

OZET**SERUM AMİLOİD P TUREVLERİ VE BUNLARIN
PREPARASYONU VE KULLANIMI**

5

Mevcut buluşun bir yönü, bir insan SAP polipeptiti üzerindeki bir glikan yapısının, SAP polipeptitinin biyolojik aktivitesini, insan serumundan izole edilmiş, karşılık gelen bir vahşi tip SAP örneğine göre arttırılabileceğine dair yapılan sürpriz keşif ile ilgilidir. Açıklama,

10

hem varyant insan SAP polipeptitleri hem de bunları yapmaya yönelik yöntemler sunar. Özellikle mevcut buluş, arzu edilen bir glikosilasyon şablonuna sahip bir insan SAP polipeptiti gibi SAP polipeptitleri üretmek için şeker tortularının in vitro ve in vivo ilavesi, delesyonu veya modifikasyonuna yönelik yöntemler ve kompozisyonlar sunar.

15

İSTEMLER

1. Bir N-bağlı oligosakkarit zincirini içeren bir rekombinant glikosile edilmiş insan Serum Amiloit P (SAP) polipeptidini içeren bir farmasötik bileşim olup, burada oligosakkarit zincirinin en az bir dalı, bir α 2,3-bağlı siyalik asit parçası ile sona erer ve burada bileşim insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'tan en az %50 oranda daha az α 2,6-bağlı siyalik asit parçalarını içerir.
2. İstem 1'e göre farmasötik bileşim olup, burada bileşim insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'den en az %75, en az %85 ya da en az %95 daha az α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımlarını içerir.
3. İstem 1'e göre farmasötik bileşim olup, burada bileşim α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımlarından büyük oranda aridir.
4. 1 ila 3 arasındaki istemlerden herhangi birine göre farmasötik bileşim olup, burada polipeptit, SEK.KİM.NO:1'in amino asit sekansı ile en az %85, en az %90, en az %95 ya da en az %99 özdeş olan bir amino asit sekansını içerir ya da SEK.KİM.NO:1'in amino asit sekansını içerir.
5. 1 ila 4 arasındaki istemlerden herhangi birine göre farmasötik bileşim olup, burada N-bağlantılı oligosakkarit zinciri tercihen Man[(α 1,6)-(Man(α 1,3)]-Man((β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)-Asn'nin bir pentasakkarit çekirdeğini içerir.

6. 1 ila 5 arasındaki istemlerden herhangi birine göre farmasötik bileşim olup, burada oligosakkarit zinciri NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 yapısına sahip olan en az bir dalı içerir.

5

7. 1 ila 6 arasındaki istemlerden herhangi birine göre farmasötik bileşim olup, burada polipeptit tercihen, bir SAP domainini ve bir ya da daha fazla heterolog domaini içeren bir füzyon proteindir.

10 **8.** İstem 7'ye göre farmasötik bileşim olup, burada bir ya da daha fazla heterolog domain, in vivo kararlılık, in vivo yarı-ömür, alım/tatbik, doku lokalizasyonu ya da dağıtımı, protein komplekslerinin oluşumu ve/veya saflaştırma arasından bir ya da daha fazlasını artırır.

15 **9.** 1 ila 8 arasındaki istemlerden herhangi birine göre farmasötik bileşim olup, burada polipeptit bir ya da daha fazla modifiye edilmiş amino asit tortusunu içerir.

20 **10.** İstem 9'a göre farmasötik bileşim olup, burada bir ya da daha fazla modifiye edilmiş amino asit tortusu, bir PEGlenmiş amino asidi, bir prenilatlanmış amino asidi, bir asetilatlanmış amino asidi, bir biyotinilatlanmış amino asidi ve/veya bir organik türetme ajanına konjuge edilmiş bir amino asidi içerir.

25 **11.** İstem 9'a ya da 10'a göre farmasötik bileşim olup, burada bir ya da daha fazla modifiye edilmiş amino asit tortusu, in vivo stabilite, in vivo yarı ömür, alım/tatbik, doku lokalizasyonu ya da dağıtımı,

protein komplekslerinin oluşumu ve/veya saflaştırma arasından birini ya da daha fazlasını arttırır.

12. 1 ila 11 arasındaki istemlerden herhangi birine göre farmasötik bileşim olup, burada oligosakkarit zincirinin bütün dalları tercihen α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımları ile sonlanır.

13. 1 ila 12 arasındaki istemlerden herhangi birine göre farmasötik bileşim olup, burada rekombinant SAP polipeptidi tercihen insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'ın bir karşılık gelen numunesinin yarısından daha az olan in vitro fibrositlerin içine monositlerin farklılaşmasını inhibe etmek için bir IC_{50} 'ye sahiptir.

14. 1 ila 13 arasındaki istemlerden herhangi birine göre farmasötik bileşim olup, burada SAP polipeptidi bir CHO hücresi içinde eksprese edilmiştir.

15. Bileşimin 1 ila 14 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim olduğu, monositlerin fibrositlerin içinde farklılaşmasının önlenmesinde kullanılmak üzere bir farmasötik bileşimdir.

16. Bileşimin 1 ila 14 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim olduğu, bir inflamatuvar rahatsızlık, bir fibrotik ya da fibroproliferatif rahatsızlık, bir hipersensitivite rahatsızlığı, bir otoimmün rahatsızlık ya da mukozit arasından seçilen bir hastalığın ya da rahatsızlığın tedavi edilmesinde ya da önlenmesinde kullanılmak üzere bir farmasötik bileşimdir.

17. Monositlerin fibrositlerin içine farklılaşmasını inhibe etmek için kullanılmak üzere bir glikosile edilmiş insan Serum Amiloit P (SAP) polipeptidi olup, burada SAP polipeptidi, bir N-bağlantılı oligosakkarit zincirini içerir ve burada oligosakkarit zincirinin en az 5 bir dalı, bir α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımı ile sona erer.

TARİFNAME**SERUM AMİLOİD P TUREVLERİ VE BUNLARIN**

5

PREPARASYONU VE KULLANIMI**BULUŞUN GEÇMİŞİ**

Serum Amiloid P (SAP), proteinlerin pentraksin familyasının bir üyesidir. SAP, karaciğer tarafından salgılanır ve kanda stabil bir pentamer şeklinde dolaşır. Önceki araştırmalar, SAP'ın, immün tepkisinin başlangıç hem de çözülme fazlarında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. SAP, bakterilerin yüzeyi üzerindeki şeker tortularına bağlanabilir ve böylelikle bunların opsonizasyonunu ve antijen sunan hücreler tarafından yutulmasını promote edebilir. SAP ayrıca bir immün tepkisinin çözülmesinde apoptotik hücreler tarafından üretilen serbest DNA'ya ve kromatine de bağlanarak bu antijenlere karşı ikincil bir enflamatuvar tepkiyi engeller. SAP'nin bağladığı moleküller, SAP'nin, FcγRII (CD32) ve FcγRIII (CD 16) için özel bir afiniteye üç klasik Fcγ reseptörünün (FcγR) tamamına bağlanma kabiliyetinden dolayı hücre dışı alanlardan çıkarılır. Reseptöre bağlandıktan sonra SAP ve her eklenmiş kompleks genellikle hücre tarafından içselleştirilir ve işlenir.

Heegaard et al. (1999), Journal of Chromatography A, 853(1-2):189-195, kapiler elektroforezinin iki önemli özelliğinden yararlanarak insan SAP bileşeninden bir heparin-bağlayıcı glikopeptidinin (T3) karakterizasyonunu tarif eder. Siebert et al. (1995), FEBS Letters,

371(1):13-16, her bir monomerin tekli N-glikanından siyalik asit yarımlarının çıkarılmasının SAP'nin ayrı kimyasal olarak indüklenmiş dinamik nükleer polarizasyonlu (CIDNP)-reaktif amino asitlerinin yüzey temsilini bariz bir şekilde etkilediğini gösterir. Benzer şekilde, Siebert et al. (1997), *Glycoconjugate Journal*, 14(8):945-949 her bir monomerin tekli N-glikanından siyalik asit yarımlarının çıkarılmasının SAP'nin ayrı CIDNP-reaktif amino asitlerinin yüzey sunumunu bariz bir şekilde etkilediğini keşfetmiştir. Boysen et al. (2004), *Protein Expr Purif*, 35(2):284-92, metilotrofik maya *Pichiapastoris*'teki insan serumu amiloit P bileşeninin (SAP) ekspresyonunu tarif eder. Kiernan et al. (2004), *Proteomics*; 4(6):1825-1829 bir afinite kütle spektrometrisine dayanan proteomik teknoloji vasıtasıyla SAP'nin doğrudan insan plazma ve idrar örneklerinden karakterizasyonunu sağlar.

15 Son zamanlarda SAP'nin, fibrozla alakalı bozukluklar, hiperduyarlılık bozuklukları, otoimmün bozukluklar, mukozit ve enflamatuvar bozukluklar, örn., mikrobiyal enfeksiyonun neden oldukları dahil olmak üzere çeşitli bozuklukları tedavi edecek bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Bakınız örneğin ABD Patent

20 Başvurusu Seri. No. 11/707.333; 12/217.617; 12/720.845 ve 12/720.847. İnsan hastalıklarının tedavisine yönelik protein terapötikleri, sağlık endüstrisinde devrim yaratmıştır. Bununla birlikte bir protein terapötiğinin gerekli potansa sahip olarak ve/veya bir terapötik ajan olarak faydalı olmak için yeterli miktarda üretilmesi

25 konusunda birçok güçlük vardır. Birçok potansiyel terapötik ajan, plazma yarı ömrü gibi biyolojik aktivitesinin doğal yollarla türetilen proteine göre artması için modifiye edilir. Polipeptitleri yeterli miktarda üretmek için genellikle rekombinant ekspresyon teknolojisi

hayata geçirilir. Ne yazık ki birçok rekombinant sistem, biyolojik özellikleri doğal yollarla türetilen formlardan farklı olan ki bu durum, bir terapötik ürünün farmakokinetiklerini, güvenliğini ve etkinliğini etkileyebilir, polipeptitler üretir.

- 5 Böylelikle hala SAP polipeptitlerinin ve bunların üretilmesine yönelik olup insanların terapötik tedavisine uygun yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

OZET

10

Mevcut buluş, istemler tarafından tanımlanır. Daha detaylı olarak, mevcut buluş, bir N-bağlantılı oligosakkarit zincirini içeren bir rekombinant glikosile edilmiş insan Serum Amiloit P (SAP) polipeptidini içeren bir farmasötik bileşim ile ilgilidir, burada

15 oligosakkarit zincirinin en az bir dalı, bir α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımı ile sona erer ve burada bileşim insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'tan en az %50 oranda daha az α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımalarını içerir. Farmasötik tercihen insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'den en az %75, en az %85 ya da en az %95 daha

20 az α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımalarını içerir. Farmasötik tercihen α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımalarından büyük oranda aridir. Polipeptit tercihen, SEK.KİM.NO:1'in amino asit sekansı ile en az %85, en az %90, en az %95 ya da en az %99 özdeş olan bir amino asit sekansını içerir ya da SEK.KİM.NO:1'in amino asit sekansını içerir.

25 N-bağlantılı oligosakkarit zinciri tercihen Man[(α 1,6-)-(Man(α 1,3)]-Man((β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)-Asn'nin bir pentasakkarit çekirdeğini içerir.

Oligosakkarit zinciri tercihen NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 yapısına sahip olan en az bir dalı içerir. Polipeptit tercihen, bir SAP domainini ve bir ya da daha fazla heterolog domaini içeren bir füzyon proteinidir. Daha tercihen bir ya da daha fazla heterolog domain, in vivo kararlılık, in vivo yarı-ömür, alım/tatbik, doku lokalizasyonu ya da dağıtım, protein komplekslerinin oluşumu ve/veya saflaştırma arasından bir ya da daha fazlasını arttırır. Polipeptit tercihen bir ya da daha fazla modifiye edilmiş amino asit tortusunu içerir. Daha tercihen, bir ya da daha fazla modifiye edilmiş amino asit tortusu, bir PEGlenmiş amino asidi, bir prenilatlanmış amino asidi, bir asetilatlanmış amino asidi, bir biyotinilatlanmış amino asidi ve/veya bir organik türetme ajanına konjuge edilmiş bir amino asidi içerir. Çok daha tercihen, bir ya da daha fazla modifiye edilmiş amino asit tortusu, in vivo stabilite, in vivo yarı ömür, alım/tatbik, doku lokalizasyonu ya da dağıtımı, protein komplekslerinin oluşumu ve/veya saflaştırma arasından birini ya da daha fazlasını arttırır. Oligosakkarit zincirinin bütün dalları tercihen α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımları ile sonlanır. Rekombinant SAP polipeptidi tercihen insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'ın bir karşılık gelen numunesinin yarısından daha az olan in vitro fibrositlerin içine monositlerin farklılaşmasını inhibe etmek için bir IC₅₀'ye sahiptir. SAP polipeptidi tercihen bir CHO hücresi içinde eksprese edilmiştir. Mevcut buluş aynı zamanda, monositlerin fibrositlerin içinde farklılaşmasının önlenmesinde kullanılmak üzere bir farmasötik bileşim ile ilgilidir, burada bileşim yukarıda ve istemlerde tanımlandığı gibi buluşun bileşimidir. Mevcut buluş aynı zamanda, bir inflamatuvar rahatsızlık, bir fibrotik ya da fibroproliferatif rahatsızlık, bir hipersensitivite rahatsızlığı, bir

otoimmün rahatsızlık ya da mukozit arasından seçilen bir hastalığın ya da rahatsızlığın tedavi edilmesinde ya da önlenmesinde kullanılmak üzere bir farmasötik bileşim ile ilgili olup, burada bileşim yukarıda ve istemlerde tanımlandığı gibi buluşun bileşimidir.

- 5 Nihai olarak, mevcut buluş monositlerin fibrositlerin içine diferansiyasyonunu inhibe etmek için kullanılmak üzere bir Glikosile edilmiş insan Serum Amiloit P (SAP) polipeptidi ile ilgili olup, burada SAP polipeptidi, bir N-bağlantılı oligosakkarit zincirini içerir ve burada oligosakkarit zincirinin en az bir dalı, bir α 2,3-bağlantılı siyalik asit
- 10 yarımı ile sona erer.

- Burada aynı zamanda varyant Serum Amiloit P (SAP) polipeptitleri ve bunları üretme yöntemleri tarif edilmiştir. Aynı zamanda, tercih edilen bir glikosilasyon şablonuna sahip olan varyant SAP polipeptitlerini üretmek için şeker tortularının in vivo eklenmesi, delesyonu ya da
- 15 modifikasyonu için yöntemler ve bileşimler tarif edilmiştir.

Belirli yönlerde, aynı zamanda bir glikosile edilmiş insan SAP polipeptidi tarif edilmiş olup, bir α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımı ile sona eren en az bir dala sahip olan bir N-bağlantılı ya da O-bağlantılı oligosakkarit zincirini içerir.

- 20 Belirli yönlerde, aynı zamanda bir glikosile edilmiş insan SAP polipeptidi tarif edilmiş olup, insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'den en az %50 daha az α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımına sahip olan bir N-bağlantılı ya da O-bağlantılı oligosakkarit zincirini içerir.

- 25 Belirli yönlerde, aynı zamanda bir hücre içinde bir SAP polipeptidinin eksprese edilmesini ve hücreden SAP polipeptidinin izole edilmesini içeren bir glikosile edilmiş insan SAP polipeptidini yapmak için

yöntemler tarif edilmiştir. Hücre bir CHO hücresi olabilir. Belirli yönlerde, hücre bir CHO-S hücresidir.

Belirli yönlerde, aynı zamanda bir insan SAP polipeptidini yapmak için yöntemler tarif edilmiş olup, bu yöntemler bir CHO hücresinin içinde bir insan SAP polipeptidinin eksprese edilmesini ve hücreden insan SAP polipeptidinin izole edilmesini içerir.

Belirli yönlerde, aynı zamanda, bir N-bağlantılı ya da O-bağlantılı oligosakkarit zinciri bulunan bir glikosile edilmiş insan SAP polipeptidinin sağlanması ve modifiye edilmiş bir glikosile edilmiş SAP polipeptidini üretmek için SAP polipeptidinin N-bağlantılı ya da O-bağlantılı oligosakkarit zincirinin enzimatik ya da kimyasal olarak değiştirilmesini içeren bir insan SAP polipeptidini yapmak için yöntemler tarif edilmiştir.

Belirli yönlerde, aynı zamanda bir insan SAP polipeptidini yapma yöntemleri de tarif edilmiş olup, yöntemler insan SAP polipeptidinin sağlanması ve bir N-bağlantılı ya da O-bağlantılı oligosakkaridi içeren bir glikosile edilmiş SAP polipeptidini üretmek için SAP polipeptidinin enzimatik ya da kimyasal olarak değiştirilmesini içerir.

Belirli yönlerde, aynı zamanda, bir CHO hücresi içinde bir SAP polipeptidinin eksprese edilmesini ve SAP polipeptidinin hücreden izole edilmesini içeren bir proses ile hazırlanan bir insan SAP polipeptidi tarif edilmiştir.

Belirli yönlerde, aynı zamanda bir α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımı ile sona eren oligosakkarit zincirinin en az bir dalına sahip olan bir N-bağlantılı oligosakkarit zinciri bulunan bir insan SAP polipeptidini içeren bir CHO hücresi tarif edilmiştir.

Belirli yönlerde, aynı zamanda, bir insan SAP polipeptidini kodlayan bir polinükleotit sekansını içeren bir CHO hücresi tarif edilmiştir.

Belirli yönlerde aynı zamanda insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'ın bir karşılık gelen numunesinin yarısından daha az, üçte birinden daha az, dörtte birinden daha az, onda birinden daha az ya da yüzde birinden daha az olan in vitro olarak fibrositlerin içine monositlerin farklılaşmasını inhibe etmek için bir IC₅₀'ye sahip olan bir insan SAP polipeptidi tarif edilmiştir.

Burada tarif edilen insan SAP polipeptitleri bir N-bağlantılı oligosakkarit zincirine sahip olabilir. N-bağlantılı oligosakkarid zincirinin en az bir dalı, bir α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımı ile sona erebilir. N-bağlantılı oligosakkarid zinciri, insan serumundan izole edilen bir doğal tip SAP'tan en az %50 daha az α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımına sahip olabilir. N-bağlantılı oligosakkarid zincirinin bütün dalları α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımaları ile sona erebilir. N-bağlantılı oligosakkarid zinciri α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımalarından büyük oranda ari olabilir. Burada tarif edilen glikovaryant SAP polipeptitleri, bir ya da daha fazla dalı içerebilir, örneğin N-bağlantılı oligosakkarid zinciri iki antenli, üç antenli, dört antenli ya da beş antenli bir yapıya sahip olması ile karakterize edilebilir. N-bağlantılı oligosakkarid zinciri, bir Man[(α 1,6)-(Man(α 1,3)]-Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)-Asn pentasakkarit çekirdeğini içerebilir. N-bağlantılı oligosakkarid zinciri NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 yapısına sahip olan en az bir dalı içerebilir. N-bağlantılı oligosakkarid zincirinin en az bir dalı, galaktoz ve N-asetilglukosaminden büyük oranda ari olabilir. N-bağlantılı oligosakkarid zincirinin bütün dalları galaktoz ve N-asetilglukosaminden büyük oranda ari olabilir. N-bağlantılı oligosakkarid zincirinin en az bir dalı, bir ya da daha fazla mannoz tortusunu içerebilir. N-bağlantılı oligosakkarit zinciri, en az bir fukoz

tortusunu içerebilir. Burada tarif edilen glikovaryant SAP polipeptitlerinin herhangi biri en az bir modifiye edilmiş glikosile tortusunu içerebilir. Bir modifiye edilmiş glikosile tortusu, suda çözünebilen ve çözünemeyen polimerler, terapötik yarımlar, 5 diyagnostik ajanlar ve biyomoleküller arasından seçilen bir ya da daha fazla modifiye edici gruba konjuge edilebilir.

Belirli yönlerde, yine burada tarif edilen SAP polipeptidi, bir rekombinant polipeptit olabilir. Yine burada tarif edilen SAP polipeptidi SEK.KİM.NO. 1, 2, 3 ya da 4 ile en az %85, %90, %95, 10 %96, %97, %98, %99 ya da %100 özdeş olan bir amino asit sekansını içerebilir. SAP polipeptidi bir insan SAP proteini olabilir. Yine burada tarif edilen bir insan SAP polipeptidi SEK.KİM.NO. 1 ile en az %85, %90, %95, %96, %97, %98, %99 ya da %100 özdeş olan bir amino asit sekansını içerebilir.

15 Belirli yönlerde, yine burada tarif edilen insan SAP polipeptidi bir SAP domainini ve bir ya da daha fazla heterolog domaini içeren bir füzyon proteini olabilir. Heterolog domain, in vivo stabilite, in vivo yarı ömür, alım/tatbik, doku lokalizasyonu ya da dağılımı, protein komplekslerinin oluşumu ve/veya saflaştırma arasından bir ya da daha 20 fazlasını arttırabilir.

Belirli yönlerde, yine burada tarif edilen insan SAP polipeptidi örneğin bir PEGlenmiş amino asit, bir glikosile edilmiş (örneğin, O-bağlantılı glikosilasyonlu) amino asit, bir prenilatlı amino asit, bir asetilatlı amino asit, bir biyotinilatlı amino asit ve/veya bir organik 25 türetme ajanına konjuge edilmiş bir amino asit gibi bir ya da daha fazla modifiye edilmiş amino asit tortusunu içerebilir. Modifiye edilmiş amino asit tortuları in vivo stabilite, in vivo yarı ömür, alım/tatbik, doku lokalizasyonu ya da dağılımı, protein

komplekslerinin oluşumu ve/veya saflaştırma arasından bir ya da daha fazlasını arttırabilir.

Burada tarif edilen insan SAP polipeptitleri, insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'nın bir karşılık gelen numunesine rölatif olarak artmış biyolojik aktiviteye sahip olabilir. Belirli yönlerde, burada tarif edilen SAP polipeptitleri, insan serumundan izole edilen doğal tip SAP'nın bir karşılık gelen numunesinin yarısından daha az, üçte birinden daha az, dörtte birinden daha az, onda birinden daha az ya da yüzde birinden daha az olan in vitro fibrositlerin içine monositlerin diferansiyasyonunu inhibe etmek için bir IC₅₀'ye sahip olabilir.

Belirli yönlerde, burada tarif edilen insan SAP polipeptitlerinin herhangi birini yapma yöntemleri bir N-bağlantılı ya da O-bağlantılı oligosakkaridi SAP polipeptidine bağlamak ya da SAP polipeptidinin mevcut N-bağlantılı ya da O-bağlantılı oligosakkarit zincirini modifiye etmek için SAP polipeptidinin enzimatik ya da kimyasal olarak değiştirildiği bir ilave adımı içerir. SAP polipeptidinin enzimatik ya da kimyasal olarak değiştirilmesi, glikosiltransferazlar, glikosidazlar ve fosfatazlar arasından seçilen bir ya da daha fazla enzimatik protein ile SAP polipeptidinin muamele edilmesini içerebilir. SAP polipeptidinin enzimatik ya da kimyasal olarak değiştirilmesi işlemi bir ya da daha fazla şeker prekürsörünün varlığında etkilenebilir. Uygun şeker prekürsörleri arasında, UDP-N-asetilglukosamin, CMP-N-glikolilnöraminik asit UDP-N-asetilgalaktosamin, CMP-N-asetilnöraminik asit, UDP-galaktoz ve GDP-fukoz bunlarla sınırlı olmaksızın yer alır. SAP polipeptidinin enzimatik ya da kimyasal olarak değiştirilmesi işlemi bir ya da daha fazla terminal α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımının N-bağlantılı ya da O-bağlantılı oligosakkarit zincirinden çıkarabilir. İzole edilmiş SAP

polipeptidinin enzimatik ya da kimyasal olarak değiştirilmesi işlemi oligosakkarit zinciri üzerindeki bir ya da daha fazla terminal α 2,6-bağlantılı siyalik asit yarımının bir ya da daha fazla terminal α 2,3-bağlantılı siyalik asit yarımı ile değiştirebilir.

- 5 Burada aynı zamanda, bir memelide kullanımı uygun olan burada tarif edilen insan SAP polipeptitlerinin farmasötik preparasyonları da tarif edilmiştir. Burada tarif edilen farmasötik preparasyonlar, burada tarif edilen SAP polipeptitlerinin en az birini ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı içerir. Farmasötik preparasyon ayrıca bir ilave
- 10 etkin maddeyi de içerebilir. Farmasötik preparasyon, bir yavaş salımlı formülasyon olarak hazırlanabilir. Burada tarif edilen farmasötik preparasyonlar, bir hastaya topikal olarak, enjeksiyonla, intravenöz enjeksiyonla, inhalasyonla, devamlı ikmalle ya da pompayla tatbik için uygundur.
- 15 Burada aynı zamanda, burada tarif edilen SAP polipeptitlerinin bir ya da daha fazlasının terapötik olarak etkili bir miktarının ihtiyacı olan bir hastaya tatbik edilmesiyle SAP'a yanıt veren rahatsızlıkların ya da hastalıkların tedavi edilmesi ya da önlenmesi için yöntemler tarif edilmiştir. SAP'a yanıt veren rahatsızlıkların ya da hastalıkların
- 20 örnekleri arasında fibrotik ya da fibroproliferatif rahatsızlıklar ya da hastalıklar, hipersensitivite rahatsızlıkları ya da hastalıkları, otoimmün rahatsızlıkları ya da hastalıkları, enflamatuvar rahatsızlıklar ya da hastalıklar ve mukozit bunlarla sınırlı olmaksızın yer alır. Burada tarif edilen SAP polipeptidi bir hastaya topikal olarak, enjeksiyonla,
- 25 intravenöz enjeksiyonla, inhalasyonla, devamlı ikmalle ya da pompayla ya da bunların bir kombinasyonu ile tatbik edilebilir. Burada tarif edilen SAP polipeptidi bir ya da daha fazla ilave etkin madde ile tatbik edilebilir.

CİZİMLERİN KISA TARİFLERİ

- Şekil 1. Fibrosit farklılaşma deneyi. ELISA bazlı bir deney, monositlerin SAP polipeptitleri ile inkübasyonundan sonra MDC üretimini ölçmek için kullanıldı. Y eksenini, insan serumundan türetilmiş SAP'nin (hSAP), CHO-S hücrelerinden izole edilmiş rekombinant insan SAP (rhSAP) ile karşılaştırmalı olarak ortalama potansını (yani 7 bağımsız deneyin ortalamasını) gösterir. hSAP'nin nispi aktivitesi, 1.0'a ayarlanır.
- Şekil 2. Varyant SAP polipeptitlerinin glikan yapısal analizi. Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre (LCMS) analizi (A) ve Anyon Aışverişli Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (AEX-HPLC) analizi (B), CHO-S hücrelerinden izole edilmiş, gliko-yeniden modellenmiş rekombinant insan SAP üzerindeki sialik asit bağlarını belirlemek için kullanıldı. Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre (LCMS) analizi (C) ve Anyon Aışverişli Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (AEX-HPLC) analizi (D), gliko-yeniden modellenmiş hSAP (insan serumundan türetilmiş SAP) üzerindeki sialik asit bağlarını belirlemek için kullanıldı. Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre (LCMS) analizi (E) ve Anyon Aışverişli Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (AEX-HPLC) analizi (F), SAP glikanlar üzerindeki terminal 2,3 bağı sialik asitlerin sayısını arttırmak amacıyla bir α 2,3-sialiltransferaz ile işleme tabi tutulmuş rhSAP üzerindeki sialik asit bağlarını belirlemek için kullanıldı. LCMS rakamları için X eksenini, Dalton cinsinden kütleyi temsil eder ve Y eksenini, nispi yoğunluğu temsil eder. HPLC eserleri için X eksenini, dakika cinsinden süredir ve Y eksenini, absorbans ünitesi (mAU)'dur.

Şekil 3. Fibrosit farklılaşma deneyi. ELISA bazlı bir deney, monositlerin SAP varyant polipeptitleri ile inkübasyonundan sonra MDC üretimini ölçmek için kullanıldı. Y eksenini, her SAP varyantının, aktivitesi 1.0'a ayarlanmış (en soldaki çubuğa bakınız) bir hSAP referans standardına kıyasla ortalama nispi aktivitesini gösterir.

Şekil 4. Fibrosit farklılaşma deneyi. Monositler, hMCSF ile işleme tabi tutuldu ve ardından fibrosit farklılaşması açısından nicelendirildi. X eksenini, donör monositler ile inkübe edilmiş hMCSF konsantrasyonunu temsil eder. Y eksenini, beşinci günde fibrosit proliferasyonunun, 5.0×10^4 hücre başına fibrositlerin sayılması yoluyla ölçülen miktarını gösterir.

Şekil 5. Fibrosit farklılaşma deneyi. Monositler, hSAP ile işleme tabi tutuldu ve ardından fibrosit farklılaşması açısından nicelendirildi. X eksenini, donör monositler ile inkübe edilmiş hSAP konsantrasyonunu gösterir. Y eksenini, beşinci günde fibrosit proliferasyonunun, 5.0×10^4 hücre başına fibrositlerin sayılması yoluyla ölçülen miktarını gösterir.

DETAYLI TARİF

20

Tanıtım

Doğal yoldan meydana gelen peptitlerin büyük kısmı, birincil peptit zinciri uzunluğu boyunca belirli amino asitlere yönelik spesifik bağlar üzerinden peptite eklenmiş karbohidrat yarımlarına (yani glikanlara) sahiptir, bu şekilde "glikopeptitler" oluşturulur. Belirli bir peptit üzerindeki glikosilasyon şablonu, bu peptitin fonksiyonu için muazzam etkilere sahip olabilir. Örneğin bir peptit üzerindeki N bağlı

glikanların yapısı, proteaz yatkınlığı, hücre içi trafik, salgı, doku hedefleme, biyolojik yarı ömür ve antijeniklik dahil peptitin çeşitli karakteristiklerini etkileyebilir. Bu karakterlerin bir veya daha fazlasının değiştirilmesi, bir peptitin kendi doğal ortamındaki etkinliğini büyük ölçüde etkiler.

Doğal yoldan meydana gelen glikopeptitlerde bulunan glikan yapıları tipik olarak N bağlı ve O bağlı glikanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Okaryotik hücrelerde eksprese edilen peptitler tipik olarak asparagin-X-serin/treonin sekansını ihtiva eden peptit birincil yapısındaki sahalarda asparagin tortuları üzerinde N glikosile edilir, buradaki X, prolin ve aspartik asit dışında herhangi bir amino asit olabilir. Bu peptitlerin karbohidrat kısmı, bir N bağlı glikan veya N bağlı oligosakarit olarak bilinir. Erken N glikosilasyon olayları, endoplazmik retikulumda (ER) meydana gelir ve memelilerde, bitkilerde, böceklerde ve diğer yüksek ökaryotlarda konserve edilir. İlk olarak on dört şeker tortusu içeren bir oligosakarit zinciri, bir lipit taşıyıcı molekül üzerinde yapılandırılır. Yeni oluşan peptit, Translasyon edilip ER içine yerleştikçe bütün oligosakarit zinciri, bir membran bağlı glikosiltransferaz enziminin katalize ettiği bir reaksiyonda asparagin tortusunun amid grubuna transfer edilir. N bağlı glikan hem ER'de hem de Golgi aparatında tekrar işlenir. İleri proses genel olarak çıkarılan ve eklenen şeker tortuları için spesifik glikosilazların ve glikosiltransferazların katalizörlük ettiği reaksiyonlarda şeker tortularından bazılarının çıkarılmasını ve başka tortularının ilave edilmesini içerir.

Tipik olarak N bağlı glikanların nihai yapıları, içinde peptitin üretildiği organizmaya bağlıdır. Örneğin bakteriler içinde üretilen peptitler genel olarak glikosile edilmemiştir. Böcek hücrelerinde

eksprese edilen peptitler tipik olarak yüksek mannoz veya pausi-mannoz N bağı oligosakarit zincirleri içerir. Memeli hücre kültüründe üretilen peptitler genellikle türe ve hücre kültürü koşullarına bağı olarak farklı şekilde glikosile edilmiştir. Aynı türde ve aynı koşullar altında bile olsa glikosil zincirinde belirli bir miktar heterojenlikle 5 bazen karşılaşılır. Genel olarak bitki hücrelerinde üretilen peptitler, hayvan hücrelerinde üretilenlerden anlamlı düzeyde farklılık gösteren glikan yapıları içerir.

Bir peptitin glikosilasyon şablonunu özelleştirmeye yönelik, 10 Yayınlanmış Uluslararası Başvurular No. WO 99/22764, WO 98/58964 ve WO 99/54342 ve ayrıca ABD Pat. No. 5,047,335'te tarif edilen yöntemler dahil çeşitli yöntemler bu konuda önerilmiştir. Esasen peptitlerin in vitro glikosilasyonu için gerekli enzimlerin çoğu klonlanmış ve sekanslanmıştır. Bazı durumlarda bu enzimler, bir 15 peptit üzerindeki bir glikana spesifik şekerlerin ilave edilmesinde in vitro kullanılır. Başka durumlarda hücreler, arzu edilen bir şeker yarımının eksprese edilmiş bir peptite ilavesi hücre içinde meydana gelecek şekilde enzimlerin ve arzu edilen peptitlerin bir kombinasyonunu eksprese etmek üzere genetik olarak 20 yapılandırılmıştır.

Karbohidratların sentezinde başlıca iki enzim sınıfı kullanılır: Glikosiltransferazlar ve glikosidazlar. Glikosiltransferazlar, bir peptit üzerinde var olan oligosakarit yapılarını modifiye eder veya bunları ekler. Glycosiltransferazlar, iyi stereokimyasal ve regio-kimyasal 25 kontrole sahip spesifik ürünlerin üretilmesinde etkilidir. Glycosiltransferazlar, oligosakaritlerin hazırlanmasında ve özellikle memeli hücrelerinde üretilen peptitler üzerindeki terminal N- ve O bağı karbohidrat yapılarının modifiye edilmesinde kullanılır. Örneğin

glikopeptitlerin terminal oligosakaritleri tamamen sialile ve/veya fukozile edilerek glikopeptit farmakodinamiklerini ve başka çeşitli biyolojik özellikleri geliştirebilen glikosiltransferazlar kullanılarak daha tutarlı şeker yapıları sağlanabilir.

- 5 Glikosidazlar ayrıca eksoglikosidazlar (örn., β -mannosidaz, β -glukosidaz) ve endoglikosidazlar (örn., Endo-A, Endo-M) halinde sınıflandırılır. Glikosidazlar normalde bir glikosidik bağın hidrolizine katalizörlük eder. Bununla birlikte uygun koşullar altında bunlar, bu bağ
- 10 oluşturmak üzere kullanılabilir. Karbohidrat sentezi için kullanılan glikosidazların çoğu, eksoglikosidazlardır; glikosil transferi, substratın indirgeyici olmayan terminalinde meydana gelir. Glikosidaz, hidroliz ürünü vermek üzere suyla veya yeni bir glikosid veya oligosakarit üretmek üzere bir akseptör ile kesilen bir glikosil-enzim ara maddesinde bir glikosil donörünü bağlar. Bir
- 15 eksoglikosidaz kullanılan örnek bir yol, β -mannosidaz tesiri yoluyla oluşturulan β -mannosidaz bağı dahil tüm N bağı glikopeptitlerin öz trisakaritinin sentezidir (Singh ve arkadaşları, Chem. Commun. 993-994 (1996)). Bunların kullanımı, eksoglikosidazlardan daha az yaygın olmakla birlikte endoglikosidazlar da karbohidratların
- 20 hazırlanmasında kullanılır. Endoglikosidazlar, bir monosakarit yerine bütün bir oligosakarit zincirinin bir polipeptit üzerine transfer edilmesinde kullanılabilir. Oligosakarit fragmanları, endo- β -N-asetilglutozaminler örneğin endo-F ve endo-M kullanılarak substratlara ilave edilmiştir (Wang ve arkadaşları; Tetrahedron Lett.
- 25 37: 1975-1978; ve Haneda ve arkadaşları, Carbohidr. Res. 292: 61-70 (1996). Bu enzim sınıflarının her biri glikosile edilmiş peptitleri üretmek için başarıyla kullanılmıştır. Genel bir inceleme için

bakınız Crout ve arkadaşları, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 98-111. (1998).

Serum amiloid P (SAP), disk benzeri bir kompleks içinde kovalent olmayan şekilde birleşmiş beş özdeş alt üniteden veya "promoterden" oluşun, memelilerde doğal yoldan meydana gelen bir serum proteinidir. SAP, proteinlerin, bu siklik pentamerik yapı ile karakterize edilen pentraksin süperfamilyasına aittir. Klasik kısa pentraksinler arasında SAP ve ayrıca C ile reaktif protein yer alır (Osmand, A.P. ve arkadaşları, Proc. Nat. Acad. Sci., 74: 739-743, 1997). SAP normalde karaciğerde sentezlenir ve yirmi dört saatlik bir fizyolojik yarı ömre sahiptir. İnsan SAP alt ünitesinin sekansı, aşağıda açıklanmıştır, bu da Gen bank Erişim No. NP_001630'a ait 20-223. amino asitlere karşılık gelir (sinyal sekansı gösterilmemiştir).

15 HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLCFRAYS DLSRA
YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPV
HICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QD
SYGGKFD RSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLPANILD
WQALNYEIRGYVIKPLVWV (SEK.KİM.NO: 1)

20

Gallus gallus SAP alt ünitesinin sekansı aşağıda açıklanmıştır.

QEDLYRKVFVFREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFTVCLRSYTDLTRP
HSLFSYATKAQDNEILLFKPKPGEYRFYVGGKYVTFRVPENRGEW
EHVCASWESGSGIAEFWLNGRPWPRKGLQKGYEVGNEAVVMLG
QE QDAYGGGFDVYNSFTGEMADVHLWDAGLSPDKMRSAYLALR
LPPAPLAWGRLRYEAKGDVVVKPRLREALGA (SEK.KİM.NO: 2)

Bos taurus SAP alt ünitesinin sekansı aşağıda açıklanmıştır.

QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDLSRG
 YSLFSYNIHSKDNELLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTVRATEKFPSPVH
 ICTSWESSTGIAEFWINGKPLVKRGLKQGYAVGAHPKIVLGQEQDS
 YGGGFDKNQSFMGEIGDLYMWDSVLSPEEILLVYQGSSSISPTILD
 WQALKYEIKGYVIVKPMVWG (SEK.KİM.NO: 3)

- 5 Cricetulus migratorius SAP alt ünitesinin sekansı aşağıda açıklanmıştır.

QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFRTYTDLSRPHSLFSYNTKN
 KDNELLYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVVEEFASPVHFCTSWESSSGIADFWVNG
 IPWVKKGLKKGTYVKTQPSIILGQEQDNYGGGFDKSKQSFVGMGDLNMWDSVL
 TPEEIKSVYEGSWLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH (SEK.KİM.NO: 4)

- 10 Burada tarif edilen bir yön, bir insan SAP polipeptiti üzerindeki bir glikan yapısının, SAP polipeptitinin biyolojik aktivitesini, insan serumundan izole edilmiş, karşılık gelen bir vahşi tip SAP örneğine göre arttırabileceğine dair yapılan sürpriz keşif ile ilgilidir. Açıklamanın örnekleri ile gösterildiği gibi insan serumundan izole
- 15 edilmiş SAP, sadece α 2,6 bağlı sialik asit tortuları ihtiva eder. Buna karşılık CHO hücrelerinde üretilen rekombinant insan SAP, sadece α 2,3 bağlı sialik asit tortuları ihtiva eder. İn vitro hücre bazlı biyo-
- 20 deneyler kullanılarak α 2,3 bağlı sialik asit SAP polipeptitlerinin, insan serumundan izole edilmiş vahşi tip SAP'den (yani α 2,6 bağlı sialik asit yarımları içeren SAP'den) tutarlı şekilde daha yüksek aktiviteye sahip olacağı gösterildi. Buluşa ait varyant SAP polipeptitleri, artan

biyolojik potanslarına bağı olarak terapötik ajanlar olarak daha etkili olacaktır. Örneğin daha güçlü SAP varyantları, insan serumundan izole edilmiş vahşi tip SAP'ye göre daha düşük dozlama ve/veya daha az sıklıkta dozlama gerektirebilir. Mevcut açıklama hem varyant insan

5 SAP polipeptitleri hem de bunları yapmaya yönelik yöntemler sunar. Özellikle açıklama, arzu edilen bir glikosilasyon şablonuna sahip bir insan SAP polipeptiti üretmek için, şeker tortularının in vitro ve in vivo ilavesi, delesyonu veya modifikasyonuna yönelik yöntemler ve kompozisyonlar içerir.

10 Tanımlar

Aksi şekilde tanımlanmadığı sürece burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler genel olarak bu konuda sıradan deneyime sahip kişilerce ortak şekilde anlaşılabilir ve aynı anlamlara sahiptir. Genel olarak burada kullanılan terminoloji ve doku kültürü, moleküler

15 genetik, organik kimya ve nükleik asit kimyası ve hibridizasyon ile ilgili laboratuvar prosedürleri bu konuda iyi bilinmekte ve yaygın şekilde kullanılmakta olanlardır. Nükleik asit ve peptit sentezi için standart teknikler kullanılır. Teknikler ve prosedürler genellikle bu konudaki geleneksel yöntemlere ve çeşitli genel referanslara

20 (örn., Sambrook ve arkadaşları, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. baskı. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) uygundur ve bunlar da bu doküman boyunca sunulmuştur.

İngilizcede "a" ve "an" örnekleriyle ifade edilen "bir" tanımlayıcısı

25 burada tanımlayıcının ait olduğu dilbilgisel objeden birine veya birden fazlasına (yani en az birine) karşılık olarak kullanılır. Örnek olarak "bir eleman", bir eleman veya birden fazla eleman anlamına gelir.

Burada kullanıldığı gibi "tedavi" ve "tedavi etme" terimleri, arzu edilen bir farmakolojik ve/veya fizyolojik etkinin elde edilmesine karşılık gelir. Etki, bir bozukluğun veya bunun semptomunun kısmen veya tamamen önlenmesi açısından profilaktik olabilir ve/veya bir bozukluk ve/veya bozukluğa atfedilebilen olumsuz bir etki için kısmi veya tam bir iyileşme açısından terapötik olabilir. Burada kullanıldığı gibi "tedavi", bir memelide, özellikle bir insanda bir hastalığın tedavi edilmesini kapsar ve şunları içerir: (a) hayatta kalma süresinin uzatılması; (b) hastalığa bağlı ölüm riskinin azaltılması; (c) hastalığın inhibe edilmesi, yani bunun geliştirilmesinin durdurulması veya hastalığın ilerleme hızının azaltılması; ve (d) hastalığın yatıştırılması, yani hastalıkta gerileme sağlanması.

Burada kullanıldığı gibi bir bozukluk veya durumu "inhibe eden" veya "engellenen" bir terapötik, istatistiksel bir örnekte, tedavi edilmemiş bir kontrol örneğine göre tedavi edilmiş örnekte bozukluk veya durumun meydana gelmesini azaltan veya bozukluğun veya durumun bir veya daha fazla semptomunun tedavi edilmemiş kontrol örneğine göre başlamasını geciktiren veya azaltan bir bileşiktir.

Burada kullanıldığı gibi "süje" ve "hasta" terimleri, memeliler, örneğin insanlar dahil olmak üzere hayvanlara karşılık gelir. "Memeli" terimi, primatları, evcil hayvanları, örneğin köpekler, kediler, koyunlar, sığırlar, atlar, keçiler, domuzlar, fareler, sıçanlar, tavşanlar, kobaylar, kısıtlanmış hayvanlar, örneğin hayvanat bahçesi hayvanlarını ve vahşi hayvanları kapsar.

Burada kullanıldığı gibi "doku" terimi, bir organa veya cilt dokusu, akciğer dokusu, böbrek dokusu ve başka tip hücreler gibi özel hücre grubuna karşılık gelir.

"Terapötik etki" terimi, bu konuda kabul görmüştür ve hayvanlarda, özellikle memelilerde ve daha belirgin olarak insanlarda, farmakolojik açıdan aktif bir maddenin neden olduğu lokal veya sistemik bir etkiye karşılık gelir. "Terapötik açıdan etkili miktar" ifadesi, böyle bir maddenin, herhangi bir tedaviye uygulanabilecek makul bir fayda/risk oranında arzu edilen lokal veya sistemik etkiyi üreten miktarı anlamına gelir. Böyle bir maddenin terapötik açıdan etkili miktarı, tedavi edilen süjeye ve hastalık durumuna, süjenin kilosuna ve yaşına, hastalık durumunun şiddetine, uygulama tarzına bağlı olarak değişecektir ve bunlar da bu konuda sıradan bilgiye sahip kişilerce kolayca belirlenebilir. Örneğin burada tarif edilen bazı kompozisyonlar, böyle bir tedavi için geçerli makul bir fayda/risk oranında arzu edilen etkiyi üretmek için yeterli bir miktarda uygulanabilir.

Burada kullanıldığı gibi "nükleik asit" terimi, bir polinükleotide örneğin deoksiribonükleik aside (DNA) ve uygun durumlarda ribonükleik aside (RNA) karşılık gelir. Terim ayrıca denklemler olarak nükleotit analoglarından yapılmış RNA veya DNA analoglarını ve tarif edilen düzeneğe uygulanabilir olduğunda tek iplikçikli (sens veya antisens gibi) ve iki iplikçikli polinükleotiti kapsayacak şekilde anlaşılmalıdır.

"Peptitler", "proteinler" ve "polipeptitler" terimleri burada birbirlerinin yerine kullanılır. "Saflaştırılmış protein" terimi, bir hücre veya hücre lizati içindeki protein(ler) ile normalde bir arada bulunun diğer proteinlerden tercihen izole edilmiş veya başka şekilde önemli ölçüde bunları içermeyen bir protein veya proteinler preparasyonuna karşılık gelir. "Diğer hücre proteinlerinden önemli ölçüde arınmış" veya "diğer kirletici proteinlerden önemli ölçüde arınmış" terimi,

proteinlerin her birinin, %20'nin altında (kuru ağırlık olarak) kirletici protein içeren ve tercihen %5'in altında kirletici protein içeren tek tek preparasyonlarını kapsayacak şekilde tanımlanır. Proteinlerin her birinin fonksiyonel formları, bu konuda iyi bilindiği gibi klonlanmış bir gen kullanılarak saflaştırılmış preparasyonlar halinde hazırlanabilir. "Saflaştırılmış" terimi ile gösterilen molekülün, diğer biyolojik makro-moleküller, örneğin diğer proteinler (özellikle saflaştırılmış preparasyonlar olarak veya konu olan yeniden oluşturulmuş karışım içindeki fonksiyonları açısından bileşen proteinlerin karakteristiklerini önemli ölçüde maskeleyebilen, azaltabilen, bozabilen veya değiştirilebilen diğer proteinler) önemli ölçüde bulunmadan var olması kast edilir. Burada kullanıldığı gibi "saflaştırılmış" terimi tercihen aynı tipteki biyolojik makro-moleküllerin kuru ağırlık olarak en az %80, daha fazla tercihen ağırlık olarak %85, daha fazla tercihen ağırlık olarak %95-99 ve en fazla tercihen ağırlık olarak en az %99.8 oranında bulunması anlamına gelir (but su, tamponlar ve diğer küçük moleküller, örneğin moleküler ağırlığı 5000'in altında olan moleküller bulunabilir). Burada kullanıldığı gibi "saf" terimi tercihen hemen yukarıdaki "saflaştırılmış" ile aynı sayısal limitlere sahiptir.

"N bağlı" oligosakaritler, bir peptit omurgasına asparagin üzerinden, bir asparagin-N-asetilglukozamin bağı yoluyla bağlanmış oligosakaritlerdir. N bağlı oligosakaritler ayrıca "N-glikanlar" olarak anılır. Doğal yoldan meydana gelen N bağlı oligosakaritler, ortak bir Man[(α 1,6)-(Man(α 1,3)]-Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N) pentasakarit özüne sahiptir. N-asetilglukozamin, galaktoz, N-asetilgalaktozamin, fukoz ve sialik asit gibi periferik şekerlerin dallarının (ayrıca anten olarak anılır) varlığı veya sayısı açısından

farklılık gösterirler. İsteğe bağlı olarak bu yapı ayrıca bir öz fukoz molekülü ve/veya bir ksiloz molekülü ihtiva edebilir.

"Sialik asit" terimi, dokuz karbonluk karboksile edilmiş şekerlerden oluşan bir elemana karşılık gelir. Sialik asit familyasının en yaygın elemanı, N-asetilnöraminik asittir (sıklıkla Neu5Ac, NeuAc veya NANA şeklinde kısaltılır). Familyanın ikinci elemanı, N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc veya NeuGc) olup burada NeuAc'nin N-asetil grubu hidroksile edilmiştir. Üçüncü sialik asit familyası elemanı, 2-keto-3-deoksi-nonulosonik asittir (KDN) (Nadano ve arkadaşları, 10 (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori ve arkadaşları, J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). Ayrıca 9-ikame edilmiş sialik asitler örneğin bir 9-O-C₁C₆-asil-Neu5Ac, örneğin 9-O-laktıl-Neu5Ac veya 9-O-asetil-Neu5Ac, 9-deoksi-9-floro-Neu5Ac ve 9-azido-9-deoksi-Neu5Ac de dahildir. Sialik asit familyasının incelemesi için 15 bakınız örn., Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)).

"Genetik olarak yapılandırılmış" veya "rekombinant" hücre, hücrenin genetik materyalinde bir veya daha fazla modifikasyona sahip olan bir hücredir. Bu modifikasyonlar arasında bunlarla sınırlı olmamakla 20 birlikte genetik materyalin sokulması, genetik materyal delesyonları ve materyal stabil şekilde korunsun korunmasın, kromozom dışı olan genetik materyalin sokulması bulunur.

Burada kullanıldığı gibi "modifiye edilmiş şeker" terimi, burada tarif edilen bir proste bir peptitin bir amino asidi veya bir glikosil tortusu 25 üzerine enzimatik şekilde ilave edilmiş, doğal yoldan veya doğal olmayan yoldan meydana gelen bir karbohidrata karşılık gelir. Modifiye edilmiş şeker, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte şeker

nükleotitleri (mono-, di- ve tri-fosfatlar), aktifleştirilmiş şekerler (örn., glikosil halidler, glikosil mesilatlar) ve ne aktifleştirilmiş ne de nükleotit olan şekerler dahil bir dizi enzim substratı arasından seçilir. "Modifiye edilmiş bir şeker", "modifiye edilmiş bir grup" ile kovalent şekilde fonksiyonelleştirilmiş olabilir. Faydalı modifiye edici gruplar arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte suda çözülebilen ve çözülmeyen polimerler, terapötik yarımlar, tanı yarımları, biyo-moleküller bulunur. Modifiye edici grup ile fonksiyonelleştirme yeri, "modifiye edilmiş şekerin" bir peptite veya peptitin glikosil tortusuna enzimatik şekilde ilave edilmesini engellemeyecek olanlar arasından seçilir.

Varyant SAP Polipeptitleri

Kısmen açıklama varyant Serum Amiloid P (SAP) polipeptitleri sunar. Özellikle burada tarif edilen SAP varyantları, her biri birbirlerinden bağımsız olarak bir α 2,3 bağlı sialik asit yarımı ile sonlanan bir, iki, üç, dört, beş veya daha fazla dala sahip bir veya daha fazla N bağlı veya O bağlı oligosakarit zinciri içeren glikosile edilmiş insan SAP polipeptitlerini kapsar. N bağlı veya O bağlı oligosakarit zincirlerinin tüm dalları, α 2,3 bağlı yarımlarda sonlanabilir. Burada ayrıca insan serumundan türetilmiş bir vahşi tip SAP polipeptitinden en az %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55, %60, %65, %75, %80, %85 daha az veya hatta en az %95 daha az α 2,6 bağlı sialik asit yarımına sahip bir N bağlı veya O bağlı oligosakarit zinciri ihtiva eden glikosile edilmiş insan SAP polipeptitleri içeren SAP varyantları tarif edilir. N bağlı veya O bağlı oligosakarit zincirlerinin, α 2,6 bağlı sialik asit yarımlarından önemli ölçüde muaf olabilmesi, örn., insan serumundan türetilmiş bir vahşi tip SAP polipeptitine göre %80, %85, %90, %95,

%97, %98'den az veya hatta %99'dan az α 2,6 bağı sialik asit yarımına sahip olması tarif edilir. Burada tarif edilen glikovaryant SAP polipeptitleri, bir veya daha fazla dala sahip (örn., iki antenli, üç antenli, dört antenli, beş antenli, vb. yapıya sahip) bir N bağı oligosakarit veya O bağı zincir içerebilir. Buluşa ait SAP polipeptitleri, bir N bağı veya O bağı oligosakarit zinciri içerir, burada oligosakarit zincirinin bir, iki, üç, dört veya beş dalı, galaktoz ve N-asetilglukozaminden önemli ölçüde muaftır (örn., insan serumundan türetilmiş bir vahşi tip SAP polipeptitine göre %80, %85, %90, %95, %97, %98'den az veya hatta %99'dan az N-asetilglukozamine sahiptir). Burada tarif edilen bazı SAP polipeptitleri, galaktozdan ve N-asetilglukozaminden önemli ölçüde muaf olan (örn., insan serumundan türetilmiş bir vahşi tip SAP polipeptitine göre %80, %85, %90, %95, %97, %98'den az veya hatta %99'dan az galaktoza ve/veya N-asetilglukozamine sahip olan) N bağı veya O bağı oligosakarit zincirlerine sahiptir. Burada tarif edilen SAP polipeptitleri, bir N bağı veya O bağı oligosakarit zinciri içerir, buradaki oligosakarit zincirinin bir, iki, üç, dört veya beş dalı, bir veya daha fazla mannoz tortusu ihtiva edebilir. Burada tarif edilen SAP polipeptiti, $\text{Man}[(\alpha 1,6-)(\text{Man}(\alpha 1,3))-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)-\text{Asn}$ pentasakarit özüne sahip bir N bağı oligosakarit içerebilir. Bu pentasakarit özü ayrıca bir veya daha fazla fukoz veya ksiloz tortusu içerebilir. Burada tarif edilen SAP polipeptitleri, bir N bağı oligosakarit zinciri içerebilir, buradaki oligosakarit zincirinin bir, iki, üç, dört veya beş dalı, $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$ yapısına sahiptir. Burada tarif edilen SAP polipeptitleri ayrıca bir N bağı oligosakarit zinciri içerebilir, buradaki tüm dallar, $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$ yapısına sahiptir.

Burada tarif edilen varyant SAP polipeptitleri, bir veya daha fazla "modifiye edilmiş" şeker tortusu içerebilir. Modifiye edilmiş şekerler, modifiye edici yarımın veya grubun eklenmesine izin veren herhangi bir pozisyonda ikame edilir. Tercih edilen yönlerde modifiye edilmiş şeker, şekerin, modifiye edilmiş şekerin SAP peptidine birleştirilmesinde kullanılan bir enzim için hala substrat görevi görmesine izin verecek bir pozisyonda ikame edilir. Modifiye edici bir grup, bir şeker yarımına enzimatik vasıtalarla, kimyasal vasıtalarla veya bunların bir kombinasyonu ile eklenebilir, bu şekilde modifiye edilmiş bir şeker, örn., modifiye edilmiş bir galaktoz, fukoz veya sialik asit üretilir. Burada kullanılmaya uygun modifiye edici gruplar ve ayrıca bu modifiye edici grupların şeker tortularına konjüge edilmesine yönelik yöntemler, aşağıdaki bölümde tarif edilmiştir.

Belirli yönlerde burada tarif edilen varyant SAP polipeptitlerinin, monositlerin fibrositler halinde in vitro farklılaşmasını inhibe etmeye yönelik IC_{50} 'si, insan serumundan izole edilmiş, karşılık gelen bir vahşi tip SAP örneğinin yarısından daha düşüktür. Burada tarif edilen varyant SAP polipeptitlerinin, monositlerin fibrositler halinde in vitro farklılaşmasını inhibe etmeye yönelik IC_{50} 'si, insan serumundan izole edilmiş, karşılık gelen bir vahşi tip SAP örneğinin 1/3'ünden az, 1/4'ünden az, 1/10'undan az veya 1/100'ünden azdır.

Burada tarif edilen varyant SAP polipeptitleri, Brutlag ve arkadaşlarının algoritmasına dayalı FASTDB bilgisayar programı (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)) kullanılarak belirlendiğinde, SEK.KİM.NO: 1'in amino asit sekansına en az %60, en az %70, en az %80, en az %85, en az %90, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98, en az %99 veya %100 oranında özdeş olabilir. Bir amino asit hizalamasının özdeşlik ve benzerlik yüzdesini hesaplamak için

kullanılan parametreler şunları içerir: Matrix=PAM 150, k-tuple=2, Yanlış Eşleşme Cezası=1, Birleşme Cezası=20, Randomizasyon Grubu Uzunluğu=0, Kesme Skoru=1, Boşluk Cezası=5 ve Boşluk Ölçüsü Cezası=0.05.

- 5 "SAP polipeptiti" terimi, fonksiyonel fragmanları ve öncekilerden herhangi birini içeren füzyon proteinlerini kapsar. Genellikle bir SAP polipeptiti, biyolojik açıdan alakalı sıcaklıklarda, pH düzeylerinde ve ozmolaritede sulu çözeltiler içinde çözülecek şekilde tasarlanacaktır. Pentamerik bir SAP kompleksi oluşturmak için kovalent olmayan
- 10 şekilde bir araya gelen SAP promoterleri, özdeş amino asit sekanslarına ve/veya translasyon sonrası modifikasyonlara sahip olabilir veya alternatif olarak tek bir kompleks içindeki ayrı ayrı SAP promoterleri, farklı sekanslara ve/veya modifikasyonlara sahip olabilir. SAP polipeptiti terimi, doğal yoldan meydana gelen SAP
- 15 polipeptitinin yanı sıra bunun bir varyantını (mutantlar, fragmanlar ve füzyonlar dahil) içeren polipeptitleri kapsar. Burada tarif edilen SAP polipeptiti, bir rekombinant polipeptit olabilir. Buluşa ait SAP polipeptiti, bir insan SAP polipeptitidir.

- Burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptiti veya bunun
- 20 fonksiyonel bir fragmanını içeren farmasötik kompozisyonlar burada sunulur. Bazı yönlerde bir SAP varyantının amino asit sekansı, SEK.KİM.NO: 1'den bir veya daha fazla konservatif veya konservatif olmayan ikame yoluyla farklılık gösterebilir. Burada kullanıldığı gibi "konservatif ikameler", karşılık gelen referans tortulara fiziksel veya
- 25 fonksiyonel açıdan benzer olan tortulardır, yani bir konservatif ikame ve bunun referans tortusu, benzer ebada, şekle, elektrik yüküne ve/veya kimyasal özelliklere (örn., kovalent veya hidrojen bağlar oluşturma yeterliliğine) sahiptir. Tercih edilen konservatif ikameler,

Dayhoff ve arkadaşları, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 (1978 & Supp.)’de kabul edilen bir nokta mutasyonuna için tanımlanan kriterleri yerine getirenlerdir. Konservatif ikamelerin örnekleri, şu gruplara dahil olan ikamelerdir: (a) valin, glisin; (b) glisin, alanin; (c) valin, izölösün, lösün; (d) aspartik asit, glutamik asit; (e) asparagin, glutamin; (f) serin, treonin; (g) lizin, arginin, metiyonin; ve (h) fenilalanin, tirozin. Hangi amino asit değişikliklerinin fenotipik açıdan sessiz olma ihtimalinin olduğu ile ilgili ilave bilgiler, Bowie ve arkadaşları, Science 247: 1306- -1310 (1990)’da bulunabilir.

- 10 Varyant SAP polipeptitleri ve bunların biyolojik fonksiyonu koruyan fragmanları, burada tarif edilen farmasötik kompozisyonlarda ve yöntemlerde faydalıdır. Bir varyant SAP polipeptiti veya bunun fragmanı, Fc γ RI, Fc γ RIIA ve/veya Fc γ RIIIB’yi bağlar. Bir varyant SAP polipeptiti veya bunun fragmanı, fibrosit, fibrosit öncüsü, 15 miyofibroblast öncüsü ve/veya hematopoietik monosit öncüsü farklılaşmasından birini veya daha fazlasını inhibe edebilir. SAP varyantları, terapötik etkinliğin veya stabilitenin (örn., ex vivo raf ömrünün ve in vivo proteolitik degradasyona direncin) güçlendirilmesi gibi amaçlarla bir SAP polipeptitinin yapısı modifiye edilerek üretilebilir. 20

Bazı yönlerde burada tarif edilen varyant SAP polipeptitleri ayrıca SAP polipeptitinde doğal olarak bulunanlara ek olarak Translasyon sonrası modifikasyonlar içerebilir. Bu modifikasyonlar arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, asetilasyon, karboksilasyon, 25 glikosilasyon (örn., O bağlı oligosakaritler, N bağlı oligosakaritler, vb.), fosforilasyon ve lipidasyon bulunur. Sonuç olarak modifiye edilmiş SAP polipeptiti, amino asit dışı öğeler, örneğin polietilen glikoller, lipitler, poli- veya monosakaritler ve fosfatlar ihtiva edebilir.

Bazı yönlerde burada tarif edilen SAP polipeptiti üzerinde yapılan bir veya daha fazla modifikasyon, SAP polipeptitinin stabilitesini güçlendirebilir. Örneğin bu modifikasyonlar, SAP polipeptitinin in vivo yarı ömrünü güçlendirebilir veya SAP polipeptitinin proteolitik degradasyonunu azaltabilir.

Bazı yönlerde burada tarif edilen varyant SAP polipeptitleri, insan SAP polipeptitinin en azından bir kısmına ve bir veya daha fazla füzyon alanına veya heterolog kısma sahip füzyon proteinleri içerir. Bu füzyon alanlarının iyi bilinen örnekleri arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte polihistidin, Glu-Glu, glutatyon S transferaz (GST), tiyoredoksin, protein A, protein G ve immünoglobulin ağır zincir sabit bölgesi (Fc), maltos bağlanma proteini (MBP) veya insan serum albümini bulunur. Bir füzyon alanı, arzu edilen bir özelliği verecek şekilde seçilebilir. Örneğin bazı füzyon alanları, füzyon proteinlerinin afinite kromatografisi yoluyla izolasyonu için özellikle faydalıdır. Afiniteli saflaştırma amacıyla afinite kromatografisine yönelik ilgili matrisler, örneğin glutatyon-, amilaz- ve nikel- veya kobalt ile konjüğe edilmiş resinler kullanılır. Başka bir örnek olarak SAP polipeptitlerinin saptanmasını kolaylaştıracak şekilde bir füzyon alanı seçilebilir. Bu saptama alanlarının örnekleri arasında çeşitli floresan proteinlerinin (örn., GFP) yanı sıra bunlar için spesifik bir antikorun var olduğu, genellikle kısa peptit sekansları olan “epitop takıları” bulunur. Bunlar için spesifik monoklonal antikorların kolayca temin edilebildiği iyi bilinen epitop takıları arasında FLAG, influenza virüsü hemaglutinin (HA) ve c-myc bulunur. Bazı durumlarda füzyon alanları, ilgili proteazın, füzyon proteinlerini kısmen sindirmesine ve böylece rekombinant proteinin buradan serbest kalmasına izin veren bir proteaz klivaj sahasına sahiptir. Serbest kalan proteinler daha sonra

5 takip eden kromatografik ayırma yoluyla füzyon alanından izole edilebilir. Bazı durumlarda SAP polipeptiti, SAP polipeptitini in vivo stabilize eden bir heterolog alana füzyonla birleştirilebilir. "Stabilize edici", ister tahribatın azaltılması, böbrek tarafından temizlenmenin azalması veya başka bir farmakokinetik etki ile olsun, serum yarı ömrünü arttıran herhangi bir şey anlamına gelir. Bir immünoglobulin ve serum albüminin Fc kısmı ile yapılan füzyonların daha yüksek stabilite verdikleri bilinir.

10 Füzyon proteinlerinin farklı ögelerinin, arzu edilen fonksiyonellik ile tutarlı bir şekilde düzenlenebileceği anlaşılır. Örneğin bir SAP polipeptiti, heterolog bir alana C-terminal konulabilir veya alternatif olarak bir heterolog alan, bir SAP polipeptitine C-terminal konulabilir. SAP polipeptitinin ve heterolog alanın bir füzyon proteini içinde komşu olmalarına gerek yoktur ve ilave alanlar veya amino asit sekansları (örn., bağlama sekansları), herhangi bir alana veya alanlarına arasına C veya N-terminal şekilde dahil edilebilir.

Değiştirilmiş N-Glikosilasyon Moleküllerini Üretme Yöntemleri

20 Varyant insan SAP polipeptitlerini üretme yöntemleri burada tarif edilir. Yöntemler genellikle, SAP polipeptiti üzerinde bir glikosilasyon yapısı üretmek veya bunu modifiye etmek amacıyla bir SAP polipeptitinin bir veya daha fazla kimyasal veya enzimatik ajan ile temas ettirilmesi adımını içerir. Yöntemler, hücre bazlı olabilir veya olmayabilir.

25 Glikan yapılarının üretilmesine veya modifiye edilmesine yönelik enzimler bu konuda iyi bilinmektedir. Burada tarif edilen yöntemlerde faydalı birçok enzim/protein, şu iki fonksiyonel sınıftan birine kategorize edilebilir: glikosiltransferazlar ve glikosidazlar. Burada

kullanıldığı gibi glikosiltransferazlar (örn., N-asetilglukozaminil-transferazlar, galaktosil-transferazlar, fukosil-transferazlar, sialil-transferazlar, glukozil-transferazlar, mannosil-transferazlar, vb.), bir donör şekeri bir akseptör yarıma transfer edebilen bir enzime/proteine karşılık gelir. Burada kullanıldığı gibi glikosidazlar (örn., glukozidazlar, mannosidazlar, N-asetilglukozaminidazlar, sialidazlar, fukosidazlar, vb.), şeker yarımları arasındaki glikosidik bağın hidrolizine katalizörlük edebilen bir enzime/proteine karşılık gelir.

Bir SAP polipeptitinin değiştirilmiş gliko formlarının üretilmesine yönelik, hücre bazlı yöntemlerde, vahşi tip (örn., CHO hücreleri) ya da bir insan hücresine göre en az bir modifiye edilmiş glikosilasyon aktivitesine sahip, genetik olarak yapılandırılmış hücreler kullanılır. Burada tarif edilen yöntemler için uygun hücreler arasında örneğin mantar hücreleri, prokaryotik hücre (yani, bakteriler, Archaea), bitki hücreleri veya hayvan hücreleri (örn., nematod, böcek, bitki, kuş, sürüngen veya memeli (örn., bir fare, sıçan, tavşan, hamster, gerbil, köpek, kedi, keçi, domuz, inek, at, balina, maymun veya insan)) bulunur. Hücreler, birincil hücreler, ölümsüzleştirilmiş hücreler veya transforme edilmiş hücreler olabilir. Bu hücreler, çeşitli ticari kaynaklardan ve araştırma kaynak tesislerinden, örn., Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (Rockville, Md.) temin edilebilir. Bazı yönlerde bir varyant SAP polipeptitini üretmek için kullanılan hücre bir CHO hücresidir.

"Glikosilasyon aktivitesi" terimi, (i) N bağlı veya O bağlı glikanları bir hedef moleküle ilave edebilen (yani bir oligosakaril-transferaz aktivitesi); (ii) N bağlı veya O bağlı glikanları bir hedef molekülden çıkarabilen; (iii) bir hedef molekül üzerindeki bir veya daha fazla N bağlı veya O bağlı glikanı modifiye edebilen; (iv) dolikol bağlı

oligosakaritleri modifiye edebilen; (v) i-iv kapsamındaki bir veya daha fazla aktiviteye yardımcı olabilen bir aktiviteye karşılık gelir. Buna göre glikosilasyon aktivitesi örneğin glikosidaz aktivitesi, glikosiltransferaz aktivitesi, şeker nükleotit sentezi, modifikasyon veya transporter aktivitesi içerir. Bir hedef molekül üzerindeki bir veya daha fazla N bağlı veya O bağlı glikanın modifikasyonu, bir mannosilfosforil-transferaz aktivitesinin, bir kinaz aktivitesinin veya bir fosfataz aktivitesinin, örn., bir mannosilfosforil-transferazın, bir kinaz veya bir fosfataz aktivitesinin, hedef molekül üzerindeki glikanların fosforilasyon durumunu değiştiren tesirini içerir.

Burada tarif edilen yöntemlerde faydalı, yapılandırılmış hücreler, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte şunları içeren bir veya daha fazla genetik modifikasyona sahip olabilir: (i) glikosilasyon aktivitesine sahip bir proteini şifreleyen bir endojen genin delesyonu; (ii) glikosilasyon aktivitesine sahip bir proteinin bir mutant formunu (örn., endojen veya eksojen protein) şifreleyen bir rekombinant nükleik asidin sokulması; (iii) glikosilasyon aktivitesine sahip bir proteinin fonksiyonel ekspresyonuna müdahale eden bir RNA molekülünün sokulması veya ekspresyonu; (iv) glikosilasyon aktivitesine sahip bir vahşi tip (örn., endojen veya eksojen) proteini şifreleyen bir rekombinant nükleik asidin sokulması; veya (v) glikosilasyon aktivitesine sahip proteinleri şifreleyen bir veya daha fazla endojen genin promoter veya güçlendirici öğelerinin değiştirilmesi, bu şekilde şifrelenmiş proteinin ekspresyonunun değiştirilmesi. Yukarıda tarif edilen RNA molekülleri örneğin küçük müdahale edici RNA (siRNA), kısa saç tokası RNA (shRNA), anti-sens RNA veya mikro RNA (miRNA) içerir. (ii). Maddenin örneğin bir endojen genin (örn., homolog rekombinasyon yoluyla), değiştirilecek endojen gene göre

daha yüksek glikosilasyon aktivitesine sahip bir proteini şifreleyen bir gen ile değiştirilmesini içerdiği anlaşılır.

Burada tarif edilen, genetik olarak yapılandırılmış hücreler, şunlar gibi bir veya daha fazla değiştirilmiş glikosilasyon aktivitesine sahiptir: (i) 5 genetik olarak modifiye edilmiş hücrede bir veya daha fazla glikosilasyon aktivitesinde bir artış, (ii) genetik olarak modifiye edilmiş hücrede bir veya daha fazla glikosilasyon aktivitesinde bir azalma, (iii) genetik olarak modifiye edilmiş hücrede bir veya daha fazla glikosilasyon aktivitesinin yerinde veya hücre içi dağılımında bir 10 değişiklik veya (iv) genetik olarak modifiye edilmiş hücrede bir veya daha fazla glikosilasyon aktivitesinin oranında, aynı kaynaktan gelen modifiye edilmemiş bir hücreye göre bir değişim. Glikosilasyon aktivitesi miktarında bir artışın, glikosilasyon aktivitesine sahip bir veya daha fazla proteinin aşırı ekspresyonuna, bir endojen genin 15 kopya sayısında bir artışa (örn., gen kopyalaması) veya bir endojen genin promoterinde, güçlendiricisinde veya baskılayıcısında bu gen tarafından şifrelenen proteinin ekspresyonunda bir artışı uyaran bir değişikliğe bağlı olabileceği anlaşılır. Bir veya daha fazla glikosilasyon aktivitesinde bir azalma, glikosilasyonu değiştiren 20 aktivitelere sahip bir veya daha fazla proteinin bir mutant formunun (örn., bir dominant negatif formunun) aşırı ekspresyonuna, bir glikosilasyon aktivitesine sahip bir veya daha fazla proteinin ekspresyonunu azaltan bir veya daha fazla müdahale edici RNA molekülünün sokulmasına veya ekspresyonuna veya glikosilasyon 25 aktivitesine sahip bir proteini şifreleyen bir veya daha fazla endojen genin delesyonuna bağlı olabilir.

Açıklamaya ait yöntemlerce kullanılan, genetik açıdan yapılandırılmış hücreler, glikosilasyon aktivitesine sahip proteinleri şifreleyen vahşi

tip veya mutant genleri eksprese edebilir (örn. aşırı eksprese edebilir). Bu genler arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte ALG7, ALG13, ALG14, ALG1, ALG2, ALG11, RFT1, ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8, ANL1, ALG10, ALG5, OST3, OST4, OST6, STT3, OST1, OST5, WBP1, SWP1, OST2, DPM1, SEC59, OCH1, MNN9, VAN1, MNN8, MNN10, MNN11, HOC1, MNN2, MNN5, MNN6, KTR1, YUR1, MNN4, KRE2, KTR2, KTR3, MNN1, MNS1, MNN4, PNO1, MNN9, glukozidaz I, glukozidaz II veya endomannosidaz bulunur. Glikosilasyon aktivitesine sahip proteinleri şifreleyen genler, herhangi bir türden (örn. alt ökaryotlar (örn. mantar (mayalar dahil) veya tripanozomlar), prokaryotlar (yani, bakteriler veya Archaea), bitki veya hayvan (örn., böcek, kuş, sürüngen veya memeli, örneğin fare veya sıçan, köpek, kedi, at, keçi, inek, domuz, insan dışı primat veya insan)) olabilir. Açıklamaya ait yöntemler için kullanılan, genetik açıdan yapılandırılmış hücrelerin, herhangi bir sayıda geni (örn., glikosilasyon aktivitesine sahip proteinleri şifreleyen genleri) ve/veya burada belirtilen genlerin bir veya daha fazlasının bir kombinasyonunu (örn., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 15 veya 20 veya daha fazla) eksprese edebileceği anlaşılır. Ek olarak açıklamaya ait yöntemlerde kullanılan, genetik açıdan yapılandırılmış hücreler, bir veya daha fazla glikosilasyon aktivitesini değiştiren veya ortadan kaldıran, herhangi bir sayıda mutasyon içerebilir.

"Gen ekspresyonu" veya "ekspresyon" terimi, bununla biyolojik açıdan aktif bir polipeptitin bir DNA sekansından üretildiği ve bir hücrede biyolojik bir aktivite sergilediği hücre proseslerine karşılık gelebilir. Bu şekilde gen ekspresyonu, transkripsiyon ve translasyon proseslerini içerir, ancak ayrıca bir genin veya gen ürününün biyolojik aktivitesini etkileyebilen, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası

prosesleri içerir. Bu prosesler arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte RNA sentezleri, prosesi ve taşımalarının yanı sıra polipeptit sentezi, taşınması ve polipeptitlerin translasyon sonrası modifikasyonu bulunur.

- 5 Örneğin burada, bir SAP geninin bir hücre içinde eksprese edilmesi suretiyle buluşa ait bir SAP polipeptitinin yapılmasına yönelik yöntemler tarif edilmiştir. Hücre, bir endojen SAP geni veya bunun fragmanını ihtiva edebilir. Bir eksojen SAP polipeptitini veya bunun fragmanını kodlayan bir polinükleotit, bir hücre içine sokulabilir (örn.,
- 10 transforme, transfekte edilebilir, vb.). Bir hücre içine sokulabilecek uygun SAP polinükleotitleri arasında nükleik asit fragmanlarının yanı sıra nükleik asit yapıları veya ekspresyon vektörleri bulunur. Endojen veya eksojen gen, bir insan SAP polipeptitini şifreler.

Bir insan SAP polipeptitini şifreleyen, konakçı hücreyi transforme etmek için kullanılan nükleik asit fragmanı, bir Shine-Dalgarno sahası

15 (örn., bir ribozom bağlanma sahası) ve enzimi üretmek için transkripte edilen mesajın translasyonunu başlatmak üzere bir başlama sahası (örn., ATG kodonu) içerebilir. Ayrıca translasyonu bitirmek için bir sonlandırma sekansı içerebilir. Bir sonlandırma sekansı tipik olarak

20 bunun için karşılık gelen aminoasetil-tRNA'nın bulunmadığı, böylelikle polipeptit sentezini bitiren bir kodondur. Bir SAP polipeptitini şifreleyen bir nükleik asit yapısı örneğin hücre içinde transkripte edildiğinde SAP polipeptiti üreten bir ekspresyon plazmidi halinde verilebilir.

- 25 Uygun bir ekspresyon vektörü, en az bir regülatör sekansa işlevsel şekilde bağlanmış, buluşa ait bir SAP polipeptitini şifreleyen bir nükleotit sekansı içerir. Regülatör sekanslar bu konuda bilinir ve açıklamaya ait polipeptitlerden birinin ekspresyonunu yönetmek üzere

seçilir. Buna göre regülatör sekans terimi, promoterler, güçlendiriciler ve başka ekspresyon kontrol öğelerini içerir. Örnek regülatör sekanslar Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)'da tarif edilir.

5 Örneğin buna işlevsel şekilde bağlandığında bir DNA sekansının ekspresyonunu regüle eden bir ekspresyon kontrol sekansı, bu vektörler içinde burada tarif edilen polipeptitlerden birini ekspresye etmek için kullanılabilir. Bu faydalı ekspresyon kontrol sekansları arasında örneğin SV40 erken ve geç promoterleri, tet promoteri, 10 adenovirüs veya sitomegalovirüs hemen erken promoteri, lac sistemi, trp sistemi, TAC veya TRC sistemi, ekspresyonu T7 RNA polimeraz tarafından yönetilen T7 promoteri, faj lambdanın başlıca operatör ve promoter bölgeleri, fd kılıf proteini için kontrol bölgeleri, 3-fosfogliserat kinazı veya başka glikolitik enzimlere yönelik promoter, 15 asit fosfataz promoterleri, örn., Pho5, maya α -eşleşme faktörleri promoterleri, bakülovirüs sisteminin polihedron promoteri ve prokaryotik veya ökaryotik hücrelerin veya bunların virüslerinin genlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği bilinen diğer sekanslar ve bunların çeşitli kombinasyonları bulunur. Ekspresyon vektörü 20 tasarımının, transforme edilecek konakçı hücre ve/veya ekspresye edilmesi arzu edilen proteinin tipi seçimi gibi faktörlere bağlı olabileceği anlaşılmalıdır. Ek olarak vektörün kopya sayısı, bu kopya sayısını kontrol edebilme ve vektör tarafından şifrelenen başka bir proteinin, örneğin antibiyotik markerlerin ekspresyonu da dikkate 25 alınmalıdır.

Konakçı hücreyi transforme etmek için kullanılan nükleik asit fragmanı veya ekspresyon sistemi isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla marker sekansı içerebilir. Genel anlamda uygun marker

sekansları tipik olarak bir gen ürününü, genellikle büyüme ortamı içindeki bir bileşiği eylemsizleştiren veya başka şekilde saptayan veya bunun tarafından saptanan bir enzimi şifreler. Örneğin bir marker sekansının dahil edilmesi, transforme edilmiş hücreyi bir antibiyotiğe karşı dirençli kılabilir veya transforme edilmiş hücreye, bileşiğe spesifik metabolizma verebilir. Direnç veren uygun marker sekanslarının örnekleri arasında kanamisin, ampisilin, kloramfenikol ve tetrasiklin bulunur. Seçme baskısından çok alternatif olarak geni ihtiva eden belirli kolonilerin saptanmasına izin veren bir marker gen, örneğin β -galaktosidaz kullanılabilir, burada renkli bir ürün veren bir substrat kullanılır.

Burada tarif edilen bir hücrenin bir nükleik asit fragmanı veya ekspresyon vektörü ile transforme edilmesi için çeşitli yöntemler uygundur. Yaygın transformasyon yöntemleri arasında elektroporasyon, lipozom aracılı transformasyon, kalsiyum aracılı transformasyon ve viral aracılı transfeksiyon bulunur.

Bir konakçı hücre, mevcut burada tarif edilen bir nükleik asit fragmanı veya ekspresyon sistemi ile transforme edildiğinde adı geçen sistem içindeki gen (örn., insan SAP), konakçı hücrelerin kromozom DNA'sı içine, bilinen adıyla homolog rekombinasyon yoluyla entegre edilebilir ve ekspresyon sistemi, konakçı içinde stabil şekilde taşınacaktır.

Vektör içindeki ekspresyon sistemini konakçı hücrelerin kromozom DNA'sı içine entegre etmek için uygun bir seçim marker geni kullanılabilir, burada adı geçen marker geni, spesifik konakçı hücrenin kromozom DNA'sı üzerindeki gene homolog bir sekansa sahiptir. Bu amaca yönelik seçim markerleri, uzman kişilerce kolayca seçilebilir. Örnek olarak tercih edilen marker, kromozom üzerinde bulunan ve

konakçı hücrelerin metabolizması ile ilişkili bir gendir. Yani kromozom üzerinde yukarıda bahsedilen gen, bir mutasyon gibi uygun bir vasıta ile eylemsizleştirilecek şekilde modifiye edilmiş bir konakçının kullanılması tercih edilir. Konakçı daha sonra karşılık gelen bozulmamış geni ihtiva eden bir ekspresyon vektörü ile homolog rekombinasyona tabi tutulabilir, bunun üzerine sadece normal metabolizma genini ihtiva eden transformantlar seçilmek üzere büyütülebilir. Bu nedenle böyle bir marker gen, ekspresyon vektörü içine sokulmuş ise adı geçen ekspresyon vektörü içindeki marker gen ile kromozom DNA'sının karşılık gelen kısmı arasında bir homolog rekombinasyon meydana gelecektir, bu şekilde heterolog genin ekspresyon kaseti aynı anda kromozom DNA'sı içine entegre edilecektir.

Bir proteinin bir hücre içinde "eksprese edilmesi" terimi ayrıca bir proteinin kendisinin hücreler içine sokulması yöntemlerini içerir. Bu nedenle bazı yönlerde açıklama, bir SAP polipeptitinin bir hücre içine sokulması suretiyle burada tarif edilen bir SAP polipeptitinin yapılmasına yönelik yöntemler sunar. Polipeptitlerin direkt olarak bir hücre içine sokulmasına yönelik yöntemler bu konuda bilinmektedir ve genel olarak hücre membran geçirginleştirme prosesi içerir. Bu teknikler arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte SAP polipeptitlerinin mikroenjeksiyonu; bir SAP polipeptitinin membran vesiküller (örn., lipozomlar, kapsüller cisimcikler, eritrosit hayaletler, protoplastlar, vb.) içinde kapsül içine alınması ve bunların bir hücre membranı ile temas ettirilerek SAP polipeptitinin füzyon yoluyla hücre içine sokulmasının sağlanması; plazma membranları içine geçici şekilde sokulan delikler üzerinden difüzyon yoluyla (örn., kazıntı yükleme, tane yükleme, vb.) makromoleküllerin hücrelere girmesine

dayalı fiziksel yöntemlerin (örn., mekanik, kimyasal, elektriksel, vb.) kullanılması; ve hücre fagositozuna bağlı doğal endositoz yoluyla alım bulunur. Bir hücre içi sokma yönteminde reseptör aracılı bir yolak kullanılabilir, burada hücre yüzeyi üzerinde eksprese edilen çeşitli reseptörlerden biri, hedef olarak belirlenir ve bir SAP polipeptiti, taşıyıcı yarım görevi gören kognat liganda (kovalent şekilde veya kovalent olmayan şekilde) eklenir. Elektrostatik adsorpsiyon kullanılarak proteinlerin canlı hücreler içine sokulmasına yönelik birçok yöntem tarif edilmiştir, burada protein ilk olarak katyonize edilir ve sonra bir hücrenin negatif yüklü yüzeyi ile temas ettirilir (Bakınız Japon Patent Yayını No. 2004/049214).

Bazı yönlerde burada, bir SAP polipeptitini eksprese eden CHO hücreleri tarif edilir. CHO hücresi, bir eksojen SAP polipeptitini eksprese edebilir. CHO hücresi, bir insan SAP polipeptitini eksprese edebilir. Açıklama, bir SAP polipeptitini şifreleyen bir polinükleotit sekansı içeren CHO hücreleri sunabilir. Polinükleotit sekansı, bir insan SAP polipeptitini şifreleyebilir. Yukarıda bahsedilen tekniklerden biri, burada tarif edilen bir SAP polipeptitini bir CHO hücresi veya burada tarif edilen başka bir uygun hücre içinde “eksprese etmek” için kullanılabilir.

Vahşi tip veya genetik olarak yapılandırılmış hücrenin bir glikosilasyon aktivitesi, indükleyici bir belirtinin (örn., bir kimyasal veya fiziksel belirtinin) varlığına bağlı veya bununla inkülenebilir olduğunda vahşi tip veya genetik olarak yapılandırılmış hücre isteğe bağlı olarak bir SAP polipeptitini şifreleyen nükleik asidin veya bir SAP polipeptitinin sokulmasından önce, bu sırada veya bundan sonra indükleyici ajan varlığında kültürlenebilir. Örneğin SAP polipeptitinin hücre içine sokulmasından sonra vahşi tip veya değiştirilmiş bir N-

glikosilasyon aktivitesine sahip bir veya daha fazla proteinin ekspresyonunu teşvik edebilen kimyasal, indükleyici bir ajana maruz bırakılabilir. Birçok indükleyici belirti, vahşi tip ve/veya değiştirilmiş N-glikosilasyon aktivitesine sahip bir veya daha fazla proteinin koşullu ekspresyonunu indüklediğinde bir hücre, birçok indükleyici ajan ile temas ettirilebilir. Kültür ortamı, SAP polipeptiti üzerindeki arzu edilen glikan yapısını üretmek üzere modifiye edilebilir. Örneğin ortamın serum, glukoz ve/veya lipit (örn., dolikol) konsantrasyonu, arzu edilen SAP glikovaryantının optimum üretimi için modifiye edilebilir. Kültür ortamının sıcaklığı, pH'ı ve/veya ozmolaritesi, arzu edilen SAP glikovaryantının optimum üretimi için değiştirilebilir.

Burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptiti ayrıca in vivo işlenebilir veya hücreden veya hücre ortamından izolasyondan önce veya sonra in vitro işlenebilir. İleri proses, SAP polipeptitinin bir veya daha fazla glikan tortusunun modifikasyonunu veya glikan yapı(lar)ı dışında SAP polipeptitinin modifikasyonunu içerebilir. SAP polipeptitinin ilave prosesi, bir veya daha fazla heterolog yarımın ilavesini (kovalent veya kovalent olmayan birleştirmesini) içerebilir. İleri proses, SAP polipeptitinin enzimatik veya kimyasal işlemini içerebilir. Enzimatik işlem, SAP polipeptitinin bir veya daha fazla glikosidaz, fosfodiesteraz, fosfolipaz, glikosiltransferaz veya proteaz ile, SAP polipeptiti üzerindeki glikan tortularının (örn., galaktoz, mannoz, fukoz, sialik asit, ksiloz, N-asetilglukozamin, vb) modifikasyonunu, ilavesini veya delesyonunu indüklemek için yeterli bir süre temas ettirilmesini içerebilir. Bir N bağlı oligosakarit zincirinin özelleştirilmesi, bu konuda iyi bilinen teknikler kullanılarak arzu edilen şeker yarımalarının sırayla modifikasyonu, ilavesi veya delesyonu yoluyla sağlanabilir. Peptit varyantları üzerindeki

karbohidrat yarımlarının enzimatik klivajı, Thotakura ve arkadaşları, 1987, Meth. Enzymol., 138:350 tarafından tarif edildiği gibi çeşitli endo ve ekso-glikosidazlar kullanılarak yapılabilir. Şeker yarımlarının ilave edilmesine yönelik örnek yöntemler ABD Patentleri No. 5,876,980 , 6,030,815 , 5,728,554 ve 5,922,577'de açıklanır.

SAP glikan yapısının modifikasyonu, bir veya daha fazla şeker nükleotitinin varlığını gerektirebilir. Burada kullanılan örnek şeker nükleotitleri arasında nükleotit mono-, di- veya trifosfatlar veya bunların analogları bulunur. Modifiye edilmiş şeker nükleotiti, bir UDP-glikosid, CMP-glikosid veya bir GDP-glikosid arasından seçilebilir. Şeker nükleotiti, bir UDP-galaktoz, UDP-galaktozamin, UDP-glukoz, UDP-glukozamin, GDP-mannoz, GDP-fukoz, CMP-sialik asit, CMP-N-glikolilneuraminik asit veya CMP-NeuAc arasından seçilebilir. Modifiye edilmiş bir şeker nükleotiti, modifiye edilmiş bir şeker tortusunu SAP polipeptidine ilave etmede kullanılabilir. Şeker nükleotitlerinin N-asetilamin türevleri de burada tarif edilen yöntemde kullanılabilir.

Glikosil yarımlarının kimyasal ilavesi veya çıkarılması, herhangi bir uygun yöntemle yapılabilir. Örneğin kimyasal deglikosilasyon, SAP polipeptidinin triflorometansülfonik aside veya başka bir güçlü aside maruz bırakılmasını içerebilir. Bu işlem, peptiti bozulmamış şekilde bırakırken bağlayıcı şeker (N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozamin) haricindeki şekerlerin büyük kısmının veya tamamının klivajı ile sonuçlanır. Kimyasal deglikosilasyon yöntemleri, Haldmuddin ve arkadaşları, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 ve by Edge ve arkadaşları, 1981, Anal. Biochem. 118: 131 tarafından tarif edilir. Kimyasal işlem örneğin değiştirilmiş SAP polipeptidinin bir asit, örneğin hidröflorik asit ile SAP

polipeptitinin modifikasyonunu indüklemek için yeterli bir süre temas ettirilmesini içerebilir. Belirli koşullar altında hidroflorik asit işlemi glikanlara fosfodiester bağlı mannoz tortularını spesifik olarak çıkarırken glikan üzerindeki fosfatı bırakır. Değiştirilmiş bir SAP polipeptiti ayrıca bir fosfat grubunun bir veya daha fazla N-glikandan çıkarılması veya ilavesi yoluyla işlenebilir. Örneğin değiştirilmiş bir SAP polipeptiti, bir mannosil kinaz veya bir mannosil fosfataz ile temas ettirilebilir.

Bazı yönlerde SAP polipeptiti glikan yapısı (N bağlı veya O bağlı oligosakarit) üzerindeki sadece terminal şeker yarımlarının modifiye edilmesi arzu edilebilir. SAP glikan yapısının bir veya daha fazla dalı, en az bir terminal sialik asit tortusunun ilavesi, çıkarılması, ikamesi veya modifikasyonu yoluyla modifiye edilebilir. Burada tarif edilen glikanların modifiye edilmesi için uygun yöntemler, SAP glikan yapısı üzerindeki sadece terminal şeker yarımını değiştirmek için kullanılabilir. Bir $\alpha 2,6$ bağına, $\alpha 2,8$ bağına veya $\alpha 2,9$ bağına sanih bir terminal sialik asit tortusu, bir veya daha fazla terminal $\alpha 2,3$ bağlı sialik asit tortusu ile değiştirilebilir. Belirli bir yönde terminal $\alpha 2,6$ bağlı sialik tortuları içeren insan SAP, bir veya daha fazla terminal $\alpha 2,6$ bağlı sialik tortusunu bir veya daha fazla $\alpha 2,3$ bağlı sialik asit tortusu ile değiştirmek için açıklamaya ait yöntemlerden birine göre modifiye edilebilir. Bir terminal $\alpha 2,3$ bağlı sialik asit tortusu, bir veya daha fazla $\alpha 2,6$ bağlı, $\alpha 2,8$ bağlı ve/veya $\alpha 2,9$ bağlı sialik asit tortusunu ilave etmek için modifiye edilebilir.

Bazı yönlerde burada tarif edilen bir SAP polipeptitini yapma prosesi, SAP polipeptitinin deglikosile edildiği bir birinci adım içerebilir. SAP polipeptiti, kısmen veya tamamen deglikosile edilmiş olabilir. Birinci deglikosilasyon adımı, sadece terminal şeker yarımlarının, SAP

polipeptiti üzerindeki glikan yapısının en az bir dalından çıkarılmasını içerebilir. Birinci deglikosilasyon adımı, en az bir α 2,6 bağlı sialik asit tortusunu çıkarabilir. Birinci deglikosilasyon adımı, en az O bağlı glikanı çıkarabilir. Birinci deglikosilasyon adımı, en az N bağlı glikanı çıkarabilir. Birinci deglikosilasyon adımı, tüm O bağlı ve N bağlı glikanları çıkarabilir. Deglikosile edilmiş bir SAP polipeptiti (kısmen veya tamamen) ayrıca burada tarif edilen yöntemlere göre işlenir, bunlar da sınırlı olmamakla birlikte kısmen veya tamamen deglikosile edilmiş SAP polipeptitinin enzimatik veya kimyasal yoldan modifiye edilmesini, kısmen veya tamamen deglikosile edilmiş SAP polipeptitinin bir hücre içine sokulmasını veya bunların kombinasyonunu içerir, buradaki yöntem(ler), burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptiti üretir. Kısmen veya tamamen deglikosile edilmiş bir SAP polipeptiti, bir hücre içine sokulduktan sonra bu ayrıca açıklamaya ait yöntemlere göre in vivo veya in vitro modifiye edilerek buluşa ait bir varyant SAP polipeptiti üretilebilir. Benzer şekilde burada tarif edilen enzimatik veya kimyasal yöntemler kullanılarak in vitro modifiye edilmiş, kısmen veya tamamen deglikosile edilmiş bir SAP polipeptiti, bir hücre içine sokularak burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptiti üretilebilir.

Burada tarif edilen bir SAP polipeptitinin bir hücre içinde işlenebileceği, ancak bunun zorunlu olmadığı anlaşılır. Örneğin açıklama, burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptitinin üretildiği hücresiz yöntemler sunar. Hücresiz yöntemler, bir SAP polipeptitinin, glikosilasyon koşulları altında, bir vahşi tip hücreden (örn., bir mantar hücresi, bir bitki hücresi veya bir hayvan hücresinden) veya genetik olarak yapılandırılmış ve en az bir modifiye edilmiş glikosilasyon aktivitesine sahip bir hücreden hazırlanmış bir hücre lizatu ile temas

ettirilmesi adımı içerebilir, burada SAP polipeptidinin hücre lizatı ile temas ettirilmesi, bir N bağlı veya O bağlı oligosakariti SAP polipeptidinde ekler veya SAP polipeptidi üzerinde var olan bir N bağlı veya O bağlı oligosakariti modifiye eder. "N-glikosilasyon koşulları",
5 bir karışımın (örn., SAP polipeptidi ve hücre lizatı), arzu edilen değiştirilmiş N-glikosilasyona izin veren koşullar altında inkübe edilmesi anlamına gelir.

Lizat içinde bir veya daha fazla glikosilasyon aktivitesini veya bunun bütünlüğünü muhafaza eden hücre lizatlarını elde etmek için uygun
10 yöntemler, hücre lizatı içindeki N-glikosilasyon aktivitelerini muhafaza eden veya bundaki değişimleri en aza indiren uygun tamponların ve/veya inhibitörlerin örneğin nükleaz, proteaz ve fosfataz inhibitörlerinin kullanılmasını içerebilir. Bu inhibitörler arasında örneğin şelatlayıcılar örneğin etilendiamintetraasetik asit
15 (EDTA), etilen glikol bis(P-aminoetil eter) N,N,N1,N1-tetraasetik asit (EGTA), proteaz inhibitörleri örneğin fenilmetilsülfonil florid (PMSF), aprotinin, löpeptin, antipain ve fosfataz inhibitörleri örneğin fosfat, sodyum florid ve vanadat bulunur. İlgili N-glikosilasyon aktivitesine veya aktivitelerine müdahale etmeyen veya bunları ancak
20 minimum düzeyde olumsuz etkileyen inhibitörler seçilebilir. Enzimatik aktiviteler ihtiva eden lizatların elde edilmesi için uygun tamponlar ve koşullar örn., Ausubel ve arkadaşları, Current Protocols in Molecular Biology (Ek 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow ve Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow ve Lane, Using
25 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3. baskı, Burtis ve Ashwood, eds. W.B. Saunders, Philadelphia, (1999)'da tarif edilir.

Bir hücre lizatı ayrıca uygun şekilde müdahale eden maddelerin varlığını ortadan kaldırmak veya en aza indirmek üzere işlenebilir. Arzu edilirse bir hücre lizatı, bu konuda uzman kişilerce iyi bilinmekte olan, hücre altı fraksiyonlaştırma ve kromatografik teknikler örneğin iyon alışverişli, hidrofobik ve geri fazlı, ebat 5 eksklüzyonlu, afinite ve hidrofobik yük indüksiyonlu kromatografi (bakınız örn., Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, üçüncü baskı, Springer-Verlag, New York (1993); Burton ve Harding, J. Chromatogr. A 814:71-81 (1998)) dahil çeşitli yöntemlerle veya 10 başka bir uygun saflaştırma tekniği ile fraksiyonlaştırılabilir.

Bütün hücre organellerinin bozulmadan ve/veya fonksiyonel kaldığı bir hücre lizatı hazırlanabilir. Örneğin bir lizat, bir veya daha fazla bozulmamış kaba endoplasmik retikülüm, bozulmamış yumuşak endoplasmik retikülüm veya bozulmamış Golgi aparatı ihtiva edebilir. 15 Bozulmamış hücre organelleri ihtiva eden lizatların hazırlanmasına ve organellerin fonksiyonelliğinin test edilmesine yönelik uygun yöntemler örn., Moreau ve arkadaşları, (1991) J. Biol. Chem. 266(7):4329-4333; Moreau ve arkadaşları, (1991) J. Biol. Chem. 266(7):4322-4328; Rexach ve arkadaşları, (1991) J. Cell Biol. 20 114(2):219-229; ve Paulic ve arkadaşları, (1999) Arch. Biochem. Biophys. 367(2):265-273'te tarif edilir.

SAP polipeptiti, glikosilasyon aktivitesine sahip sadece bir saflaştırılmış protein ile temas ettirilebilir. SAP polipeptiti, glikosilasyon aktivitesine sahip birden fazla saflaştırılmış protein ile 25 temas ettirilebilir. Glikosilasyon aktivitesine sahip bir veya daha fazla protein, standart protein izolasyon teknikleri kullanılarak saflaştırılabilir. Bir SAP polipeptiti, yukarıda tarif edildiği gibi SAP polipeptitlerinin modifikasyonunu indüklemek için yeterli bir süre

boyunca uygun bir tampon içinde bir veya daha fazla protein ile temas ettirilebilir. SAP polipeptiti, birden fazla protein ile aynı anda veya sırayla temas ettirilebilir. SAP polipeptitinin glikosilasyon aktivitesine sahip birden fazla protein ile sırayla temas ettirilmesi durumunda SAP polipeptiti, bir veya daha fazla adım sonrasında saflaştırılabilir, ancak bu zorunlu değildir. Yani bir SAP polipeptiti, protein aktivitesi "A" ile temas ettirilebilir ve sonra molekülün protein aktivitesi "B" ile temas ettirilmesinden önce saflaştırılabilir. Peptitlerin bu şekilde modifiye edilmesi yöntemleri bu konuda bilinmektedir, örn., Lee ve Park (2002) 30(6):716-720 ve Fujita ve Takegawa (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 282(3):678-682.

Burada tarif edilen yöntemler, bir SAP polipeptitinin örn., bir hücreden veya bir hücre lizatının bileşenlerinden izole edilmesi adımını içerir. Protein izolasyonuna yönelik birçok standart teknik bu konuda bilinmektedir. Örneğin polipeptitlerin izole edilmesi yöntemleri arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte ebat eksklüzyonlu kromatografi, geri fazlı kromatografi, sıvı kromatografisi (örn., HPLC), afinite kromatografisi (örn., metal şelasyon veya immüno-afinite kromatografisi), iyon alışverişli kromatografi, hidrofobik etkileşimli kromatografi, çökeltme, diferansiyel çözünürleştirme, immüno-çökeltme, santrifüj (örn., ultra-santrifüj, sukroz gradyanlı santrifüj, vb.) veya bunların herhangi bir kombinasyonu bulunur. Bazı düzeneklerde SAP polipeptiti, polipeptitin saflaştırılmasını kolaylaştırmak için bir afinite takısına konjüge edilebilir. SAP saflaştırmasına yönelik uygun afinite takıları arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte çitin bağlanma proteini (CBP), maltoz bağlanma proteini (MBP), glutatyon-S-transferaz (GST), streptavidin, biyotin ve poli(His) takıları bulunur. Afinite

takıları, rekombinant proteinin bir parçası olarak (yani bir heterolog afinite takı alanı ve bir SAP polipeptit alanı içeren bir füzyon proteini olarak) üretilebilir veya in vivo veya in vitro SAP polipeptidine (kovalent şekilde veya kovalent olmayan şekilde) eklenebilir. Bir SAP polipeptitini izole etmek için birçok saflaştırma adımı kullanılabilir. Orneğin bir saflaştırma takısı içeren bir SAP polipeptiti, bir hücre lizatından veya çok bileşenli karışımdan afinite saflaştırması kullanılarak afinite ile saflaştırılabilir. Daha sonra afinite ile saflaştırılmış SAP polipeptiti ayrıca ilave bir saflaştırma adımı, örn., ebat eksklüzyonlu kromatografi veya RP-HPLC ile istenmeyen küçük kirleticileri temizlemek üzere tekrar saflaştırılabilir. Burada tarif edilen bir polipeptitin bir hücre içinde üretilmesi durumunda SAP polipeptiti, hücrenin kendisinden veya içinde hücrenin kültürlendiği ortamdan izole edilebilir. Burada tarif edilen SAP polipeptitleri, bir hücreden üretilir ve kültür ortamı içine salgılanır. Burada tarif edilen izolasyon, hücre fraksiyonunun, çözülebilir, SAP ihtiva eden fraksiyondan (örn., santrifüj yoluyla) ayrılmasını içerebilir.

Bazı yönlerde SAP polipeptitini, hedef molekülün bir veya daha fazla N-glikosilasyon aktivitesi ile temas ettirilmesinden önce bir katı faz desteğine bağlanması avantajlı olabilir. Bu bağlama, N-glikosilasyon modifikasyonlarını takiben daha kolay saflaştırmaya izin verebilir. Uygun katı faz destekleri arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte çok oyuklu deney plakaları, partiküller (örn., manyetik veya şifrelenmiş partiküller), bir kromatografi kolonu veya bir membran bulunur.

Burada tarif edilen, değiştirilmiş SAP polipeptitleri, bir heterolog yarıma enzimatik veya kimyasal vasıtalar kullanılarak eklenebilir. Bir "heterolog yarım", değiştirilmiş hedef moleküle (örn., kovalent şekilde

veya kovalent olmayan şekilde) birleştirilmiş bir bileşene karşılık gelir; bu bileşen, SAP polipeptiti üzerinde ilk başta bulunan bileşenden farklıdır. Heterolog yarımlar arasında örneğin suda çözülebilen ve çözülmeyen polimerler, hedefleme yarımları, terapötik yarımlar, tanı yarımları ve biyo-moleküller bulunur.

Burada tarif edilen SAP polipeptitleri, bir veya daha fazla "modifiye edilmiş" şeker tortusu içerebilir. Modifiye edici bir grup, bir şeker yarımına enzimatik vasıtalarla, kimyasal vasıtalarla veya bunların bir kombinasyonu ile eklenebilir, bu şekilde modifiye edilmiş bir şeker, örn., modifiye edilmiş bir galaktoz, fukoz veya sialik asit üretilir. Bir modifiye edilmiş sialik asit kullanıldığında bu yöntemlerde bir sialil-transferaz veya bir trans-sialidaz kullanılabilir. Şekerler, modifiye edici yarımın eklenmesine izin veren, ancak yine de şekerin, modifiye edilmiş şekerin peptite birleştirilmesinde kullanılan enzim için substrat görevi görmesine izin veren bir pozisyonda ikame edilebilir.

Genel olarak şeker yarımı ve modifiye edici grup, reaktif gruplar kullanılarak birbirlerine bağlanır, bunlar da tipik olarak bağlama prosesi ile yeni bir organik fonksiyonel gruba veya reaktif olmayan türe transforme edilir. Şeker reaktif fonksiyonel grup(lar), şeker yarımı üzerindeki herhangi bir pozisyonda bulunabilir. Mevcut buluşun uygulanmasında faydalı reaktif gruplar ve reaksiyon sınıfları genellikle biyo-konjüгат kimyası konusunda iyi bilinenlerdir. Reaktif şeker yarımları ile temin edilebilen, şu anda tercih edilen reaksiyon sınıfları, nispeten yumuşak koşullar altında ilerleyenlerdir. Bunlar arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte nükleofilik ikameler (örn., aminler ve alkollerin asil halidler, aktif esterler ile reaksiyonu), elektrofilik ikameler (örn., enamin reaksiyonları) ve karbon-karbon ve karbon-heteroatom çoklu bağlarının ilavesi (örn., Michael reaksiyonu,

Diels-Alder ilavesi) bulunur. Bunlar ve diğ er faydalı reaksiyonlar örneğ in Smith ve March, Advanced Organic Chemistry, 5. baskı, John Wiley & Sons, New York, 2001 Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996; ve Feeney ve arkadaşları, Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series, Cilt 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982'de tartışılır.

Bir şeker çekirdeğ inden veya modifiye edici gruptan kaynaklanan faydalı reaktif fonksiyonel gruplar arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte ş unlar bulunur: (a) karboksil grupları ve bunların çeş itli türevleri (örn., N-hidroksisukinimid esterler, N-hidroksibenzotriazol esterler, asit halidler, asil imidazoller, tiyoesterler, p-nitrofenil esterler, alkil, alkenil, alkinil ve aromatik esterler); (b) ö rn., esterlere, eterlere, aldehidlere, vb. dönüştürülebilir hidroksil grupları.; (c) haloalkil grupları, buradaki halid daha sonra bir nükleofilik grup örneğ in bir amin, bir karboksilat anyonu, tiyol anyonu, karbanyon veya bir alkoksid iyonu ile değ iştirilebilir, bu şekilde halojen atomunun fonksiyonel grubunda yeni bir grubun kovalent eklenmesi sağlanır; (d) dienofil grupları, bunlar Diels-Alder reaksiyonlarına dahil olabilir, örneğ in maleimido grupları; (e) aldehid veya keton grupları, bu şekilde müteakip türevlendirme, karbonil türevlerinin örneğ in iminler, hidrazonlar, semikarbazonlar veya oksimlerin oluşturulması suretiyle veya Grignard ilavesi veya alkillityum ilavesi gibi mekanizmalar yoluyla mümkündür; (f) örneğ in sülfonamidler oluşturmak için aminler ile daha sonra reaksiyona yönelik sülfonil halid grupları; (e) tiyol grupları, bunlar örneğ in disülfidlere dönüştürülebilir veya alkil ve asil halidler ile reaksiyona sokulabilir; (h) amin veya sülfhidril grupları, bunlar örneğ in asile, alkile veya oksidize edilebilir; (i)

alkenler, bunlar örneğin siklo-ilavelere, asilasyona, Michael ilavesine, metateze, Heck reaksiyonuna, vb. uğrayabilir.; (j) epoksidler, bunlar örneğin aminler ve hidroksil bileşikleri ile reaksiyona girebilir.

Reaktif fonksiyonel gruplar, reaktif şeker çekirdeğini veya modifiye edici grubu birleştirmek için gerekli reaksiyonlarda yer almayacak veya bunlara müdahale etmeyecek şekilde seçilebilir. Alternatif olarak reaktif bir fonksiyonel grup, bir koruma grubu varlığı ile reaksiyonda yer almaktan korunabilir. Bu konuda uzman kişiler, belirli bir fonksiyonel grubun, bu seçilen reaksiyon koşulları setine müdahale etmeyecek şekilde nasıl korunacağını anlayacaktır. Faydalı koruma gruplarının örnekleri için bakınız örneğin, Greene ve arkadaşları, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991.

Modifiye edilmiş şeker, aktifleştirilmiş bir şeker olabilir. Burada faydalı, aktifleştirilmiş, modifiye edilmiş şekerler tipik olarak aktifleştirilmiş bir ayırma grubu içerecek şekilde sentetik olarak değiştirilmiş glikosidlerdir. Burada kullanıldığı gibi “aktifleştirilmiş ayırma grubu”, enzim ile regüle edilen ikame reaksiyonlarında kolayca yeri değiştirilen yarımlara karşılık gelir. Birçok aktifleştirilmiş şeker bu konuda bilinmektedir. Bakınız örneğin Vocado ve arkadaşları, Carbohydrate Chemistry and Biology, Cilt 2, Ernst ve arkadaşları, Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Almanya, 2000; Kodama ve arkadaşları, Tetrahedron Lett. 34: 6419 (1993); Loughheed ve arkadaşları, J. Biol. Chem. 274: 37717 (1999)).

Bu tür ayırma gruplarının örnekleri arasında floro, kloro, bromo, tosilat, mesilat, triflat ve benzeri bulunur. Burada kullanılmaya yönelik, tercih edilen aktifleştirilmiş ayırma grupları, glikosidin akseptöre enzimatik transferini anlamlı düzeyde sterik olarak

engellemeyenlerdir. Buna göre aktifleştirilmiş glikosid türevlerinin örnekleri arasında glikosil floridler ve glikosil mesilatlar ve glikosil floridler bulunur. Glikosil florid örnekleri arasında α -galaktosil florid, α -mannosil florid, α -glukozil florid, α -fukosil florid, α -ksilosil florid, α -sialil florid, α -N-asetilglukozaminil florid, α -N-asetilglukozaminil florid, β -galaktosil florid, β -mannosil florid, β -glukozil florid, β -fukosil florid, β -ksilosil florid, β -sialil florid, β -N-asetilglukozaminil florid ve β -N-asetilgalaktozaminil florid yer alır.

Bir modifiye edilmiş şeker tortusu, bir veya daha fazla suda çözülebilen polimere konjüge edilebilir. Suda çözülebilen birçok polimer bu konuda uzman kişilerce bilinir ve mevcut açıklamanın uygulanmasında faydalıdır. Suda çözülebilen polimer terimi, sakaritler (örn., dekstran, amiloz, hiyaluronik asit, poli(sialik asit), heparanlar, heparinler, vb.); poli(amino asitler); nükleik asitler; sentetik polimerler (örn., poli(akrilik asit), poli(eterler), örn., poli(etilen glikol)); peptitler, proteinler ve benzeri gibi türleri kapsar. Mevcut açıklama, suda çözülebilen herhangi bir polimer ile uygulanabilir, bunun tek sınırlaması, polimerin, konjügatın geri kalanının eklenebileceği bir nokta içermesidir.

Suda çözülebilen polimerlerin ve sakaritlerin aktifleştirilmesine yönelik yöntemlerin ve kimyanın yanı sıra sakaritlerin ve polimerlerin çeşitli türlere konjüge edilmesine yönelik yöntemler literatürde tarif edilir. Polimerlerin aktivasyonuna yönelik yaygın şekilde kullanılan yöntemler arasında fonksiyonel grupların siyanojen bromid, periodat, glutaraldehid, bi-epoksidler, epiklorohidrin, divinil sülfon, karbodiimid, sülfonil halidler, triklorotriazin, vb. ile aktivasyonu bulunur (bakınız R. F. Tailor, (1991), Protein Immobilization, Fundamentals and Applications, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong,

(1992), Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson ve arkadaşları, (1993), Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, N.Y.; Dunn, R. L. ve arkadaşları, Eds. Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series Cilt 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991)

Bazı yönlerde modifiye edilmiş bir şeker tortusu, bir veya daha fazla suda çözülmeyen polimere konjüge edilir. Suda çözülmeyen bir polimere konjügasyon, bir terapötik peptiti kontrollü tarzda vermek için kullanılabilir. Polimerik ilaç verme sistemleri bu konuda bilinmektedir. Bakınız örneğin, Dunn ve arkadaşları, Eds. Polymeric drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series Cilt 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Bu konuda uzman kişiler, önemli ölçüde bilinen herhangi bir ilaç verme sisteminin, burada tarif edilen konjüglara uygulanabileceğini takdir edecektir.

Temsilci suda çözülmeyen polimerler arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte polifosfazenler, poli(vinil alkoller), polyamidler, polikarbonatlar, polialkilenler, poliakrilamidler, polialkilen glikoller, polialkilen oksidler, polialkilen tereftalatlar, polivinil eterler, polivinil esterler, polivinil halidler, polivinilpirolidon, poliglikolidler, polisiloksanlar, poliüretanlar, poli(metil metakrilat), poli(etil metakrilat), poli(butil metakrilat), poli(izobutil metakrilat), poli(heksil metakrilat), poli(izodesil metakrilat), poli(lauril metakrilat), poli(fenil metakrilat), poli(metil akrilat), poli(izopropil akrilat), poli(izobutil akrilat), poli(oktadesil akrilat) polietilen, polipropilen, poli(etilen glikol), poli(etilen oksid), poli (etilen tereftalat), poli(vinil asetat),

polivinil klorid, polistiren, polivinil pirolidon, pluronikler ve polivinilfenol ve bunların kopolimerleri bulunur.

Bunlar ve burada tartışılan diğer polimerler, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), Polysciences (Warrenton, Pa.), Aldrich (Milwaukee, Wis.), Fluka (Ronkonkoma, N.Y.) ve BioRad (Richmond, Calif.) gibi ticari kaynaklardan kolayca temin edilebilir veya bu tedarikçilerden alınan monomerlerden standart teknikler kullanılarak sentezlenebilir. Burada tarif edilen konjüгатlarda faydalı, temsilci biyo-degrade olabilen polimerler arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte polilaktidler, poliglikolidler ve bunların kopolimerleri poli(etilen tereftalat), poli(butirik asit), poli(valerik asit), poli(laktid-kaprolakton), poli(lactid-ko-glikolid), polianhidridler, poliortoesterler, bunların harmanları ve kopolimerleri bulunur. Jeller oluşturan kompozisyonlar, örneğin kolajen ve pluronikler içerenler özellikle faydalıdır.

Bir veya daha fazla modifiye edilmiş şeker tortusu, bir veya daha fazla PEG molekülüne konjüğe edilebilir.

Bazı yönlerde modifiye edilmiş şeker, bir biyomoleküle konjüğe edilebilir. Burada tarif edilen biyomolekül, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte fonksiyonel proteinler, enzimler, antijenler, antikolar, peptitler, nükleik asitler (örn., tekli nükleotitler veya nükleosidler, oligonükleotitler, polinükleotitler ve tek ve daha fazla iplikçikli nükleik asitler), lektinler, reseptörleri veya bunların bir kombinasyonunu içerebilir. Biyo-moleküller esasen floresansızdır veya bir deneyde bir floresan markeri olarak kullanılmak üzere uygun olmayacakları minimum miktarda floresan yayabilir. Diğer biyomoleküller floresanlı olabilir.

Biyomolekül, bir hedefleme yarımı olabilir. Burada kullanıldığı gibi bir “hedefleme yarımı” ve “hedefleme ajanı”, vücudun belirli bir dokusunda veya bölgesinde seçici şekilde konumlanacak türe karşılık gelir. Burada tarif edilen SAP polipeptidini spesifik bir hücre içi 5 bölmeye yöneltecek şekilde bir biyo-molekül seçilebilir, bu şekilde peptidin bu hücre içi bölmeye verilmesi, dokuya verilen türevlendirilmemiş peptit miktarına kıyasla artar. Konumlanmaya, moleküler belirleyicilerin spesifik algısı, hedefleme ajanı veya konjüгатının moleküler büyüklüğü, iyonik etkileşimler, hidrofobik 10 etkileşimler ve benzeri aracılık eder. Bir ajanın belirli bir dokuya veya bölgeye hedeflenmesine yönelik başka mekanizmalar, bu konuda uzman kişilerce bilinir.

Modifiye edilmiş şeker, bir terapötik yarım içerebilir. Bu konuda uzman kişiler, terapötik yarım kategorisi ile biyomoleküller arasındaki 15 çakışmayı takdir edecektir, yani birçok biyomolekül, terapötik özelliklere veya potansiyele sahiptir.

Faydalı terapötik yarım sınıfları arasında örneğin steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçlar; steroid anti-enflamatuar ilaçlar; adjuvanlar; antihistaminik ilaçlar; antitusif ilaçlar; antipruritik ilaçlar; 20 antikolinergik ilaçlar; anti-emetik ve mide bulantısı önleyici ilaçlar; anoreksik ilaçlar; merkezi uyarıcı ilaçlar; antiaritmik ilaçlar; β -adrenergik bloker ilaçlar; kardiyotonik ilaçlar; antihipertansif ilaçlar; diüretik ilaçlar; vazodilatör ilaçlar; vazokonstriktör ilaçlar; antiülser ilaçlar; anestetik ilaçlar; antidepresan ilaçlar; trankilizer ve sedatif 25 ilaçlar; antipsikotik ilaçlar ve antimikrobiyal ilaçlar bulunur.

Mevcut açıklamanın uygulanmasında faydalı diğer ilaç yarımaları arasında antineoplastik ilaçlar, sitosidal ajanlar, anti-estrogenler ve antimetabolitler bulunur. Ayrıca tanı (örn. görüntüleme) ve terapi

amaçlı radyoizotop bazlı ajanlar ve konjüge edilmiş toksinler de bu sınıfa dahildir.

Terapötik yarım ayrıca bir hormon, bir kas gevşetici, bir antispazmodik, kemik aktiveleştirici ajan, endokrin modüle edici ajan, 5 diyabet modülatörü, androjen, antidiüretikler veya kalsitonin ilacı olabilir.

Diğer faydalı modifiye edici gruplar arasında immüno-modülatör ilaçlar, immüno-supresanlar, vb. bulunur. Sulindak, etodolak, ketoprofen ve ketorolak gibi anti-enflamatuar aktiviteli gruplar da 10 kullanılabilir. Mevcut açıklamayla bağlantılı olarak kullanılacak diğer ilaçlar bu konuda uzman kişilerce bilinecektir.

Burada tarif edilen yöntemlerle üretilen, değiştirilmiş N-glikosilasyon SAP polipeptitleri, homojen (yani SAP polipeptiti örneği, spesifik N-glikan yapısı açısından tektiptir) veya önemli ölçüde homojen olabilir. 15 "Önemli ölçüde homojen", SAP polipeptitlerinin en az yaklaşık %25'inin (örn., en az yaklaşık %27, en az yaklaşık %30, en az yaklaşık %35, en az yaklaşık %40, en az yaklaşık %45, en az yaklaşık %50, en az yaklaşık %55, en az yaklaşık %60, en az yaklaşık %65, en az yaklaşık %70, en az yaklaşık %75, en az yaklaşık %80, en az 20 yaklaşık %85, en az yaklaşık %90 veya en az yaklaşık %95 veya en az yaklaşık %99'unun) aynı spesifik N-glikan yapısını ihtiva etmesi anlamına gelir.

Burada tarif edilen varyant SAP polipeptitlerinin, monositlerin fibrositler halinde in vitro farklılaşmasını inhibe etmeye yönelik 25 IC₅₀'si, insan serumundan izole edilmiş, karşılık gelen bir vahşi tip SAP örneğinin 1/2'sinden az, 1/3'ünden az, 1/4'ünden az, 1/10'undan az veya 1/100'ünden azdır. Fibrosit farklılaşması için Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin (PBMC'ler) veya monosit hücrelerinin

SAP'ye tepkiselliğinin belirlenmesine yönelik birçok iyi karakterize edilmiş yöntem vardır. Bu yöntemler, burada tarif edilen SAP varyant polipeptitlerinin, insan serumundan türetilmiş bir SAP'a, başka bir SAP varyant polipeptidine veya başka fibrosit baskılayıcı veya aktifleştirici ajana kıyasla göreceli potansını belirlemek için kullanılabilir. Bu yöntemlerde kullanılmaya uygun PBMC'ler veya monositler, çeşitli doku kültürü çizgilerinden elde edilebilir. Alternatif olarak fibrosit farklılaşma deneyleri için uygun hücreler, PBMC veya monosit hücreleri ihtiva eden bir biyolojik örnekten elde edilebilir.

5

10 Biyolojik örnek, serumdan, plazmadan, sağlıklı dokudan veya fibrotik dokudan elde edilebilir. Genel olarak fibrosit farklılaşma deneyleri, PBMC'nin veya monosit hücrelerinin ortam içinde çeşitli konsantrasyonlarda bir SAP polipeptiti ile fibrosit farklılaşma derecesini belirlemek amacıyla inkübe edilmesi suretiyle

15 gerçekleştirilir. SAP konsantrasyonu, 0.0001 µg/mL ila 1 µg/ml arasında değişebilir ve bazı düzeneklerde 0.001 µg/mL, 1.0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL, 40 µg/mL, 45 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL veya 500 µg/mL'dir. Bazı deneylerde ortam, 1-100 ng/ml

20 hMCSF ile desteklenebilir; tercih edilen hMCSF konsantrasyonu 25 ng/mL'dir. PBMC ve monositlerin fibrositler halinde farklılaştığına dair gösterge, uzman kişilerce belirlenebilir. Genel olarak fibrositler, uzunlamasına iğ şeklinde olan ve oval bir çekirdeği bulunan yapışkan hücreler olarak morfolojik açıdan tanımlanır. Bazı deneylerde hücreler

25 sabitlenir ve örn., bir invert mikroskop kullanılarak direkt sayım yoluyla fibrositlerin sayılmasından önce Hema 3 ile boyanır. Fibrosit farklılaşma miktarı, bu konuda uzman kişilerce SAP'ye hücre tepkiselliği göstergesi olarak yorumlanır. Açıklamanın örnekleri ile

- gösterildiği gibi fibrosit farklılaşması ne kadar çok baskılanırsa bu, SAP tepkiselliğinin daha yüksek derecede olduğunu gösterir. Fibrosit farklılaşmasını ölçmeye yönelik alternatif bir yöntem, fibrosite spesifik hücre yüzeyi markerlerinin veya salgılanmış faktörlerin örn., sitokinlerin (örn., IL-1ra, ENA-78/CXCL-5, PAI-1), fibronektin, kolajen-1'in ekspresyonunun belirlenmesini içerir. Hücre yüzeyi markerlerinin veya salgılanmış faktörlerin saptanması ve/veya nicelendirilmesi yöntemleri bu konuda iyi bilinmekte olup bunlar arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte çeşitli ELISA ve FACS bazlı, bir veya daha fazla fibrosite spesifik markere yönelik immüno-reaktif antikörlerin kullanıldığı teknikler bulunur. Açıklamanın örneklerinde tarif edildiği gibi Makrofaj Türevli Kemokin (MDC) ekspresyonunun ölçülmesi, fibrosit farklılaşmasını belirlemenin etkili bir yöntemidir.
- 15 Bir SAP polipeptidinin N-glikosilasyonunun (örn., değiştirilmiş N-glikosilasyonunun) saptanmasına ve/veya karakterize edilmesine yönelik yöntemler arasında DNA sekanslayıcı yardımcı (DSA), florofor yardımcı karbohidrat elektroforezi (FACE) veya yüzey güçlendirmeli lazer desorpsiyon/iyonizasyon time-of-flight kütle spektrometresi (SELDI-TOF MS) bulunur. Örneğin bir analizde DSA-FACE kullanılabilir, burada örneğin glikoproteinler denature edildikten sonra örn. bir membran üzerinde immobilizasyon yapılır. Glikoproteinler daha sonra uygun bir indirgeyici ajan örneğin ditiyotreitol (DATA) veya β -merkaptoetanol ile indirgenebilir.
- 25 Proteinlerin sülfhidril grupları, iyodoasetik asit gibi bir asit kullanılarak karboksile edilebilir. Ardından N-glikanlar, N-glikosidase F gibi bir enzim kullanılarak proteinden salınabilir. N-glikanlar, isteğe bağlı olarak yeniden oluşturulabilir ve indirgeyici aminasyon yoluyla

türevlendirilebilir. Türevlendirilen N-glikanlar daha sonra konsantre edilebilir. N-glikan analizi için uygun aletler arasında örneğin ABI PRISM[®] 377 DNA sekanslayıcı (Applied Biosystems) bulunur. Veri analizi örneğin GENESCAN[®] 3.1 yazılımı (Applied Biosystems) kullanılarak yapılabilir. İsteğe bağlı olarak izole edilmiş mannoproteinler ayrıca bir veya daha fazla enzim ile işleme tabi tutularak bunların N-glikan durumu teyit edilebilir. Örnek enzimler arasında örneğin α -mannosidaz veya α -1,2 mannosidaz bulunur. İlave N-glikan analizi yöntemleri arasında örneğin kütle spektrometresi (örn., MALDI-TOF-MS), normal fazda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), geri fazlı ve iyon alışverişli kromatografi (örn., glikanlar etiketlenmediğinde pulslu amperometrik saptama ve glikanlar uygun şekilde etiketlenmiş ile UV absorbanslı veya floresanlı) bulunur. Bakınız ayrıca Callewaert ve arkadaşları, (2001) Glycobiology 11(4):275-281 ve Freire ve arkadaşları, (2006) Bioconjug. Chem. 17(2):559-564.

Tedavi Yöntemleri

Burada aynı zamanda bir hastada SAP'ye yanıt veren bir bozukluğun tedavisi içine yöntemler tarif edilmiş olup, burada terapötik açıdan etkili miktarda burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptiti, buna ihtiyaç duyan bir hastaya uygulanacaktır. Tedavinin dozajı ve sıklığı, bu konuda uzman kişilerce belirlenebilir ve hastanın semptomlarına, yaşına ve kilosuna ve tedavi edilecek veya önlenecek bozukluğun doğasına ve şiddetine bağlı olarak değişecektir. Bir varyant SAP polipeptiti, hastaya günde bir veya iki kez, haftada bir veya iki kez,

ayda bir veya iki kez veya semptomların başlamasından hemen önce veya başladığı anda uygulanacaktır.

Dozajlar, bu konuda uzman kişilerce bilinen veya burada öğretilen tekniklerle kolayca belirlenebilir. SAP'nin toksisitesi ve terapötik etkinliği, standart farmasötik prosedürlerle, örneğin LD₅₀ ve ED₅₀ belirlenerek deney hayvanlarında belirlenebilir. ED₅₀ (Etkili Doz 50), bir hayvan popülasyonunun %50'sinde belirtilen etkiyi üretmek için gerekli ilaç miktarıdır. LD₅₀ (Ölümcül Doz 50), aynı popülasyonun %50'sini öldüren ilaç dozudur.

10 SAP'a yanıt veren bozukluk, fibroz olabilir. SAP'nin fibroz için terapötik tedavi olarak kullanılması, ABD Patent Başvurusu No. 2007/0243163'te tarif edilir. Konu olan yöntem ile tedaviye açık olabilecek, fibrozla ilişkili bozukluklar arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte kolajen hastalığı, interstisyel akciğer hastalığı, insan fibrotik akciğer hastalığı (örn., obliteratif bronşiyolit, idiyopatik pulmoner fibroz, bilinen etiyojili pulmoner fibroz, akciğer hastalığında tümör stroma, akciğerleri etkileyen sistemik skleroz, Hermansky-Pudlak sendromu, kömür işçilerine ait pnömokonyoz, asbestoz, silikoz, kronik pulmoner hipertansiyon, AIDS ile bağlantılı pulmoner hipertansiyon, sarkoidoz, orta ila şiddetli astım ve benzeri), fibrotik vasküler hastalık, arteriyel skleroz, ateroskleroz, varikoz damarlar, koroner enfarktüs, serebral enfarktüs, miyokardiyal fibroz, muskuloskeletal fibroz, ameliyat sonrası adezyonlar, insan böbrek hastalığı (örn., nefritik sendrom, Alport sendromu, HIV ile bağlantılı nefropati, polikistik böbrek hastalığı, Fabry hastalığı, diyabetik nefropati, kronik glomerülonefrit, sistemik lupus ile bağlantılı nefrit ve benzeri), progresif sistemik skleroz (PSS), primer skalloping kolanjit (PSC), karaciğer fibrozu, karaciğer sirozu, renal fibroz,

pulmoner fibroz, kistik fibroz, kronik graft versus host hastalığı, skleroderma (lokal ve sistemik), Grave oftalmopati, diyabetik retinopati, glokom, Peyronie hastalığı, penis fibrozu, sistoskop sonrası üretrostenoz, ameliyat sonrası iç büyüme, skarlanma, miyelofibroz, 5 idiyopatik retroperitoneal fibroz, bilinen etiyolojili peritoneal fibroz, madde ile sağlanan ergotizm, benin veya malignan kansere bağlı fibroz, mikrobiyal enfeksiyona bağlı fibroz (örn., viral, bakteriyel, parazitik, mantar, vb.), Alzheimer hastalığı, enflamatuar bağırsak hastalığına bağlı fibroz (Crohn hastalığında striktür formasyonu ve 10 mikroskobik kolit), stromal hücre tümörleri, mukozit, kimyasal veya çevresel etkilerin neden olduğu fibroz (örn., kanser kemoterapisi, pestisitler veya radyasyon (örn., kanser radyoterapisi)) bulunur.

Fibrozla bağlantılı bozukluk, sistemik veya lokal skleroderma, keloidler, hipertrofik skarlar, ateroskleroz, restenoz, pulmoner 15 enflamasyon ve fibroz, idiyopatik pulmoner fibroz, karaciğer sirozu, kronik hepatit B veya C enfeksiyonunun sonucu olan fibroz, böbrek hastalığı, skar dokudan kaynaklanan kalp hastalığı, makuler dejenerasyon ve retinal ve vitreal retinopati arasından seçilebilir. Fibrozla alakalı bozukluk, kemoterapötik ilaçlardan, radyasyonun 20 neden olduğu fibrozdan ve yaralanma ve yanıklardan kaynaklanır. Fibrozla alakalı bozukluk veya durum, ameliyat sonrası, örn. trabeküektomi veya gözde başka filtreleme ameliyatları sonrası skarlanmadan kaynaklanır.

SAP'ye yanıt veren bozukluk, Th1 veya Th2 tepkilerinin aracılık 25 ettikleri gibi bir hipersensitivite bozukluğudur. SAP'nin hipersensitivite bozuklukları için terapötik tedavi olarak kullanılması da ABD Geçici Başvurusu No 61/209,795'te tarif edilir. SAP ile tedaviye açık olabilecek, hipersensitivite ile alakalı bozukluklar

arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte alerjik rinit, alerjik sinüzit, alerjik konjunktivit, alerjik bronkokonstriksiyon, alerjik dispne, akciğerlerde mukus üretiminde alerjik artış, atopik egzama, dermatit, ürtiker, anafilaks, pnömonit ve alerjik astım bulunur.

- 5 Burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptiti, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte antimikrobiyaller (örn., sefalosporinler, sülfonamidler, penisilin ve diğer β -laktamlar), antikonvulsanlar (örn., fenitoin, fenobarbital, karbamazepin, dapson, allopurinol ve minosiklin), kemoterapötikler (örn., taksanlar, platinyum bileşikleri,
- 10 asparaginazlar ve epipodofillotoksinler), heparin, insülin, protamin, aspirin ve diğer steroidal olmayan anti-enflamatuar ilaçlar, kas gevşeticiler (örn., sukunilkolin, atrakuryum vekuronyum ve pankuronyum), indükleme ajanları (örn., barbituratlar, etomidat, propofol), narkotikler (örn., fentanil, meperidin, morfin), intravasküler
- 15 hacim genişletme koloidleri, radyo-kontrast materyalleri, kan ürünleri, lateks, hayvan ürünleri, hayvan kepeği, toz akarları, böcekler (örn., ısırıklar, sokanlar veya venom), kozmetikler, metaller (örn., nikel, kobalt ve kromat), bitkiler, sporlar, polen, gıda (örn., süt, yumurtalar, buğday, soya, yer fıstığı ve ağaç fıstıkları, deniz ürünleri), aşılama ve
- 20 mantar antijenleri (örn., *Aspergillus*, *Curvularia*, *Exserohilum* ve *Alternaria* türleri) dahil çeşitli antijenlere verilen anafilaks gibi alerjene spesifik immün tepkilerinin tedavisinde kullanılabilir.

SAP'ye yanıt veren bozukluk, Th1 veya Th2 tepkilerinin aracılık ettikleri gibi bir otoimmün bozukluktur. SAP'nin otoimmün

25 bozukluklar için terapötik tedavi olarak kullanılması da ABD Geçici Başvurusu No 61/209,845'te tarif edilir. SAP ile tedaviye açık olabilecek, otoimmün ile alakalı bozukluklar arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte tip I diyabet, multipl skleroz, romatoid artrit,

psöryatik artrit, otoimmün miyokardit, pemfigus, myasthenia gravis, Hashimoto tirodit, Graves hastalığı, Addison hastalığı, otoimmün hepatit, kronik Lyme artrit, ailevi dilate kardiyomiyopati, juvenil dermatomiyosit, polikondrit, Sjogren sendromu, psöryazi, juvenil idiyopatik artrit, enflamatuar bağırsak hastalığı, sistemik lupus eritematoz, kronik obstruktif pulmoner hastalık ve graft-versus-host hastalığı bulunur.

SAP'a yanıt veren bozukluk, bir mukozit olabilir. SAP'nin mukozit için terapötik tedavi olarak kullanılması da ABD Başvurusu No 12/217,614'te tarif edilir. Burada tarif edilen yöntemler, oral, özofagal ve gastrointestinal mukozitin ve ayrıca gastrik ve duodenal ülserlerin veya mide ve özofagus erozyonlarının tedavisinde faydalı olabilir.

Burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptiti, bir enflamatuar hastalığın veya durumun tedavisinde kullanılabilir. Enflamatuar hastalık, bir viral, bakteriyel, mantar veya parazitik enfeksiyon olabilir. SAP'nin viral enfeksiyon için terapötik tedavi olarak kullanılması da ABD Patenti 6,406,698'de ve Uluslararası Patent Başvurusu No. WO1997/026906'da tarif edilmiştir.

20 Farmasötik Preparasyonlar ve Formülasyonlar

Bazı yönlerde burada tarif edilen yöntemler aynı zamanda en az bir varyant SAP polipeptitinin, süjeye bir terapötik ajan olarak uygulanmasını içerir. Burada tarif edilen terapötik ajanlar, bir veya daha fazla fizyolojik açıdan kabul edilebilir taşıyıcılar veya eksipyanlar kullanılarak geleneksel tarzda formüle edilebilir. Örneğin, terapötik ajanlar ve bunların fizyolojik açıdan kabul edilebilir tuzları ve solvatları örneğin enjeksiyon (örn., SubQ, IM, IP), inhalasyon veya insuflasyon (ağız veya burun yoluyla) veya oral,

bukal, dil altı, transdermal, nazal, parenteral veya rektal yoldan uygulanmak üzere formüle edilebilir. Terapötik ajanlar, hedef hücrelerin mevcut olduğu bölgede, yani spesifik bir doku, organ veya sıvıda (örn., kan, serebrospinal sıvı, tümör kütlesi, vb.) lokal uygulamaya yönelik olabilir.

Burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptitinin, burada tarif edildiği gibi bir hastada bir bozukluğun veya bir durumun tedavisi veya önlenmesi amaçlı bir ilacın üretiminde kullanılmasını, örneğin bir varyant SAP polipeptitinin burada tarif edilen bir bozukluğun veya durumun tedavisine yönelik ilacın üretiminde kullanılmasını sunar. Bazı yönlerde burada tarif edilen bir varyant SAP polipeptiti, burada tarif edilen bir hastalığın veya durumun tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yönelik bir farmasötik preparasyonu yapmak için kullanılabilir.

Terapötik ajanlar, sistemik ve topikal veya lokalize uygulama dahil olmak üzere çeşitli uygulama modları için formüle edilebilir. Teknikler ve formülasyonlar genellikle Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA'da bulunabilir. Parenteral uygulamada intramüsküler, intravenöz, intraperitonel ve subkütan dahil olmak üzere enjeksiyon tarif edilir. Enjeksiyon için bileşikler, sıvı çözeltiler içinde, tercihen fizyolojik açıdan uyumlu tamponlar, örneğin Hank çözeltisi veya Ringer çözeltisi içinde formüle edilebilir. Ek olarak bileşikler, katı formda formüle edilebilir ve kullanılmadan hemen önce çözülebilir veya süspansiyon edilebilir. Liyofilize formlar da dahildir. Terapötik ajanlar, hücrelere, bunlarla sınırlı olmamak üzere, lipozomlar içerisine kapsüle etme gibi bu konuda aşina kişiler tarafından bilinen çeşitli yöntemlerle, iyontoforez yoluyla veya hidrojeller, siklodekstrinler, biyo-bozunabilir

nanokapsüller ve biyo-adhesif mikrosferler gibi başka vesiküller içerisine dahil etme yoluyla uygulanabilir.

Oral uygulama için farmasötik kompozisyonlar, geleneksel vasıtalarla farmasötik açıdan kabul edilebilir eksipiyanlar, örneğin bağlama ajanları (örn., önceden jelatinleştirilmiş mısır nişastası, polivinilpirolidon ve hidroksipropil metilselüloz); dolgu maddeleri (örn., laktoz, mikrokristalli selüloz veya kalsiyum hidrojen fosfat); yağlayıcılar (örn., magnezyum stearat, talk ve silika); ayrıştırıcılar (örn., patates nişastası veya sodyum nişasta glikolat) veya ıslatıcı ajanlar (örn., sodyum lauril sülfat) ile hazırlanmış tabletler, pastiller veya kapsüller formunu alabilir. Tabletler, bu konuda iyi bilinen yöntemler ile kaplanabilir. Oral uygulamaya yönelik sıvı preparasyonlar, örneğin çözeltiler, şuruplar veya süspansiyonlar şeklinde olabilir veya bunlar, kullanılmadan önce su veya başka uygun bir araç ile oluşturulacak kuru bir ürün şeklinde sunulabilir. Bu sıvı preparasyonlar, geleneksel vasıtalar ile farmasötik açıdan kabul edilebilir katkı maddeleri, örneğin süspanse edici ajanlar (örn., sorbitol, şurup, selüloz türevleri ve hidrojene yenilebilir yağlar); emülsife edici ajanlar (örn., lesitin, akasya); sulu olmayan araçlar (örn., badem yağı, yağlı esterler, etil alkol, fraksiyonlu bitkisel yağlar) ve koruyucular (örn., metil veya propil-p-hidroksikarbonatlar, sorbit asit) ile birlikte hazırlanabilir. Preparasyonlar ayrıca tampon tuzları, aroma, renklendirici ve tatlandırıcı ajanlardan uygun olanları ihtiva edebilir. Oral uygulamaya yönelik preparasyonlar, aktif bileşiğin kontrollü salımını sağlamak için uygun şekilde formüle edilebilir.

İnhalasyon yoluyla uygulama (örn., pulmoner verme) terapötik ajanlar, uygun bir itici örn., diklorodiflorometan, trikloroflorometan, diklorotetrafloroetan, karbon dioksit veya başka uygun bir gaz

kullanılarak basınçlı paketlerden veya bir nebulizerden bir aerosol sprey sunumu formunda elverişli şekilde verilebilir. Bir basınçlı aerosol durumunda dozaj ünitesi, ölçülü bir miktar verecek bir valf sağlanarak belirlenebilir. Bir inhaler veya insüflatörde kullanılma
5 amaçlı örn., jelatinden yapıma kapsüller ve kartuşlar, bileşik ve laktoz veya nişasta gibi uygun bir toz bazdan oluşan bir toz karışım ihtiva edecek şekilde formüle edilebilir.

Burada tarif edilen yöntemlerde farmasötik bileşikler ayrıca intranazal veya intrabronkiyal yollardan örneğin insulfasyon, tozlar ve aerosol
10 formülasyonları halinde uygulanabilir (steroid inhalantlarının örnekleri için bakınız Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacol. 35:1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111). Örneğin aerosol formülasyonları, basınçlı kabul edilebilir iticiler örneğin diklorodiflorometan, propan, nitrojen ve benzeri içine
15 konulabilir. Bunlar ayrıca bir nebulizer veya bir atomizer içindeki gibi basınçlı olmayan preparasyonlar için farmasötikler olarak formüle edilebilir. Tipik olarak bu uygulama, sulu farmakolojik açıdan kabul edilebilir bir tampon içindedir.

Varyant SAP polipeptitlerinin respiratuar yoldan (örn., intranazal,
20 inhalasyon, vb.) verilmesine uygun farmasötik kompozisyonlar katı veya sıvı formda hazırlanabilir.

Burada tarif edilen SAP polipeptitleri, enjeksiyon, örn., bolus enjeksiyon veya sürekli infüzyon yoluyla parenteral uygulama için formüle edilebilir. Enjeksiyonluk formülasyonlar, koruyucu ilave
25 edilerek örn., ampuller veya çok dozlu kaplar içinde birim dozaj formunda sunulabilir. Kompozisyonlar, yağlı veya sulu araçlar içinde süspansiyonlar, çözeltiler veya emülsiyonlar gibi formlarda olabilir ve formülasyon ajanları örneğin süspanse edici, stabilize edici ve/veya

disperse edici ajanlar ihtiva edebilir. Alternatif olarak aktif muhteviyat, kullanım öncesinde uygun bir araç, örn., steril pirojensiz su ile oluşturulacak toz formunda olabilir.

Ek olarak burada tarif edilen SAP polipeptitleri, bir depo preparasyon olarak da formüle edilebilir. Bu gibi uzun tesirli formülasyonlar, 5 implantasyon (örneğin subkütan veya intramüsküler yolla) veya intramüsküler enjeksiyon yoluyla uygulanabilir. Bu nedenle örneğin terapötik ajanlar, uygun polimerik veya hidrofobik materyaller (örneğin kabul edilebilir bir yağ içinde bir emülsiyon şeklinde) veya 10 iyon değiştirme resinleri ile veya idareli çözülebilir türevler, örneğin idareli çözülebilir bir tuz şeklinde formüle edilebilir. Kontrollü salım formülü ayrıca patchleri kapsar.

Burada tarif edilen bileşikler, merkezi sinir sistemine (CNS) verilmek üzere formüle edilebilir (Begley, Pharmacology & Therapeutics 104: 15 29-45 (2004)'te ele alınmıştır). CNS'ye ilaç verilmesine yönelik geleneksel yaklaşımlar şunları içerir: nöro-cerrahi stratejileri (örn., intraserebral enjeksiyon veya intraserebroventriküler infüzyon); ajanın moleküler manipülasyonu (örn., kan-beyin bariyerinin endojen taşıma yollarından birinden faydalanma çabaları kapsamında kan-beyin 20 bariyerini kendi başına geçemeyen bir ajan ile kombinasyon halinde, bir endotelial hücre yüzeyi molekülü için afiniteye sahip bir taşıma peptiti içeren bir kimerik füzyon proteininin üretilmesi); bir ajanın lipit çözünürlüğünü arttırmak üzere tasarlanmış farmakolojik stratejiler (örn., suda çözülebilen ajanların lipit veya kolesterol taşıyıcılara konjüge edilmesi); ve hiperozmotik bozma yoluyla BBB 25 bütünlüğünün geçici olarak bozulması (bir mannitol çözeltisinin karotid arter içine infüzyonundan veya biyolojik açıdan aktif bir ajan örneğin bir anjiyotensin peptitin kullanılmasından kaynaklanır).

Burada tarif edilen SAP polipeptitleri genellikle topik ilaç uygulaması için uygun olan ve bu konuda bilinen bu gibi herhangi bir materyal içeren topik bir taşıyıcı ihtiva eden topik bir formülasyona dahil edilir. Topikal taşıyıcı, kompozisyonu arzu edilen formda, örn., bir merhem, losyon, krem, mikroemülsiyon, jel, yağ, çözelti veya benzeri şekilde 5 sağlayacak şekilde seçilebilir ve doğal yollarla meydana gelen yada sentetik orijinli bir materyalden oluşabilir. Seçilen taşıyıcının, aktif ajanı veya topik formülasyondaki diğer bileşenleri olumsuz yönde etkilememesi tercih edilebilir. Burada kullanım için uygun topik 10 taşıyıcıların örnekleri arasında su, alkoller ve diğer toksik olmayan organik solventler, gliserin, madeni yağ, silikon, vazelin, lanolin, yağ asitleri, bitkisel yağlar, parabenler, balmumları ve benzeri yer alır.

Farmasötik kompozisyonlar (kozmetik preparasyonlar dahil), ağırlık olarak yaklaşık %0.00001 ila %100, örneğin %0.001 ila %10 veya 15 %0.1 ila %5 bir veya daha fazla burada tarif edilen varyant SAP polipeptiti içerebilir. Bazı topik formülasyonlarda aktif ajan, formülasyonun ağırlığa göre yaklaşık olarak %0.25 ila %75'i aralığında, tercihen formülasyonun ağırlığa göre yaklaşık olarak %0.25 ila %30'u aralığında, daha fazla tercihen formülasyonun 20 ağırlığa göre yaklaşık olarak %0.5 ila %15'i aralığında ve en fazla tercihen de formülasyonun ağırlığa göre yaklaşık olarak %1.0 ila %10'u aralığında mevcuttur.

Gözdeki durumlar örn., terapötik ajanların sistemik, topik, intraoküler enjeksiyonu veya terapötik ajanları salan bir sürekli salım cihazının 25 sokulması yoluyla tedavi edilebilir veya önlenir. Burada tarif edilen SAP polipeptitleri, farmasötik açıdan kabul edilebilir oftalmik bir araç içinde verilebilir, böylece bileşik, bileşiğin, korneaya ve gözün iç bölgelerine, örn., ön odacık, konjunktiva, arka odacık, vitröz

yapı, sulu salgı, vitröz salgı, kornea, iris/siliyer, lens, koroid/retina ve skleraya nüfuz etmesini sağlamaya yeterli bir zaman periyodu boyunca oküler yüzey ile temas halinde tutulur. Farmasötik açıdan kabul edilebilir oftalmik araç örneğin bir merhem, bitkisel yağ veya kapsüle edici bir materyal olabilir. Alternatif olarak bileşikler, vitröz veya sulu salgı içine direkt olarak enjekte edilebilir. Bir başka alternatifte bileşikler, gözün tedavisinde kullanılmaya yönelik, sistemik uygulama örneğin intravenöz infüzyon veya enjeksiyon amaçlı olabilir.

10 Burada tarif edilen terapötik ajanlar, bu konudaki yöntemlere göre oksijensiz ortamda saklanabilir.

Ornek kompozisyonlar, bir veya daha fazla farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı ve isteğe bağlı olarak başka terapötik muhteviyatlar ile birlikte bir SAP polipeptiti içerir. Taşıyıcı(lar), kompozisyonun diğer muhteviyatları ile uyumlu olma ve süjude kabul edilemez bozucu bir etki uyandırmama anlamında "farmasötik açıdan kabul edilebilir" olmalıdır. Bu taşıyıcılar burada tarif edilmiştir veya başka şekilde farmakoloji konusunda uzman kişilerce iyi bilinmektedir. Farmasötik kompozisyonlar, pirojensizdir ve bir insan hastaya uygulanmaya uygundur. Farmasötik kompozisyonlar, tahriş edici taşıyıcı ve bir insan hastaya uygulanmaya uygundur. Farmasötik kompozisyonlar, alerjen taşıyıcı ve bir insan hastaya uygulanmaya uygundur. Kompozisyonlar, eczacılık alanında iyi bilinen yöntemlerden herhangi biriyle hazırlanabilir.

25 Bir SAP polipeptiti, zaman salımlı bir formülasyon içinde, örneğin bir yavaş salım polimeri içeren bir kompozisyon içinde uygulanabilir. Bir SAP polipeptiti, hızlı salıma karşı koruma sağlayacak taşıyıcılar ile birlikte hazırlanabilir. Örnekler arasında bir kontrollü salım aracı

örneğin bir polimer, mikro-kapsül haline getirilmiş bir verme sistemi veya biyo-yapışkan jel bulunur. Alternatif olarak bir SAP polipeptidinin uzun süreli verilmesi, kompozisyon içine, absorpsiyonu geciktiren ajanların, örneğin alüminyum monostearat hidrojel ve jelatinin dahil edilmesi suretiyle sağlanabilir.

Nükleik asit bileşiklerinin verilmesine yönelik yöntemler bu konuda bilinmektedir (bakınız örn., Akhtar ve arkadaşları, 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; ve Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Sullivan ve arkadaşları, Uluslararası Başvuru No. WO 94/02595). Bu protokoller, hemen hemen her nükleik asit bileşiğinin verilmesi için kullanılabilir. Nükleik asit bileşikleri, hücrelere, bunlarla sınırlı olmamak üzere, lipozomlar içerisine kapsüle etme gibi bu konuda aşına kişiler tarafından bilinen çeşitli yöntemlerle, iyontoforez yoluyla veya hidrojel, siklodekstrinler, biyo-bozunabilir nanokapsüller ve biyo-adhesif mikrosferler gibi başka vesiküller içerisine dahil etme yoluyla uygulanabilir. Alternatif olarak nükleik asit/araç kombinasyonu, direkt enjeksiyon veya bir infüzyon pompası kullanımı yoluyla lokal olarak verilir. Diğer verme yolları arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte oral (tablet veya hap formu) ve/veya intratekal verme (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158) bulunur. Diğer yaklaşımlar arasında çeşitli transport ve taşıma sistemlerinin kullanılması, örneğin konjüгатların ve biyo-bozunabilen polimerlerin kullanılması bulunur. İlaç verme stratejileri hakkında kapsamlı bir inceleme için bakınız Ho ve arkadaşları, 1999, Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 336-343 ve Jain, Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 ve Groothuis ve arkadaşları, 1997, J. NeuroVirol., 3, 387-400. Nükleik asit verme ve uygulamasının daha

detaylı tarifleri, Sullivan ve arkadaşları, yukarıda, Draper ve arkadaşları, PCT WO93/23569, Beigelman ve arkadaşları, Uluslararası Başvuru No. WO99/05094 ve Klimuk ve arkadaşları, Uluslararası Yayın No. WO99/04819'da sunulur.

5

Ornekler, açıklama amaçlı olarak sunulmuştur.

ORNEKLER

10 Ornek 1: Rekombinant SAP, insan serumundan türetilmiş SAP'den daha güçlüdür.

CHO-S hücrelerinden izole edilmiş rekombinant insan SAP (rhSAP) ve insan serumundan türetilmiş SAP (hSAP), bir in vitro biyo-deney kullanılarak biyo-aktivite açısından deneye tabi tutuldu. Bu deneyde
15 monosit açısından zengin Periferel Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC'ler), değişik konsantrasyonlarda rhSAP veya hSAP ile 96 saat süreyle inkübe edildi. Bu inkübasyonun ardından ortaya çıkar kültür süpernatantları çıkarıldı ve ELISA ile deneye tabi tutularak üretilen Makrofaj Türevli Kemokin (MDC) miktarı nicelendirildi.
20 MDC, fibrositler tarafından üretilir ve bu nedenle monositlerin fibrositler halinde farklılaşmasının bir göstergesidir. Ornek ile hSAP referans standart arasında inhibitör konsantrasyonunun, %50 (IC₅₀) karşılaştırılması suretiyle bir SAP glikovaryantının nispi potansı belirlenebilir. Sonuç, hSAP referans standardına göre örneğin
25 IC₅₀ oranı olarak ifade edilir.

Tüm SAP örnekleri ve standartları başlangıçta Desteklenmiş FibroLife Ortamı içinde 1.0 mg/mL konsantrasyona kadar seyreltildi. SAP standartları seri şekilde seyreltilerek 60, 30, 20, 13.4, 8.8, 6.0, 3.0, 1.5

ve 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çalışma standart konsantrasyonları üretildi (nihai standart konsantrasyon 30, 15, 10, 6.7, 4.4, 3.0, 1.5, 0.75 ve 0.375 $\mu\text{g/mL}$). Bakınız aşağıdaki Tablo 1.

Çalışma rhSAP Standart Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Standart Hacmi	Desteklenmiş FibroLife Ortam Hacmi
60	60 (1mg/mL)	940
30	600 (60 $\mu\text{g/mL}$)	600
20	800 (30 $\mu\text{g/mL}$ Std)	400
13.4	800 (20 $\mu\text{g/mL}$ Std)	400
8.8	800 (13.4 $\mu\text{g/mL}$ Std)	400
6.0	800 (8.8 $\mu\text{g/mL}$ Std)	400
3.0	600 (6.0 $\mu\text{g/mL}$ Std)	600
1.5	600 (3.0 $\mu\text{g/mL}$ Std)	600
0.75	600 (1.5 $\mu\text{g/mL}$ Std)	600

5

ELISA deneyi için hazırlanmak amacıyla yakalama antikoru (yani, fare anti-insan MDC), taşıyıcı protein olmadan PBS içinde çalışma konsantrasyonuna seyreltildi. Seyreltilen yakalama antikoru, 96 oyuklu plakaları kaplamak için kullanıldı ve sonra her plaka kapatıldı ve bir gece süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Kaplanan plakaları kullanmadan önce her oyuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile yıkandı, bu proses toplam üç yıkama için iki kez tekrar edildi. Daha sonra her oyuğa 300 μL reaktif madde seyreltici ilave edilerek ve oda sıcaklığında bir saat süreyle inkübe edilerek plakalar bloke edildi. İnkübasyondan sonra havalandırma ve oyuk yıkama prosedürü tekrar edildi.

15

ELISA deneyi için monosit/fibrosit kültürlerinden veya SAP standartlarından gelen süpernatantlardan 100 μL 'lik örnekler her oyuğa

ilave edildi. Plaka daha sonra oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildikten sonra havalandırıldı ve oyuklar yıkandı. Sonra 100 μL 'lik bir Streptavidin-HRP çalışma seyreltisi her oyuğa ilave edildi. Plaka 20 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra her oyuğa 50 μL Durdurma Çözeltisi ilave edildi. Hemen her oyuğun optik yoğunluğu, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikrolaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Dalga boyu düzeltilmesi mevcut ise mikrolaka okuyucu, 540 nm'ye veya 570 nm'ye ayarlandı. Dalga boyu düzeltilmesi mevcut değil ise 540 nm'de veya 570 nm'de yapılan okumalar, 450 nm'de yapılan okumalardan çıkarıldı. Bu çıkarma, plakadaki optik kusurları düzeltir.

RHSAP ve hSAP, bu deney kullanılarak biyo-aktivite açısından deneye tabi tutuldu (Şekil 1). Ortalama olarak RHSAP, hSAP'den 3.4 kat daha aktiftir (7 bağımsız deneyin ortalaması).

15

Ornek 2: SAP glikan yapılarının modifikasyonu

İn vitro gliko yeniden modelleme teknikleri kullanılarak bir rekombinant insan SAP (rhSAP) örneği üzerindeki glikan yarımları, terminal $\alpha 2,3$ bağlı sialik asit yarımlarını $\alpha 2,6$ bağlı sialik asit yarımları ile değiştirecek şekilde modifiye edildi (Şekil 2, A ve B). Benzer şekilde insan serumundan türetilmiş bir SAP (hSAP) örneği de terminal $\alpha 2,6$ bağlı sialik asit yarımlarını $\alpha 2,3$ bağlı sialik asit yarımları ile değiştirecek şekilde modifiye edildi (Şekil 2, C ve D). Ek olarak CHO-S hücrelerinden izole edilen rhSAP ancak kısmen sialile olduğundan bir rhSAP örneği, ekli glikan yapılarını $\alpha 2,3$ bağlı sialik asit yarımları ile tamamen sialile etmek üzere işleme tabi tutuldu (Şekil 2, E ve F).

rhSAP ve hSAP (Calbiochem Kat#970549), bir α 2,3,6,8,9-sialidaz (Sigma Kat #N8271) ile işleme tabi tutularak polipeptitlerin sialilasyonu tamamen giderildi. 17 saat süreyle sialidaz işleminden sonra desialile edilmiş (yani asialo) rhSAP ve hSAP, fosfoetanolamin (PE) afinite ve ebat eksklüzyonlu (Sephadex 200 prep dereceli) kromatografi kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan asialo SAP polipeptitleri daha sonra α 2,3- veya α 2,6-sialiltransferazlar (Calbiochem Kat #566223) kullanılarak, CMP-sialik asit (Calbiochem Kat #233264) varlığında 17 saat süreyle 37°C'de enzimatik olarak işleme tabi tutuldu. Aşağıdaki tablolar, her reaksiyon karışımının detaylarını verir.

Asialo rhSAP Reaksiyonları (Rxns)			
α2,3 sialiltransferaz ile işleme tabi tutma (ST3Gal3)			
	parametre	birim	değer
rhSAP, ST3Gal3 reaktif madde stokları	[asialo rhSAP] stk	mg/mL	10.8
	asialo rhSAP MW	g/mol	116293
	[asialo hSAP] stk	μ M	93
	maks [Galaktoz]	μ M	929
	[ST3Gal3] stk	mg/mL	0.9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μ M	10.7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn hacimleri	rxn'de μ L asialo rhSAP	μ L	260
	rxn'de μ L ST3Gal3	μ L	50
	rxn'de μ L CMP-SA	μ L	75
	tampon (10mM	μ L	615

	HEPES/150 mM NaCl, pH 8)		
	toplam rxn hacmi	μL	1000
rxn konsantrasyonları	[asialo rhSAP] rxn	μM	24.1
	maks [Galaktoz]	μM	241
	[SAP] rxn	mg/mL	2.8
	[ST3Gal3] rxn	μM	0.5357
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0.045
	[CMP-SA] rxn	mM	2.85
	asialo rhSAP:ST3	kütle oranı	62
	asialo rhSAP:ST3	molar oran	45
	CMP-SA:ST3	molar oran	5316
	CMP-SA:asialo rhSAP	molar oran	118
	CMP-SA:Galaktoz	molar oran	11.8
α2,6 sialiltransferaz ile işleme tabi tutma (ST6 Rxn)			
	parametre	birim	değer
rhSAP, ST6 reaktif madde stokları	[asialo rhSAP] stk	mg/mL	10.8
	asialo rhSAP MW	g/mol	116293
	[asialo rhSAP] stk	μM	93
	maks [Galaktoz]	μM	929
	[ST6] stk	mg/mL	0.205
	ST6 MW	g/mol	42000
	[ST6] stk	μM	4.9

	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn hacimleri	rxn'de μ L asialo rhSAP 1	μ L	260
	rxn'de μ L ST6	μ L	30
	rxn'de μ L CMP-SA	μ L	75
	tampon (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μ L	635
	toplam rxn hacmi	μ L	1000
rxn konsantrasyonları	[asialo rhSAP] rxn	μ M	24.1
	max [Galaktoz]	μ M	241
	[asialo rhSAP] rxn	mg/mL	2.8
	[ST6] rxn	μ M	0.146
	[ST6] rxn	mg/mL	0.006
	[CMP-SA] rxn	mM	2.85
	asialo rhSAP:ST6	k \ddot{u} tle oranı	457
	asialo rhSAP:ST6	molar oran	165
	CMP-SA:ST6	molar oran	19448
	CMP-SA:asialo rhSAP	molar oran	118
	CMP-SA:Galaktoz	molar oran	11.8
hSAP, ST3Gal3 reaktif madde stokları	[asialo hSAP] stk	mg/mL	5.6
	SAP MW	g/mol	116293
	[asialo hSAP] stk	μ M	48

	max [Galaktoz]	μM	482
	[ST3Gal3 stk	mg/mL	0.9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μM	10.7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn hacimleri	rxn'de μL asialo hSAP	μL	500
	rxn'de μL ST3Gal3	μL	50
	rxn'de μL CMP-SA	μL	75
	tampon (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μL	375
	toplam rxn hacmi	μL	1000
rxn konsantrasyonları	[asialo hSAP] rxn	μM	24.1
	max [Galaktoz]	μM	241
	[asialo hSAP] rxn	mg/mL	2.8
	[ST3Gal3] rxn	μM	0.54
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0.045
	[CMP-SA] rxn	mM	2.85
	asialo hSAP:ST3	kütle oranı	62
	asialo hSAP:ST3	molar oran	45
	CMP-SA:ST3	molar oran	5316
	CMP-SA:asialo hSAP	molar oran	118
	CMP-SA:Galaktoz	molar	11.8

		oran	
α2,6 sialiltransferaz ile işleme tabi tutma (ST6Rxn)			
	parametre	birim	değer
hSAP,ST6 reaktif madde stokları	[asialo HSAP] stk	mg/mL	5.6
	asialo hSAP MW	g/mol	116293
	[asialo HSAP] stk	μ M	48
	max [Galaktoz]	μ M	482
	[ST6] stk	mg/mL	0.205
	ST6 MW	g/mol	42000
	[ST6] stk	μ M	4.9
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn hacimleri	rxn'de μ L asialo hSAP	μ L	500
	rxn'de μ L ST6	μ L	30
	rxn'de μ L CMP-SA	μ L	75
	tampon (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μ L	395
	toplam rxn hacmi	μ L	1000
rxn konsantrasyonları	[asialo hSAP] rxn	μ M	24.1
	maks [Galaktoz]	μ M	241
	[asialo hSAP] rxn	mg/mL	2.8
	[ST6] rxn	μ M	0.146
	[ST6] rxn	mg/mL	0.006
	[CMP-SA] rxn	mM	2.85
	asialo hSAP:ST6	kütle oranı	455
	asialo hSAP:ST6	molar	164

		oran	
	CMP-SA:ST6	molar oran	19448
	CMP-SA:asialo hSAP	molar oran	118
	CMP-SA:Galaktoz	molar oran	11.8

Ayrı bir reaksiyonda rhSAP'nin α 2,3-sialiltransferaz kullanılarak ve ilk önce molekül desialile edilmeden komple sialilasyonu, 37°C'de 17 saat süreyle aşağıdaki tabloya göre yapıldı.

5

α2,3 sialiltransferaz ile işleme tabi tutma (ST3Gal3)			
	parametre	birim	değer
rhSAP ST3Gal3 reaktif madde stokları	[rhSAP] stk	mg/mL	19.0
	rhSAP MW	g/mol	11629 3
	[rhSAP] stk	μ M	163
	maks [Galaktoz]	μ M	1634
	[ST3Gal3] stk	mg/mL	0.9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μ M	10.7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn hacimleri	rxn'de μ L rhSAP	μ L	500
	rxn'de μ L ST3Gal3	μ L	50
	rxn'de μ L CMP-SA	μ L	100
	tampon (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μ L	350

	toplam rxn hacmi	μL	1000
rxn konsantrasyonları	[rhSAP] rxn	μM	81.7
	maks [Galaktoz]	μM	817
	[rhSAP] rxn	mg/mL	9.5
	[ST3Gal3] rxn	μM	0.54
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0.045
	[CMP-SA] rxn	mM	3.80
	BTA-02-17:ST3	kütle oranı	211
	BTA-02-17:ST3	molar oran	152
	CMP-SA:ST3	molar oran	7088
	CMP-SA:BTA-02-17	molar oran	46
CMP-SA:Galaktoz	molar oran	4.6	

Sialilasyon işleminden sonra sialile edilmiş rhSAP ve hSAP varyantları, PE afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı, ardından 10 mM NaPi/%5 sorbitol pH 7.5 (P5S tamponu) içine diyaliz edildi. Arzu edilen sialik asit bağlarının (yani α 2,3 bağlı hSAP ve α 2,6 bağlı RHSAP) konfirmasyonu, Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi (Şekil 2; A, C ve E) ve Anyon Alışverişli Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Şekil 2; B, D ve F) kullanılarak, glikovaryant SAP polipeptitlerinin α 2,3 sialidaz (Calbiochem Kat#480706) ile 37°C'de 24 saat süreyle işleme tabi tutulmasından sonra gerçekleştirildi.

Ornek 3: Fibrositler halinde monosit farklılaşmasının inhibe edilmesi açısından SAP glikovaryant potansını belirlemek için in vitro biyo-deneyle

- 5 Gliko yeniden modellenmiş rHSAP ve hSAP, Ornek 1’de tarif edilen aynı in vitro biyo-deneyle kullanılarak biyo-aktivite açısından deneye tabi tutuldu. Kısaca monosit açısından zengin periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC’ler), değişik konsantrasyonlarda bir SAP polipeptidi ile 96 saat süreyle inkübe edildi. Bu inkübasyonun
- 10 ardından ortaya çıkar kültür süpernatantları çıkarıldı ve ELISA ile deneye tabi tutularak üretilen Makrofaj Türevli Kemokin (MDC) miktarı nicelendirildi. Sonuçlar, hSAP referans standardına göre örneğin IC₅₀ oranı olarak ifade edildi ve nispi aktivite olarak çizildi (hSAP nispi aktivitesi = 1). Tüm α 2,3-sialik asit bağı ihtiva eden test
- 15 materyalleri, hSAP’dan ≥ 2.4 kat daha aktifti (Şekil 3). SAP’nin α 2,3 ve α 2,6 bağı sialik asit türevlerinin eşit karışımları, beklendiği gibi %100 α 2,6 bağı ve %100 α 2,3 bağı SAP arasında orta aktivite düzeyleri gösterir (Şekil 3’te en sağdaki iki çubuk).

- Fibrosit farklılaşmasını nicelendirmenin alternatif bir yöntemi,
- 20 monositler bir fibrosit baskılayıcı (örn., SAP veya bunun varyantı) veya aktiveleştirici bir ajan (örn. M-CSF) ile inkübe edildikten sonra üretilen fibrosit sayısının direkt olarak sayılmasını içerir. Bir deneyde monositler, tam kandan türetilmiş PBMC’den, bu konuda standart olan negatif manyetik tane seçimi (örn., CAT# 113-41D, Invitrogen,
- 25 Carlsbad, CA) kullanılarak saflaştırıldı ve 25 veya 50 ng/ml M-CSF ile desteklenmiş FibroLife Ortam ihtiva eden 96 Oyuklu bir doku kültürü plakası içinde üç tekrar halinde kültürlendi. Plaka, 96 saat süreyle 37°C’de %5 CO₂ inkübatör içinde inkübe edildi. Hücreler

daha sonra paraformaldehid ile sabitlendi ve Hema 3 boya (Kat # 122-911, Hema 3 Boya, Fisher Scientific, Hampton, NH) ile boyandı. Oyuk başına fibrosit sayısı, bir invert mikroskop kullanılarak oyuk başına beş farklı alanın sayımı toplanarak belirlendi. Fibrositler, 5 uzunlamasına iğ şeklinde olan ve oval bir çekirdeği bulunan yapışkan hücreler olarak morfolojik açıdan tanımlandı. Veriler, 25 veya 50 ng/ml M-CSF'nin bu donörde monositlerden farklılaşan fibrosit sayısını ~%50 oranında arttırmak için yeterli olduğunu gösterdi (Şekil 4). Takip eden deneylerde 25 ng/ml M-CSF ile desteklenmiş FibroLife 10 Ortamı gerektiği kadar ve aşağıda tanımlandığı gibi kullanıldı.

Fibrolife Ortamı: (Kat # LM-0001, Lifeline Cell Technology, Walkersville, MD), 10 mM HEPES (Kat # H0887, Sigma-Aldrich), 1 x esansiyel olmayan amino asitler (Kat # M7145, Sigma-Aldrich,), 1 mM sodyum piruvat (Kat # S8636, Sigma-Aldrich), 2 mM glutamin 15 (Kat # 25030-149, Invitrogen), 100 U/ml penisilin ve 100 ug/ml streptomisin (Kat # P0781, Sigma-Aldrich) ve ITS-3 (Kat # I2771, 500 ug/ml sığır serum albümini, 10 ug/ml insulin, 5 ug/ml transferrin, 5 ng/ml sodyum selenit, 5 ug/ml linoleik asit ve 5 ug/ml oleik asit ; Sigma-Aldrich) ile desteklenmiş.

20 İlave bir deneyde PBMC veya monositler, tam kandan saflaştırıldı ve çeşitli miktarlarda SAP ile desteklenmiş FibroLife Ortam (yukarıda tarif edildiği gibi) içinde üç tekrar halinde kültürlendi. Plaka, 96 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂ inkübatör içinde inkübe edildi. Hücreler daha sonra paraformaldehid ile sabitlendi ve Hema 3 boya (Kat # 122- 25 911, Hema 3 Boya, Fisher Scientific, Hampton, NH) ile boyandı. Oyuk başına fibrosit sayısı, bir invert mikroskop kullanılarak oyuk başına beş farklı alanın sayımı toplanarak belirlendi. Bu sistemde fibrosit farklılaşmasının maksimum inhibisyonunu sağlamak için

gerekli minimum SAP konsantrasyonu 2ug/ml olarak belirlendi (Şekil 5). Fibrosit sayısı, tüm donörlerde artan SAP konsantrasyonu ile azalır.

SEKANS LİSTESİ

<110> PROMEDIOR, INC.

5 <120> SERUM AMİLOİD P TÜREVLERİ BUNLARIN PREPARASYONU VE
KULLANIMI

<130> T3337 EP/1

10

<150> 61/217,931

<151> 2009-06-04

<160> 4

15

<170> PatentIn versiyonu 3.5

<210> 1

<211> 204

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<400> 2

Gln Glu Asp Leu Tyr Arg Lys Val Phe Val Phe Arg Glu Asp Pro Ser
 1 5 10 15

Asp Ala Tyr Val Leu Leu Gln Val Gln Leu Glu Arg Pro Leu Leu Asn
 20 25 30

Phe Thr Val Cys Leu Arg Ser Tyr Thr Asp Leu Thr Arg Pro His Ser
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Ala Gln Asp Asn Glu Ile Leu Leu Phe
 50 55 60

Lys Pro Lys Pro Gly Glu Tyr Arg Phe Tyr Val Gly Gly Lys Tyr Val
 65 70 75 80

Thr Phe Arg Val Pro Glu Asn Arg Gly Glu Trp Glu His Val Cys Ala
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Leu Asn Gly Arg
 100 105 110

Pro Trp Pro Arg Lys Gly Leu Gln Lys Gly Tyr Glu Val Gly Asn Glu
 115 120 125

Ala Val Val Met Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Val Tyr Asn Ser Phe Thr Gly Glu Met Ala Asp Val His Leu Trp
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Leu Ser Pro Asp Lys Met Arg Ser Ala Tyr Leu Ala Leu
 165 170 175

Arg Leu Pro Pro Ala Pro Leu Ala Trp Gly Arg Leu Arg Tyr Glu Ala
 180 185 190

Lys Gly Asp Val Val Val Lys Pro Arg Leu Arg Glu Ala Leu Gly Ala
 195 200 205

<210> 3

<211> 205

<212> PRT

5 <213> Bos taurus

<400>3

Gln Thr Asp Leu Arg Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Ser
 1 5 10 15
 Thr Asp His Val Thr Leu Ile Thr Lys Leu Glu Lys Pro Leu Lys Asn
 20 25 30
 Leu Thr Leu Cys Leu Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Gly Tyr Ser
 35 40 45
 Leu Phe Ser Tyr Asn Ile His Ser Lys Asp Asn Glu Leu Leu Val Phe
 50 55 60
 Lys Asn Gly Ile Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Lys Thr Lys Val
 65 70 75 80
 Thr Val Arg Ala Thr Glu Lys Phe Pro Ser Pro Val His Ile Cys Thr
 85 90 95
 Ser Trp Glu Ser Ser Thr Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Lys
 100 105 110
 Pro Leu Val Lys Arg Gly Leu Lys Gln Gly Tyr Ala Val Gly Ala His
 115 120 125
 Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140
 Asp Lys Asn Gln Ser Phe Met Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp
 145 150 155 160
 Asp Ser Val Leu Ser Pro Glu Glu Ile Leu Leu Val Tyr Gln Gly Ser
 165 170 175
 Ser Ser Ile Ser Pro Thr Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Lys Tyr Glu
 180 185 190
 Ile Lys Gly Tyr Val Ile Val Lys Pro Met Val Trp Gly
 195 200 205
 <210> 4
 <211> 204
 <212> PRT
 5 <213> *Cricetulus migratorius*
 <400> 4

Gln Thr Asp Leu Thr Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Glu
 1 5 10 15

Ser Asp Tyr Val Lys Leu Ile Pro Arg Leu Glu Lys Pro Leu Glu Asn
 20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Thr Tyr Thr Asp Leu Ser Arg Pro His Ser
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Lys Asn Lys Asp Asn Glu Leu Leu Ile Tyr
 50 55 60

Lys Glu Arg Met Gly Glu Tyr Gly Leu Tyr Ile Glu Asn Val Gly Ala
 65 70 75 80

Ile Val Arg Gly Val Glu Glu Phe Ala Ser Pro Val His Phe Cys Thr
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Asp Phe Trp Val Asn Gly Ile
 100 105 110

Pro Trp Val Lys Lys Gly Leu Lys Lys Gly Tyr Thr Val Lys Thr Gln
 115 120 125

Pro Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Asn Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Lys Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Met Gly Asp Ieu Asn Met Trp
 145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Thr Pro Glu Glu Ile Lys Ser Val Tyr Glu Gly Ser
 165 170 175

Trp Leu Glu Pro Asn Ile Leu Asp Trp Arg Ala Leu Asn Tyr Glu Met
 180 185 190

Ser Gly Tyr Ala Val Ile Arg Pro Arg Val Trp His
 195 200

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- US 707333 A [0003]
- US 12217617 B [0003]
- US 12720845 B [0003]
- US 12720847 B [0003]
- WO 9922764 A [0032]
- WO 9858964 A [0032]
- WO 9954342 A [0032]
- US 5047335 A [0032]
- JP 2004049214 A [0076]
- US 5876980 A [0079]
- US 6030815 A [0079]
- US 5728554 A [0079]
- US 5922577 A [0079]
- US 20070243163 A [0115]
- US 61209795 A [0117]
- US 61209845 A [0119]
- US 217614 A [0120]
- US 6406698 B [0121]
- WO 1997026906 A [0121]
- WO 9402595 A, Sullivan [0138]
- WO 9323569 A, Draper [0138]
- WO 9905094 A, Beigelman [0138]
- WO 9904819 A, Klimuk [0138]
- EP 61217931 A [0153]

10 Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **HEEGAARD et al.** Journal of Chromatography A, 1999, vol. 853 (1-2), 189-195 [0002]
- **SIEBERT et al.** FEBS Letters, 1995, vol. 371 (1), 13-16 [0002]
- **SIEBERT et al.** Glycoconjugate Journal, 1997, vol. 14 (8), 945-949 [0002]
- **BOYSEN et al.** Protein Expr Purif, 2004, vol. 35 (2), 284-92 [0002]
- **KIERNAN et al.** Proteomics, 2004, vol. 4 (6), 1825-1829 [0002]
- **SINGH et al.** Chem. Commun., 1996, 993-994 [0034]
- **WANG et al.** Tetrahedron Lett., vol. 37, 1975-1978 [0034]
- **HANEDA et al.** Carbohydr. Res., 1996, vol. 292, 61-70 [0034]
- **CROUT et al.** Curr. Opin. Chem. Biol.,
- **BOWIE et al.** Science, 1990, vol. 247, 1306-1310 [0055]
- Goedel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology. Academic Press, 1990 [0071]
- **THOTAKURA et al.** Meth. Enzymol., 1987, vol. 138, 350 [0079]
- **HALDMUDDIN et al.** Arch. Biochem. Biophys., 1987, vol. 259, 52 [0081]
- **EDGE et al.** Anal. Biochem., 1981, vol. 118, 131 [0081]
- **AUSUBEL et al.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1999, vol. 47 [0085]
- **HARLOW ; LANE.** Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0085]
- **HARLOW ; LANE.** Using Antibodies:

- 1998, vol. 2, 98-111 [0034]
- **OSMAND, A.P. et al.** Proc. Nat. Acad. Sci., 1997, vol. 74, 739-743 [0035]
 - **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0037]
 - **NADANO et al.** J. Biol. Chem., 1986, vol. 261, 11550-11557 [0047]
 - **KANAMORI et al.** J. Biol. Chem., 1990, vol. 265, 21811-21819 [0047]
 - **VARKI.** Glycobiology, 1992, vol. 2, 25-40 [0047]
 - Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function. Springer-Verlag, 1992 [0047]
 - **BRUTLAG et al.** Comp. App. Biosci., 1990, vol. 6, 237-245 [0053]
 - **DAYHOFF et al.** Atlas of Protein Sequence and Structure, 1978, vol. 5, 345-352 [0055]
 - **SMITH; MARCH.** Advanced Organic Chemistry. John Wiley & Sons, 2001 [0093]
 - **HERMANSON.** Bioconjugate Techniques. Academic Press, 1996 [0093]
 - **FEENEY et al.** Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series. American Chemical Society, 1982, vol. 198 [0093]
 - **GREENE et al.** Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, 1991 [0095]
 - **VOCADLO et al.** Carbohydrate Chemistry and Biology, vol. 2 [0096]
 - **CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY.** Wiley-VCH Verlag, 2000 [0096]
 - **KODAMA et al.** Tetrahedron Lett., 1993, vol. 34, 6419 [0096]
 - **LOUGHEED et al.** J. Biol. Chem., 1999, vol. 274, 37717 [0096]
 - **R. F. TAYLOR.** Protein Immobilization, Fundamentals and Applications. Marcel Dekker, 1991 [0098]
 - **S. S. WONG.** Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking. CRC Press, 1992 [0098]
 - **G. T. HERMANSON et al.** A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1999 [0085]
 - Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders, 1999 [0085]
 - Scopes, Protein Purification: Principles and Practice. Springer-Verlag, 1993 [0086]
 - **BURTON ; HARDING. J.** Chromatogr. A, 1998, vol. 814, 71-81 [0086]
 - **MOREAU et al.** J. Biol. Chem., 1991, vol. 266 (7), 4329-4333 [0087]
 - **MOREAU et al.** J. Biol. Chem., 1991, vol. 266 (7), 4322-4328 [0087]
 - **REXACH et al.** J. Cell Biol., 1991, vol. 114 (2), 219-229 [0087]
 - **PAULIK et al.** Arch. Biochem. Biophys., 1999, vol. 367 (2), 265-273 [0087]
 - **FUJITA; TAKEGAWA.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001, vol. 282 (3), 678-682 [0088]
 - Polymeric drugs and Drug Delivery Systems. **DUNN et al.** ACS Symposium Series. American Chemical Society, 1991, vol. 469 [0099]
 - **CALLEWAERT et al.** Glycobiology, 2001, vol. 11 (4), 275-281 [0112]
 - **FREIRE et al.** Bioconjug. Chem., 2006, vol. 17 (2), 559-564 [0112]
 - Remington's Pharmaceutical Sciences. Meade Publishing Co, [0124]
 - **ROHATAGI.** J. Clin. Pharmacology, 1995, vol. 35, 1187-1193 [0127]
 - **TJWA.** Ann. Allergy Asthma Immunol., 1995, vol. 75, 107-111 [0127]
 - **BEGLEY.** Pharmacology & Therapeutics, 2004, vol. 104, 29-45 [0131]
 - **AKHTAR et al.** Trends Cell Bio., 1992, vol. 2, 139 [0138]
 - Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics. 1995 [0138]
 - **GOLD.** Neuroscience, 1997, vol. 76, 1153-1158 [0138]
 - **HO et al.** Curr. Opin. Mol. Ther., 1999,

- Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, 1993 [0098]
- Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems. **DUNN, R. L. et al.** ACS Symposium Series. American Chemical Society, 1991, vol. 469 [0098]
 - **JAIN.** Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 [0138]
 - **GROOTHUIS et al.** J. NeuroVirol., 1997, vol. 3, 387-400 [0138]

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI**ŞEKİL 1**

A = p değeri

5 B = Nispi Aktivite

ŞEKİL 2A

C = Sialilasyon Rxn

D = 17 saat inkübasyon

10 E = Kütle

ŞEKİL 2B

F = rhSAP Sialilasyon Reaksiyonu no.

G = (ST6 ile 17 saat inkübasyondan sonra)

15 H = (ST3 ile 17 saat inkübasyondan sonra)

I = Desialile edilmiş hSAP

J = hSAP Çalışma Standardı

K = Dakika

20 **ŞEKİL 2D**

L = Sialilasyon Reaksiyonu no.

M = 17 saat inkübasyondan sonra

ŞEKİL 2E

25 N = 17 saat

ŞEKİL 2F

O = Sialilasyon Reaksiyonu

ŞEKİL 3

P = Ortalama Nispi Aktivite

R = hSAP standart

S = a2,3 Gliko yeniden mod. rhSAP

5 T = a2,3 Gliko yeniden mod. hSAP

U = a2,6 Gliko yeniden mod. rhSAP

V = a2,6 Gliko yeniden mod. hSAP

Y = a2,3 Komple Sial. rhSAP

Z = 1:1'lik a2,3:a2,6 rhSAP karışımı

10 A1 = 1:1'lik a2,3:a2,6 hSAP karışımı

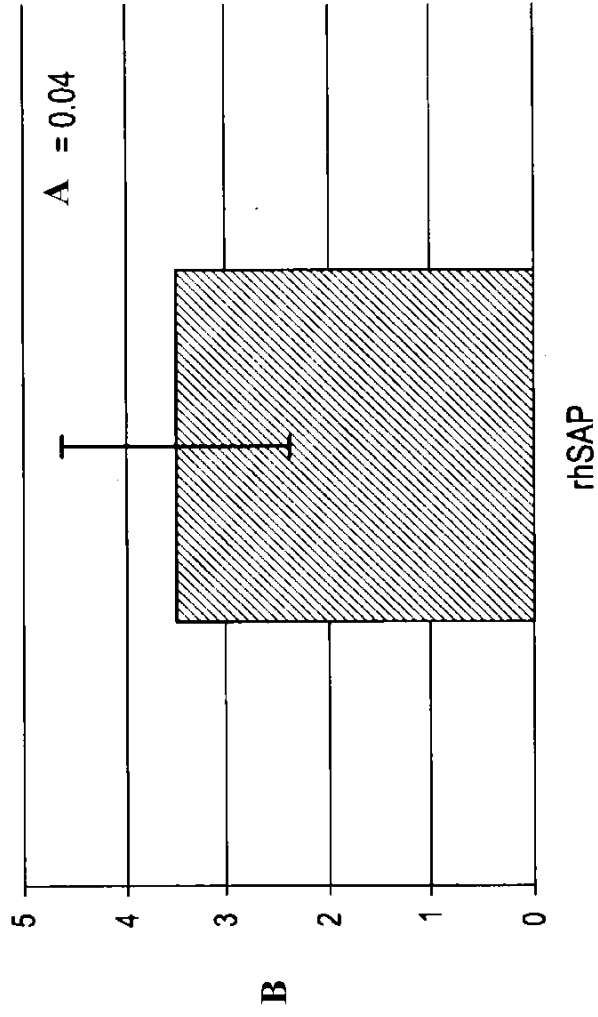
ŞEKİL 4

B1 = 5.0×10^4 hücre başına Fibrosit sayısı

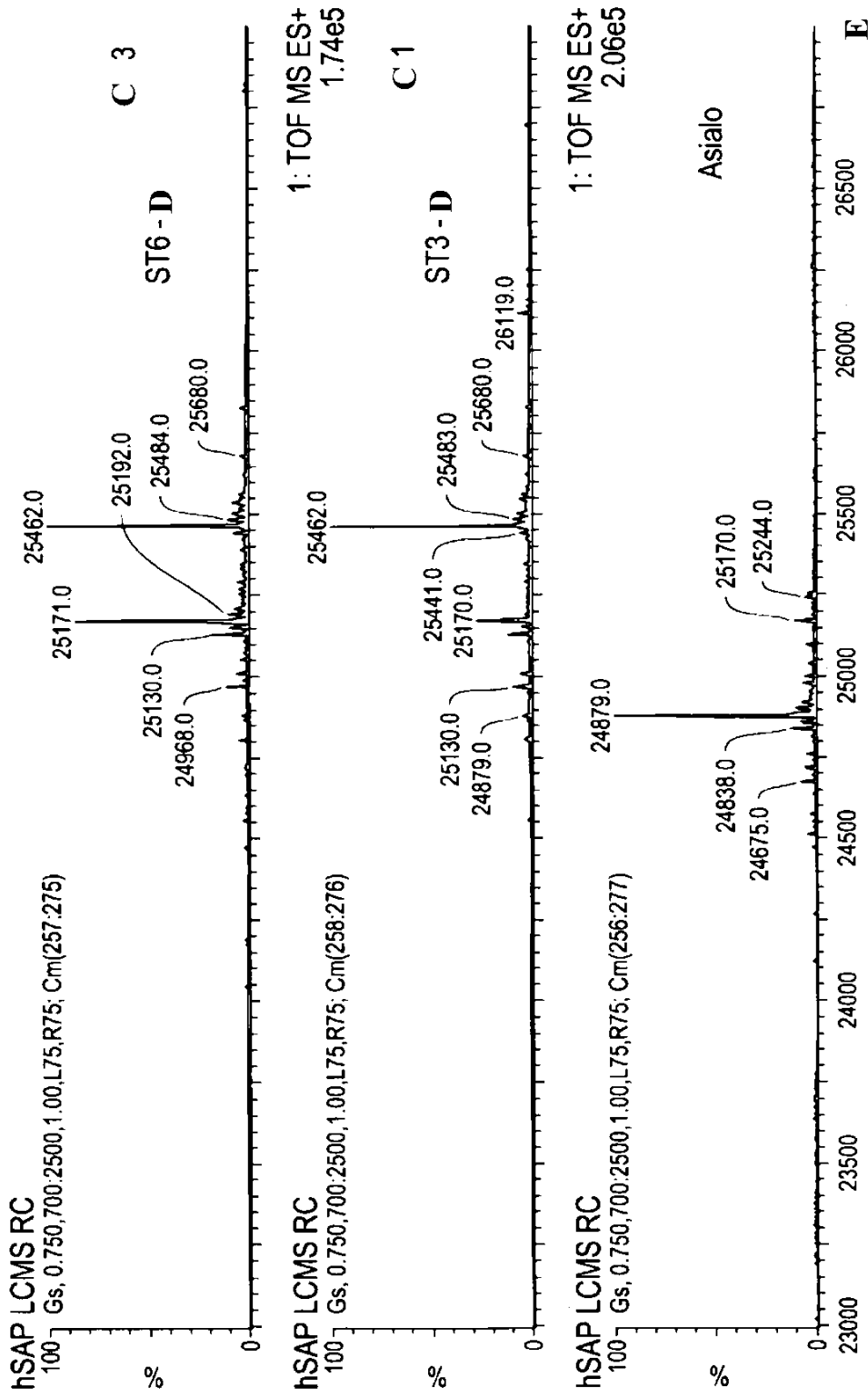
15

20

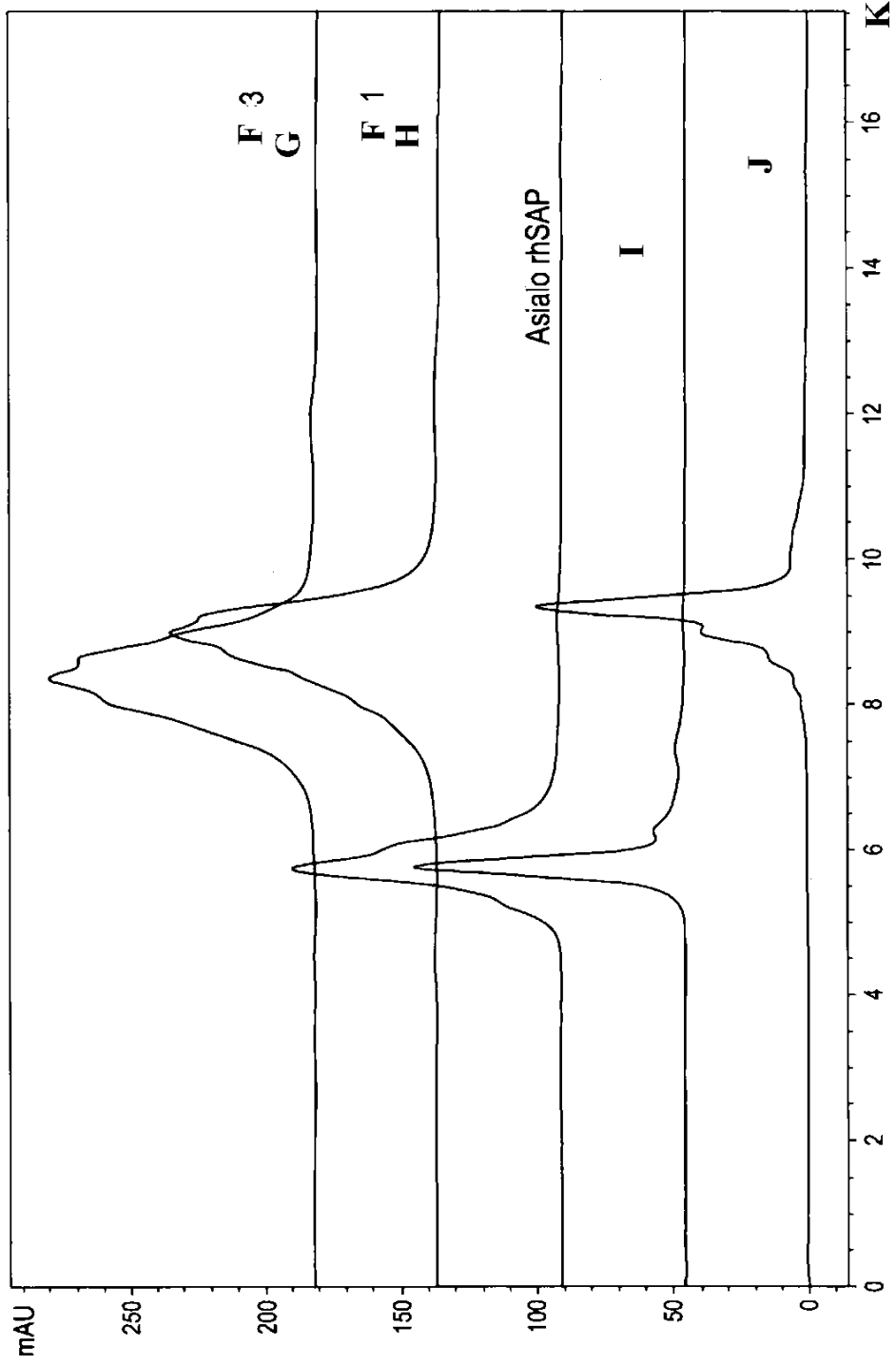
25



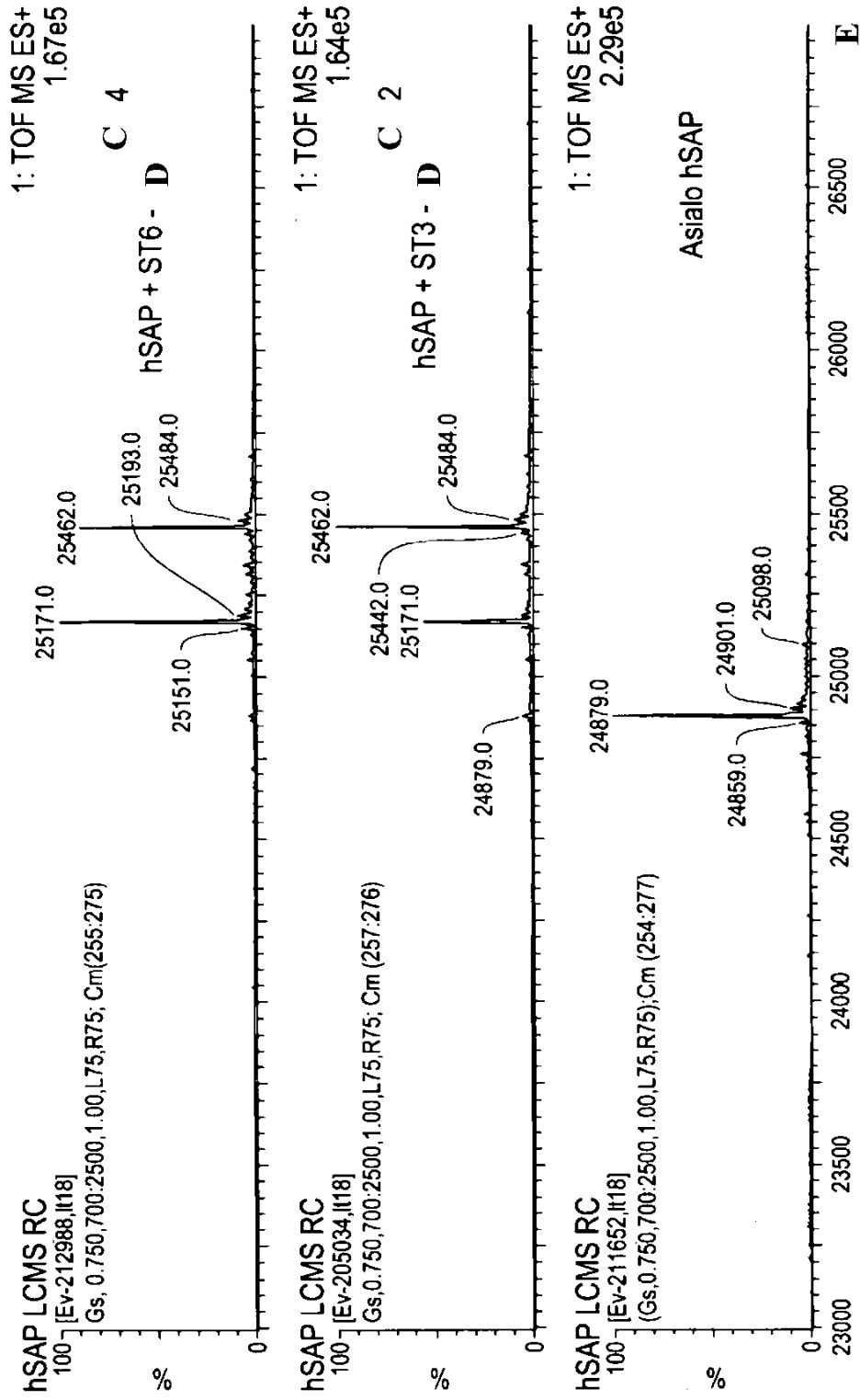
ŞEKİL 1



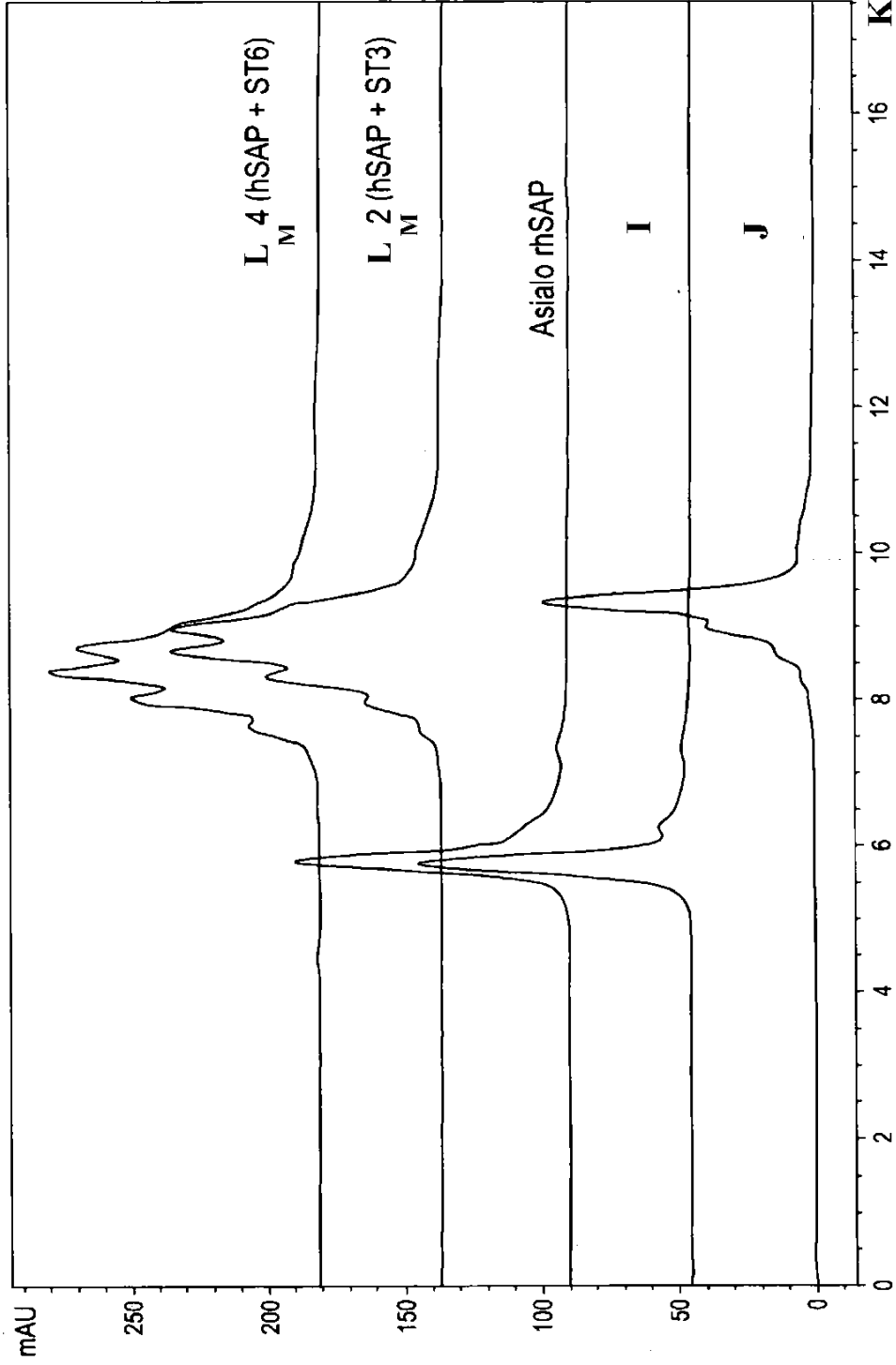
ŞEKİL 2A



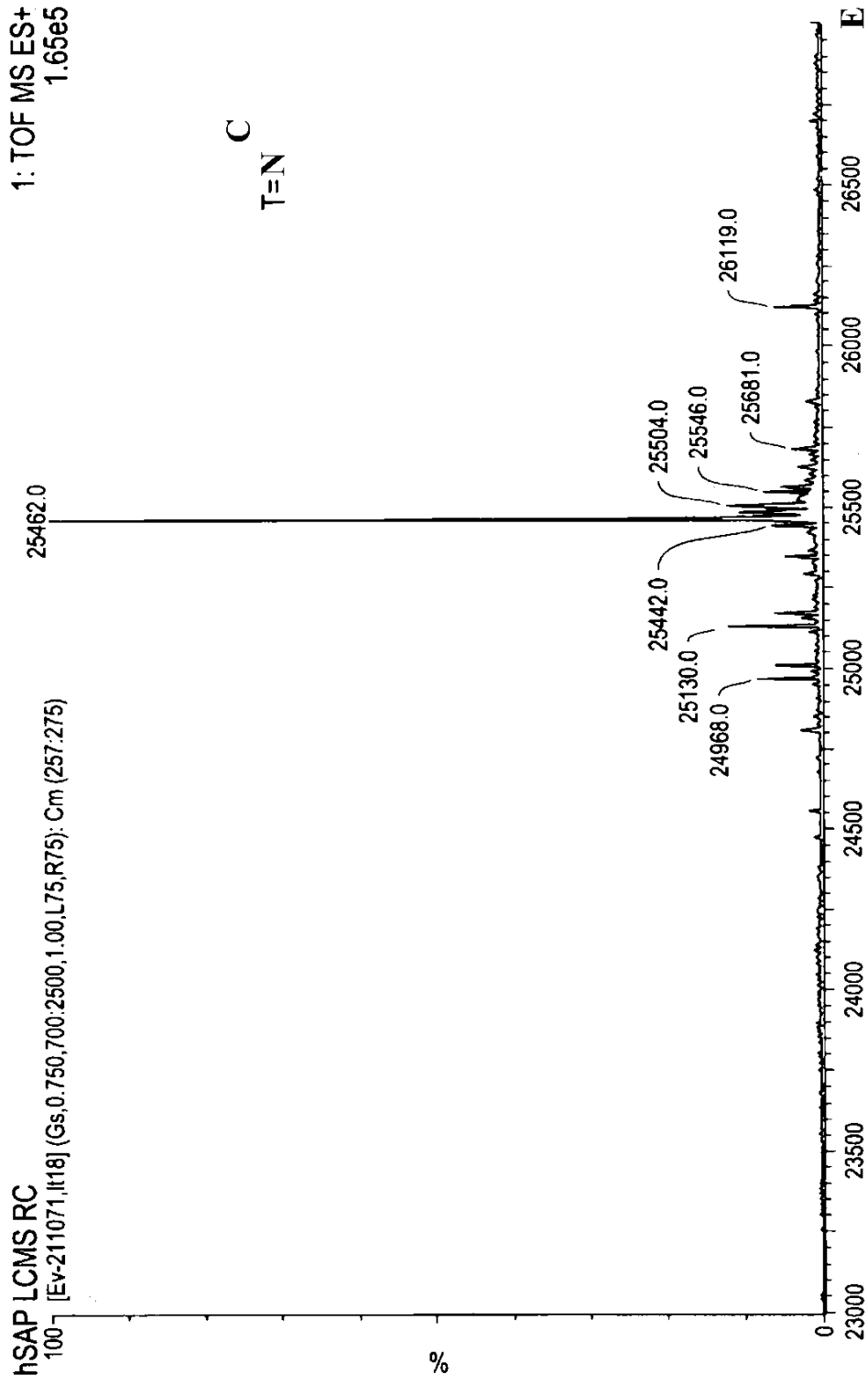
ŞEKİL 2B



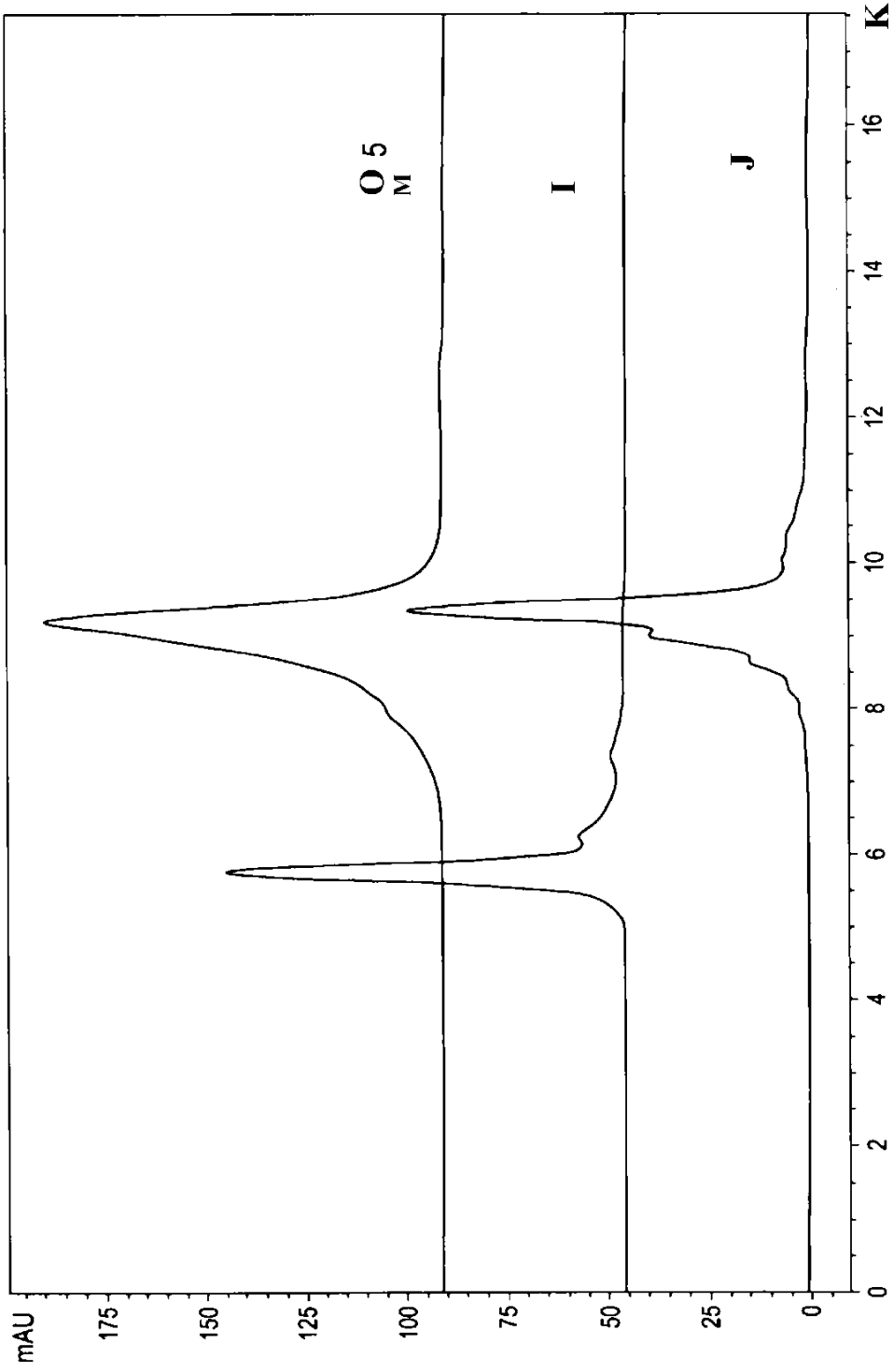
ŞEKİL 2C



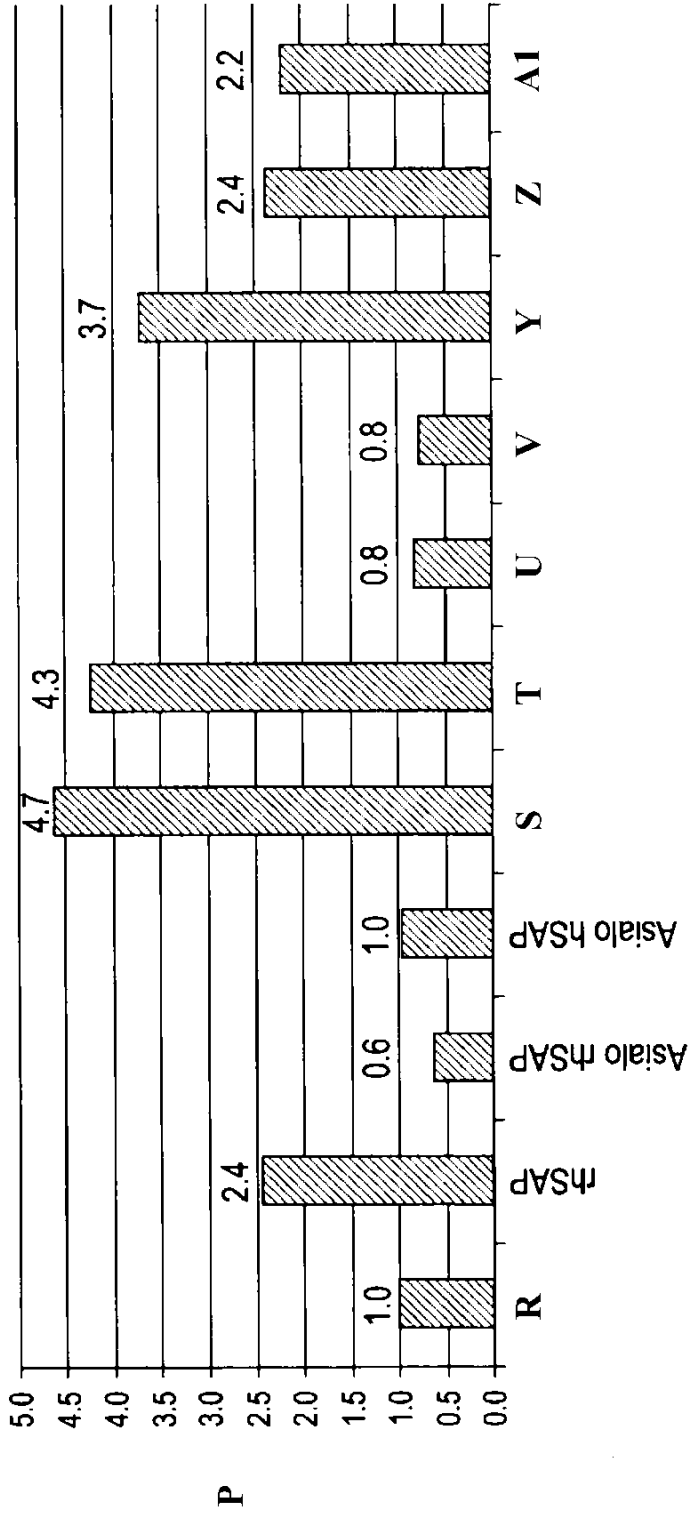
ŞEKİL 2D



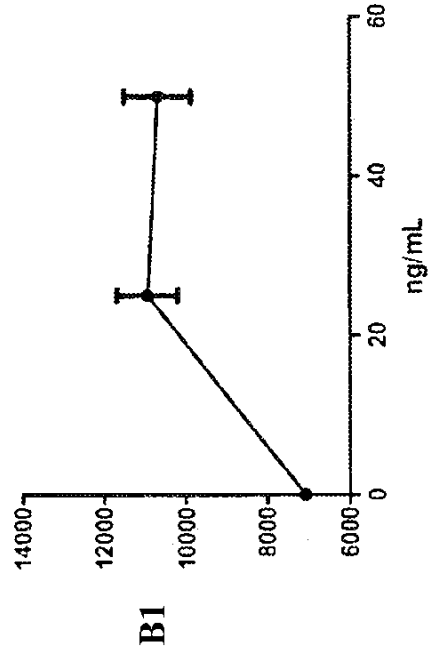
ŞEKİL 2E



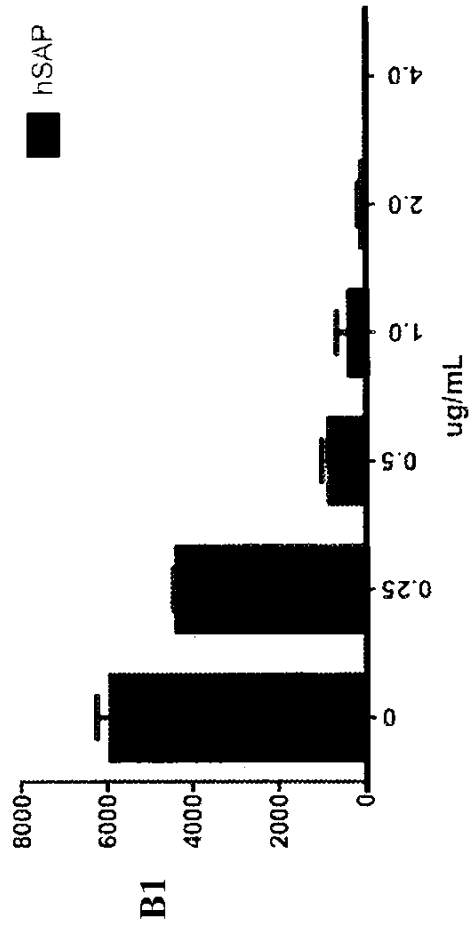
ŞEKİL 2F



ŞEKİL 3



ŞEKİL 4



ŞEKİL 5