesifiktir. Floroforlar, "küçük molekül" florları veya proteinli florlar olabilir.

"Floresan etiket" ifadesi ile, doğasında bulunan floresan özellikleri vasıtasıyla saptanabilen herhangi bir molekül kastedilir. Uygun floresan etiketler arasında bunlarla sınırlı olmamak üzere floresan, rodamin, tetrametilrodamin, ösin, eritrosin, kumarin, metil-kumarinler, piren, Malaşit yeşili, stilben, Lucifer Sarısı, Cascade Mavisi J, Texas Kırmızısı, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon yeşili, Alexa-Fluor boyaaları (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor

680), Cascade Mavisi, Cascade Sarısı ve R-fikoeritrin (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rhodamin ve Texas Kırmızısı (Pierce, Rockford, IF), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Fife Science, Pittsburgh, PA) bulunur. Floroforlar dahil olmak üzere uygun optik boyalar, Richard P. Haugland'a ait Molecular Probes Handbook kitabında tarif edilir.

Uygun proteinli floresan etiketler arasında ayrıca, bunlarla sınırlı olmamak üzere, bir Renilla, Ptilosarcus veya GFP'nin Aequorea türleri dahil olmak üzere yeşil flüoresan proteini, (Chalfie ve diğ., 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Erişim Numarası U55762), mavi flüoresan proteini (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim ve diğ., 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), arttırılmış sarı flüoresan proteini (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), lusiferaz (Ichiki ve diğ., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galaktosidaz (Nolan ve diğ., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) ve Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, U.S. Patent No. 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558) bulunur.

Burada tarif edilen örnek niteliğindeki antijen bağlayıcı proteinler, antijen bağlayıcı protein tarafından bağlanmış OSMR üzerindeki farklı epitopa dayanan özelliklere sahiptir. "Epitop" terimi, bir antijen bağlayıcı protein, örneğin bir antikör, bir hedef moleküle bağlandığında antijen bağlayıcı protein tarafından temas ettirilen hedef molekülün amino asitleri anlamına gelir. Bir epitop, bitişik olabilir veya bitişik olmayabilir (örn. (i) tek zincirli bir polipeptitte, polipeptit sekansında birbirine bitişik olmayan, ancak hedef molekül bağlamında bitişik olan amino asit kalıntıları, antijen bağlayıcı proteine bağlıdır veya (ii) iki veya daha fazla ayrı bileşen içeren multimerik bir reseptörde, örneğin OSMR ve gp130 veya OSMR ve IL-31 reseptörü A'da, amino asit kalıntıları bir

veya daha fazla ayrı bileşen üzerinde mevcuttur, ancak hala antijen bağlayıcı proteine bağlıdır). Epitop determinantları örneğin amino asitler, şeker yan zincirleri, fosforil veya sülfonil gibi kimyasal olarak aktif yüzey molekül grupları içerebilir ve üç boyutlu spesifik yapısal özelliklere ve spesifik yük özelliklerine sahip olabilir. Genellikle belirli bir hedef molekül için özgül olan antijen bağlayıcı proteinler tercihen, protein ve/veya makromoleküllerden oluşan bir kompleks karışımında hedef molekül üzerindeki bir epitopu tanıyacaktır.

Bir antikor bağlayıcı protein tarafından bağlanan epitopun karakterize edilmesine yönelik yöntemler teknikte iyi bilinir ve bu yöntemler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, gruplama (*ing. binning*) (çapraz-rekabet) (Miller ve diğ. "Epitope binning of murine monoclonal antibodies by a multiplexed pairing assay" *J Immunol Methods* (2011) 365, 118-25), peptit haritalama (örn. PEPSPOT™) (Albert ve diğ. "The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterized by Peptide Array Analysis" 2008 *Thromb. Haemost.* 99, 634-7), kimeraz gibi mutagenez yöntemleri (Song ve diğ. "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-6942) , alanin taraması (Cunningham ve Wells "High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis" *Science* (1989) 244, 1081-1085) , arginin taraması (Lim ve diğ. "A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor" *Biochemistry* (2010) 49, 3797-3804), HD değişim yöntemleri (Coates ve diğ. "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2009) 23 639-647), NMR çapraz satürasyon yöntemleri (Morgan ve diğ. "Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR cross-saturation" *Biochemistry* (2005) 44, 518-23) ve kristalografi (Gerhardt ve diğ. "Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human

neutralizing antibody" *J. Mol. Biol* (2009) 394, 905-21) bulunur. Söz konusu yöntemler, epitop içeren amino asitler hakkında sundukları detay düzeyinde farklılık gösterir. Örnek 4, örnek niteliğinde bir epitop gruplama yöntemi sağlar.

5 Mevcut buluşun antijen bağlayıcı proteinleri, burada tarif edilen örnek niteliğindeki antijen bağlayıcı protein, örneğin Ab1, Ab2 veya Ab3 ile çakışan bir epitopa sahip olanları içerir. Belirli uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, örnek niteliğindeki antijen bağlayıcı proteinler ile özdeş bir epitopa
10 sahiptir. Başka uygulamalarda antijen bağlayıcı protein, sadece örnek niteliğindeki antijen bağlayıcı protein ile aynı amino asitlerden oluşan bir alt gruba bağlanır.

Belirli uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, Ab1, Ab2 veya Ab3 ile özdeş veya üst üste çakışan bir epitopa sahiptir
15 ve a) SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 veya SEQ ID NO:29'da belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir hafif zincir değişken domeni; b) SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 veya SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir ağır
20 zincir değişken domeni; veya c) a)'nın hafif zincir değişken domeni veya b)'nin ağır zincir değişken domeni içerir.

Belirli uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, Ab1, Ab2 veya Ab3 ile özdeş veya üst üste çakışan bir epitopa sahiptir ve SEQ ID NO:27'de belirtilen amino asit sekansına en az %90
25 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir hafif zincir değişken domeni ve SEQ ID NO:9'da belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir ağır zincir değişken domeni; SEQ ID NO:28'de belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş
30 bir hafif zincir değişken domen ve SEQ ID NO:10'da belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir ağır zincir değişken domeni; ve SEQ ID NO:29'da belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az %95 özdeş veya tamamen özdeş bir hafif zincir değişken domeni ve SEQ ID
35 NO:11'de belirtilen amino asit sekansına en az %90 özdeş, en az

%95 özdeş veya tamamen özdeş bir ağır zincir değişken domeni içerir.

Belirli uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, Ab1, Ab2 veya Ab3 ile özdeş veya üst üste çakışan bir epitopa sahiptir

5 ve a) SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 veya SEQ ID NO:29'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasını içeren bir hafif zincir değişken domenini; b) SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 veya SEQ ID NO:11'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en
10 fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasını içeren bir ağır zincir değişken domeni; veya c) a)'nın hafif zincir değişken domeni ve b)'nin ağır zincir değişken domenini içerir.

Belirli uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, Ab1, Ab2 veya Ab3 ile özdeş veya üst üste çakışan bir epitopa sahiptir

15 ve SEQ ID NO:27'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir hafif zincir değişken domeni ve SEQ ID NO:9'da belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir ağır

20 zincir değişken domeni içeren proteinler; SEQ ID NO:28'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir hafif zincir değişken domeni ve SEQ ID NO:10'da belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi,

25 silmesi veya ornatmasına sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren proteinler; ve bir hafif zincir değişken domeni SEQ ID NO:29'de belirtilen amino asit sekansından en fazla on veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip ve

30 veya en fazla beş amino asit eklemesi, silmesi veya ornatmasına sahip bir ağır zincir değişken domeni içeren proteinler içerir.

SEQ ID NO: 9'un örnek niteliğinde bir ağır zincir değişken domen varyantı, SEQ ID NO:9'da yer alan pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik
35 asit) içerir. SEQ ID NO:53'te belirtilen amino asit sekansı, SEQ

ID NO:9'un bir ağır zincir değişken domen varyantına bir örnektir.

SEQ ID NO: 10'un örnek niteliğinde bir ağır zincir değişken domen varyantı, SEQ ID NO:10'da yer alan pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içerir. SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansı, SEQ ID NO:10'un bir ağır zincir değişken domen varyantına bir örnektir.

Belirli uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, Ab1, Ab2 veya Ab3 ile özdeş veya üst üste çakışan bir epitopa sahiptir

ve a) SEQ ID NO:30'da belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:33'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ

ID NO:36'da belirtilen LCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3; b) SEQ ID NO:31'de belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID NO:34'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ ID

NO:37'de belirtilen LCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3; veya c) SEQ ID NO:32'de belirtilen LCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR1; SEQ ID

NO:35'te belirtilen LCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR2; ve SEQ ID NO:38'de belirtilen LCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir LCDR3 içeren bir hafif zincir değişken domenini ve d) SEQ ID NO:12'de belirtilen

HCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:15'te belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve SEQ ID NO:18'de belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya

ornatımına sahip bir HCDR3; e) SEQ ID NO:13'te belirtilen HCDR1

sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:16'da belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve SEQ ID NO:19'da belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR3; veya f) SEQ ID NO:14'te belirtilen HCDR1 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR1; SEQ ID NO:17'de belirtilen HCDR2 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR2; ve SEQ ID NO:20'de belirtilen HCDR3 sekansından en fazla üç amino asit eklemesi, silmesi veya ornatımına sahip bir HCDR3 içeren bir ağır zincir değişken domenini içerir.

Hemen yukarıda tarif edilen tercih edilen OSMR antijeni bağlayıcı proteinler arasında, a)'nın bir hafif zincir değişken domenini ve d)'nin bir ağır zincir değişken domenini içeren proteinler; b)'nin bir hafif zincir değişken domenini ve e)'nin bir ağır zincir değişken domenini içeren proteinler; ve c)'nin bir hafif zincir değişken domeni ve f)'nin bir ağır zincir değişken domenini içeren proteinler bulunur.

a)'nın hafif zincir değişken domenini ve d)'nin ağır zincir değişken domenini içeren OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:9'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içeren bir ağır zincir değişken domeni içerir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:53'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

b)'nin hafif zincir değişken domenini ve d)'nin ağır zincir değişken domenini içeren OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, isteğe göre SEQ ID NO:10'da pozisyon 73'e karşılık gelen pozisyonda asparagin dışında bir amino asit (örneğin aspartik asit) içeren bir ağır zincir değişken domeni içerir. Böyle uygulamalarda ağır zincir değişken domeni, isteğe göre SEQ ID NO:54'te belirtilen amino asit sekansını içerir.

Özdeş veya çakışan bir epitopa sahip antijen bağlayıcı

proteinler, genellikle antijeni bağlamak için çapraz rekabete girer. Bu nedenle belirli uygulamalarda, mevcut buluşun bir antijen bağlayıcı proteini Ab1, Ab2 veya Ab3 ile çapraz rekabete girer. "Çapraz rekabete girmek" veya "çapraz rekabet", antijen bağlayıcı proteinlerinin bir hedef üzerinde ayn epitop veya bağlanma alanı için rekabete etmesidir. Bu rekabet, referans antijen bağlayıcı proteinin (örn. antikor veya antikorum antijen bağlayıcı kısmı) bir test antijen bağlayıcı proteinin spesifik bağlanmasını önlediği veya inhibe ettiği veya bunun tam tersinin gerçekleştiği bir test ile belirlenebilir. Bir test molekülünün bağlanma için bir referans molekülü ile rekabet edip etmediğini belirlemek için çok sayıda rekabetçi bağlanma testi kullanılabilir. Kullanılabilen test örnekleri arasında, katı faz doğrudan veya dolaylı radyoimmünolojik test (RIA), doğrudan veya dolaylı enzim immünolojik test (EIA), sandviç rekabet testi (bkz. örn. Stahli ve diğ. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253), katı faz doğrudan biotin-avidin EIA (bkz. örn. Kirkland ve diğ., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-9), katı faz doğrudan etiketli test, katı faz doğrudan etiketli sandviç testi, Luminex (Jia ve diğ. "A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies" *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91-98) ve yüzey plazmon rezonansı (Song ve diğ. "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-42) bulunur. Çapraz rekabetin belirlenmesine yönelik örnek niteliğinde bir yöntem, Örnek 5'te tarif edilir. Bir rekabet eden antijen bağlayıcı protein fazla miktarda mevcut olduğunda genellikle, bir referans antijen bağlayıcı proteinin ortak bir antijene bağlanmasını en az %50, %55, %60, %65, %70 veya %75 oranında inhibe edecektir. Bazı durumlarda bağlanma, en az %80, %85, %90, %95, %96, %97, %98, %99 veya daha yüksek bir oranda inhibe edilir.

OSMR antijeni bağlayıcı Proteinlerini Kodlayan Polinükleotitler

Burada tarif edilen antikorlar da dahil olmak üzere OSMR antijeni

bağlayıcı proteinleri kodlayan nükleik asitler veya izole edilmiş nükleik asitler, mevcut buluşun kapsamı dahilindedir.

Tercih edilen nükleik asitler arasında, burada tarif edilen örnek niteliğindeki hafif ve ağır zincirleri kodlayanlar

5 bulunur.

Ab1 LC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:21'de belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

10 Ab2 LC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:22'de belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

Ab3 LC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:23'te belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

15 Ab1 HC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:3'te belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

20 Ab2 HC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:4'te belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

Ab3 HC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:5'te belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

25 Bir varyant Ab1 HC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:47'de belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

Bir varyant Ab2 HC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:48'de belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

30 Bir varyant Ab3 HC'yi kodlayan örnek niteliğindeki herhangi bir nükleik asit, SEQ ID NO:49'da belirtilen sekansı içeren bir nükleik asittir.

35 Mevcut buluşun görünüşleri arasında burada tarif edilen amino asit sekanslarını kodlayan polinükleotit varyantları (örn. dejenerasyon nedeniyle) bulunur.

Mevcut buluşun görünüşleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere aşağıdaki örnek niteliğindeki uygulamalar dahil çeşitli uygulamalar bulunur.

İzole edilmiş bir nükleik asit bir polinükleotit içeriyor olup, söz konusu polinükleotitler aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansını içeren bir veya daha fazla polipeptidi kodlar:

A. 1. SEQ ID NO:27-29'da belirtilen bir hafif zincir değişken domen sekansına en az %90 özdeş bir hafif zincir değişken domen sekansı;

2. SEQ ID NO:9-11'de belirtilen bir ağır zincir değişken domen sekansına en az %90 özdeş bir ağır zincir değişken domen sekansı;

3. (1)'in bir hafif zincir değişken domeni ve (2)'nin bir ağır zincir değişken domeni; ve

B. Aşağıdaki sekanslarla aynı veya her bir CDR'de toplam en fazla üç amino asit eklemesi, ornatması ve/veya silmesi ile farklı olan bir CDR1, CDR2, CDR3 içeren bir hafif zincir değişken domeni ve/veya bir CDR1, CDR2, CDR3 içeren bir ağır zincir değişken domeni:

1. Ab1'e ait bir hafif zincir CDR1 (SEQ ID NO:30), CDR2 (SEQ ID NO:33), CDR3 (SEQ ID NO:36) veya bir ağır zincir CDR1 (SEQ ID NO:12), CDR2 (SEQ ID NO:15), CDR3 (SEQ ID NO:18);

2. Ab2'ye ait bir hafif zincir CDR1 (SEQ ID NO:31), CDR2 (SEQ ID NO:34), CDR3 (SEQ ID NO:37) veya bir ağır zincir CDR1 (SEQ ID NO:13), CDR2 (SEQ ID NO:16), CDR3 (SEQ ID NO:19); ve

3. Ab3'e ait bir hafif zincir CDR1 (SEQ ID NO:32), CDR2 (SEQ ID NO:35), CDR3 (SEQ ID NO:38) veya bir ağır zincir CDR1 (SEQ ID NO:14), CDR2 (SEQ ID NO:17), CDR3 (SEQ ID NO:20).

Bazı uygulamalarda nükleik asit, SEQ ID NO:53 veya SEQ ID NO:54'de belirtilen amino asit sekansını içeren bir polipeptidi kodlar.

Bazı uygulamalarda nükleik asit, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 veya SEQ ID NO:52'de belirtilen amino asit sekansını içeren bir

polipeptidi kodlar.

Tercih edilen uygulamalarda nükleik asit veya izole edilmiş nükleik asit tarafından kodlanan polipeptit, OSMR'yi bağlayan bir antijen bağlayıcı proteinin bir bileşenidir.

- 5 Nükleik asitlerin izolasyonu için problemler veya primerler olarak veya veri tabanı aramaları için sorgu sekansları olarak kullanılacak burada tarif edilen nükleotit sekansları, amino asit sekanslarından "geriye doğru translasyon" yoluyla veya kodlayıcı DNA sekansının tanımlandığı polipeptitler ile birlikte
- 10 amino asit özdeşlik bölgelerinin tanımlanması yoluyla elde edilebilir. İyi bilinen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) prosedürü, bir OSMR antijeni bağlayıcı proteini veya OSMR antijeni bağlayıcı protein polipeptidi fragmanlarından oluşan arzu edilen bir kombinasyonu kodlayan bir DNA sekansını izole
- 15 etmek ve amplifiye etmek için kullanılabilir. DNA fragmanlarından oluşan kombinasyonun arzu edilen uçlarını tanımlayan oligonükleotitler, 5' ve 3' primerleri olarak kullanılır. Oligonükleotitler ayrıca, DNA fragmanlarının amplifiye kombinasyonlarının bir ekspresyon vektörüne
- 20 yerleştirilmesini kolaylaştırmak için kısıtlama endonükleazları için tanıma alanları içerebilir. PCR teknikleri, Saiki ve diğ., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu ve diğ., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), s. 189-196 ve *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al.,
- 25 eds., Academic Press, Inc. (1990) yayınlarında tarif edilmiştir. Buluşun nükleik asit molekülleri, tek iplikli veya çift iplikli formda DNA ve RNA ve ayrıca ilgili tamamlayıcı sekansları içerir. DNA, örneğin cDNA, genomik DNA, kimyasal olarak sentezlenmiş DNA, PCR ile amplifiye edilmiş DNA ve bunların kombinasyonlarını
- 30 içerir. Buluşun nükleik asit molekülleri, tam uzunluklu genleri veya cDNA moleküllerini ve ayrıca bunların fragmanlarından oluşan bir kombinasyonu içerir. Buluşun nükleik asitleri, tercihen insan kaynaklarından türetilir, ancak mevcut buluş insan olmayan türlerden türetilenleri de içerir.
- 35 Bazı uygulamalarda buluşun nükleik asitleri, izole edilmiş

nükleik asitlerdir.

Bir "izole edilmiş nükleik asit", doğal olarak oluşan kaynaklardan izole edilmiş nükleik asitler söz konusu olduğunda, nükleik asidin izole edildiği organizmanın genomunda mevcut
5 bitişik genetik sekanslardan ayrılmış bir nükleik asittir. Bir şablondan enzimatik olarak veya kimyasal olarak sentezlenen nükleik asitler, örneğin PCR ürünleri, cDNA molekülleri veya örneğin oligonükleotitler söz konusu olduğunda, bu prosesler sonucu elde edilen nükleik asitlerin izole edilmiş nükleik
10 asitler olduğu anlaşılır. İzole edilmiş bir nükleik asit molekülü, ayrı bir fragman formunda veya daha büyük bir nükleik asit yapısının bir bileşeni olan bir nükleik asit molekülünü ifade eder. Tercih edilen bir uygulamada nükleik asitler, kontamine edici endojen materyallerden büyük ölçüde arındırılır.
15 Nükleik asit molekülü tercihen, büyük ölçüde saf formda ve standart biyokimyasal yöntemlerle bileşenlerinin nükleotit sekanslarının tanımlanması, manipülasyonunu ve geri kazanılmasını sağlayan bir miktar veya konsantrasyonda en az bir kere izole edilmiş DNA veya RNA'dan türetilmiştir (örneğin
20 Sambrook ve diğ., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. baskı, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) yayınında tarif edilen şekilde). Bu sekanslar tercihen, tipik olarak ökaryotik genler bulunan dahili translasyona uğratılmamış sekanslarla veya intronlarla kesintiye uğratılmamış
25 bir açık okuma çerçevesi formunda sağlanabilir ve/veya yapılandırılır. Translasyona uğratılmamış DNA sekansları, açık bir okuma çerçevesinde 5' ucunda veya 3' ucunda olabilir ve kodlama bölgesinin manipülasyonuna veya ifadesine müdahale etmez.
30 Mevcut buluş ayrıca, orta düzeyde sıkı koşullar altında ve daha çok tercihen yüksek düzeyde sıkı koşullar altında burada tarif edilen OSMR antijen proteinlerini kodlayan nükleik asitlere hibridize olan nükleik asitleri veya izole edilmiş nükleik asitleri içerir. Hibridizasyon koşullarının seçimini etkileyen
35 temel parametreler ve uygun koşullarını belirlenmesine yönelik

talimatlar, Sambrook,, Fritsch ve Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., bölüm 9 ve 11; ve Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel ve diğ., eds., John Wiley & Sons, Inc., bölümler 2.10 ve 6.3-6.4) yayınlarında yer alır ve teknikte yetkin kişilerce, örneğin DNA'nın uzunluğu ve/veya baz bileşimini baz alınarak kolaylıkla belirlenebilir. Orta düzeyde sıkı koşullara ulaşmanın bir yolu, 5 x SSC, %0,5 SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0) içeren bir ön yıkama çözeltisi, yaklaşık %50 formamit, 6 x SSC'lik hibridizasyon tamponu ve yaklaşık 55 C derecelik bir hibridizasyon sıcaklığı (veya örneğin yaklaşık 42 C derecelik bir hibridizasyon sıcaklığıyla birlikte yaklaşık %50 formamit içeren başka benzer hibridizasyon çözeltileri) ve 0,5 x SSC, %0,1 SDS içinde yaklaşık 60 C derecelik yıkama koşullarını içerir. Yüksek düzeyde sıkı koşullar genel olarak, yukarıda yer alan hibridizasyon şartları olarak tanımlanır, ancak yaklaşık 68 C derecede 0,2 x SSC, %0,1 SDS ile yıkanır. SSPE (1xSSPE, 0,15M NaCl, 10 mM NaH.sub.2 PO.sub.4 ve 1,25 mM EDTA, pH 7,4'tür) SSC (1xSSC, 0,15M NaCl ve 15 mM sodyum sitrattır) için hibridizasyon ve yıkama tamponları içinde ornatılır; hibridizasyon tamamlandıktan sonra yıkamalar 15 dakika boyunca gerçekleştirilir. Yıkama sıcaklığı ve yıkama tuzu konsantrasyonun, teknikte yetkin kişilerce bilindiği üzere veya aşağıda tarif edildiği üzere hibridizasyon reaksiyonlarını ve dubleks stabilitesini düzenleyen temel prensiplerin uygulanmasıyla istenilen sıklık derecesine ulaşmak için gerektiği şekilde ayarlanabileceğinin anlaşılmalıdır (bkz. örn. Sambrook ve diğ., 1989). Bir nükleik asidi bilinmeyen bir sekansın bir hedef nükleik asidine hibridize ederken hibrit uzunluğunun hibridize edici nükleik asidin uzunluğu kadar olduğu varsayılır. Bilinen sekansın nükleik asitleri hibridize edilirken, hibrit uzunluğu nükleik asitlerin sekanslarının hizalanmasıyla ve optimal sekans tamamlayıcı bölgesinin veya bölgelerinin tanımlanmasıyla belirlenebilir. Uzunluğu 50 baz çiftinden kısa olması beklenen hibritler için hibridizasyon

sıcaklığı, hibritin erime sıcaklığından (T_m) 5 ila 10 C derece daha az olması gerekir ve burada T_m , aşağıdaki denklemlere göre belirlenir. Uzunluğu 18 baz çiftinden daha az olan hibritler için T_m (C derece) = $2(A + T \text{ bazlarının } \#) + 4(\#G + C \text{ bazlarının } \#)$. Uzunluğu 18 baz çiftinden fazla olan hibritler için T_m (C derece) = $81,5 + 16,6(\log_{10} [Na^+]) + 0,41(\% G + C) - (600/N)$, burada N, hibritteki baz sayısını ve $[Na^+]$ ise hibridizasyon tamponundaki sodyum iyonlarının konsantrasyonunu ifade eder (1xSSC için $[Na^+] = 0,165M$) Tercihen her bir hibritleyici nükleik asit, en az 15 nükleotit (veya daha çok tercihen en az 18 nükleotit veya en az 20 nükleotit veya en az 25 nükleotit veya en az 30 nükleotit veya en az 40 nükleotit veya en çok tercihen en az 50 nükleotit) uzunluğuna veya hibridize olduğu mevcut buluşun nükleik asidinin en az %25'i (daha çok tercihen en az %50 veya en az %60 veya en az %70 ve en çok tercihen en az %80) kadar uzunluğa sahiptir ve hibridize olduğu mevcut buluşun nükleik asit ile en az %60 sekans özdeşliğine (daha çok tercihen en az %70, en az %75, en az %80, en az %81, en az %82, en az %83, en az %84, en az %85, en az %86, en az %87, en az %88, en az %89, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 ve en çok tercihen en az %99,5) sahiptir ve burada sekans özdeşliği, tarif edilen sekans boşlukları en aza indirilirken çakışma ve özdeşliği en üst düzeye çıkarılacak şekilde hizalandığında, hibritleyici nükleik asitlerinin sekanslarının karşılaştırılmasıyla belirlenir.

Mevcut buluşun varyantları, genellikle teknikte iyi bilinen kaset veya PCR mutagenezi veya diğer teknikler kullanılarak varyantı kodlayan ve ardından burada belirtilen hücre kültüründe rekombinant DNA'yı ifade edilen DNA'yı üretmek için antijen bağlayıcı proteini kodlayan DNA'daki nükleotitlerin alana özgü mutagenezi ile hazırlanabilir. Ancak, yaklaşık 100-150 kalıntıya sahip varyant CDR'lerini içeren antijen bağlayıcı protein fragmanları, kurulan teknikler kullanılarak *in vitro* sentez ile hazırlanabilir. Aşağıda daha ayrıntılı olarak belirtileceği gibi

modifiye edilmiş özelliklere sahip varyantlar da seçilebilmesine rağmen, varyantlar tipik olarak, doğal olarak oluşan analog ile aynı niteliksel biyolojik aktivite, örneğin OSMR'ye bağlanma sergiler.

5 Teknikte yetkin kişilerce takdir edileceği üzere, genetik kodun dejenerasyonu nedeniyle, mevcut buluşun CDR'lerini (ve antijen bağlayıcı proteinin ağır ve hafif zincirleri veya diğer bileşenlerini) kodlayan çok fazla sayıda nükleik asit yapılabilir. Bu nedenle belirli bir amino asit sekansını
10 tanımlandıktan sonra teknikte yetkin kişiler, kodlanan proteinin amino asit sekansını değiştirmeyecek şekilde bir veya daha fazla kodon sekansının basit bir şekilde modifiye edilmesiyle herhangi bir sayıda farklı nükleik asit yapabilir.

Mevcut buluş ayrıca, yukarıdaki gibi en az bir polinükleotit
15 içeren plazmitler formunda ifade sistemleri ve yapılar, ifade vektörleri, transkripsiyon veya ifade kasetleri sağlar. Ek olarak buluş, bu ifade sistemlerini veya yapılarını içeren konak hücreler sağlar.

Herhangi bir konak hücrede kullanılan ifade vektörleri tipik
20 olarak, plazmit bakımına ve eksojen nükleotit sekanslarının klonlanması ve ifade edilmesine yönelik sekanslar içerir.

Topluca "yan sekanslar" olarak adlandırılan söz konusu sekanslar, belirli uygulamalarda aşağıdaki nükleotit sekanslarının bir veya daha fazlasını içerecektir: bir promotör,
25 bir veya daha fazla güçlendirici sekans, bir replikasyon kökeni, bir transkripsiyon sonlandırma sekansı, bir verici ve alıcı birleştirme alanı içeren bir tam intron sekansı, polipeptit sekresyonu için bir lideri kodlayan bir sekans, bir ribozom bağlanma alanı, bir poliadenilasyon sekansı, ifade edilecek
30 polipeptidi kodlayan nükleik asidin yerleştirilmesi için bir polibağlayıcı bölgesi ve seçilebilir bir markör elemanı. Bu sekansların her biri aşağıda tartışılmıştır.

İsteğe bağlı olarak vektör, bir "etiket" kodlayıcı sekans, başka bir deyişle OSMR antijeni bağlayıcı protein kodlayıcı sekansın
35 5' ve 3' ucunda bulunan bir oligonükleotit molekülü içerebilir;

söz konusu oligonükleotit sekansı, polyHis (örneğin hexaHis) veya FLAG, HA (hemaglutinin influenza virüsü) veya ticari olarak temin edilebilen antikorlar için mevcut myc gibi başka bir "etiket"i kodlar. Bu etiket, tipik olarak polipeptidin ifadesi
5 üzerinde polipeptide kaynaştırılır ve afinite saflaştırması veya konak hücreden OSMR antijeni bağlayıcı proteinin saptanması için bir araç olarak kullanılabilir. Afinite saflaştırması, örneğin bir afinite matrisi olarak etikete karşı antikorlar kullanılarak kolon kromatografisi yoluyla gerçekleştirilebilir. İsteğe bağlı
10 olarak etiket, daha sonra saflaştırılan OSMR antijeni bağlayıcı proteinden örneğin bölünmeye yönelik belirli peptidazlar kullanılarak çeşitli yollarla çıkarılabilir.

Yan sekanslar, homolog (konak hücre ile aynı türden ve/veya suştan), heterolog (konak hücrenin türünden veya suşundan başka
15 bir türden), hibrit (birden daha fazla kaynaktan elde edilen bir yan sekans kombinasyonu), sentetik veya natif olabilir. Bu şekilde bir yan sekansın kaynağı, yan sekansın konak hücre mekanizmasında fonksiyonel olması ve konak hücre mekanizması tarafından aktive edilmesi kaydıyla, herhangi bir prokaryotik veya ökaryotik organizma, herhangi bir omurgalı veya omurgasız organizma veya herhangi bir bitki olabilir.

Mevcut buluşun vektörlerinde yararlı yan sekanslar, teknikte iyi bilinen birkaç yöntemden herhangi biri ile elde edilebilir. Burada yararlı yan sekanslar tipik olarak, haritalama ve/veya
25 kısıtlayıcı endonükleaz sindirimi ile daha önce tanımlanmıştır ve bu nedenle uygun kısıtlayıcı endonükleazlar kullanılarak uygun doku kaynağından izole edilebilir. Bazı durumlarda bir yan sekansın tam nükleotit sekansı bilinebilir. Burada söz konusu yan sekans, nükleik asit sentezi veya klonlaması için burada
30 tarif edilen yöntemler kullanılarak sentezlenebilir.

Yan sekansın tamamının mı ya da sadece bir kısmının mı bilindiği, polimeraz zincir reaksiyonun (PCR) kullanılmasıyla ve/veya bir genomik kütüphanenin aynı veya başka bir türden elde edilen bir oligonükleotit ve/veya yan sekans fragmanı gibi uygun bir prob
35 ile taranmasıyla belirlenebilir. Yan zincirin bilinmemesi

durumunda, bir yan zincir içeren DNA'nın bir fragmanı, örneğin bir kodlama sekansı, hatta başka bir gen veya genler içerebilen daha büyük bir DNA parçasından izole edilebilir. İzolasyon, uygun DNA fragmanını üretmek için kısıtlayıcı endonükleaz sindirimi yoluyla ve ardından agaroz jel saflaştırma, Qiagen® kolon kromatografisi (Chatsworth, CA) ve teknikte yetkin kişilerce bilinen başka yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. Bu amacı gerçekleştirmek için uygun enzimlerin seçimi, teknikte yetkin kişilerce kolayca anlaşılabacaktır.

10 Bir replikasyon kökeni tipik olarak ticari olarak satın alınan prokaryotik ifade vektörlerinin bir parçasıdır ve söz konusu köken, bir konak hücrede vektörün amplifikasyonuna yardımcı olur. Seçilen vektörün bir replikasyon alan kökenini içermesi halinde, bilinen bir sekansa bağlı olarak kimyasal olarak sentezlenebilir ve vektöre bağlanır. Örneğin plazmit pBR322'den

15 elde edilen replikasyon kökeni (New England Biolabs, Beverly, MA), en çok gram negatif bakteriler için uygundur ve çeşitli viral kökenleri (örn. SV40, polyom, adenovirüs, vesiküler stomatitus virüsü (VSV) veya HPV veya BPV gibi

20 papillomavirüsleri) memeli hücrelerde klonlama vektörleri için yararlıdır. Genel olarak memeli ifade vektörleri için replikasyon bileşeninin kökeni gerekmez (örneğin, SV40 kökeni genellikle, yalnızca virüs erken promotörü içermesinden dolayı kullanılır).

25 Bir transkripsiyon sonlandırma sekansı, tipik olarak bir polipeptit kodlama bölgesinin 3' ucuna yerleştirilir ve transkripsiyonu sonlandırmaya yarar. Prokaryotik hücrelerde bir transkripsiyon sonlandırma sekansı genellikle, ardından bir poly-T sekansı gelen G-C bakımından zengin bir fragmandır.

30 Sekans, bir kütüphaneden kolayca klonlanırken veya bir vektörün parçası olarak ticari olarak satın alınırken, aynı zamanda burada tarif edilenler gibi nükleik asit sentezine yönelik yöntemler kullanılarak kolaylıkla sentezlenebilir.

Seçilebilir bir markör gen, seçici bir kültür ortamında

35 büyütülen bir konak hücrenin sağkalması ve büyümesi için gerekli

olan bir proteini kodlar. Tipik seçim markörü, (a) prokaryotik konak hücreler için antibiyotiklere ya da diğer toksinlere, örneğin ampisilin, tetrasiklin veya kanamisine direnç kazandıran, (b) hücrenin oksotrofik yetmezliklerini tamamlayan ya da (c) kompleks veya tanımlanan ortamda mevcut olmayan kritik besin maddelerini sağlayan proteinleri kodlar. Spesifik seçilebilir markörler, kanamisine dirençli gen, ampisiline dirençli gen ve tetrasikline dirençli gendir. Faydalı olması açısından, neomisine dirençli bir gen ayrıca, prokaryotik ve ökaryotik konak hücrelerde seçim için kullanılabilir.

İfade edilecek geni amplifiye etmek için diğer seçilebilir genler kullanılabilir. Amplifikasyon, büyüme ve sağkalım için kritik olan bir proteinin üretilmesi için gerekli genlerin, ardışık jenerasyon rekombinant hücrelerin kromozomlarında birbirinin arka sıra tekrarlandığı bir süreçtir. Memeli hücreler için uygun seçilebilir markör örnekleri arasında, dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve promotör içermeyen timidin kinaz genleri bulunur. Memeli hücre transformantları, yalnızca transformantların, vektörde bulunan seçilebilir gen sayesinde hayatta kalabilmek için benzersiz bir şekilde adapte edildiği seçim basıncı altına yerleştirilir. Seçim basıncı, dönüştürülen hücrelerini ortamdaki seçim maddesinin konsantrasyonunun art arda arttırıldığı koşullar altında kültürlenmesiyle uygulanır ve böylece OSMR polipeptidine bağlanan bir antijen bağlayıcı protein antikoru gibi seçilebilir genin ve başka bir geni kodlayan DNA'nın amplikasyonuna neden olur. Sonuç olarak bir OSMR antijeni bağlayıcı protein gibi yüksek miktarda bir protein, amplifiye DNA'dan sentezlenir.

Bir ribozom bağlanma alanı genellikle mRNA'nın translasyonun başlatılması için gereklidir ve bir Shine-Dalgarno sekansı (prokaryotlar) veya bir Kozak sekansı (ökaryotlar) ile karakterize edilir. Eleman tipik olarak, promotöre göre 3' ucunda ve ifade edilecek kodlama sekansına göre 5' ucunda yer alır. Belirli uygulamalarda bir veya daha fazla kodlama bölgesi, bir dahili ribozom bağlama alanına (IRES) işlevsel olarak

bağlıdır ve be böylece bir tek RNA transkriptinden iki açık okuma çerçevesinin translasyonunu olanak sağlar.

Bir ökaryotik konak hücre ifade sisteminde glikozilasyonun istendiği bazı durumlarda, glikozilasyonu veya verimi arttırmak için çeşitli ön veya prosekanslar manipüle edilebilir. Örneğin belirli bir sinyal peptidinin peptidaz bölünmesi değiştirilebilir veya aynı zamanda glikozilasyonu da etkileyebilen prosekanslar eklenebilir. Son protein ürünü, (matür proteinin birinci amino asidine göre) -1 pozisyonunda tamamen uzaklaştırılmamış olan ifadeye özgü bir veya daha fazla ilave amino asit içerebilir. Örneğin son protein ürünü, peptidaz bölünme alanında bulunan amino ucuna bağlı bir veya iki amino asit kalıntısına sahip olabilir. Alternatif olarak bazı enzim bölünme alanlarının kullanılması sonucunda, söz konusu enzimin matür polipeptit içindeki bu alanda kesmesi durumunda, istenilen polipeptidin hafifçe kesilmiş formda olmasına neden olur.

Buluşun ekspresyon ve klonlama vektörleri tipik olarak, konak organizma tarafından tanınan ve OSMR antijeni bağlayıcı proteini kodlayan moleküle işlevsel olarak bağlı bir promotör içerecektir. Promotörler, (genellikle 100 ile 1000 bp arasındaki) yapısal bir genin transkripsiyonun kontrol eden yapısal genin başlangıç kodonunun yukarısında (5' ucunda) bulunan transkripsiyona uğramamış sekanslardır. Promotörler geleneksel olarak iki sınıfa ayrılır: indüklenebilir promotörler ve konstitütif promotörler. İndüklenebilir promotörler, kültür koşullarındaki bazı değişimlere, örneğin bir besinin varlığına veya yokluğuna ya da sıcaklıktaki bir değişime yanıt olarak kontrolü altındaki DNA'dan yüksek seviyelerde transkripsiyonu başlatır. Diğer yandan konstitütif promotörler, işlevsel olarak, başka bir deyişle gen ifadesi üzerinde çok az kontrol ile veya hiç kontrol olmaksızın bağlı oldukları geni eşit bir şekilde transkribe eder. Çeşitli potansiyel konak hücreler tarafından tanınan çok sayıda promotör iyi bilinir. Uygun bir promotör, promotörün kısıtlayıcı enzim sindirimi ile kaynak DNA'dan çıkartılmasıyla ve istenilen promotör sekansının vektöre

yerleştirilmesiyle buluşun bir OSMR antijeni bağlayıcı proteinini içeren ağır zinciri veya hafif zinciri kodlayan DNA'ya işlevsel olarak bağlıdır.

Maya kökenli konaklar ile kullanılmaya uygun promotörler de
5 teknikte iyi bilir. Maya kökenli güçlendiriciler, maya promotörleriyle birlikte fayda sağlayacak bir biçimde kullanılır. Memeli konak hücrelerle kullanılmaya uygun promotörler iyi bilinir ve bu promotörler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, polyom virüsü, kuş çiçek hastalığı
10 virüsü, adenovirüs (örneğin Adenovirüs 2), sığır papilom virüsü, kuş sarkom virüsü, sitomegalovirüs, bir retrovirüs, hepatit B virüsü ve en çok tercihen Simian Virüsü 40 (SV40) bulunur. Uygun diğer memeli promotörler arasında, heterolog memeli promotörleri, örneğin ısı şok promotörleri ve aktin promotörleri
15 bulunur.

İlgi konusu olabilecek ilave promotörler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, SV40 erken promotörü (Benoist ve diğ., 1981, *Nature* 290:304-310); CMV promotörü (Thomsen ve diğ., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); Rous sarkom virüsünün 3'
20 uzun uç tekrarında bulunan promotör (Yamamoto ve diğ., 1980, *Cell* 22:787-797); herpes timidin kinaz promotörü (Wagner ve diğ., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); metallotiyonin geninden elde edilen promotör ve düzenleyici sekanslar (Prinster ve diğ., 1982, *Nature* 296:39-42); ve
25 prokaryotik promotörler, örneğin beta-laktamaz promotörü (Villa-Kamaroff ve diğ., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); veya tac promotörü (DeBoer ve diğ., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25) bulunur. Ayrıca doku özgüllüğü sergileyen ve transgenik hayvanlarda kullanılmış aşağıdaki
30 hayvan transkripsiyonel kontrol bölgeleri de ilgi konusudur: pankreatik asinar hücrelerde aktif olan elastaz I geni kontrol bölgesi (Swift ve diğ., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz ve diğ., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); pankreatik beta
35 hücrelerinde aktif olan insülin geni kontrol bölgesi (Hanahan,

1985, *Nature* 315:115-122); lenfoid hücrelerde aktif olan immünoglobulin geni kontrol bölgesi (Grosschedl ve diğ., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames ve diğ., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander ve diğ., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444);
5 testiküler, meme, lenfoid ve mast hücrelerinde aktif olan fare meme tümörü virüsü kontrol bölgesi (Leder ve diğ., 1986, *Cell* 45:485-495); karaciğerde aktif olan albumin gen kontrol bölgesi (Pinkert ve diğ., 1987, *Genes ve Devel.* 1 :268-276); Karaciğerde aktif olan alfa-feto-protein geni kontrol bölgesi (Krumlauf ve
10 diğ., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer ve diğ., 1987, *Science* 253:53-58); karaciğerde aktif olan alfa 1-antitripsin geni kontrol bölgesi (Kelsey ve diğ., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); miyeloid hücrelerde aktif olan beta-globin geni kontrol bölgesi (Mogam ve diğ., 1985, *Nature* 315:338-340;
15 Kollias ve diğ., 1986, *Cell* 46:89-94); beyindeki oligodendrosit hücrelerinde aktif olan miyelin temel protein geni kontrol bölgesi (Readhead ve diğ., 1987, *Cell* 48:703-712); iskelet kasında aktif olan miyosin hafif zincir-2 gen kontrol bölgesi (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); ve hipotalamusta aktif olan
20 gonadotropik salgılatıcı hormon geni kontrol bölgesi (Mason ve diğ., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Bir güçlendirici sekans, daha yüksek ökaryotlar tarafından bulunun bir OSMR antijeni bağlayıcı proteinini içeren hafif zincir veya ağır zinciri kodlayan DNA'nın transkripsiyonunu
25 arttırmak için vektöre yerleştirilir. Güçlendiriciler, transkripsiyonu arttırmak için bir promotörü etkileyen, genellikle yaklaşık 10-300 bp uzunluğundaki cis-etkili elemanlardır. Güçlendiriciler, transkripsiyon birimine göre hem 5' ucundaki hem de 3' ucundaki pozisyonlarda bulmasından dolayı
30 nispeten oryantasyon ve pozisyonundan bağımsızdır. Memeli genlerinden elde edilebilen çeşitli güçlendirici sekansları bilinir (örn. globin, elastaz, albümin, alfa -feto-protein ve insülin). Ancak tipik olarak bir virüsten elde edilen bir güçlendirici kullanılır. SV40 güçlendiricisi, sitomegalovirüs
35 erken promotör güçlendiricisi, polyom güçlendiricisi ve teknikte

bilinen adenovirüs güçlendiricileri, ökaryotik promotörlerin aktivasyonuna yönelik örnek niteliğindeki güçlendirici elemanlardır. Bir güçlendiririci, bir vektör içerisinde bir kodlayıcı sekansa göre 5' veya 3' ucuna yerleştirilebilirken, 5 tipik olarak promotörden 5' ucundaki bir alana yerleştirilir. Uygun natif veya heterolog bir sinyal sekansını (lider sekans veya sinyal peptidi) kodlayan bir sekans, antikorun hücre dışı salgılanmasını arttırmak için bir ifade vektörüne dahil edilebilir. Sinyal peptidinin veya liderinin seçimi, antikorun 10 üretileceği konak hücrelerin türüne bağlıdır ve heterolog bir sinyal sekansı, natif sinyal sekansının yerini alabilir. Memeli konak hücrelerde işlevsel sinyal peptit örnekleri arasında aşağıdakiler bulunur: US Patent No. 4,965,195'te tarif edilen interlökin-7'ye (IL-7) yönelik sinyal sekansı; Cosman ve diğ., 15 1984, *Nature* 312:768'de tarif edilen interlökin-2 reseptörüne yönelik sinyal sekansı; EP Patent No. 0367 566'da tarif edilen interlökin-4 reseptörü sinyal peptidi; U.S. Patent No. 4,968,607'de tarif edilen tip I interlökin-1 reseptörü sinyal peptidi; EP Patent No. 0 460 846'da tarif edilen tip II 20 interlökin-1 reseptörü sinyal peptidi.

Vektör, konak hücre genomuna entegre edildiğinde ifadeyi kolaylaştıran bir veya daha fazla eleman içerebilir. Bunlar örnek olarak, bir EASE elemanı (Aldrich ve diğ. 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) ve bir matris bağlama bölgesi (MAR) 25 verilebilir. MAR'lar, kromatinin yapısal organizasyonuna aracılık eder ve entegre edilmiş vektörü "pozitif" etkisinden yalıtılabilir. Dolayısıyla vektörlerin stabil transfektanlar oluşturmak için kullanılması durumunda MAR'lar özellikle yararlıdır. Teknikte çok sayıda doğal ve sentetik MAR içeren 30 nükleik asit bilinir (örneğin U.S. Pat. No. 6,239,328; 7,326,567; 6,177,612; 6,388,066; 6,245,974; 7,259,010; 6,037,525; 7,422,874; 7,129,062).

Buluşun ifade vektörleri, ticari olarak temin edilebilen bir vektör gibi bir başlangıç vektöründen oluşturulabilir. Bu 35 vektörler, istenilen yan sekansların tümünü içerebilir veya

içermeyebilir. Burada tarif edilen yan sekanslardan birinin veya daha fazlasının vektörde hali hazırda mevcut olmaması durumunda bu sekanslar tek tek elde edilebilir ve vektöre bağlanabilir. Yan zincirlerin her birinin elde edilmesine yönelik yöntemler

5 teknikte yetkin kişilerce iyi bilinir.

Vektör oluşturulduktan ve bir OSMR antijen bağlayıcı sekansı içeren bir hafif zinciri, bir ağır zinciri veya bir hafif zincir ve bir ağır zinciri kodlayan bir nükleik asit molekülü vektörün uygun alanına yerleştirildikten sonra, tamamlanan vektör,

10 amplifikasyon ve/veya polipeptit ifade için uygun bir konak hücreye yerleştirilir. Bir OSMR antijeni bağlayıcı protein için bir ifade vektörünün seçilen bir konak hücreye dönüştürülmesi, transfeksiyon, enfeksiyon, kalsiyum fosfat birlikte çökeltmesi, elektroporasyon, mikroenjeksiyon, lipofeksiyon, DEAE-dektran

15 aracılı transfeksiyon gibi iyi bilinen yöntemlerle veya bilinen başka tekniklerle gerçekleştirilebilir. Seçilen yöntem kısmen, kullanılacak konak hücre tipinin bir fonksiyonu olacaktır. Söz konusu yöntemler ve diğer uygun yöntemler, teknikte yetkin kişilerce bilinir ve örneğin yukarıda yer alan Sambrook ve diğ.,

20 2001 yayınında ortaya konmuştur.

Uygun koşullar altında kültürlendiğinde bir konak hücre, (konak hücrenin söz konusu proteini ortama salgılaması halinde) kültür ortamından veya (proteinin salgılanmamış olması halinde) doğrudan proteini üreten konak hücreden art arda toplanabilen

25 bir OSMR antijen bağlanma proteinini sentezler. Uygun bir konak hücrenin seçilmesi, örneğin istenilen ifade düzeyleri, aktivite (örneğin glikozilasyon veya fosforilasyon) için istenen veya gerekli polipeptit modifikasyonları ve biyolojik olarak aktif bir moleküle katlanma kolaylığı çeşitli faktörlere bağlıdır. Bir

30 konak hücre, ökaryotik veya prokaryotik olabilir.

İfadeye yönelik konaklar olarak mevcut memeli hücre hatları teknikte iyi bilinir ve bu hücre hatları, arasında bunlarla sınırlı olmamakla üzere, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATTC: American Type Culture Collection) temin edilebilen

35 ölümsüzleştirilmiş hücre hatları bulunur ve teknikte bilinen bir

ifade sisteminde kullanılan herhangi bir hücre hattı buluşun rekombinant polipeptitlerini oluşturmak için kullanılabilir. Genel olarak konak hücreler, istenen bir anti-OSMR antikör polipeptidini kodlayan DNA'yı içeren bir rekombinant ifade vektörü ile dönüştürülür. Kullanılabilen konak hücreler arasında prokaryotlar, maya kökenli veya daha yüksek ökaryotik hücreler bulunur. Prokaryotlar arasında, örneğin *E. coli* veya bacilli gibi gram negatif ya da gram-pozitif organizmalar bulunur. Daha yüksek ökaryotik hücreler arasında böcek hücreleri ve memeli kökenli yerleşik hücre hatları bulunur. Uygun memeli konak hücre hatları örnekleri arasında, maymun böbrek hücrelerinin COS-7 hattı (ATCC CRL 1651) (Gluzman ve diğ., 1981, Cell 23:175), L hücreleri, 293 hücreleri, C127 hücreleri, 3T3 hücreleri (ATCC CCL 163), Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri, Veggie CHO gibi türevleri ve serumsuz ortamda büyüyen ilgili hücre hatları (Rasmussen ve diğ., 1998, Cytotechnology 28: 31), HeLa hücreleri, BHK (ATCC CRL 10) hücre hatları ve McMahan ve diğ., 1991, EMBO J. 10: 2821 yayınında tarif edildiği gibi Afrika yeşil maymunu böbrek hücre hattı CVI'dan (ATCC CCL 70) türetilen CVI/EBNA hücre hattı, insan embriyonik böbrek hücreleri, örneğin 293, 293 EBNA veya MSR 293, insan epidermal A431 hücreleri, insan Colo205 hücreleri, diğer dönüştürülmüş primat hücre hatları, normal diploid hücreleri, primer dokunun *in vitro* kültüründen türetilen hücre suşları, primer eksplantlar, HL-60, U937, HaK veya Jurkat hücreleri bulunur. İsteğe bağlı olarak HepG2/3B, KB, NIH 3T3 or S49 gibi memeli hücre hatları, örneğin çeşitli sinyal iletimi ve raportör deneylerinde polipeptidin kullanılmasının arzu edilmesi durumunda polipeptit ifadesi için kullanılabilir. Alternatif olarak polipeptidi maya gibi daha düşük ökaryotlarda veya bakteri gibi prokaryotlarda oluşturmak mümkündür. Uygun mayalar arasında, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* suşu, *Candida* veya heterolog polipeptitleri ifade edebilen herhangi bir maya suşu bulunur. Uygun bakteri suşları arasında, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* veya heterolog polipeptitleri ifade

edebilen herhangi bir bakteri suşu bulunur. Polipeptidin maya veya bakteri içinde oluşturulması halinde, fonksiyonel polipeptit elde etmek üzere maya veya bakteri içinde oluşturulan polipeptidin, örneğin uygun alanların fosforilasyonu veya glikozilasyonu yoluyla modifiye edilmesi arzu edilebilir. Bu kovalent bağlar, bilinen kimyasal veya enzimatik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Söz konusu polipeptit ayrıca, buluşun nükleik asidinin veya izole edilmiş nükleik asidinin bir veya daha fazla böcek ekspresyon vektörü içindeki uygun kontrol sekanslarına işlevsel olarak bağlanmasıyla ve bir böcek ifade sisteminin kullanılmasıyla oluşturulabilir. Baculovirus/böcek hücre ifade sistemlerine yönelik materyaller ve yöntemler, örneğin Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A. şirketinden bir kit (MaxBac® kiti) halinde ticari olarak temin edilebilir ve söz konusu yöntemler, örneğin Summers ve Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 119871. ve Luckow ve Summers. *Bio/Technology* 6:47 (1988) yayınında tarif edildiği üzere teknikte iyi bilinir. Ayrıca hücre içermeyen transkripsiyon sistemleri de, burada açıklanan nükleik asit yapılarından türetilen RNA'lar kullanılarak polipeptitler oluşturmak üzere kullanılabilir. Bakteri, mantar, maya ve memeli hücre konakları ile kullanılmaya yönelik uygun klonlama ve ifade vektörleri, Pouwels ve diğ. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985) yayınında tarif edilir. Buluşun bir nükleik asidini veya izole edilmiş bir nükleik asidini içeren, tercihen en az bir ekspresyon kontrol sekansına işlevsel olarak bağlı bir konak hücre, bir "rekombinant konak hücre"dir.

Belirli uygulamalarda hücre hatları, hangi hücre hatlarının yüksek ifade düzeylerine sahip olduğunun ve hangi hücre hatlarının OSMR bağlama özelliklerine sahip antijen bağlayıcı proteinlerini yapısal olarak ürettiğinin belirlenmesiyle seçilebilir. Başka bir uygulamada, kendi antikoru üretmeyen, ancak heterolog bir antikor üretebilen ve salgılayabilen B hücre soyundan gelen bir hücre hattı seçilebilir.

Hücre Tüketen OSMR antijeni bağlayıcı Proteinler

Tercih edilen uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, OSMR'ye bağlanır ve OSM ve/veya IL-31 bağlanmasını inhibe eder ve böylece OSMR ifade eden hücrelerde OSM ve/veya IL-31 aracılı sinyalleme azaltır. Ancak belirli uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein, OSMR'yi bağlar ve bir OSMR ifade eden hücreyi tüketmek üzere hedefler. Çeşitli görünümde OSMR antijeni bağlayıcı protein, OSM ve/veya IL-31 bağlanmasını inhibe eder ve OSMR hücrelerini tüketmek üzere hedefler.

- 5
- 10 Hücre tüketen OSMR antijeni bağlayıcı proteinler, OSMR ifadesi ile ilişkili hastalıkların veya bozuklukların, örneğin bir otoimmün hastalığın, inflamatuvar hastalığın, hücre dışı matris birikmesi veya yeniden modellenmesi ile ilişkili bir hastalık veya bozukluğun veya bir OSMR ifade eden tümörün tedavi edilmesi
- 15 için özellikle yararlıdır. Antijen bağlayıcı proteinler, örneğin antikorlar içeren hücrelerin hedeflenmesine yönelik yöntemler teknikte iyi bilinir. Örnek niteliğindeki uygulamalar aşağıda tartışılmıştır.

Antikor İlaç Konjüгатları

- 20 Buluşun uygulamaları arasında antikor ilaç konjüгатları (ADC'ler : Antibody Drug Conjugates) bulunur. Genel olarak ADC, kemoterapötik bir maddeye, örneğin sitotoksik bir maddeye, sitostatik bir maddeye, bir toksine veya radyoaktif bir maddeye konjüge edilmiş bir antikor içerir. İlacın antikora konjüge
- 25 edilmesi için bir bağlayıcı molekül kullanılabilir. Teknike, ADC teknolojisinde yararlı çok çeşitli bağlayıcılar ve ilaçlar bilinir ve mevcut buluşun uygulamalarında kullanılabilir. (Bkz. US20090028856; US2009/0274713; US2007/0031402; W02005/084390; W02009/099728; US5208020; US5416064; US5475092; 5585499; 6436931; 6372738 ve 6340701).
- 30

Bağlayıcılar Belirli uygulamalarda ADC, bir veya daha fazla bağlayıcı bileşenden oluşan bir bağlayıcı içerir. Örnek niteliğindeki bağlayıcı bileşenler arasında 6-maleimidokaproil, maleimidopropanoil, valin-sitrullin, alanin-fenilalanin, p-aminobenziloksikarbonil ve bağlayıcı ayıracılar ile konjügasyon

35

sonucu elde edilenler, örneğin bunlarla sınırlı olmamak üzere N-süksinimidil 4-(2-piridiltiyo) pentanoat ("SPP"), N-süksinimidil 4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1 karboksilat ("SMCC," burada ayrıca "MCC" olarak da adlandırılır), ve N-süksinimidil (4-iyodo-asetil) aminobenzoat ("SIAB") bulunur.

Bağlayıcılar, "bölünebilir (cleavable)" bir bağlayıcı veya "bölünemeyen (non-cleavable)" bir bağlayıcı olabilir (Ducry ve Stump, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 5-13). Bölünebilir ayıraçlar, belirli çevre faktörlerine tabi tutulduğunda, örneğin hedef hücre içerisine özümsemiğinde ilacı salması üzere tasarlanır. Bölünebilir bağlayıcılar arasında asit kararsız bağlayıcılar, proteaza duyarlı bağlayıcılar, fotokararsız bağlayıcılar, dimetil bağlayıcı veya disülfür içeren bağlayıcılar bulunur. Bölünemeyen bağlayıcılar, hedef hücre tarafından özümsemişmenin ve hedef hücre içinde tükenmenin ardından, antikorun veya ilacın en az bir amino asidiyle kovalent olarak ilişkili kalmaya eğilimlidir. MCC, örnek niteliğinde bölünemeyen bir bağlayıcıdır.

İlaçlar

Belirli uygulamalarda antikor, kemoterapötik bir ajana konjüge edilir. Kemoterapötik maddeler arasında, alkilleyici maddeler, örneğin tiyotepa ve siklofosfamid (CYTOXAN™); alkil sülfonatlar örneğin busülfan, improsülfan ve piposülfan; aziridinler, örneğin benzodopa, karbokuon (carboquone), altretamin, trietilenmelamin, trietilenfosforamit, trietilentiyofosfaoramit ve trimetilolomelamin metürodopa ve uredopa; asetogeninler (özellikle bullatasin (bullatacin) ve bullatasinon (bullatacinone)) dahil olmak üzere etileniminler ve metilamlaminler; bir kamptotesin (sentetik analogu topotekan dahil olmak üzere); bryostatin; kallistatin; CC-1065 (adozelesin, karzelesin ve bizelesin sentetik analogları dahil olmak üzere); kriptofisinler (özellikle kriptofisinler 1 ve kriptofisinler 8); dolastatin; duokarmisin (sentetik analogları KW-2189 ve CBI-TMI dahil olmak üzere); elöterobin; pankratistatin; bir sarkodistin; spongistatin; azot hardalları

örneğin klorambusil, klomafazin, kolofosphamit, estramustin ,
ifosfamid, mekloreten, mekloreten oksit hidroklorür,
melfalan, novembisin, fenesterin, prednimustin, trofosfamid,
5 urasil hardalı; nitrosüreler örneğin karmustin, klorozotosin,
fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; antibiyotikler,
örneğin enedin antibiyotikleri (örneğin kalikamisin , özellikle
kalikamisin .gamal ve kalikamisin teta I, bkz. Örn. Angew Chem.
Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dinemisin A dahil olmak üzere
dynemisin; bir esperamisin; ve ayrıca neokarzinostatin kromofor
10 ve ilgili kromoprotein enedin antibiyotiği kromomoforları),
aklasinomisiner, aktinomisiner, autramisin, azaserin,
bleomisiner, kaktinomisiner, karabisin, kaminomisiner,
karzinofilin; kromomisiner, daktinomisiner, daunorobisin,
detorubisin, 6-diazo-5-okso-L-norlösin, (morfolin-doksorubisin,
15 siyanomorfolindoksorubisin, 2-pirrolino-doksorubisin ve
doksidoksorubisin dahil olmak üzere) doksorubisin, epirubisin,
esorubisin, idarubisin, marsellomisin, nitomisiner,
mikofenolik asit, nogalamisin, olivomisiner, peplomisin,
potfiromisin, puromisin, kelamisin, rodorubisin, streptonigrin,
20 streptozosin, tübersitin, ubenimeks, zinostatin, zorubisin;
anti-metabolitler, örneğin metotreksat ve 5-florourasil (5-FU);
folik asit analogları, örneğin denopterin, metotreksat,
pteropterin, trimetreksat; pürin analogları, örneğin fludarabin,
6-mersaptopurin, tiyamiprin, tiyoguanin; pirimidin analogları
25 örneğin, ansitabin, azasitidin, 6-azauridin, karmofur,
sitarabin, dideoksiuridin, doksifluridin, enositabin,
floksuridin, 5-FU; androjenler, örneğin kalusteron,
dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan,
testolakton; anti-adrenaller, örneğin aminoglutetimid, mitotan,
30 trilostan; folik asit takviyesi, örneğin frolinik asit;
aseglaton; aldofosfamid glikojen; aminolevulinik asit; amsakrin;
bestrabusil; bisantren; edatraksat; defofamin; demekolsin;
diazikon; elfomithin; eliptinyum asetat; bir epotilon;
etoglusit; galyum nitrat; hidroksiüre; lentinan; lonidamin;
35 maytansinoid, örneğin maytansin ve ansamitosimler; mitoguazon;

mitoksantron; mopidamol; nitrasrin; pentostatin; fenamed;
pirarubisin; podofillinik asit; 2-etilhidrazid; prokarbazin;
PSK®; razoksan; rizoksin; sizofuran; spirogermanyum; tenuazonik
asit; triazikon; 2,2',2"-triklorotrietilamin; trikotesenler
5 (özellikle T-2 toksin, verrasurin A, roridin A ve anguidin);
uretan; vindesin; dakarbazin; mannomustin; mitobronitol;
mitolaktol; pipobroman; gasitosin; arabinozid ("Ara-C");
siklofosfamid; tiyotepa; taksoidler, örneğin paklitaksel
(TAXOL™, Bristol-Myers Skibb Oncology, Princeton, NJ) ve
10 doksetaksel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Fransa);
klorambusil; gemitabin; 6-tioguanin; mersaptopurin;
metotreksat; platinyum analogları, örneğin cisplatin ve
karboplatin; vinblastin; platinyum; etoposid (VP-16); ifosfamid;
mitomisin C; mitoksantron; vinsristin; vinorelbinin; navelbin;
15 novantron; teniposit; daunomisin; aminopterin; kseloda;
ibandronat; CPT-11; topoisomeraaz inhibitörü RFS 2000;
diflorometilomitin (DMFO); retinoik asit; kapesitabin;
yukarıdakilerden herhangi birinin farmasötik olarak kabul
edilebilir tuzları, asitleri veya türevleri bulunur.

20 Bu tanım ayrıca, tümörler üzerindeki hormon etkisini düzenleyen
veya inhibe eden anti-hormonal maddeler, örneğin tamoksifen,
raloksifen, aromataz inhibitörü 4(5)-imidazoller, 4-
hidroksitamoksifen, trioksifen, keoksifen, LY117018, onapriston
ve toremifen (Fareston) dahil olmak üzere anti-östrojenler ve
25 flutamid, nitulamit, bikalutamit, löprolit ve goserelin gibi
anti-antrojenler; siRNA ve yukarıdakilerin herhangi birinin
farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları, asitleri ve
türevlerini içerir. Mevcut buluş ile kullanılabilen diğer
kemoterapötik maddeler, US Yayın No. 20080171040 veya US Yayın
30 No. 20080305044 yayınlarında açıklanmıştır.

Bir antikoron iki veya daha fazla farklı kemoterapötik ajana
konjüge edilebildiği veya farmasötik bir bileşim, bir antikoron
karışımını içerebildiği düşünülür ve söz konusu antikoron
bileşeni, farklı bir kemoterapötik ajana konjüge edilmesinin
35 dışında özdeştir. Söz konusu uygulamalar, çoklu biyolojik

yolaklarının bir hedef hücre ile hedeflenmesi için yararlı olabilir.

Tercih edilen uygulamalarda ADC, tubulin polimerizasyonu inhibe ederek etki eden mitotik inhibitörler olan bir veya daha fazla

5 maytansinoid molekülüne konjüge edilmiş bir antikor içerir. Çeşitli modifikasyonlar dahil maytansinoidler, US Pat. No. 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 10 4371533 ve WO 2009/099728 yayınlarında tarif edilmiştir. Maytansinoid ilaç parçaları, doğal kaynaklardan izole edilebilir ve rekombinant teknoloji kullanılarak üretilebilir veya sentetik olarak hazırlanabilir. Örnek niteliğindeki maytansinoidler arasında C-19-dekloro (US Pat No. 4256746), C-20-hidroksi (veya 15 C-20-demetil) +/-C-19-dekloro (US Pat. No. 4307016 ve 4361650), C-20-demetoksi (veya C-20-açiloksi (-OCOR), +/-dekloro (US Pat. No. 4294757), C-9-SH (US Pat. No. 4,424,219), C-14-alkoksimetil (demetoksi/CH₂OR) (U.S. Pat. No. 4,331,598), C-14-hidroksimetil veya asiloksimetil (CH₂OH veya CH₂OAc) (U.S. Pat. No. 20 4,450,254), C-15-hidroksi/açiloksi (U.S. Pat. No. 4,364,866), C-15-metoksi (U.S. Pat. No. 4,313,946 ve 4,315,929), C-18-N-demetil (U.S. Pat. No. 4,362,663 ve 4,322,348) ve 4,5-deoksi (U.S. Pat. No. 4,371,533) bulunur.

Maytansinoid bileşiklerinin üzerindeki çeşitli pozisyonun, 25 istenen bağlantı türüne bağlı olarak bağlantı pozisyonu olarak kullanılabilir. Örneğin bir ester bağının oluşturulması için bir hidroksil gruplu C-3 pozisyonu, hidrozimetil ile modifiye edilmiş C-14 pozisyonu, bir hidroksil grubuyla modifiye edilmiş C-15 pozisyonu ve bir hidroksil grubuna sahip C-20 pozisyonunun 30 hepsi uygundur (US Pat. No. 5208020, RE39151 ve 6913748; US Patent Başvuru Yayın No. 20060167245 ve 20070037972 ve WO 2009099728).

Tercih edilen maytansinoidler arasında, DM1, DM3 ve DM4 gibi 35 teknikte bilinen maytansinoidler bulunur (US Pat. Başvuru Yayın No. 2009030924 ve 20050276812).

Maytansinoidler içeren ADC'ler, bu ADC'lerin oluşturulmasına yönelik yöntemler ve bunların terapötik kullanımı, US Patent No. 5208020 ve 5416064, US Pat. Başvuru Yayın No. 20050276812 ve WO 2009099728 yayınlarında açıklanmıştır. Maytansinoid ADC'ler oluşturulması için yararlı bağlayıcılar, teknikte bilinir (US Pat. No. 5208020 ve US Pat. Başvuru Yayın No. 2005016993 ve 20090274713). Bir SMCC bağlayıcısı içeren maytansinoid ADC'ler, US Pat. Başvuru Yayın No. 2005/0276812 yayınında açıklanan şekilde hazırlanabilir.

10 Efektör Fonksiyonu Geliştirilmiş Antikorlar

Bir antikorun Fc kısmının fonksiyonlarından biri, antikor hedefini bağladığında bağışıklık sistemi ile iletişim kurmaktır. Bu fonksiyona "efektör fonksiyonu" adı verilir. Bu iletişim, antikora bağımlı hücrel sitotoksositeye (ADCC), antikora bağımlı hücrel fagositoza (ADCP) ve/veya tamamlayıcıya bağımlı sitotoksositeye (CDC) neden olur. ADCC ve ADCP, Fc'nin immün sistemi hücrelerinin yüzeyi üzerinde bulunan Fc reseptörlerine bağlanmasıyla aracılık edilir. CDC, Fc'nin tamamlayıcı sistem proteinleri, örneğin Clq ile bağlanmasıyla aracılık edilir.

20 IgG alt sınıfları, efektör fonksiyonlara aracılık etme kabiliyetleri bakımından farklılık gösterir. Örneğin IgG1, ADCC ve CDC'ye aracılık etmesi bakımından IgG2 ve IgG4'ten çok daha üstündür. Dolayısıyla OSMR'yi ifade eden bir hücrenin tüketilmek üzere hedeflendiği uygulamalarda, bir anti-OSMR IgG1 antikoru tercih edilir.

Bir antikorun efektör fonksiyonu, Fc bölgesinde bir veya daha fazla mutasyonunun dahil edilmesiyle arttırılabilir veya azaltılabilir. Buluşun uygulamalar arasında, efektör fonksiyonunu arttırmak için tasarlanmış bir Fc'ye sahip antikorlar bulunur (U.S. 7,317,091 ve Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009). Yüksek efektör fonksiyonuna sahip örnek niteliğindeki IgG1 Fc molekülleri arasında, (Kabat numaralandırma şemasına dayalı olarak) aşağıdaki ornatmaları içerenler bulunur:

35 S239D/I332E

- 5 S239D/A330S/I332E
S239D/A330L/I332E
S298A/D333A/K334A
P247I/A339D
P247I/A339Q
D280H/K290S
D280H/K290S/S298D
D280H/K290S/S298V
F243L/R292P/Y300L
10 F243L/R292P/Y300L/P396L
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
G236A/S239D/I332E
K326A/E333A
K326W/E333S
15 K290E/S298G/T299A
K290N/S298G/T299A
K290E/S298G/T299A/K326E
K290N/S298G/T299A/K326E

20 Buluşun diğer uygulamaları arasında, efektör fonksiyonunu azaltmak için tasarlanmış bir Fc'ye sahip antikorlar bulunur. Düşük efektör fonksiyonuna sahip örnek niteliğindeki Fc molekülleri arasında, (Kabat numaralandırma şemasına dayalı olarak) aşağıdaki ornatmaları içerenler bulunur:

- 25 N297A (IgG1)
L234A/L235A (IgG1)
V234A/G237A (IgG2)
L235A/G237A/E318A (IgG4)
H268Q/V309LA330S/A331S (IgG2)
C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
30 C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
L234F/L235E/P331S (IgG1)
S267E/L328F (IgG1)

IgG Fc içeren proteinlerin efektör fonksiyonunu arttırmaya yönelik başka bir yöntem ise Fc fukozilasyonunun azaltılmasıdır.
35 Fc'ye bağlanan iki antenli kompleks tip oligosakkaritlerden

çekirdek fukozun çıkarılması, antijen bağlanma veya CDC efektör fonksiyonunun değiştirmeksizin ADCC efektör fonksiyonunu büyük ölçüde arttırmıştır. Fc içeren moleküllerin, örneğin antikorların fukozilasyonunun azaltılması veya ortadan kaldırılması için çeşitli yollar bilinir. Bunlar arasında, FUT8 nakavt hücre hattı, varyant CHO hattı Lec13, sıçan hibridom hücre hattı YB2/0, spesifik olarak FUT8 genine karşı bir küçük engelleyici RNA içeren bir hücre hattı ve β -1,4-N-asetilglukosaminiltransferaz III ve Golgi α -mannosidaz II'yi birlikte ifade eden bir hücre hattı dahil olmak üzere belirli memeli hücre hatlarında rekombinant ifadesi bulunur. Alternatif olarak Fc içeren molekül, memeli olmayan bir hücrede, örneğin bir bitki hücresinde, mayada veya E. coli gibi prokaryotik hücrede ifade edilebilir. Dolayısıyla buluşun belirli uygulamalarında bir bileşim, buluşun düşük fukozilasyona sahip veya tamamen fukozilasyona sahip olmayan bir antikorunu içerir.

Farmasötik Bileşimler

Bazı uygulamalarda mevcut buluş, farmasötik olarak etkili seyrelticiler, taşıyıcı, çözüldürücü, emülsifiye edici madde, koruyucu madde ve/veya adjuvan ile birlikte buluşun antijen bağlayıcı proteinlerden birinin veya birden fazlasının terapötik olarak etkili bir miktarını içeren farmasötik bir bileşim sağlar. Belirli uygulamalarda antijen bağlayıcı protein bir antikordur. Buluşun farmasötik bileşimleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere sıvı, dondurulmuş veya liyofize bileşimler bulunur.

Formülasyon materyalleri tercihen, alıcılar için kullanılan dozajlarda ve konsantrasyonlarda toksik değildir. Spesifik uygulamalarda, bir OSMR antijeni bağlayıcı proteinin, örneğin bir OSMR bağlayıcı antikor, terapötik olarak etkili bir miktarını içeren farmasötik bileşimler sağlanır.

Belirli uygulamalarda söz konusu farmasötik bileşim, örneğin bileşimin pH değerini, ozmolaritesini, vizkositesini, duruluğunu, rengini, izotonizitesini, kokusunu, sterilliğini, stabilitesini, çözünme veya salınım oranını, adsorpsiyon veya

penetrasyonunu modifiye etmek, muhafaza etmek veya korumak için formülasyon materyallerini içerebilir. Bu uygulamalarda uygun formülasyon malzemeleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, amino asitler (örneğin glisin, glutamin, asparagin, arginin, prolin veya lizin); antimikrobiyaller; antioksidanlar (örneğin askorbik asit, sodyum sülfid veya sodyum hidrojen-sülfid); tamponlar (örneğin borat, bikarbonat, Tris-HCl, sitratlar, fosfatlar veya diğer organik asitler); hacim arttırıcı maddeler (örneğin mannitol veya glisin); şelatlayıcı maddeler (örneğin etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)); kompleks oluşturuıcı maddeler (örneğin kafein, polivinilpirrolidon, beta-siklodekstrin veya hidroksipropil-beta-siklodekstrin); dolgu maddeleri; monosakkaritler; disakkaritler ve diğer karbohidratlar (örneğin glikoz, mannoz veya dekstrinler); proteinler (örneğin serum albümin, jelatin veya immünoglobülinler); renklendirici, aroma verici ve seyreltici maddeler; emülsifiye edici maddeler; hidrofilik polimerler (örneğin polivinilpirrolidon); düşük molekül ağırlıklı polipeptitler; tuz oluşturuıcı karşı iyonlar (örneğin sodyum); koruyucular (örneğin benzalkonyum klorür, benzoik asit, salisilik asit, timerosal, fentil alkol, metilparaben, propilparaben, klorheksidin, sorbik asit veya hidrojen peroksit); çözücüler (örneğin gliserin, propilen glikol veya polietilen glikol); şeker alkoller (örneğin mannitol veya sorbitol); askıda tutma maddeleri; sürfaktanlar veya ıslatıcı maddeler (örneğin pluronikler, PEG, sorbitan esterler, polisorbitat 20 gibi polisorbitatlar, polisorbitat, triton, trometamin, lesitin, kolesterol, tiloksapal); dayanıklılık arttırıcı maddeler (örneğin sakaroz veya sorbitol); tonisite arttırıcı maddeler (örneğin alkali metal halitler, tercihen sodyum veya potasyum klorür, mannitol sorbitol); aktarım araçları; seyrelticiler; ekspanyanlar ve/veya farmasötik adjuvanlar bulunur. Bkz. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18. baskı, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Belirli uygulamalarda optik farmasötik bileşim, örneğin

amaçlanan uygulama yoluna, aktarım formatına ve arzu edilen dozaja bağlı olarak teknikte yetkin kişilerce belirlenecektir. Bkz. örn. yukarıda yer alan REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Belirli uygulamalarda bu bileşimler, buluşun antijen bağlayıcı proteinlerinin fiziksel durumunu, stabilitesini, in vivo salınım oranını ve in vivo temizlenme hızını etkileyebilir. Belirli uygulamalarda farmasötik bir bileşimde primer araç veya taşıyıcı, tabiatı bakımından sulu veya susuz olabilir. Örneğin uygun bir araç veya taşıyıcı, parenteral uygulama için bileşimlerde yaygın olan diğer malzemeler ile takviye edilmiş olması muhtemel enjeksiyona yönelik sıvı, fizyolojik salin çözeltisi veya yapay serebrospinal sıvı olabilir. Nötr tamponlu salin veya serum albümin ile karıştırılmış salin, diğer örnek araçlardır. Spesifik uygulamalarda farmasötik bileşimler, yaklaşık pH 7,0-8,5'lik Tris tamponu veya yaklaşık pH 4,0-5,5'lik asetat tamponu içerir ve ayrıca sorbitol veya bunun uygun bir ornatığını içerebilir. Buluşun belirli uygulamalarında, buluşun OSMR antijeni bağlayıcı protein bileşimleri, istenen saflık derecesine sahip seçilen bileşimin liyofilize bir kek veya bir sulu çözelti formunda opsiyonel formülasyon maddeleri (yukarıda yer alan REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES) ile karıştırılmak suretiyle depolanmak üzere hazırlanabilir. Ayrıca, belirli uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein ürünü, sukroz gibi uygun ekspiyanlar kullanılarak bir liyofilizat olarak formüle edilebilir.

Buluşun farmasötik bileşimleri, parenteral uygulama için seçilebilir. Alternatif olarak bileşimler, inhalasyon için veya örneğin oral olarak sindirim kanalı üzerinden uygulama için seçilebilir. Bu farmasötik olarak kabul edilebilir bileşimlerin hazırlanması, teknikte uzmanlık dahilindedir. Formülasyon bileşenleri, tercihen uygulama alanı için kabul edilebilir konsantrasyonlarda bulunur. Belirli uygulamalarda tamponlar, bileşimin fizyolojik pH değerinde veya biraz daha düşük bir pH değerinde, tipik olarak yaklaşık 5 ile yaklaşık 8 arasında bir pH değerinde muhafaza edilmesi için kullanılabilir.

Parenteral uygulama söz konusu olduğunda, mevcut buluşta kullanılmaya yönelik terapötik bileşimler, pirojensiz, farmasötik olarak kabul edilebilir bir araç içinde istenen OSMR antijeni bağlayıcı proteini içeren parenteral olarak kabul edilebilir sulu çözelti formunda sağlanabilir. Parenteral enjeksiyon için özellikle uygun bir araç, OSMR antijeni bağlayıcı proteinin uygun şekilde korunmuş bir steril, izotonik çözelti olarak formüle edildiği steril damıtılmış su olabilir. Belirli uygulamalarda söz konusu hazırlama, enjekte edilebilir mikroküreler, biyolojik olarak aşınabilir partiküller, polimerik bileşikler (örneğin polilaktik asit veya poliglolik asit), boncuklar veya lipozomlar gibi bir madde içeren istenen molekülün formülasyonunu içerebilir ve söz konusu formülasyon, depo enjeksiyon yoluyla teslim edilebilen ürünün kontrollü veya sürekli salınımını sağlar. Belirli uygulamalarda hiyalüronik asit de kullanılabilir ve dolaşımda uzun süre kalmasını destekleyen bir etkiye sahiptir. Belirli uygulamalarda implante edilebilir ilaç aktarım aygıtları, istenen antijen bağlayıcı proteini uygulamak üzere kullanılabilir.

Mevcut buluşun farmasötik bileşimleri inhalasyon için formüle edilebilir. Bu uygulamalarda buluşun OSMR antijeni bağlayıcı proteinleri, fayda sağlayacak bir şekilde kuru, solunabilir bir toz halinde formüle edilir. Spesifik uygulamalarda OSMR antijeni bağlayıcı protein inhalasyon çözeltileri, aerosol aktarım için bir itici ile formüle edilebilir. Belirli uygulamalarda çözeltiler, nebülize edilebilir. Dolayısıyla pulmoner uygulama ve formülasyon yöntemleri, kimyasal olarak modifiye edilmiş proteinlerin pulmoner aktarımını tarif eden Uluslararası Patent Başvuru No. PCT/US94/001875 yayınında tarif edilmiştir.

Formülasyonların oral yoldan verilebileceği de düşünülmüştür. Bu şekilde uygulanan OSMR antijeni bağlayıcı proteinleri, tabletler ve kapsüller gibi katı dozaj formlarının bileşik haline getirilmesinde geleneksel olarak kullanılan taşıyıcılar ile veya bunlar olmaksızın formüle edilebilir. Belirli uygulamalarda bir kapsül, gastrointestinal kanalda biyoyararlanımın en üst

seviyede ve presistemik bozunmanın en düşük seviyede olduğu noktada formülasyonun aktif kısmını serbest bırakmak üzere tasarlanabilir. OSMR antijeni bağlayıcı proteinin absorpsiyonun kolaylaştırılması için ilave maddeler de bulunabilir.

5 Seyrelticiler, tatlandırıcılar, düşük erime noktalı mumlar, bitkisel yağlar, yağlayıcılar, askıda tutma maddeleri, tablet parçalayıcı maddeler ve bağlayıcılar da kullanılabilir.

Sürekli veya kontrollü olarak aktarma formülasyonlarda OSMR antijeni bağlayıcı proteinlerini içeren formülasyonlar dahil

10 olmak üzere ilave farmasötik bileşimler, ilgili tekniğin uzmanlarına aşikardır. Lipozom taşıyıcılar, biyolojik olarak aşınabilen mikropartiküller veya gözenekli boncuklar ve depo enjeksiyonları gibi sürekli veya kontrollü olarak aktarma araçlarının formüle edilmesine yönelik teknikler, teknikte uzman

15 kişilerce bilinir. Bkz. örn. farmasötik bileşimlerin aktarılması için gözenekli polimerik mikropartiküllerin kontrollü salınımının tarif edildiği Uluslararası Patent Başvuru No. PCT/US93/00829. Sürekli salınımlı preparasyonlar, şekillendirilmiş ürün formunda, örneğin filmler veya

20 mikrokapsüller formunda yarı geçirgen polimer matrisleri içerir. Sürekli salınım matrisleri arasında poliestерler, hidrojeller, polilaktitler (U.S. Pat. No. 3,773,919 ve Avrupa Patent Başvurusu Yayın No. EP 058481), L-glutamik asit ve gama-etil-L-glutamatın kopolimerleri (Sidman ve diğ., 1983, Biopolymers

25 2:547-556), poli (2-hidroksietil-metakrilat) (Langer ve diğ., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 ve Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etilen vinil asetat (yukarıda yer alan Langer ve diğ., 1981) veya poli-D(-)-3-hidroksibutrik asit (Avrupa Patent Başvurusu

30 Yayın No. EP 133,988) bulunur. Sürekli salınımlı bileşimler ayrıca, teknikte bilinen birkaç yöntemden herhangi biri ile hazırlanabilen lipozomları içerebilir. Bkz. örn. Eppstein ve diğ., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; Avrupa Patent Başvurusu No. EP 036,676; EP 088,046 ve EP 143,949.

35 In vivo uygulama için kullanılan farmasötik bileşimler tipik

olarak steril preparatlar olarak sağlanır. Sterilizasyon, steril
filtreleme membranları içerisinde filtreleme yoluyla
gerçekleştirilebilir. Bileşim liyofilize edildiğinde, bu yöntem
kullanılarak gerçekleştirilen sterilizasyon, liyofilizasyon ve
5 sulandırmadan önce veya sonra yapılabilir. Parenteral uygulamaya
yönelik bileşimler, liyofilize formda veya bir çözelti içinde
saklanabilir. Parenteral bileşimler, genelde steril erişim
noktasına sahip bir kap içerisinde, örneğin bir intravenöz
solüsyon torbası veya bir hipodermik enjeksiyon iğnesi ile
10 parçalanabilen bir tıpaya sahip bir viyal içine yerleştirilir.
Buluşun görünüşleri, uluslararası patent başvurusu WO 06138181A2
(PCT/US2006/022599) yayınında tarif edilen farmasötik bileşimler
olarak kullanılabilen buluşun OSMR antijeni bağlayıcı
proteinlerinin kendiliğinden tamponlayıcı formülasyonlarını
15 içerir.

Yukarıda tarif edildiği üzere belirli uygulamalar, OSMR antijeni
bağlayıcı protein bileşimlerini, özellikle OSMR antijeni
bağlayıcı proteine ek olarak bu bölümde veya bu belgede başka
yerlerde örnek olarak tarif edilenler gibi bir veya daha fazla
20 eksipiyan içeren farmasötik olarak OSMR antijeni bağlayıcı
bileşimlerini sağlar. Bu bağlamda eksipiyanlar, vizkositenin
ayarlanması gibi formülasyonların fiziksel, kimyasal veya
biyolojik özelliklerinin ayarlanması gibi çok çeşitli amaçlar
ve/veya etkinliğin geliştirilmesine veya bu formülasyonların
25 stabilize edilmesine yönelik buluşun prosesleri ve örneğin
imalat, nakliye, depolama, kullanım öncesi hazırlama, uygulama
ve sonrasında ortaya çıkan stresler nedeniyle bozulmaya karşı
prosesler için mevcut buluşta kullanılabilir.

Bu bağlamda, yararlı protein stabilizasyonu ve formülasyon
30 materyalleri ve yöntemleri konusunda çeşitli açıklamalar
arasında örneğin Arakawa ve diğ., "Solvent interactions in
pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991);
Kendrick ve diğ., "Physical stabilization of proteins in aqueous
solution," in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS:
35 THEORY AND PRACTICE, Carpenter ve Manning, eds. Pharmaceutical

Biotechnology. 13: 61-84 (2002) ve Randolph ve diğ., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002) bulunur ve bunlar kısmen, özellikle mevcut buluşa uygun ekspiyanlar ve bunların kendiliğinden tamponlayıcı protein formülasyonlarına yönelik prosesler ve özellikle veterinerlik ve/insan tıbbi kullanımlarına yönelik protein farmasötik ürünleri ve prosesleri ile ilgilidir.

Tuzlar, buluşun belirli uygulamalarına uygun olarak, örneğin bir formülasyonun iyonik kuvvetini ve/veya izotonisitesini ayarlamak için ve/veya bileşimin bir proteinin veya başka bir bileşeninin çözünürlüğünü ve/veya fiziksel stabilitesini buluşa uygun olarak geliştirmek için kullanılabilir.

İyi bilindiği üzere iyonlar, proteinlerin yüzeyinde yüklü kalıntılarına bağlanarak ve proteinde yüklü ve polar grupları koruyarak ve elektrostatik etkileşimlerin, çekici ve itici etkileşimlerin kuvvetini azaltarak proteinlerin natif durumlarını stabilize edebilir. İyonlar ayrıca, proteinin denatüre durumunu özellikle proteinin denatüre peptit bağlantılarına (--CONH) bağlanarak stabilize edebilir. Bir proteindeki yüklü ve polar gruplarla iyonik etkileşim ayrıca, moleküller arası elektrostatik etkileşimleri azaltabilir ve böylece protein agregasyonunu ve çözünmezliğini önleyebilir veya azaltabilir.

İyonik türler, proteinler üzerindeki etkileri bakımından önemli ölçüde farklılık gösterir. Buluşa uygun olarak farmasötik bileşimlerin formüle edilmesinde kullanılabilen, iyonlar ve iyonların proteinler üzerindeki etkileri bakımından birkaç kategorik sıralama geliştirilmiştir. İyonik ve polar noniyonik çözücülerini çözeltideki proteinlerin konformasyonel stabilitesi üzerindeki etkileri bakımından sıralayan Hofmeister serisi bunlara bir örnektir. Stabilize edici çözücüler "kosmotropik" olarak adlandırılır. Destabilize edici çözücüler "katropik" olarak adlandırılır. Kosmotroplar genellikle, proteinlerin çözeltiden çökeltilmesi ("salting-out") için yüksek konsantrasyonlarda (örneğin >1 molar amonyum sülfat)

kullanılabilir. Kaotropolar yaygın olarak proteinlerin denatüre edilmesi ve/veya çözündürülmesi için kullanılır. İyonların "salt-in" ve "salt-out"a göre nispi etkinliğini, Hofmeister serisindeki pozisyonlarını tanımlar.

5 Mevcut buluşun çeşitli uygulamalarına uygun olarak OSMR antijeni bağlayıcı protein formülasyonlarında serbest amino asitler, hacim arttırıcı maddeler, stabilize edici maddeler ve antioksidanlar olarak ve aynı zamanda diğer standart kullanımlarda kullanılabilir. Bir formülasyonda proteinlerin stabilize edilmesi için lizin, prolin, serin ve alanin kullanılır. Glisin, doğru kek yapısını ve özelliklerini sağlamak için liyofilizasyonda yararlıdır. Arginin, hem sıvı hem de liyofilize formülasyonlarda protein agregasyonunu inhibe etmek için yararlı olabilir. Metionin, bir antioksidan olarak yararlıdır.

15 Polioller arasında örneğin monnitrol, sükroz ve sorbiyol gibi şekerler ve örneğin gliserol ve propilen glikol gibi polihidrik alkoller ve burada tartışmak amacıyla polietilen glikol (PEG) ve ilgili maddeler bulunur. Polioller, kosmotropiktir. Proteinlerin fiziksel ve kimyasal bozunma proseslerinden korunması için sıvı ve liyofilize edilmiş formülasyonlarda yararlı stabilize edici maddelerdir. Polioller ayrıca formülasyonların tonisitesini ayarlamak için yararlıdır.

25 Mevcut buluşun seçilmiş uygulamalarında yararlı polioller arasında liyofilize formülasyonlarda kekin yapısal stabilitesini sağlamak için kullanılan mannitoldür. Kekin yapısal stabilitesini sağlar. Genel olarak bir liyoprotektan, örneğin sukroz ile kullanılır. Sorbitol ve sükroz, tonisiteyi ayarlamaya yönelik olarak tercih edilen maddeler arasındadır ve nakliye sırasında veya imalat prosesi boyunca yığınların hazırlanması sırasında donma-çözülme stresleri karşısında korumak üzere stabilizör olarak kullanılır. Glükoz ve laktoz gibi (serbest aldehit veya keton grupları içeren) indirgeyici şekerler, yüzey lizin ve arginin kalıntılarından glikozile edilebilir. Bu nedenle bunlar genel olarak buluşa uygun olarak kullanılmaya yönelik

tercih edilen polioller arasında değildir. Ek olarak asidik koşullar altında fruktoz ve glikoza hidrolize edilebilen ve sonuç olarak glikasyona yol açan sükroz gibi reaktif türler oluşturan şekerler, bu bağlamda buluşun tercih edilen poliollerini

5 arasında değildir. PEG, proteinleri stabilize etmek için yararlıdır ve bu bağlamda mevcut buluşta bir kriyoprotektan olarak kullanılabilir.

OSMR antijeni bağlayıcı protein formülasyonlarının uygulamaları ayrıca sürfaktanları içerir. Protein molekülleri, yüzeylerde

10 adsorpsiyona ve hava-sıvı, katı-sıvı ve sıvı-sıvı arayüzlerinde denatürasyona ve sonuç olarak agregasyona karşı duyarlı olabilir. Bu etkiler genel olarak protein konsantrasyonu ile ters orantılı olarak ölçeklenir. Bu zararlı etkileşimler genellikle protein konsantrasyonu ile ters orantılı olarak

15 ölçeklenir ve tipik olarak bir ürünün nakliyesi ve işlenmesi sırasında oluşanlar gibi fiziksel çalkalanma ile şiddetlenir.

Sürfaktanlar, yüzey adsorpsiyonunu önlemek, en az indirmek veya azaltmak için kullanılır. Mevcut buluşta bu bağlamda yararlı sürfaktanlar arasında polisorbata 20, polisorbata 80, sorbitan

20 polietoksilatların diğer yağlı asit esterleri ve poloksamer 188 bulunur.

Sürfaktanlar ayrıca, protein konformasyonel stabilitesini kontrol etmek için yaygın olarak kullanılır. Bu bağlamda sürfaktanların kullanımı, tipik olarak herhangi bir sürfaktan,

25 bazı proteinleri stabilize ederken diğerlerini destabilize ettiği için proteine özgüdür.

Polisorbatlar, oksidatif bozunmaya duyarlıdır ve temin edilirken sıklıkla protein kalıntısı olan zincirlerinin, özellikle metioninin oksidasyonuna neden olan peroksitlerden yeterli

30 miktarda içerir. Sonuç olarak, polisorbata dikkatlice kullanılmalı ve kullanıldıklarında etkili en düşük konsantrasyonlarında kullanılmalıdır. Bu bağlamda polisorbata, eksipiyanların etkili en düşük konsantrasyonlarında kullanılması gerektiği şeklindeki genel

35 kuralına örnektir.

OSMR antijeni bağlayıcı protein formülasyonların uygulamaları ayrıca bir veya daha fazla antioksidan içerir. Proteinlerin zararlı oksidasyonu, ortamdaki oksijen ve sıcaklık seviyelerini uygun düzeylerde tutarak ve ışığa maruz bırakmaktan kaçınarak bir dereceye kadar önlenebilir. Antioksidan ekstreptanlar, proteinlerin oksidatif bozunmasını önlemek için de kullanılabilir. Bu bağlamda yararlı antioksidanlar arasında indirgeyici maddeler, oksijen/serbest radikal tutucuları ve şelatlayıcı maddeler bulunur. Buluşa uygun olarak terapötik protein formülasyonlarında kullanılmaya yönelik antioksidanlar tercihen suda çözünebilir ve aktivitelerini bir ürünün raf ömrü boyunca muhafaza eder. EDTA, bu bağlamda buluşa uygun olarak tercih edilen bir antioksidandır.

Antioksidanlar proteinlere zarar verebilir. Örneğin, özellikle glutatyon gibi indirgeyici maddeler, moleküller arası disülfid bağlantılarını bozabilir. Dolayısıyla mevcut buluşta kullanılmaya yönelik antioksidanlar, diğer şeylerin yanı sıra, formülasyonda proteinlere zarar verme ihtimallerini ortadan kaldırması veya yeterli ölçüde azaltması için seçilir.

Mevcut buluşa uygun formülasyonlar, protein kofaktörleri olan ve örneğin belirli insülin süspansiyonları oluşturmak için gerekli çinko gibi protein koordinasyon kompleksleri oluşturmak için gerekli metal iyonları içerebilir. Metal iyonlar ayrıca, proteinleri bozan bazı süreçleri inhibe edebilir. Ancak metal iyonlar ayrıca, proteinleri bozan fiziksel ve kimyasal süreçleri katalize eder.

Aspartik asidin izoaspartik aside izomerizasyonunun inhibe edilmesi için magnezyum iyonları (10-120 mM) kullanılabilir. Ca^{+2} iyonları (100 mM'ye kadar) insan deoksiribonükleazının stabilitesini artırabilir. Ancak Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} , rhDNaz'ı destabilize edebilir. Benzer şekilde Faktör VIII, Ca^{+2} ve Sr^{+2} tarafından stabilize edilebilirken Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Fe^{+2} tarafından destabilize edilebilir ve agregasyonu, Al^{+3} iyonları tarafından artırılabilir.

OSMR antijeni bağlayıcı protein formülasyonların uygulamaları

ayrıca bir veya daha fazla koruyucu içerir. Aynı kapta birden fazla ekstraksiyon içeren çok dozlu parenteral formülasyonlar geliştirilirken koruyucular gerekir. Koruyucuların birinci fonksiyonu, mikrobiyal büyümeyi inhibe etmek ve ilaç ürününün raf ömrü veya kullanım süresi boyunca ürün sterilliğini sağlamaktır. Yaygın olarak kullanılan koruyucu maddeler arasında benzil alkol, fenol ve m-krezol bulunur. Koruyucuların küçük molekülü parenteraller ile uzun zamandır kullanılmasına rağmen, koruyucular içeren protein formülasyonlarının geliştirilmesi zorlayıcı olabilir. Koruyucular neredeyse proteinler üzerinde destabilize edici bir etkiye (agregasyon) sahiptir ve bu, çok dozlu protein formülasyonlarında kullanımlarını sınırlandırmada önemli bir faktör haline gelmiştir. Bugüne kadar çoğu protein ilacı, sadece tek kullanıma yönelik formüle edilmiştir. Ancak çok dozlu formülasyonlar mümkün olduğunda, hasta rahatlığı gibi ilave bir avantaja ve artan pazarlanabilirliğe sahiptir. Korunmuş formülasyonların geliştirilmesinin daha uygun, çok kullanımlı enjeksiyon kalem sunumlarının ticarileştirilmesine yol açtığı insan büyüme hormonu (hGH) bunlara iyi bir örnektir. Korunmuş hGH içeren bu şekilde en az dört kalem cihazı piyasada mevcuttur. Norditropin (sıvı, Novo Nordisk), Nutropin AQ (sıvı, Genentech) & Genotropin (liyofilize--çift bölmeli kartuş, Pharmacia & Upjohn) fenol içerirken Somatropin (Eli Lilly), m-krezol ile formüle edilir.

Korunmuş dozaj formlarının formülasyonu ve geliştirilmesi sırasında çeşitli yönlerin dikkate alınması gerekir. İlaç ürünündeki etkili koruyucu konsantrasyon optimize edilmelidir. Bu, belirli bir koruyucu maddenin protein stabilitesinden ödün vermeden anti-mikrobiyal etkinlik sağlayan konsantrasyon aralıklarına sahip dozaj formunda test edilebilir.

Beklendiği üzere koruyucular içeren sıvı formülasyonların geliştirilmesi, liyofilize formülasyonlardan daha zorlayıcıdır. Dondurularak kurutulmuş ürünler, koruyucu olmaksızın liyofilize edilebilir ve kullanım sırasında bir seyreltici içeren bir koruyucu ile yeniden oluşturulabilir. Bu, bir koruyucu maddenin

bir protein ile temas halinde olduğu zamanı kısaltır ve böylece ilgili stabilite risklerini önemli ölçüde azalır. Sıvı formülasyonlar söz konusu olduğunda, ürünün bütün raf ömrü boyunca (yaklaşık 18 ila 24 ay) koruyucu etkinliği ve stabilitesi korunmalıdır. Dikkat edilmesi gerek önemli bir nokta ise aktif ilaç ve tüm eksipiyan bileşenlerini içeren son formülasyonda koruyucu etkinliğin gösterilmesi gerektiğidir.

OSMR antijeni bağlayıcı protein formülasyonları genel olarak, diğer şeylerin yanı sıra biyoyararlanım ve süreklilik aralıkları dahilinde spesifik uygulama yolları ve yöntemleri için, spesifik uygulama dozajları ve uygulama sıklıkları için, spesifik hastaların spesifik tedavileri için tasarlanacaktır. Bu nedenle formülasyonlar, buluşa uygun olarak, bunlarla sınırlı olmamak üzere oral, aural, optalmikal, rektal ve vajinal yollar dahil olmak üzere uygun herhangi bir yolla ve intravenöz ve intra-arteriyel enjeksiyon, intramüsküler enjeksiyon ve sübkütanöz enjeksiyon dahil olmak üzere parenteral yolla uygulanacak aktarıma yönelik tasarlanabilir.

Farmasötik bileşim formüle edildikten sonra, bir çözelti, süspansiyon, jel, emülsiyon, katı, kristal şeklinde veya dehidre veya liyofilize bir toz olarak steril şişelerde saklanabilir. Bu formülasyonlar, kullanıma hazır bir formda veya uygulama öncesi sulandırılan bir formda (örneğin liyofilize) saklanabilir. Mevcut buluş ayrıca, tek dozlu bir uygulama birimin oluşturulmasına yönelik kitler sağlar. Mevcut buluşun kitlerinin her biri, kurutulmuş bir proteine sahip bir birinci kap ve sulu bir formülasyona sahip bir ikinci kap içerebilir. Buluşun belirli uygulamalarında, tek veya çok bölmeli önceden doldurulmuş şırıngaları (örneğin sıvı şırıngaları ve liyofilize şırıngalar) içeren kitler sağlanır.

Kullanılacak bir OSMR antijeni bağlayıcı protein içeren farmasötik bileşimin terapötik olarak etkili bir miktarı, örneğin terapötik bağlam ve amaçlara bağlı olacaktır. Teknikte yetkin bir kişi, tedavi için uygun dozaj düzeylerinin, molekül uygulandıktan sonra kısmen OSMR antijeni bağlayıcı proteinin

kullanıldığı endikasyona, uygulama yoluna ve/veya hastanın büyüklüğüne (vücut ağırlığı, vücut yüzeyi veya organ büyüklüğü) veya durumuna (yaş ve genel sağlık durumu) göre değişmesini takdir edecektir. Belirli uygulamalarda klinisyen, optimal terapötik etkiyi elde etmek için dozajı titre edebilir ve uygulama yolunu modifiye edebilir. Tipik bir dozaj, yukarıda bahsedilen faktörlere bağlı olarak yaklaşık 0,1 µg/kg ile 30 mg/kg veya daha fazlası arasında değişebilir. Spesifik uygulamalarda dozaj, yaklaşık 1,0 µg/kg ile yaklaşık 20 mg/kg arasında, tercihe göre 10 µg/kg ile yaklaşık 10 mg/kg arasında veya 100 µg/kg ile yaklaşık 5 mg/kg arasında değişebilir.

Bir OSMR antijeni bağlayıcı proteinin terapötik olarak etkili bir miktarı tercihen, hastalık semptomlarının şiddetinde bir azalmaya, hastalığın semptomsuz dönemlerin sıklığı veya süresinde bir artışa veya hastalıktan kaynaklanan bozukluğun veya sakatlığın önlenmesine neden olur.

Farmasötik bileşimler bir tıbbi cihaz kullanılarak uygulanabilir. Farmasötik bileşimlerin uygulanmasına yönelik tıbbi cihazların örnekleri, U.S. Patent No. 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447, 233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851 ve 5,399,163 yayınlarında tarif edilir.

OSMR ile İlişkili Bir Hastalığın veya Bozukluğun Teşhis Edilmesine veya Tedavi Edilmesine Yönelik Yöntemler

Buluşun OSMR antijeni bağlayıcı proteinleri, biyolojik bir numunede OSMR'nin saptanması için özellikle yararlıdır. Belirli uygulamalarda bir hastadan elde edilen biyolojik bir numune, bir OSMR antijeni bağlayıcı protein ile temas ettirilir. OSMR antijeni bağlayıcı proteinin OSMR'ye bağlanması, numunede OSMR'nin varlığı veya nispi miktarını belirlemek için saptanır. Bu yöntemler, bir OSMR antijeni bağlayıcı protein ile tedavi edilmeye uygun hastaların teşhis edilmesi veya belirlenmesinde yararlıdır.

Belirli uygulamalarda buluşun bir OSMR antijeni bağlayıcı proteini, bir otoimmün bozukluk, inflamatuvar bozukluk veya hücre

dışı matris birikmesi veya yeniden modellenmesi ile ilişkili hastalığın teşhis edilmesi, saptanması veya tedavi edilmesi için kullanılır.

Bu bozuklukların tedavisinde OSMR antiijeni bağlayıcı protein, immün sisteminin OSMR ifade eden hücrelerini tahrip etmek üzere hedefleyebilir ve/veya OSMR'nin OSM ve/veya IL-31 ile etkileşimini bloke edebilir.

OSMR aracılı sinyalleme ile ilişkili hastalıklar veya bozukluklar, burada açıklanan bir veya daha fazla OSMR antiijeni bağlayıcı protein ile tedavi edilmeye özellikle uygundur. Söz

konusu bozukluklar arasında, bunlarla sınırlı kalmamak zere, inflamasyon, ağrı, prurit, prurigo nodularis, dermatit, astım, otoimmün hastalığı, paranoplastik otoimmün hastalıkları, kıkırdak inflamasyonu, fibroz (pulmoner fibroz ve deri fibrozu

dahil olmak üzere ancak bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla), fibrotik hastalık, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (COPD), interstitial pnömonit, anormal kolajen birikmesi, sistemik kütanöz amiyeloitoz, primer kütanöz amiloidoz, Behçet hastalığı, nazal polipozis, karaciğer sirozu, kıkırdak yıkımı, kemik

bozunması, juvenil artrit, romatoid artrit, jarthritis, juvenil romatoid artrit, pausiartiküler juvenil romatoid artrit, poliartiküler juvenil romatoid artrit, sistemik başlangıçlı juvenil romatoid artrit, juvenil ankilozan spondilit, juvenil enteropatik artrit, juvenil reaktif artrit, juvenil Reter

sendromu, SEA sendromu (Seronegativite, Entesopati, Artropati Sendrom), juvenil dermatomiyozit, juvenil psoriatik artrit, juvenil skleroderma, juvenil sistemik lupus eritematoz, juvenil vaskülit, pausiartiküler romatoid artrit, poliartiküler romatoid artrit, sistemik başlangıçlı romatoid artrit, ankilozan

spondilit, enteropatik artrit, reaktif artrit, Reter sendromu, SEA sendromu (Seronegativite, Entesopati, Artropati sendromu), dermatomiyozit, psoriatik artrit, skleroderma, skleroderma ile ilişkili interstisyel akciğer hastalığı, vaskülit, miyolit, polimiyolit, dermatomyolit, poliarteritis nodosa, Wegener

granülomatözisi, arterit, ploymiyalji romatika, sarkoidoz,

skleroderma, skleroz, birincil biliyer skleroz, sklerozan kolanjit, Sjogren sendromu, psoriyazis, plak psoriyazis, guttat psoriyazis, invers psoriyazis, püstüler psoriyazis, eritrodermik psoriyazis, dermatit, atopik dermatit, ateroskleroz, lupus, Still hastalığı, Sistemik lupus Eritematoz (SLE), Myastenia gravis, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), Crohn hastalığı, ülseratif kolit, çölyak hastalığı, multipl skleroz (MS), astım, COPD, rinosinüzit, polipli rinosinüzit, eozinofilik esofagit, eozinofilik bronşit, bronşit, Guillain-Barre hastalığı, Tip I diabetes mellitus, tiroidit (örneğin Graves hastalığı), Addison hastalığı, Reynaud fenomeni, otoimmün hepatit, GVHD, transplantasyon rejeksiyonu, böbrek hasarı, kardiyovasküler hastalık, enfeksiyon, sepsis, HIV enfeksiyonu, travma, böbrek alogreft nefropati, IgA nefropatisi, diyabetik nefropati, diyabetik retinopati, maküler dejenerasyon, biliyer atrezi, konjestif kalp yetmezliği, ateroskleroz, restenoz, radyasyon kaynaklı fibroz, kemoterapi kaynaklı fibroz, yanıklar, cerrahi travma, glomerüloskleroz ve benzerleri bulunur.

Tercih edilen uygulamalarda otoimmün bozukluk, inflamatuvar bozukluk veya hücre dışı matris birikmesi veya yeniden modellemesi ile ilişkili bir bozukluk, fibroz, kıkırdak yıkımı, artrit, romatoid artrit, skleroderma, skleroderma ile ilişkili interstisyel akciğer hastalığı, idyopatik pulmoner fibroz, siroz, psoriyazis, atopik dermatit, sistemik kutanöz amiyeloitoz, primer kutanöz amiloidoz, inflamasyon, pruritik inflamasyon, prurigo nodularis ve ağrıdır.

Belirli uygulamalarda mevcut buluşun bir OSMR antijeni bağlayıcı proteini, bir kanseri veya tümörijenik bozukluğu teşhis etmek, saptamak veya tedavi etmek için kullanılır. Bir kanserin veya tümörijenik bozukluğun tedavisinde OSMR antijeni bağlayıcı protein, OSMR ifade eden hücreleri tahrip etmek üzere hedefleyebilir ve/veya OSMR'nin ve/veya IL-31'in OSMR ile etkileşimini bloke edebilir ve böylece OSMR aracılı sinyallemeyi azaltabilir. OSM ve/veya IL-31 aracılı sinyallemeyi bloke eden OSMR antijeni bağlayıcı proteinlerin, kanser hastalarında

geliştirilmiş sağkalımın desteklenmesinde yararlı olabileceği düşünülür. Bir OSMR antijeni bağlayıcı protein ile teşhis edilebilen, saptanabilen veya tedavi edilebilen kanser veya tümörjenik bozukluklar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere genellikle katı tümörler, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, endometriyal kanser, böbrek kanseri, özofagus kanseri, pankreas kanseri, yassı hücreli karsinoma, uveal melanom, servikal kanser, kolorektal kanser, mesane, beyin, pankreatik, kafa, boyun, karaciğer, lösemi, lenfoma ve Hodgkin hastalığı, multipl miyelom, melanom, mide kanseri, astrositik kanser, mide, ve pulmoner adenokarsinom bulunur.

Antijen bağlayıcı proteinler, tümör büyümesini, ilerlemesini ve/veya metastazını inhibe etmek için kullanılabilir. Bu inhibisyon, çeşitli yöntemler kullanılarak izlenebilir. Örneğin inhibisyon, azalan tümör büyüklüğüne ve/veya bir tümör içindeki metabolik aktivitede bir azalmaya neden olabilir. Bu parametrelerin her ikisi de örneğin MRI veya PET taramaları ile ölçülebilir. İnhibisyon ayrıca, nekroz düzeyini, tümör hücre ölümünü ve tümör içindeki vaskülarite düzeyini belirlemek için biyopsi yoluyla izlenebilir. Metastazın derecesi, bilinen yöntemler kullanılarak izlenebilir.

Burada verilen tüm örneklerin veya örnekleyici dil (örneğin, "gibi") kullanımının, sadece buluşun uygulamalarını daha iyi aydınlatmak amaçlı olması ve aksi iddia edilmedikçe buluşun kapsamında bir sınırlama getirmemesi amaçlanmıştır. Tarifnamede yer alan herhangi bir dil kullanımının, herhangi bir talep edilmemiş unsurun buluşun uygulanması için zorunlu olduğu şeklinde yorumlanmamalıdır.

ÖRNEKLER

Hem gerçek hem de geleceğe yönelik olarak verilen aşağıdaki örnekler, mevcut buluşun spesifik uygulamalarını veya özelliklerini tasvir etme amacıyla sağlanmıştır ve buluşun kapsamını sınırlandırması amaçlanmamıştır.

ÖRNEK 1: XENOMOUSE® Platformu Kullanılarak Anti-OSMR

Antikorlarının Üretilmesi

- İnsan OSMR'ye karşı yönlendirilmiş tamamen insan antikorlar, (United States Patent No. 6,114,598; 6,162,963; 6,833,268; 7,049,426; 7,064,244 ve Green ve diğ., *Nature Genetics* 7:13-21, 1994; Mendez ve diğ., *Nature Genetics* 15:146-56; 1997; Green ve diğ., *J. Ex. Med.* 188:483-95, 1998 ve Kellermann ve diğ., *Current Opinion in Biotechnology*, 13:593-7, 2002 yayınlarında tarif edildiği üzere) XENOMOUSE® teknolojisi kullanılarak oluşturulmuştur.
- OSMR'ye yönelik antikorlar oluşturmak için XENOMOUSE® hayvanlarının iki farklı suşu, örneğin XMG2-KL ve XMG4-KL fareleri, (Amgen, Seattle, WA tarafından hazırlanan) insan OSMR-Fc çözünebilir proteinleri ile bağışıklanmıştır. Uygun bir miktarda immünojen (on µg/fare çözülebilir insan OSMR-Fc proteini), 3 Aralık 1996'da dosyalanmış U.S. Patenti Başvuru Seri No. 08/759,620 ve 11 Haziran 1998'da yayınlanmış Uluslararası Patent Başvurusu No. WO 98/24893 ve 21 Aralık 2000'de yayınlanmış WO 00/76310 yayınlarında tarif edilen yöntemlere göre XENOMOUSE® hayvanlarının ilk immünizasyonu için kullanılmıştır. İlk immünizasyonun ardından immünojen sonraki arttırıcı immünizasyonları (beş µg/fare çözünür insan OSMR-Fc proteini), bir zaman çizelgesine göre ve farelerde uygun bir titrede anti-OSMR antikorunun indüklenmesi için gerekli bir sürede uygulanmıştır.
- İlk enjeksiyondan yaklaşık dört hafta sonra serumlar toplanmış ve spesifik titreler ELISA ile belirlenmiştir. XENOMOUSE® hayvanlarını titrelemek için kullanılan protokol şu şekildedir: Costar 3368 ortamını bağlayıcı plakalar, neutravadin @ 8 µg/mL (50 µL/kuyucuk) ile kaplanmış ve 4°C'de 1XPBS/%0,05 azit içinde gece boyunca inkübe edilmiştir. Plakalar, RO suyu ile TiterTek 3 devirli yıkama kullanılarak yıkanmıştır. Plakalar, 250 µL 1XPBS/%1 süt kullanılarak bloke edilmiştir ve oda sıcaklığında en az 30 dakika inkübe edilmiştir. Blok, RO suyu ile TiterTek 3 döngülü yıkaması kullanılarak yıkanmıştır. Daha sonra, 2 µg/mL'de 1XPBS/%1 süt/10mM Ca²⁺ (test seyrelticisi) içinde 50

µl/kuyucuk biyotinlenmiş huOSMR-FNFH (Amgen, Seattle, WA tarafından hazırlanmıştır) yakalanmıştır ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra RO suyu ile TiterTek 3 devirli yıkama kullanılarak yıkanmıştır. Primer antikor için serumlar, 5 1:100 oranından çiftler halinde 1:3 oranına titre edilmiştir. Bu işlem, 50 µL/kuyucuk test seyrelticisi içinde gerçekleştirilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra RO suyu ile TiterTek 3 devirli yıkama kullanılarak yıkanmıştır. Sekonder antikor, 50 µL/kuyucuk'ta test seyrelticisi içinde keçi anti 10 İnsan IgG Fc HRP @ 400 ng/mL'dir. Bu antikor oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra RO suyu ile TiterTek 3 devirli yıkama kullanılarak yıkanmış ve kağıt havlular üzerinde nazikçe kurutulmuştur. Substrat için tek adımlı TMB çözeltisi (Neogen, Lexington, Kentucky) kullanılmış (50 µL/kuyucuk) ve substrat, 30 15 dakika boyunca oda sıcaklığında gelişmeye bırakılmıştır. Uygun titreler sergileyen hayvanlar tespit edilmiştir. Beş XMG2KL hayvanının, OSMR'ye karşı spesifik bir IgG immün yanıtı verdiği tespit edilmiştir. Bu hayvanlardan dalaklar ve drene olan lenf nodları hasat edilmiş ve hibridom üretimi için bir 20 araya getirilmiştir. Spesifik immün yanıtları veren beş XMG4KL hayvanı, benzer şekilde hasat edilmiş ve ayrı bir füzyon taraması olarak ilerletilmiştir. İmmün hayvanlardan elde edilen zenginleştirilmiş B hücreleri, standart teknikler kullanılarak hibridomlar oluşturmak için (Kohler ve diğ., *Nature* 256, 495-7, 25 1975) salgılanmayan miyelom P3 x 63Ag8.653 hücrelerine ((Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu CRL-1580; Kearney ve diğ., *J. Immunol.* 123: 1548-50, 1979) kaynaştırılmıştır. Hibridomlar daha sonra yüksek yoğunlukta (kuyucuk başına çoklu farklı hibridom klonları) 96 kuyucuklu doku kültür plakalarına 30 yerleştirilmiştir ve dört hafta boyunca büyütülmüştür. Hibridom hattı süpernatantları, geçici olarak transfekte edilmiş 293T hücreleri üzerinde ifade edilen tam uzunluklu insan ve sinomolgus OSMR'ye bağlanma bakımından Florometrik Mikrohacimli Test Teknolojisi (FMAT: Fluorometric Microvolume Assay 35 Technology) (Applied Biosystems, Foster City, CA) ile

5 taranmıştır. Kısaca, 384 kuyucuklu FMAT plakalarında, 3.000 OSMR
293T ile transfekte edilmiş hücre ve 15.000 parental 293T
hücreden oluşan 40 µl'lik bir karışım, 15 µL'lik hibridom
süpernatant ve 10 µL'lik anti-insan hafif zincir
10 (hukappa/hulambda) Alexa647 (Invitrogen, Carlsbad, CA) etiketli
sekonder antikoru (1,0 µg/mL final konsantrasyonu) ile
birleştirilmiştir. Plakalar daha sonra oda sıcaklığında üç saat
inkübe edilmiş ve FMAT okuyucu kullanılarak flüoresan
okunmuştur. Bu taramalarda insan ve sinomolgus OSMR'ye bağlanan
885 hibridom hattı tespit edilmiştir.

ÖRNEK 2: İnsan OSMR Bloğu Testleri

OSMR antikorlarının insan OSMR aracılığıyla sinyallemeyle bloke
etme kabiliyeti, ligand olarak insan onkostatin M (OSM) veya
insan interlökin 31'in (IL-31) kullanıldığı iki test
15 kullanılarak belirlenmiştir. Testler birlikte, antikorların OSM
ve/veya IL-31'in bağlanması yoluyla tetiklenen OSMR'nin
sinyallemesini inhibe edip edemeyeceğini belirlemek için
kullanılmıştır.

İlk taramada antikorlar, OSMR aracılığıyla OSM'nin sinyalini
20 bloke etme kabiliyetleri bakımından değerlendirilmiştir. Primer
normal insan akciğer fibroblastlarının OSM ile uyarılması,
STAT3'ün fosforilasyonunu ve bunu takiben çekirdeğe
translokasyonu indükler. Hücreler, Costar 384 kuyucuklu
plakalarda kuyucuk başına 3000 hücrede ekilmiş ve gece boyunca
25 yapışmaya bırakılmıştır. Hücreler, antikor süpernatantları ile
yirmi dakika boyunca ön işleme tabi tutulmuştur ve daha sonra 80
pM insan OSM ile 30 dakika boyunca uyarılmıştır. Hücreler, PBS
içinde 3 kere yıkanmış, %3,5 formaldehit çözeltisi ile
sabitlenmiş, yıkanmış (PBST içinde 3 kere) ve %0,5 Triton X-100
30 çözeltisi ile geçirgen hale getirilmiştir. Hücreler daha sonra
bir saat boyunca bir anti-fosfoSTAT3 antikoru ile boyanmış,
yıkanmış ve bir AlexaFluor (tümü Cellomics'e ait HitKit içinde
bulunur) ile konjüge edilmiş antikor ile boyanmıştır. Plakalar,
bir Nükleer Yoğunluk değeri ve bir Sitoplazmik Yoğunluk değeri
35 oluşturmak için Cellomics tescilli algoritmasının kullanılarak

ArrayScan cihazında okunmuştur. Sonuçlar, söz konusu iki değerin arasında fark olarak bildirilmiştir ve ayrıca en üst düzeyde uyarılmış hücreler ve ortam ile içeren kontrol verisine normalleştirilmiştir (POC).

5 İkinci testte antikorlar, insan IL-31RA4 ve OSMR'yi aşırı ifade etmiş stabil bir hücre hattında OSMR yoluyla IL-31'in proliferatif bir sinyali inhibe etme kabiliyetleri bakımından test edilmiştir. BaF3 hücreleri, iki plazmid ile stabil bir şekilde transfekte edilmiştir: pcDNA3.1 + huOSMRb (NeoR) ve
10 pcDNA3.1 + huIL31RA4 (ZeoR). Murin IL-3'ün yokluğunda, bu hücre hattı, yalnızca insan IL-31'e yanıt olarak çoğalabilir ve bu nedenle anti-OSMR antikorlarının bloke etme kabiliyetini değerlendirmek için spesifik olarak kullanılabilir. BaF3 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 20.000 hücre
15 yoğunluğunda yerleştirilmiştir. Antikorlar ve ligand (huIL-31, Peprotech), 100 µL'lik bir son hacimde kuyucuklara ilave edilmiştir ve plakalar, %5 CO2, 37C nemlendirilmiş bölmede 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 20 µL Alamar Blue ilave edilmiş ve plakalar yeniden
20 inkübatöre koyulmuştur. Plakalar, Alamar Blue ilavesinin sonrasında bir Molecular Devices Vmax Plate reader (570-600 nm) üzerinde çeşitli zaman noktalarında okunmuştur.

Söz konusu iki teste ait sonuçlar aşağıda yer alan Tablo 4'te sunulmuştur. 3000'den fazla hibridom süpernatantı bu iki testte
25 bloklama kabiliyeti bakımından taranmıştır; en iyi 200 bloklayıcı, 4 noktalı bir titrasyonda tekrar test edilmiştir ve bunlardan 14'ü rekombinant protein üretimi ve başka testler için seçilmiştir. Örnek niteliğindeki üç antikor (antikor 1-3) için IC50 değerleri her iki deney için de gösterilmiştir. Bazı
30 antikorlar, OSM ile indüklenen STAT3 translokasyonunu IL-31 ile indüklenen çoğalmayı inhibe ettiğinden daha fazla inhibe etmiştir ve bazı antikorlarda da tam tersi görülmüştür. Ancak üç antikor da, OSM ve IL-31 aracılı sinyalleşmesine karşı güçlü inhibitörlerdir.

35 **Tablo 4**

IC50	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	157 pM	252 pM	1,35 nM
IL-31	35,2 pM	27,6 pM	780 pM

ÖRNEK 3: Sinomolqus OSMR Bloğu Testleri

OSMR antikorunun sinomolqus OSMR aracılığıyla sinyallemeyi bloke etme kabiliyeti, ligand olarak insan OSM veya insan IL-31 kullanıldığı iki test kullanılarak araştırılmıştır.

İlk taramada antikorlar, bir primer bir böbrek epitelyal hücre hattı kullanılarak sinomolqus OSMR aracılığıyla OSM'nin sinyalini bloke etme kabiliyetleri bakımından değerlendirilmiştir. Bu hücrelerin sinomolqus (sino) OSM ile uyarılması, STAT3'ün fosforilasyonunu ve bunu takiben çekirdeğe translokasyonu indükler. Hücreler, Costar 384 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına 3000 hücrede ekilmiş ve gece boyunca yapışmaya bırakılmıştır. Hücreler, antikor süpernatantları ile yirmi dakika boyunca ön işleme tabi tutulmuştur ve daha sonra 80 pM sino OSM ile 30 dakika boyunca uyarılmıştır. Hücreler, PBS içinde 3 kere yıkanmış, %3,5 formaldehit çözeltisi ile sabitlenmiş, yıkanmış (PBST içinde 3 kere) ve %0,5 Triton X-100 çözeltisi ile geçirgen hale getirilmiştir. Hücreler daha sonra bir saat boyunca bir anti-fosfoSTAT3 antikor ile boyanmış, yıkanmış ve bir AlexaFluor (tümü Cellomics'e ait HitKit içinde bulunur) ile konjüge edilmiş antikor ile boyanmıştır. Plakalar, bir Nükleer Yoğunluk değeri ve bir Sitoplazmik Yoğunluk değeri oluşturmak için Cellomics tescilli algoritmasının kullanılarak ArrayScan cihazında okunmuştur. Sonuçlar, söz konusu iki değerin arasında fark olarak bildirilmiştir ve ayrıca en üst düzeyde uyarılmış hücreler ve ortam ile içeren kontrol verisine normalleştirilmiştir (POC).

İkinci testte antikorlar, sino IL-3 IRA ve OSMR'yi aşırı ifade etmiş stabil bir hücre hattında sinomolqus OSMR yoluyla IL-31'in

proliferatif bir sinyali inhibe etme kabiliyetleri bakımından test edilmiştir. Örnek 2'ye benzer şekilde BaF3 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 20.000 hücre yoğunluğunda yerleştirilmiştir. Antikorlar ve ligand (sinomolgus IL-31, kurum içi, Amgen, Seattle, WA), 100 µL'lik bir son hacimde kuyucuklara ilave edilmiştir ve plakalar, %5 CO2, 37C nemlendirilmiş bölmede 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 20 µL Alamar Blue ilave edilmiş ve plakalar yeniden inkübatöre koyulmuştur. Plakalar, Alamar Blue ilavesinin sonrasında Molecular Devices Vmax Plate reader (570-600 nm) üzerinde çeşitli zaman noktalarında okunmuştur.

Söz konusu iki teste ait sonuçlar, iki test için de gösterilen her bir antikor için IC50 değeri ile birlikte aşağıda yer alan Tablo 5'te sunulmuştur. Sonuçlar, antikor 1, 2 ve 3'ün her birinin, OSM ve IL-31 aracılı sinyallemesine karşı güçlü inhibitörler olduğunu doğrular.

Tablo 5

IC50	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	1,26 nM	518 pM	1,24 nM
IL-31	225 pM	29,3 pM	6,87 nM

ÖRNEK 4: Anti-OSMR Antikorlarının Epitop Gruplaması (Binning)

Anti-OSMR xenomouse antikorlarının epitoplarını karakterize etmek üzere antikor rekabet çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Birbiriyle rekabet eden antikorların hedef üzerinde aynı alana bağlandıkları kabul edilir. Bu deneylerde OSMR veya alakasız antikorlar, bir uygulama antikoruna (biyotinlenmiş monovalent fare anti-insan IgG Fc antikor) önceden bağlanmış streptavidin kaplı Luminex boncukları üzerinde yakalanmıştır. OSMR antijeni veya tamponu (antijensiz) kuyucuklara ilave edilmiştir ve bir prob antikoru her bir kuyucuğa eklenmiş ve bir PE etiketli monovalent fare anti-insan IgG Fc antikoru ile tespit

edilmiştir. Her kuyucuğun ortalama flüoresan yoğunluğu ölçülmüştür. Tam referans için bkz. Jia ve diğ., *J. Immunol. Methods* 288: 91-8, 2004. Belirli bir kuyucukta flüoresansın tespit edilmesi, prob antikorunun diğer OSMR antikorunun varlığında bile OSMR'ye bağlanabildiğini ve bunların ayrı epitoplara bağlandıklarını göstermiştir. Aşağıda Tablo 6'da gösterildiği gibi en az üç kutu bulunmuştur.

Tablo 6

Kutu 1	Ab4
Kutu 2	Ab1, Ab2, Ab3, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12 ve Ab13
Kutu 3	Ab14

ÖRNEK 5: Anti-OSMR Antikorlarının Afinite Tayini

Anti-OSMR antikorlarının afiniteleri belirlenmiştir. Antikorlar 1-3'ün (Ab 1-3) insan OSMR ile etkileşimini araştırmak için kinetik hız sabitleri belirlenmiştir.

Biyosensör analizi, 25°C'de bir HBS-EP+ (1X) tampon sisteminde (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,0 mM EDTA, %0,05 Sürfaktan P20) bir CM5 sensör çipi içeren bir Biacore 3000 optik biyosensörü ile gerçekleştirilmiştir. Tüm ayıraçlar, enjeksiyondan önce 8°C'de muhafaza edilmiştir. Keçi anti-insan IgG (Jackson ImmunoResearch, #109-005-098), Akış Hücreleri 1 ve 2'ye standart amin kenetleme yoluyla sensör çipine immobilize edilmiştir (~3000 RU) ve etanolamin ile bloke edilmiştir. hOSMR.FH, 150 nM'de yürütme tamponu içinde hazırlanmıştır ve 0,617 nM'ye 3 kat seyreltilmiştir. Antikorlar 1-3, yürütme tamponunda seyreltilmiştir (0,25 ila 0,5 µg/mL). Antikorlar, 10 µL/dk'lık bir akış hızında Akış Hücresi 2 üzerinden enjekte edilmiştir (15 uL). Yaklaşık 50 RU antikor yakalanmıştır. Yüzey, stabilize olmaya bırakılmıştır (90 sn) ve daha sonra hOSMR'nin her bir konsantrasyonu (150, 50,0, 16,7, 5,56, 1,85 ve 0,617),

birleşme (5 dk) ve ayrışmayı (5 dk) gözlemlemek için 50 µL/dk'lık bir akış hızında Akış Hücre 1 ve 2 üzerinden geçirilmiştir. Numuneler, ikili halinde ve rastgele sırayla yürütülmüştür.

Tampon analit boşları (0 nM hOSMR) numune enjeksiyonlarından önce, enjeksiyonların arasında ve enjeksiyonlardan sonra enjekte edilmiştir. Antikorlar, 10 µL/dk'lık bir akış hızında Akış Hücresi 2 üzerinden enjekte edilmiştir (15 uL). Yaklaşık 50 RU antikor yakalanmıştır. Yüzey, stabilize olmaya bırakılmıştır (90 sn) ve daha sonra hOSMR'nin her bir konsantrasyonu (150), birleşme (5 dk) ve ayrışmayı (1-2 saat) gözlemlemek için 50 µL/dk'lık bir akış hızında Akış Hücre 1 ve 2 üzerinden geçirilmiştir. Numuneler üçlü halinde yürütülmüştür.

Tampon analit boşları (0 nM hOSMR) numune enjeksiyonlarından önce ve enjeksiyonlardan sonra enjekte edilmiştir. Yüzey, iki 10 mM glisin (pH 1,5, 50 µL) enjeksiyonu ile birlikte 50 µL/dk'lık bir akış hızında rejenere edilmiştir. Ardından bir tampon boş enjeksiyon (15 sn) gerçekleştirilmiştir.

Veriler, Scrubber 2.0 ile aşağıdaki gibi analiz edilmiştir. Akış Hücresi 2'den elde edilen veriler, Akış Hücresi 1'den (boş referans) elde edilen veriler çıkarılmıştır. Çıkarılan referans veriler (2-1), daha sonra en yakın 0 nM konsantrasyon verisinden çıkarılmıştır (çift referanslı). Çift referanslı uzun ayrışma verileri, ayrışma hızı sabitini (kd) belirlemek için bir 1:1 oranında bağlanma modeline uydurulmuştur. Bu ayrışma hızı sabiti, ayrışma hızı sabitini (ka) ve denge ayrışma sabitini (Kd) belirlemek için çift referanslı kısa ayrışma verisinin bir 1:1 oranında bağlanma modeline uydurulması için bir uydurulmuş parametre olarak kullanılmıştır.

Ayırıcılar, deney koşulları altında iyi bir şekilde davranmıştır ve veriler (bkz. aşağıda yer alan Tablo 7), bir 1:1 oranında bağlanma modelinde iyi bir şekilde uyum sağlamıştır.

Tablo 7

Antikor	Antijen	k_d (1/Ms)	K_d (1/s)	K_d (pM)
Ab1	huOSMR	$4,47 \times 10^5$	$9,95 \times 10^{-5}$	221

Ab2	huOSMR	5,50 x 10 ⁵	1,81 x 10 ⁻⁵	32,7
Ab2	huOSMR	9,47 x 10 ⁵	1,02 x 10 ⁻⁵	1080

ÖRNEK 6: Anti-OSMR Antikorları

İnsan OSMR'ye karşı yönlendirilmiş tamamen insan antikorlar, aşağıda Örnek 1'de tarif edilen XENOMOUSE® teknolojisi kullanılarak üretilmiştir. Antikor 1, 2 ve 3'ün her birinin, OSM ve/veya IL-31 aracılı sinyallemeinin güçlü inhibitörleri olduğu görülmüştür. Antikor 1, 2 ve 3'ün sekansları (örn. Ab1, Ab2, ve Ab3), belirlenmiştir ve aşağıda Tablo 8'de belirtilmiştir.

Tablo 8

Açıklama	SEQ ID NO	Sekans
Ab1-Ağır Zincir nükleotidi	3	caggtgcagctggtgcagctctgggctgaggtgaagaagcctggggc ctcagtgaaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccagtt atgatatcaactgggtgcgacaggccactggacaggggcttgagtgg atgggatggatgaaccctaatagtggttaacacagactatgcacagaa gttccagggcagagtcaccatgaccaggaacatttcataagcacgg cctacattgagctgagcagcctgagatctgaggacacggcgctttat tactgtgcgagagatatggtggctgcgaatacggattactacttcta ctacgggtatggacgtctggggccaagggaacacgggtcacgctctct cagctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctcc aggagcacctccgagagcacagcgccctgggctgcttggtcaagga ctaactccccgaaccgggtgaagggtgctgtggaactcaggcgctctga ccagcgggctgcacaccttcccagctgtctacagtcctcaggactc tactcctcagcagcgtggtgacgctgacctccagcaacttcggcac ccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagg
		tggacaagacagttgagcgcgaatggtgtgtcgagtgcacacgctgc ccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttctcttccccccaaa acccaaggacacctcatgatctcccggaaccttgaggtcacgtgctg tggtggtggaagtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactgg taogtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccacggga ggagcagttcaacagcacgttcogtgggtcagcgtcctcacgcttg tgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggctctcc aacaagggcctcccagcccccatcgagaaaacctctccaaaaccaa agggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggg aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggc ttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc ggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggct ccttcttctctacagcaagctcacggtggacaagagcaggtggcag caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcattgaggtctctgcacaa

Ab2-Ağır Zincir4 nükleotidi	4	caagtgagagctcagtcagctcaggtgagagtgaggaacccctgggac ctcagtggaagctctcctgcgaagctctctccatacaccctcaacaggt atcgaacacaaatgggctgcgaacaggtcactcagacaagggcttcagtgac atgggatgggatgaacccctaacagtggttacacagggctatgcaagaa gttccagggcgaagtgacacataacaggaacaccccaaacacacac ccacacacagaacagacacccctgacatctcaggaacacccctccaggtat tactgtgcgagaggttatcagtggtgtgcaatcaggtattactctctc ttatggtatggagctctggggcccaaggcccaagggtccacggctctcct caggtcgcgaacagggccctcaggtctccacccctgcccctgctcc aggaacacctcagtcaggaacagggccctgggtgcctcgttcaagja ctactccacagacacgggtgcggtgtgtgcgaactccaggtctcag ccagcaggggtgtgcgaacctccacggctgtctcctcaggtccctcaggtctc tactccctcaggtgcgaacctccacggctgtctcctcaggtccctcaggtctc ccaggtccctcaggtgcgaacctccacggctgtctcctcaggtccctcaggtctc
Ab3-Ağır Zincir5 nükleotidi	5	caggttcatctcgggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggc ctcagtggaaggtctcctgcgaaggtctcgtgttacacctttaccagct atgggtatcagctgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtg atgggatgggtcagcaacttacagtggttaacacaaactatgcacagaa gctccagggcagagtcacatgaccacagacacatccacgagcacag cctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtat tactgtgcgagagggaaacttctactactacgggtatggacgtctcgggg ccaggggaccaagggtcacggctctcctcagctagcaccaagggcccat cgggtcttccccctggcgccctgctccagggagcacctccgagagcaca ggggccctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgac gggtgtcgtggaactcaggcgtcttgaccagcggcgtgcacaccttc cagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtg accgtgcctccagcaacttcggcaccacagacctacacctgcaacgt
		agatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgca aatggtgtgtcagagtgccacacgtgcccagcaccacctgtggcagga ccgtcagttcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgat ctccccgacccctgaggtcacgtgcgtgggtggcagtgagccacg aagaccccagaggtccagttcaactggtaagtggaacggcgtggaggtg cataatgccaaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgtt ccgtgtgggtcagcgtcctcacggttgtgcaccaggactggctgaacg gcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagggcctcccagccccc atcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagcccccagagaaccaca gggtgtacaccttgcccccatccccgggaggagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctaccccagcgcacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaacaaactacaagaccac acctcccatgctggactccgacgggtccttcttctctctacagcaagc tcacgggtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
Ab1-Ağır Zincir6 proteini	6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRNISIISTAYIELSSLRSEDTAVY YCARDMVAANTDYFFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVFSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPFC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab2-Ağır Zincir proteini	7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGYTGGAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMEMSSLRSEDNAVY YCARDIVAANTDYYFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVFPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKV NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ab3-Ağır Zincir proteini	8	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEW MGWLSTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARGNFYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVFPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ab1-Ağır Zincir Değişken Bölgesi	9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRNISISTAYIELSSLRSEDNAVY YCARDMVAANTDYYFYYGMDVWGQGTITVTVSS
Ab2-Ağır Zincir Değişken Bölgesi	10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGYTGGAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMEMSSLRSEDNAVY YCARDIVAANTDYYFYYGMDVWGQGTITVTVSS

Ab3-Ağır Zincir Değişken Bölgesi	11	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEW MGWLSTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARGNFYYYGMDVWGQGTTVTVSS
Ab1-Ağır Zincir CDR1	12	SYDIN
Ab2-Ağır Zincir CDR1	13	SYEIN
Ab3-Ağır Zincir CDR1	14	SYGIS
Ab1-Ağır Zincir CDR2	15	WMNPNSGNTDYAQKFQG
Ab2-Ağır Zincir CDR2	16	WMGWMNPNSGYTGIAQKFQG
Ab3-Ağır Zincir CDR2	17	WLSTYSGNTNYAQKLQG
Ab1-Ağır Zincir CDR3	18	DMVAANTDYYFYYGMDV
Ab2-Ağır Zincir CDR3	19	DIVAANTDYYFYYGMDV
Ab3-Ağır Zincir CDR3	20	GNFYYYGMDV
Ab1-Hafif Zincir nükleotidi	21	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcatctgggacccccgggca gagggtcaccatctctgttctggaagcagctccaacgtcggaagta atactgtaagctggtaccaacagctcccaggaacggcccccaactc ctcatctatactaataatcgggcgccctccggggctccctgaccgatt ctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggc tccagtctgaggatgaggtgattatttctgtgcagcggttagatgac agtctgaatggtgtggtattcgggcgagggaacaaaactgaccgtcct aggccaaccgaaagcgggcgccctcggtcactctgttcccgcctcct ctgaggagcttcaagccaacaaggccacactgggtgtgtctcataagt gacttctaccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcag ccccgtcaaggcgggagtgaggagaccaccacacccctccaaacaaagca acaacaagtaacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcag tggaagtccacagaagctacagctgccaggtcacgcctgaaggag caccgtggagaagacagtgggccccctacagaatgttca

Ab2-Hafif Zincir nükleotidi	22	cagtctgtgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggca gagggtcaccatctcttgttctggaagcaactccaacatcggaagta atactgtcaactggtaccaccagctcccaggaacggccccaaactc ctcatctataatattaataagcgccctcaggggtccctgaccgatt ctctggctccaaagtctggctcctcagcctccctggccatcagtgggc tccagtctgaggatgaggtgattattactgttcaacatgggatgac agcctggatggtgtggtattcggcggagggaaccaagctgaccgtcct aggccaaccgaaagcggcgcctcggtcactctgttcccgccctcct ctgaggagcttcaagccaacaaggccacactgggtgtgtctcataagt gacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcag ccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacacctccaaacaaagca acaacaagtaacggccagcagctatctgagcctgacgctgagcag tggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggggag caccgtggagaagacagtggccccctacagaatgttca
Ab3-Hafif Zincir nükleotidi	23	gaaattgtgttgacgcagctctccaggcaccctgtctttgtctccagg ggaaagagccaccctctcctgcagggccagtccagagtgttagcagca gtaacttagcctggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctc ctcatctttggtgtctccagcagggccactggcatcccagacaggtt cagtggcagtggtgtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagac tggagcctgaagattttgcagtgtattactgtcagcagtatggtagc tcgcctccgatcaccttcggccaagggaacgactggagattaaacg tacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagc agttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc tatcccagagaggccaaagtaacagtgggaaggtggataacgcctcca atcgggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggaca gcacctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaagcagactac gagaaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggcctgag ctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt
Ab1-Hafif Zincir proteini	24	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNVGSNTVSWYQQLPGTAPKL LIYTNNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAALDD SLNGVVFEGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Ab2-Hafif Zincir proteini	25	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYHQLPGTAPKL LIYNINKRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYFCSTWDD SLDGVVFEGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Ab3-Hafif Zincir proteini	26	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Ab1-Hafif Zincir Değişken	27	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNVGSNTVSWYQQLPGTAPKL LIYTNNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAALDD SLNGVVFEGGGTKLTVLG
Ab2-Hafif Zincir Değişken	28	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYHQLPGTAPKL LIYNINKRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYFCSTWDD SLDGVVFEGGGTKLTVLG
Ab3-Hafif Zincir Değişken	29	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPPITFGQGTRLEIKR
Ab1-Hafif Zincir CDR1	30	SGSSSNVGSNTVS

Ab2-Hafif	31	SGSNSNIGSNTVN
Zincir CDR1		
Ab3-Hafif	32	RASQSVSSSYLA
Zincir CDR1		
Ab1-Hafif	33	TNNRRPS
Zincir CDR2		
Ab2-Hafif	34	NINKRPS
Zincir CDR2		
Ab3-Hafif	35	GASSRAT
Zincir CDR2		
Ab1-Hafif	36	AALDDSLNGVV
Zincir CDR3		
Ab2-Hafif	37	STWDDSLDGVV
Zincir CDR3		
Ab3-Hafif	38	QQYGSSPFIT
Zincir CDR3		

ÖRNEK 7: Modifiye Edilmiş Anti-OSMR Antikorları

Ab1, Ab2 ve Ab3'ün modifiye edilmiş versiyonları oluşturulmuştur. Antikorların modifiye edilmiş üç formu için de ağır zincir C ucundaki lizin kaldırılmıştır. Ab1 ve Ab2 için pozisyon 73'teki glikozilasyon alanı, pozisyon 73'teki asparaginin bir aspartik asit ile ornatılarak kaldırılmıştır. Bu varyantlar, Ab1-N73D ve Ab2-N73D olarak adlandırılır. Modifiye edilmiş sekanslar, aşağıda Tablo 9'da yer alır (modifiye edilmiş nükleotitler ve amino asitlerin altı çizilmiştir).

Tablo 9

Açıklama	SEQ ID NO	Sekans
----------	--------------	--------

Ab2 versiyon 2- Ağır Zincir nükleotidi (N73D / C ucu lizini silinmiş)	48	cagggtgcagctgggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggc ctcagtgaaaggtctcctgcaaggettctggatacaccttcaccagtt atgaaatcaactgggtgcgacaggccactggacaagggcttgagtgg atgggatggatgaaccctaacagtggttacacaggctatgcacagaa gttcacagggcagagtcaccatgaccagggaacacctccataagcacag cctacatggaaatgagcagcctgagatctgaggacacggcctgtat tactgtgcgagagatatagtggctgcgaatacggattactacttcta ttatgggtatggacgtctggggccaagggaacacgggtcacgtctcct cagctagcaccaaggggcccatcggtcttccccctggcgccctgctcc aggagcacctccgagagcacagcgccctgggctgctgggtcaagga ctaactccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggegtctga ccagcggtgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcaggactc tactcctcagcagcgtgggtgacgtgcccctccagcaacttcggcac ccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagg tggaacaagacagttgagcgcaaagtgtgtgctgagtgcccacgggtgc ccagcaccacctgtggcaggacggtcagttctcctcttccccccaaa acccaaggacacctcatgatctcccggaaccttgaggtcacgtgcg tggtgggtggacgtgagccacgaagaccccagggccagttcaactgg tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccacggga ggagcagttcaacagcacgttcgggtgtggtcagcgtcctcaccgttg tgcaccaggactgggtgaacggcaaggagtacaagtgaagggtctcc aaciaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaa agggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggt aggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctgggtcaaaggc ttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc ggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgaaggct ccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcag caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcattgaggtctctgcacaa ccaetacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt
--	----	--

(C ucu lizini silinmiş)		YCARGNFYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAG PSVLEFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
Ab1 versiyon 2- Ağır Zincir Değişken Bölgesi	53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYIELSSLRSEDTAVY YCARDMVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
Ab2 versiyon 2- Ağır Zincir Değişken Bölgesi	54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGYTGYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMEMSSLRSEDTAVY YCARDIVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS

ELISA deneyleri, farklı Fc bölgelerine sahip Ab1 veya Ab2 değişken bölgelerini (veya Ab1 veya Ab2'nin N73D varyantı) içeren antikorlar kullanılarak çeşitli formatlarda (düşük
5 aviditeli format için Yakalamalı (capture) ELISA; çözelti fazı formatı için Sandviç ELISA ve katı hal avidite formatı için Direkt ELISA) gerçekleştirilmiştir.

Ab1 ve Ab2'nin her biri, insan IgG2 kökenli CH1, CH2, CH3 domenlerini içerir. Burada kullanıldığı şekliyle "Ab1" ve "Ab1
10 IgG2 WT" terimleri aynı antikoru ifade eder. Benzer şekilde "Ab2" ve "Ab2 IgG2 WT" terimleri aynı antikoru ifade eder.

"IgG4P agly / IgG1" olarak tanımlanan antikorlar, insan IgG4'ten CH1 domenine, karmayı azaltmak için (pozisyon 228'de bulunan) bir Ser'den Pro'ya mutasyona sahip insan IgG4'ten menteşe, N
15 bağlantılı glikozilasyon alanı elimine etmek için (pozisyon 297'de bulunan) bir Asn'den Gln'ye mutasyona sahip insan IgG4'ten CH2 domeni ve insan IgG1'den CH3 domenine kaynaştırılmıştır Ab1 veya Ab2'nin (veya Ab1 veya Ab2'nin N73D varyantının) değişken bölgelerini içerir. "IgG4P agly / IgG1"
20 çerçevesi, US yayınlanmış patent başvurusu numarası US 2012/0100140'da tarif edilmiştir.

ELISA sonuçları, N73D ornatması yoluyla glikozilasyon alanının çıkarılmasının, modifiye edilmiş antikorların OSMR'ye bağlanmasını etkilemediğini göstermiştir. Bkz. Tablo 10.

Tablo 10

Antikor	Yakalamalı (EC50) nM	Sandviç (EC50) nM	Direkt (EC50) nM
Ab1 IgG2 WT	10,2	0,581	0,184
Ab1 N73D IgG2	4,85	0,359	0,0728
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	2,86	0,05	0,0626
Ab2 IgG2 WT	3,63	0,366	0,182
Ab2 N73D IgG2	5,49	0,343	0,179
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	1,61	0,064	0,0558

Bağlanma çalışmaları, BIAcore yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı Fc bölgelerine sahip Ab1 veya Ab2'nin (Ab1 veya Ab2'nin N73D varyantının) değişken bölgelerini içeren antikorlar, üreticinin protokollerine göre bir CM4 çipi (GE lifesciences) üzerinde immobilize edilmiştir. Çözünebilir OSMR, analit olarak kullanılmıştır. N73D ornatması yoluyla Ab1 ve Ab2'de glikosilasyon alanının kaldırılması, bağlanma afinitelerini geliştirmiştir. Ab1 için ornatma, Kon hızını geliştirirken, Ab2 için Koff hızını geliştirmiştir. Bkz. Tablo 11.

Tablo 11

Antikor	Kon (M-ls-1)	Koff(1/s)	KD (M)
Ab1 IgG2 WT	1.64E+05	1.50E-04	0.913E-9
Ab1 N73D IgG2	2.49E+05	1.68E-04	0.675E-9
Ab2 IgG2 WT	1.88E+05	1.89E-04	1.01E-09
Ab2 N73D IgG2	1.73E+05	4.99E-05	0.289E-9

5 Fab fragmanlarının stabilitesi, antikorların termal açılımının değerlendirilmesiyle belirlenmiştir. Fab fragmanlarının yüksek erime sıcaklığı, artan stabilite ile doğrudan ilişkilidir. Diferansiyel taramalı flüorimetri deneyleri ile değerlendirildiği üzere, Ab2 üzerindeki glikozilasyon alanlarının N73D ornatılmasıyla kaldırılması, Fab fragmanlarının termal stabilitesini etkilememiştir ve Ab1 üzerinde küçük etkiler göstermiştir. Bkz. Tablo 12.

Tablo 12

Antikor	Fab Tm (Santigrat)	Standart Hata (Santrigat)
Ab1 IgG2 WT	73,24	0,0097
Ab1 N73D IgG2	71,21	0,005
Ab1 N73D IgG4P agly / IαG1	74,23	0,014
Ab2 IgG2 WT	76,71	0,0096
Ab2 N73D IgG2	76,54	0,14
Ab2 N73D IgG4P agly / IαG1	76,69	0,018

Modifiye edilmiş anti-OSMR antikorlarının insan OSMR aracılığıyla sinyallemeyi bloke etme kabiliyeti değerlendirilmiştir. Modifiye edilmiş antikorlar, IL31, OSM veya IL31 ve OSM varlığında bir BaF_hu-IL31R/OSMR/gp130 hücre hattında çoğalmayı inhibe etme kabiliyetleri bakımından değerlendirilmiştir. Sonuçlar, her bir antikör için IC50 değeri ile birlikte aşağıda Tablo 13 ve 14'te sunulmuştur. Sonuçlar, modifiye edilmiş Ab1 ve Ab2 versiyonlarının, OSM ve IL-31 aracılı sinyallemesine karşı güçlü inhibitörler olduğunu doğrular.

10 **Tablo 13**

Antikor	IL31 (IC50)	OSM (IC50)	IL31/OSM (IC50)
Ab2	0,3828	0,3528	~1,9
Ab1 IgG2 WT	0,6691	0,5298	4,004
Ab1 N73D IgG2	0,7565	0,5226	3,702
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	0,4672	0,5657	3,080

Tablo 14

Antikor	IL31 (IC50)	OSM (IC50)	IL31/OSM (IC50)
Ab2	0,4426	0,4019	1,8
Ab2 IgG2 WT	0,3671	0,4758	2,049
Ab2 N73D IgG2	0,2191	0,1859	1,474
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	0,2838	0,2401	1,276

SEKANS LİSTESİ

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

Arnett v.d..

5

<120> ONKOSTATİN M RESEPTÖRÜ ANTİJENİ BAĞLAYICI PROTEİNLER

<130> 01017/47340

10 <160> 46

<170> PatentIn versiyon 3.5

15 <210> 1

<211> 979

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> İnsan OSMR

<400> 1

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

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

405					410					415					
Glu	Trp	Ser	Gly	Gln	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Glu
			420					425					430		
Ala	Pro	Asp	Val	Trp	Arg	Ile	Val	Ser	Leu	Glu	Pro	Gly	Asn	His	Thr
		435					440					445			
Val	Thr	Leu	Phe	Trp	Lys	Pro	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Ala	Asn	Gly	Lys
	450					455					460				
Ile	Leu	Phe	Tyr	Asn	Val	Val	Val	Glu	Asn	Leu	Asp	Lys	Pro	Ser	Ser
465					470					475					480
Ser	Glu	Leu	His	Ser	Ile	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Lys	Leu	Ile
				485					490					495	
Leu	Asp	Arg	Cys	Ser	Tyr	Gln	Ile	Cys	Val	Ile	Ala	Asn	Asn	Ser	Val
			500					505					510		
Gly	Ala	Ser	Pro	Ala	Ser	Val	Ile	Val	Ile	Ser	Ala	Asp	Pro	Glu	Asn
		515					520					525			
Lys	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Arg	Ile	Ala	Gly	Thr	Glu	Gly	Gly	Phe	Ser
	530					535					540				
Leu	Ser	Trp	Lys	Pro	Gln	Pro	Gly	Asp	Val	Ile	Gly	Tyr	Val	Val	Asp
545					550					555					560
Trp	Cys	Asp	His	Thr	Gln	Asp	Val	Leu	Gly	Asp	Phe	Gln	Trp	Lys	Asn
				565					570					575	
Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Thr	Ser	Thr	Val	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	Phe	Arg
			580					585					590		
Pro	Gly	Val	Arg	Tyr	Asp	Phe	Arg	Ile	Tyr	Gly	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg
		595					600					605			
Ile	Ala	Cys	Leu	Leu	Glu	Lys	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ser	Gln	Glu	Leu	Ala
	610					615					620				
Pro	Ser	Asp	Asn	Pro	His	Val	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	His	Ser
625					630					635					640
Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ser	Gln	Pro	Gly	Phe
				645					650					655	

Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His
 660 665 670

Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys
 675 680 685

Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu
 690 695 700

Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala
 705 710 715 720

Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu
 725 730 735

His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe Cys Val
 740 745 750

Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile Lys Glu
 755 760 765

Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser
 770 775 780

Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn Val Ser
 785 790 795 800

Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr
 805 810 815

Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu
 820 825 830

Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn His Ser
 835 840 845

Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala
 850 855 860

Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro Lys Ala
 865 870 875 880

Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala
 885 890 895

Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu
 900 905 910

Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp
 915 920 925

Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys Ser Glu
 930 935 940

Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro
 945 950 955 960

Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu
 965 970 975

His Tyr Cys

<210> 2

<211> 977

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Sinomolgus maymunu OSMR

10 <400> 2

Met Ala Leu Phe Val Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Ile Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu
 20 25 30

Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Ile His Gln Ser Leu
 35 40 45

His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys
 50 55 60

Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Val
 65 70 75 80

Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Pro Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His
 85 90 95

Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val
 100 105 110

Arg Ile Lys Ser Val Ile Asp Asp Ala Ser Phe Pro Glu Pro Asn Phe
 115 120 125

Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Tyr Leu
 130 135 140

Gly Arg Gly Thr Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu
 145 150 155 160

Gly Ser Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn
 165 170 175

Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp
 180 185 190

Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn
 195 200 205

Arg Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Lys
 210 215 220

Gly Ile Glu Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Phe Ser Cys Glu Ser Gln Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr
 245 250 255

Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln Pro Ser
 260 265 270

Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys
 275 280 285

Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu
 290 295 300

Met Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser
 305 310 315 320

Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro
 325 330 335

Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr
 340 345 350

Trp Lys Val His Ser Met Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile
 355 360 365

Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asp Val Ser Ile Asn

370					375					380					
Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr
385					390					395					400
Met	Ala	Arg	Val	Arg	Cys	Ala	Asp	Ala	Ser	His	Phe	Trp	Lys	Trp	Thr
				405					410					415	
Glu	Trp	Ser	Gly	Gln	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Glu
			420					425					430		
Ala	Pro	Asp	Val	Trp	Arg	Ser	Val	Asn	Ser	Glu	Pro	Gly	Asn	His	Thr
		435					440					445			
Val	Thr	Leu	Phe	Trp	Lys	Pro	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Ala	Asn	Gly	Lys
	450					455					460				
Ile	Leu	Phe	Tyr	Asn	Val	Val	Val	Glu	Asn	Leu	Asp	Lys	Pro	Ser	Arg
465					470					475					480
Ser	Glu	Leu	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Lys	Leu	Ile
				485					490					495	
Leu	Asp	Arg	Cys	Ser	Tyr	Gln	Ile	Cys	Val	Thr	Ala	Asn	Asn	Ser	Val
			500					505					510		
Gly	Ala	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Ile	Val	Ile	Ser	Ala	Asp	Pro	Glu	Asn
		515					520					525			
Lys	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Arg	Ile	Ala	Gly	Thr	Glu	Gly	Gly	Phe	Ser
	530					535					540				
Leu	Ser	Trp	Lys	Pro	Gln	Pro	Gly	Asp	Val	Ile	Gly	Tyr	Val	Val	Asp
545					550					555					560
Trp	Cys	Asp	His	Pro	Gln	Asp	Val	Leu	Gln	Trp	Lys	Asn	Val	Gly	Pro
				565					570					575	
Asn	Thr	Thr	Ser	Thr	Val	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	Phe	Arg	Pro	Gly	Val
			580					585					590		
Arg	Tyr	Asp	Phe	Arg	Ile	Tyr	Gly	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Ile	Ala	Cys
		595					600					605			
Leu	Leu	Glu	Lys	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ser	Gln	Glu	Leu	Ala	Pro	Ser	Asp
	610					615					620				

Asn	Pro	His	Val	Leu	Val	Asp	Met	Leu	Thr	Ser	His	Ser	Phe	Thr	Leu	625	630	635	640
Ser	Trp	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ser	Gln	Pro	Gly	Phe	Ile	Gln	Gly	645	650	655	
Tyr	His	Val	Tyr	Leu	Lys	Ser	Lys	Ala	Arg	Gln	Cys	His	Pro	Arg	Phe	660	665	670	
Gln	Lys	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Glu	Cys	Cys	Arg	Tyr	Lys	Ile	675	680	685	
Asp	Asn	Pro	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Ile	Val	Asp	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	690	695	700	
Ser	Phe	Tyr	Glu	Phe	Phe	Val	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser	Ala	Gly	Glu	Gly	705	710	715	720
Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Glu	His	Ser	Ser	725	730	735	
Met	Leu	Ile	Arg	Ile	Leu	Leu	Pro	Met	Val	Phe	Cys	Val	Leu	Leu	Ile	740	745	750	
Met	Ile	Val	Cys	Tyr	Leu	Lys	Ser	Gln	Trp	Ile	Lys	Glu	Thr	Cys	Tyr	755	760	765	
Pro	Asp	Ile	Pro	Asp	Pro	Tyr	Lys	Ser	Ser	Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Lys	770	775	780	
Phe	Lys	Glu	Asn	Pro	His	Leu	Thr	Ile	Met	Asn	Val	Ser	Asp	Cys	Ile	785	790	795	800
Pro	Asp	Ala	Ile	Glu	Val	Val	Ser	Lys	Pro	Glu	Gly	Thr	Lys	Ile	Gln	805	810	815	
Leu	Leu	Gly	Thr	Arg	Lys	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Glu	Leu	Thr	Lys	Pro	820	825	830	
Asn	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Glu	Lys	Asn	His	Ser	Gly	Pro	Gly	835	840	845	
Pro	Cys	Ile	Cys	Phe	Glu	Asn	Phe	Thr	Tyr	Asn	Gln	Ala	Ala	Ser	Asp	850	855	860	
Ala	Gly	Ser	Cys	Gly	His	Val	Pro	Val	Pro	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Ser	865	870	875	880

Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala Leu Glu
885 890 895

Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Val Pro Ala Gly Glu Thr Ser
900 905 910

Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Ser Gly Asp Lys Asp
915 920 925

Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Pro Pro His Cys Ser Glu Tyr Lys
930 935 940

Met Gln Met Ala Val Pro Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro Thr Glu
945 950 955 960

Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu His Tyr
965 970 975

Arg

<210> 3

<211> 1356

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Ab1 Ağır zinciri

10 <400> 3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc	120
actggacagg ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta atagtggtaa cacagactat	180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca ttcccataag cacggcctac	240
attgagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgttt attactgtgc gagagatatg	300
gtggctgcga atacggatta ctactttctac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc	360
acggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc	420
tccaggagca cctccgagag cacaggggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc	480
gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc gctctgacca gcggcgtgca caccttccca	540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctacgacgag tggtgaccgt gccctccagc	600
aacttcggca cccagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg	660
gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc gagtgccac cgtgccagc accacctgtg	720
gcaggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg	780
accctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccgga ggtccagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag	900
ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc ctaccggtg tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc	1020
atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa ccacagggtg acaccctgcc cccatcccg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacacct	1200
cccatgctgg actccgacgg ctcttctctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa	1356

<210> 4

<211> 1356

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Ab2 Ağır zinciri

<400> 4

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgaaa tcaactgggt gcgacaggcc	120
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtgggta cacaggctat	180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac	240
atggaaatga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatata	300
gtggctgcga atacggatta ctacttctat tatgggatgg acgtctgggg ccaagggacc	360
acggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc	420
tccaggagca cctccgagag cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc	480
gaaccgggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gctctgacca gcggcgtgca caccttccca	540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc	600
aacttcggca cccagacctc cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg	660
gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg	720
gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg	780
acctctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacccga ggtccagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag	900
ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc	1020
atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa ccacagggtg acacctgcc cccatcccg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacacct	1200
cccatgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa	1356

<210> 5

<211> 1335

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Ab3 Ağır zinciri

<400> 5

caggttcatc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg ctctctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ctcagcactt acagtggtaa cacaaactat	180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac	240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagggaac	300
ttctactact acggtatgga cgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctctcagct	360
agcaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac	600
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa	660
tgttggtgctg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc	720
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gagggtgcata atgccagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag	960
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag	1020
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccatcccggt aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc	1200
tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtctccgg gtaaa	1335

<210> 6

<211> 452

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Ab1 Ağır zinciri

<400> 6

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Met Val Ala Ala Asn Thr Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 130 135 140

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

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

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 7

<211> 452

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab2 Ağır zinciri

10 <400> 7

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

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
 195 200 205

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

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 225 230 235 240

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 290 295 300

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 8

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab3 Ağır zinciri

10 <400> 8

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

130		135		140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp				
145		150		155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu				
	165		170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser				
	180		185	190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro				
	195		200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu				
	210		215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu				
225		230		235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu				
	245		250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln				
	260		265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys				
	275		280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu				
	290		295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys				
305		310		315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys				
	325		330	335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser				
	340		345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys				
	355		360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln				
	370		375	380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

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

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

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

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Abl Ağır zinciri değişken bölgesi

10 <400> 9

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Met Val Ala Ala Asn Thr Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 10

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab2 Ağır zinciri değişken bölgesi

10 <400> 10

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

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

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

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ile Val Ala Ala Asn Thr Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab3 Ağır zinciri değişken bölgesi

10 <400> 11

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

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

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

Gly Trp Leu Ser Thr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asn Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab1 Ağır zinciri CDR1

10 <400> 12

Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab2 Ağır zinciri CDR1

20 <400> 13

Ser Tyr Glu Ile Asn
1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Ab3 Ağır zinciri CDR1
 <400> 14

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5
 10
 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Ab1 Ağır zinciri CDR2
 <400> 15

Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly
 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Ab2 Ağır zinciri CDR2
 <400> 16

Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Gln
1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly
20

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab3 Ağır zinciri CDR2

10 <400> 17

Trp Leu Ser Thr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <223> Ab1 Ağır zinciri CD3

<400> 18

Asp Met Val Ala Ala Asn Thr Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 19

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Ab2 Ağır zinciri CDR3
 5 <400> 19
 Asp Ile Val Ala Ala Asn Thr Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

 Val

 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Ab3 Ağır zinciri CDR3
 15 <400> 20
 Gly Asn Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

 <210> 21
 <211> 648
 <212> DNA
 20 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Ab1 Hafif Zinciri
 25 <400> 21

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagca tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcttggttctg gaagcagctc caacgtcgga agtaatactg taagctggta ccaacagctc	120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat actaataatc ggcgccctc cggggtccct	180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
tctgaggatg aggctgatta tttctgtgca gcgttagatg acagtctgaa tgggtgtgta	300
ttcggcggag ggaccaaact gaccgtccta ggccaaccga aagcggcgcc ctcggtcact	360
ctgttccccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggg gtgtctcata	420
agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag	480
gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc	540
tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg	600
catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttca	648

<210> 22

<211> 648

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Ab2 Hafif Zinciri

10 <400> 22

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcttggttctg gaagcaactc caacatcgga agtaatactg tcaactggta ccaccagctc	120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aatattaata agcggccctc aggggtccct	180
gaccgattct ctggctccaa gtctggctcc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
tctgaggatg aggctgatta ttactgttca acatgggatg acagcctgga tgggtgtgta	300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggccaaccga aagcggcgcc ctcggtcact	360
ctgttccccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggg gtgtctcata	420
agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag	480
gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc	540
tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg	600
catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttca	648

<210> 23

<211> 648

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> misc_feature
<223> Ab3 Hafif Zinciri
<400> 23

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcttt ggtgcttcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggta gctcgccctcc gatcaccttc	300
ggccaagggg cagcactgga gattaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc	360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt	648

<210> 24

10 <211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> MISC_FEATURE
<223> Ab1 Hafif Zinciri
<400> 24

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Ala Leu Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

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

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 25

<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab2 Hafif Zinciri

<400> 25

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

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn
			20					25					30		

Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	His	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		35					40					45			

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

Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

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

Asp Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

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

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 26

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab3 Hafif Zinciri

10 <400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 27

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Ab1 Hafif Zinciri variable
 <400> 27

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

10 <210> 28
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Ab2 Hafif Zinciri variable
 <400> 28

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr His Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

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

Asp Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 29

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Ab3 Hafif Zinciri variable

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab1 Hafif Zinciri CDR1

10 <400> 30

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Ser Asn Thr Val Ser
1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab2 Hafif Zinciri CDR1

<400> 31

Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

5 <210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab3 Hafif Zinciri CDR1

<400> 32

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

15 <210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab1 Hafif Zinciri CDR2

<400> 33

Thr Asn Asn Arg Arg Pro Ser
1 5

25 <210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> MISC_FEATURE
<223> Ab2 Hafif Zinciri CDR2
<400> 34

Asn Ile Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

5 <210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Ab3 Hafif Zinciri CDR2
<400> 35
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

15 <210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Ab1 Hafif Zinciri CDR3
<400> 36
Ala Ala Leu Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val
1 5 10

25 <210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab2 Hafif Zinciri CDR3

<400> 37

Ser	Thr	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Asp	Gly	Val	Val
1				5					10	

5 <210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Ab3 Hafif Zinciri CDR3

<400> 38

Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Pro	Ile	Thr
1				5					10

15 <210> 39

<211> 252

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> İnsan OSM

<400> 39

Met	Gly	Val	Leu	Leu	Thr	Gln	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Leu	Ala	1	5	10	15
Leu	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Met	Ala	Ala	Ile	Gly	Ser	Cys	Ser	20	25	30	
Lys	Glu	Tyr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Gln	Lys	Gln	Thr	Asp	Leu	35	40	45	
Met	Gln	Asp	Thr	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ile	Gln	Gly	50	55	60	
Leu	Asp	Val	Pro	Lys	Leu	Arg	Glu	His	Cys	Arg	Glu	Arg	Pro	Gly	Ala	65	70	75	80
Phe	Pro	Ser	Glu	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Arg	Arg	Gly	Phe	Leu	85	90	95	
Gln	Thr	Leu	Asn	Ala	Thr	Leu	Gly	Cys	Val	Leu	His	Arg	Leu	Ala	Asp	100	105	110	
Leu	Glu	Gln	Arg	Leu	Pro	Lys	Ala	Gln	Asp	Leu	Glu	Arg	Ser	Gly	Leu	115	120	125	
Asn	Ile	Glu	Asp	Leu	Glu	Lys	Leu	Gln	Met	Ala	Arg	Pro	Asn	Ile	Leu	130	135	140	
Gly	Leu	Arg	Asn	Asn	Ile	Tyr	Cys	Met	Ala	Gln	Leu	Leu	Asp	Asn	Ser	145	150	155	160
Asp	Thr	Ala	Glu	Pro	Thr	Lys	Ala	Gly	Arg	Gly	Ala	Ser	Gln	Pro	Pro	165	170	175	
Thr	Pro	Thr	Pro	Ala	Ser	Asp	Ala	Phe	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Gly	Cys	180	185	190	
Arg	Phe	Leu	His	Gly	Tyr	His	Arg	Phe	Met	His	Ser	Val	Gly	Arg	Val	195	200	205	

Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn Arg Ser Arg Arg His Ser Pro
 210 215 220

His Gln Ala Leu Arg Lys Gly Val Arg Arg Thr Arg Pro Ser Arg Lys
 225 230 235 240

Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly Gln Leu Pro Arg
 245 250

<210> 40

<211> 196

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Sinomolgus maymunu OSM proteini

10 <400> 40

Ala Ala Met Gly Ser Cys Ser Lys Glu Tyr Arg Met Leu Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu Asp
 20 25 30

Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly Leu Asp Ile Pro Lys Leu Arg Glu His
 35 40 45

Cys Arg Glu Ser Pro Gly Ala Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly
 50 55 60

Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly Arg
 65 70 75 80

Ile Leu His Arg Leu Ala Asp Leu Glu Gln His Leu Pro Lys Ala Gln
 85 90 95

Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu Gln
 100 105 110

Met Ala Arg Pro Asn Val Leu Gly Leu Arg Asn Asn Val Tyr Cys Met
 115 120 125

Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser Asp Met Thr Glu Pro Thr Lys Ala Gly
 130 135 140

Arg Gly Thr Pro Gln Pro Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Asp Val Phe
 145 150 155 160

Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys Ser Phe Leu Arg Gly Tyr His Arg Phe
 165 170 175

Met His Ser Val Gly Arg Val Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn
 180 185 190

Arg Ser Arg Arg
 195

<210> 41

<211> 164

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <223> Insan IL-31

<400> 41

Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys
1 5 10 15

Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu
20 25 30

Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu
35 40 45

Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val
50 55 60

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

Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg
85 90 95

Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp Glu Ile Ile Glu His Leu Asp
100 105 110

Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr
115 120 125

Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe
130 135 140

Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln

145 150 155 160

Gln Ala Thr Thr

<210> 42

<211> 138
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Sinomolgus maymunu IL-31
 <400> 42

```

Thr Leu Pro Val His Phe Leu Gln Pro Ser Asp Ile Gln Lys Ile Val
1          5          10          15

Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Lys Glu
          20          25          30

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

Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Ile Ile His Ser Pro Ala Ile Arg Ala
          50          55          60

Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp Glu
65          70          75          80

Ile Ile Glu His Leu Asp Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu Thr
          85          90          95

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

Thr Ile Ser Gln Gln Phe Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser
          115          120          125

Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr
          130          135

```

10 <210> 43
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> ĩnsan IL-31RA

<400> 43

Met	Lys	Leu	Ser	Pro	Gln	Pro	Ser	Cys	Val	Asn	Leu	Gly	Met	Met	Trp	1	5	10	15
Thr	Trp	Ala	Leu	Trp	Met	Leu	Pro	Ser	Leu	Cys	Lys	Phe	Ser	Leu	Ala	20	25	30	
Ala	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Cys	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	35	40	45	
Lys	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Trp	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Thr	Ser	Tyr	Thr	50	55	60	
Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Arg	Thr	Tyr	Ala	Phe	Gly	Glu	Lys	His	Asp	Asn	65	70	75	80
Cys	Thr	Thr	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Asn	Arg	Ala	Ser	Cys	Ser	Phe	85	90	95	
Phe	Leu	Pro	Arg	Ile	Thr	Ile	Pro	Asp	Asn	Tyr	Thr	Ile	Glu	Val	Glu	100	105	110	
Ala	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Ser	His	Met	Thr	Tyr	Trp	Arg	115	120	125	
Leu	Glu	Asn	Ile	Ala	Lys	Thr	Glu	Pro	Pro	Lys	Ile	Phe	Arg	Val	Lys	130	135	140	
Pro	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Arg	Met	Ile	Gln	Ile	Glu	Trp	Ile	Lys	Pro	145	150	155	160
Glu	Leu	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Arg	Phe	Arg	165	170	175	
Thr	Val	Asn	Ser	Thr	Ser	Trp	Met	Glu	Val	Asn	Phe	Ala	Lys	Asn	Arg	180	185	190	
Lys	Asp	Lys	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Phe	Thr	195	200	205	
Glu	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	Lys	Phe	Trp	210	215	220	
Ser	Asp	Trp	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	225	230	235	240

Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly
 245 250 255

Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val
 260 265 270

Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn
 275 280 285

Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu
 290 295 300

His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu
 325 330 335

Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp
 340 345 350

Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp
 355 360 365

Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser
 370 375 380

Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys
 385 390 395 400

Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His
 405 410 415

Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly
 420 425 430

Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys
 435 440 445

Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly
 450 455 460

Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly
 465 470 475 480

Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser
 485 490 495

Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser
500 505 510

Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe
515 520 525

Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu
530 535 540

Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn
545 550 555 560

Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser
565 570 575

Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu
580 585 590

Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro
595 600 605

Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn
610 615 620

Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly
625 630 635 640

Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser
645 650 655

Ser Cys Pro Thr Ser Ile
660

<210> 44

<211> 649

<212> PRT

5 <213> *Macaca fascicularis*

<220>

<221> misc_feature

<223> *Sinomolgus maymunu* IL-21RA

<400> 44

Met	Met	Trp	Thr	Trp	Ala	Leu	Trp	Met	Phe	Pro	Leu	Leu	Cys	Lys	Phe
1				5					10					15	

Gly Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr

Glu Asn Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Val Asn Thr Thr Asn Gln Gln
 275 280 285

Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Tyr Trp Val Ser Met Ile Ser
 290 295 300

Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Thr Thr Leu Arg Ile Pro Ala
 305 310 315 320

Ile Gln Glu Lys Ser Phe Arg Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Leu
 325 330 335

Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val
 340 345 350

Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Met Asp Ser Glu His Pro
 355 360 365

Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln
 370 375 380

Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro
 385 390 395 400

Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala
 405 410 415

Lys Glu Gly Ile Pro Ser Lys Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile
 420 425 430

Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu
 435 440 445

Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly
 450 455 460

Gly Thr Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
 465 470 475 480

Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Thr Val Arg Val Met Ala
 485 490 495

Ser Thr Ser Ala Gly Gly Ile Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr
 500 505 510

Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly
 515 520 525

Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys
530 535 540

Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Ser Val Pro Asn Pro
545 550 555 560

Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp Arg Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys
565 570 575

Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile
580 585 590

Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Ser
595 600 605

Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Met Phe Thr Asp Glu Ala
610 615 620

Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Glu Asn Arg
625 630 635 640

Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile
645

<210> 45

<211> 918

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> ĩnsan gpl30

10 <400> 45

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu
1 5 10 15

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
 85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
 100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
 115 120 125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
 130 135 140

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
 145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
 165 170 175

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
 180 185 190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
 195 200 205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
 210 215 220

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys
 245 250 255

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
 260 265 270

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
 275 280 285

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu
 290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile
 305 310 315 320

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile

325																330																335																																			
Asp	Pro	Ser	His	Thr	Gln	Gly	Tyr	Arg	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Trp	Lys																																																				
			340																	345																	350																														
Thr	Leu	Pro	Pro	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Tyr	Glu	Val																																																				
			355																	360																	365																														
Thr	Leu	Thr	Arg	Trp	Lys	Ser	His	Leu	Gln	Asn	Tyr	Thr	Val	Asn	Ala																																																				
			370																	375																	380																														
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Thr	Leu																																																				
			385																	390																	395																	400													
Thr	Val	Arg	Asn	Leu	Val	Gly	Lys	Ser	Asp	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Ile																																																				
			405																	410																	415																														
Pro	Ala	Cys	Asp	Phe	Gln	Ala	Thr	His	Pro	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Ala																																																				
			420																	425																	430																														
Phe	Pro	Lys	Asp	Asn	Met	Leu	Trp	Val	Glu	Trp	Thr	Thr	Pro	Arg	Glu																																																				
			435																	440																	445																														
Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Ile	Leu	Glu	Trp	Cys	Val	Leu	Ser	Asp	Lys	Ala																																																				
			450																	455																	460																														
Pro	Cys	Ile	Thr	Asp	Trp	Gln	Gln	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	His	Arg	Thr																																																				
			465																	470																	475																	480													
Tyr	Leu	Arg	Gly	Asn	Leu	Ala	Glu	Ser	Lys	Cys	Tyr	Leu	Ile	Thr	Val																																																				
			485																	490																	495																														
Thr	Pro	Val	Tyr	Ala	Asp	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Glu	Ser	Ile	Lys	Ala																																																				
			500																	505																	510																														
Tyr	Leu	Lys	Gln	Ala	Pro	Pro	Ser	Lys	Gly	Pro	Thr	Val	Arg	Thr	Lys																																																				
			515																	520																	525																														
Lys	Val	Gly	Lys	Asn	Glu	Ala	Val	Leu	Glu	Trp	Asp	Gln	Leu	Pro	Val																																																				
			530																	535																	540																														
Asp	Val	Gln	Asn	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Arg	Thr																																																				
			545																	550																	555																	560													
Ile	Ile	Gly	Asn	Glu	Thr	Ala	Val	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	His	Thr	Glu																																																				
			565																	570																	575																														

Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
 580 585 590

Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
 595 600 605

Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
 610 615 620

Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
 625 630 635 640

Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
 645 650 655

Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
 660 665 670

Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Ser Asn Phe
 675 680 685

Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Val Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
 690 695 700

Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
 705 710 715 720

Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
 725 730 735

Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
 740 745 750

Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
 755 760 765

His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
 770 775 780

Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
 785 790 795 800

His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
 805 810 815

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
 820 825 830

Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu
835 840 845

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln
850 855 860

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly
865 870 875 880

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala
885 890 895

Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln
900 905 910

Gly Gly Tyr Met Pro Gln
915

<210> 46

<211> 918

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Sinomolgus maymunu gp130

10 <400> 46

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

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
 115 120 125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
 130 135 140

Glu Trp Asn Arg Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
 145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
 165 170 175

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
 180 185 190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
 195 200 205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
 210 215 220

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Arg Leu Lys
 245 250 255

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
 260 265 270

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
 275 280 285

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Cys Cys Met Lys Glu
 290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Asn Gly Ile
 305 310 315 320

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile
 325 330 335

Asp Pro Ser His Ala Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Met Trp Lys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val

355		360		365											
Thr	Leu	Thr	Arg	Trp	Lys	Ser	His	Leu	Gln	Asn	Tyr	Thr	Val	Asn	Asp
370						375					380				
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Asp	Arg	Tyr	Val	Ala	Thr	Leu
385					390					395					400
Thr	Ala	Arg	Asn	Leu	Val	Gly	Lys	Ser	Asp	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Ile
				405					410					415	
Pro	Ala	Cys	Asp	Phe	Gln	Ala	Thr	His	Pro	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Ala
			420					425					430		
Phe	Pro	Lys	Asp	Asn	Met	Leu	Trp	Val	Glu	Trp	Thr	Thr	Pro	Arg	Glu
		435					440						445		
Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Ile	Leu	Glu	Trp	Cys	Val	Leu	Ser	Asp	Lys	Ala
450						455					460				
Pro	Cys	Ile	Ala	Asp	Trp	Gln	Gln	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	His	Arg	Thr
465					470					475					480
His	Leu	Arg	Gly	Asn	Leu	Ala	Glu	Ser	Lys	Cys	Tyr	Leu	Ile	Thr	Val
				485					490					495	
Thr	Pro	Val	Tyr	Ala	Asp	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Glu	Ser	Ile	Lys	Ala
			500					505					510		
Tyr	Leu	Lys	Gln	Ala	Pro	Pro	Ser	Lys	Gly	Pro	Thr	Val	Arg	Thr	Lys
		515					520					525			
Lys	Val	Gly	Lys	Asn	Glu	Ala	Val	Leu	Glu	Trp	Asp	Gln	Leu	Pro	Val
530						535					540				
Asp	Val	Gln	Asn	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Arg	Thr
545					550					555					560
Ile	Ile	Gly	Asn	Glu	Thr	Ala	Val	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	His	Thr	Glu
				565					570					575	
Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Met	Val	Arg	Met
			580					585					590		
Ala	Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Gly	Gly	Lys	Asp	Gly	Pro	Glu	Phe	Thr	Phe
		595					600					605			

Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
 610 615 620

Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
 625 630 635 640

Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
 645 650 655

Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
 660 665 670

Arg His Asn Phe Ser Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
 675 680 685

Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
 690 695 700

Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
 705 710 715 720

Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
 725 730 735

Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
 740 745 750

Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
 755 760 765

His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
 770 775 780

Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
 785 790 795 800

His Val Asp Gly Ser Asp Asp Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
 805 810 815

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
 820 825 830

Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu
 835 840 845

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Glu
 850 855 860

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Pro Phe Gly Pro Gly
865 870 875 880

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Ile Gly Met Glu Ala Ala
885 890 895

Ile Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln
900 905 910

Gly Gly Tyr Met Pro Gln
915