

## ÖZET

### ALFA-SİNÜKLEİN İLE İLİŞKİLİ BOZUKLUKLAR İÇİN TERAPÖTİK VE TEŞHİS YÖNTEMLERİNDE KULLANIMA YÖNELİK ANTİKORLAR VE AŞILAR

5

Bir bireyde bir  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun bir başlangıç geciktirilmesi için veya tedavi edilmesi için bir aşı bir çözünmez kümelenmiş forma bir  $\alpha$ -sinükleinin stabilize olmayan oligomerinden daha düşük bir formasyon oranına sahip olan izole edilmiş stabilize çözünür bir  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin terapötik olarak etkili bir miktarı içermektedir. Bir bireyde bir  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun bir başlangıç geciktirilmesi için veya tedavi edilmesi için bir antikor, çözünür  $\alpha$ -sinükleini bağlamaktadır. Bir  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun bir başlangıç geciktirilmesi için, tedavi edilmesi için veya önlenmesi için yöntemler, aşı veya antikoru kullanmaktadır.  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerini saptama yöntemleri, antikoru kullanmaktadır.

10

## İSTEMLER

1. Bir bireyde  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bir bozukluğun tedavisinde kullanılm için ve/veya başlangıcının geciktirilmesi için bir ilaç olup, burada  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluk, Parkinson hastalığı, Lewy cisimli ve/veya Lewy nöritli demans, Alzheimer hastalığı, Down sendromu, Multipl Sistem Atrofisi (MSA), Lewy cismi patolojili diğer hastalıklar, Alzheimer hastalığı sendromu, amiyotrofik lateral skleroz, frontotemporal demans, Huntington hastalığı, prion hastalığı, Creutzfeldt Jakob hastalığı, Gerstmann-Sträussler-Scheinker sendromu, kuru, ölümcül ailesel uykusuzluk, serebrovasküler amiloidoz, glakom, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, psikiyatrik sendromlar, şizofreni ve şizofreni benzeri bozukluklardan oluşan gruptan seçilmektedir, ilaç, bir stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinden üretilen ve stabilize bir çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerini bağlayabilen bir antikor içermektedir, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri,  $\alpha$ -sinükleinin stabilize olmayan bir çözünür oligomerinden bir çözünmez kümelenmiş biçime daha düşük bir oluşum oranına sahiptir, burada  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ila 8'den seçilen bir sekansa  $\alpha$ -sinükleinini içermektedir ve burada stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, bir protein çapraz bağlama maddesi ile çapraz bağlanarak veya bir stabilize edici maddeye bağlayarak stabilize edilmektedir.
2. Stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein protofibrili içerdiği, İstem 1'e göre kullanılm için ilaç.
3.  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun, Parkinson hastalığı, Lewy cisimli ve Lewy nöritli demans, Alzheimer hastalığı, Down sendromu, Multipl Sistem Atrofisi (MSA), Lewy cismi patolojili diğer hastalıklar ve Alzheimer hastalığı sendromundan oluşan gruptan seçildiği, İstem 1 veya 2'ye göre kullanılm için ilaç.
4.  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğunun Parkinson hastalığı olduğu, İstem 1 veya 2'ye göre kullanılm için ilaç.
5. Antikoron, yabancı tip çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerini bağlayabildiği, İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre kullanılm için ilaç.
6. Antikoron,  $\alpha$ -sinüklein monomerlere ve çözünmez fibrillere bağlanma gücü ile

kiyaslandığında çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerine daha yüksek bir bağlanma gücüne sahip olduğu, İstem 5'e göre kullanılmak için ilaç.

- 5 **7.** Antikorun, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin uygulanmadığı olduğu bir insan olmayan hayvandan toplandığı, İstem 1'e göre kullanılmak için ilaç.
- 8.** Antikorun, hibridom teknolojisi, faj görüntüleme, ribozom görüntüleme, memeli hücresi görüntüleme veya bakteriyel görüntüleme ile üretildiği, İstem 1'e göre kullanılmak için ilaç.
- 10 **9.** Antikorun monoklonal olduğu, İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre kullanılmak için ilaç.
- 10.** Antikorun, insanlarda antijenliğin azaltılması için, insan, insanlaştırılmış veya modifiye olduğu, İstemler 1 ila 9'dan herhangi birine göre kullanılmak için ilaç.
- 15 **11.** Stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerin, bir aldehit, bir doymuş, doymamış veya çoklu doymamış yağ asidi veya bunların bir kombinasyonunu içeren bir hidrofobik organik madde, bir iyonik olmayan deterjan veya bir zwitteriyonik deterjan veya bunların herhangi bir kombinasyonu, trigliseritler, fosfolipitler, sfingolipidler, gangliyozidler, kolesterol, kolesterol-esterler, uzun zincirli alkoller ve bunların herhangi bir kombinasyonundan
- 20 oluşan gruptan seçilen en az bir bileşik veya deoksikolat, kolat ve taurokolat ve bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen bir safra asit türevi ile modifiye edilen bir  $\alpha$ -sinüklein protofibrilli içerdiği veya stabilize  $\alpha$ -sinüklein protofibrilin, 1- $\alpha$ -hidroksi-sekosterol ile modifiye edilmiş veya disüksinimidil tartrat, bis-sülfosüksinimidil suberimidat ve 3,3-ditiyobis-sülfosüksinimidil propiyonat ve bunların herhangi bir
- 25 kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen en az bir protein çapraz bağlama maddesi ile çapraz bağlanan bir  $\alpha$ -sinüklein protofibril içerdiği, İstemler 1 ila 10'dan herhangi birine göre kullanılmak için ilaç.
- 12.** Stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin,  $\alpha$ -sinükleinin bir stabilize olmayan çözünür
- 30 oligomerinden bir çözünmez kümelenmiş biçime, daha düşük bir oluşum oranına sahip olduğu, antikorun, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinden üretildiği, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 ila 8'den seçilen bir sekansın  $\alpha$ -sinükleinini içerdiği ve stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin, bir protein çapraz bağlama maddesi ile çapraz bağlanmasında veya bir stabilize edici maddeye bağlanmasında
- 35 stabilize edildiği, bir stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerini bağlayabilen bir antikor.

**13.** Antikorun, 2000 Da'lık bir moleküler ağırlığa sahip bir stabilize  $\alpha$ -sinüklein protofibrilli bağlayabildiği, İstemler 1 ila 11'den herhangi birine göre kullanılm için ilaç veya İstem 12'ye göre antikor.

5

**14.** Stabilize  $\alpha$ -sinüklein protofibrilin, 4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit, 4-okso-2-nonenal ve akrolein ve bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen bir hidrofobik organik madde ile modifiye edilmiş bir  $\alpha$ -sinüklein protofibril içerdiği, İstem 11 veya İstem 13'e göre kullanılm için ilaç veya İstem 12 veya İstem 13'e göre antikor.

10

**15.** İstemler 12 ila 14'ten herhangi birine göre antikorun, çözünür  $\alpha$ -sinüklein içeren veya içerdiğinden şüphelenilen bir biyolojik örneğe eklenmesini ve antikor ile çözünür  $\alpha$ -sinüklein arasında oluşan herhangi bir kompleksin bir konsantrasyonunun saptanması ve ölçülmesini içeren, çözünür  $\alpha$ -sinükleinin in vitro saptanması yönelik bir yöntem.

15

**16.**  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun, Parkinson hastalığı, Lewy cisimli ve/veya Lewy nöritli demans, Alzheimer hastalığı, Down sendromu, Multipl Sistem Atrofisi (MSA), Lewy cisimi patolojili diğer hastalıklar, Alzheimer hastalığı sendromu, amiyotrofik lateral skleroz, frontotemporal demans, Huntington hastalığı, prion hastalığı, Creutzfeldt Jakob hastalığı, Gerstmann-Sträussler-Scheinker sendromu, kuru, ölümcül ailesel uykusuzluk, serebrovasküler amiloidoz, glakom, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, psikiyatrik sendromlar, şizofreni ve şizofreni benzeri bozukluklardan oluşan gruptan seçildiği ve bunun antikor veya fragmentinin, bir stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerini bağladığı stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin  $\alpha$ -sinükleinin stabilize olmayan bir çözünür oligomerinden bir çözünmez kümelenmiş biçime daha düşük bir oluşum oranına sahip olduğu, yöntemin, bir antijenin bir insan olmayan hayvana uygulanması ve antijene karşı oluşturulan antikorun toplanması içerdiği, antijenin,  $\alpha$ -sinükleinin bir stabilize olmayan çözünür oligomerinden bir çözünmez kümelenmiş biçime, daha düşük bir oluşum oranına sahip stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri içerdiği,  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ila 8'den seçilen bir sekansın  $\alpha$ -sinükleinini içerdiği ve stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerin, bir protein çapraz bağlama maddesi ile çapraz bağlanmasıyla veya bir stabilize edici maddeye bağlanmasıyla stabilize edildiği, bir bireyde  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bir bozukluğun bir başlangıcını geciktirilmesi için veya tedavisi için bir antikorun üretilmesine yönelik bir yöntem.

20

25

30

35

## TARİFNAME

### ALFA-SİNÜKLEİN İLE İLİŞKİLİ BOZUKLUKLAR İÇİN TERAPÖTİK VE TEŞHİS YÖNTEMLERİNDE KULLANIMA YÖNELİK ANTİKORLAR VE AŞILAR

5

#### **TEKNİK ALAN**

Mevcut buluş, antikorlar ile ve  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluklar için, örneğin Lewy cisimleri ve/veya Lewy nöritleri şeklinde kümelenmiş çözünmez  $\alpha$ -sinüklein birikiminin beyinde mevcut olduğu  $\alpha$ -sinükleinopatiler için terapötik ve teşhis yöntemlerinde kullanılmaları ile ilgilidir. Bu bozukluklar, Parkinson hastalığı (PD), Lewy cisimli demans (DLB), Alzheimer hastalığı ve Lewy cisimi varyantı, multipl sistem atrofisi ve  $\alpha$ -sinüklein patolojisi ile diğer nörodejeneratif bozukluklar gibi nörodejeneratif bozuklukları içermekte, ancak bunlarla sınırlanmamaktadır.

15

Daha ayrıntılı olarak, buluş, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinükleini bağlayan antikorlarla ilgilidir. Stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri, bir çözünmez kümelenmiş forma  $\alpha$ -sinükleinin stabilize olmayan bir oligomerinden daha düşük bir oluşum oranına sahiptir. Stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, örneğin, bir protofibril olarak anılan, daha büyük bir oligomer şeklinde olabilmektedir.

20

Buluş aynı zamanda,  $\alpha$ -sinükleinin saptanması için *in vitro* yöntemler ve Parkinson hastalığı, Lewy cisimli demans, Alzheimer hastalığı ve Lewy cisimi varyantı ve multipl sistem atrofisi gibi ancak bunlarla sınırlanmayan bir  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun başlangıcını, tedavisinin veya önlenmesinin geciktirilmesi için yöntemler ile ilgilidir.

25

#### **ÖNCEKİ TEKNİK**

Parkinson hastalığı (PD) ve Lewy cisimli demans (DLB),  $\alpha$ -sinüklein beyin patolojisi ile nörodejeneratif bozuklukları iki en yaygın örneğidir.

30

PD, en yaygın hareket bozukluğudur ve rijidite, hipokinesi, titreme ve postural instabilite ile karakterize edilmektedir. PD'nin, dünyada yaklaşık olarak dört ila altı milyon kişiyi etkilediğine inanılmaktadır.

35

DLB, tüm demansların %5 ila 15'ini temsil etmektedir. Unutkanlığa ve genellikle değişen diğer bunama belirtilerine ek olarak, DLB hastaları tipik olarak, tekrar eden düşmeler ve görsel halüsinasyonlardan muzdariptir.

5  $\alpha$ -sinükleinin nöron hücreleri içinde birikmesi ya, yuvarlak 10 ila 20  $\mu$ m büyüklüğünde eozinofilik hiyalin inklüzyonları olan Lewy cisimlerinin ya da uzatılmış iplik benzeri distrofik aksonlar ve dendritler olan Lewy nöritlerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. PD'li beyinde, Lewy cisimleri ve Lewy nöritler, siyah madde ile nöron bağlayan striyatuma sınırlanmaktadır. Bu cisimler, PD belirtilerini açığıklayan, hareket ve postural işlevlerin gerçekleştirilmesi için 10 önemlidir. DLB'li beyinde, Lewy cisimleri ve Lewy nöritlerin yaygın birikimi, orta beyin ve kortikal alanlarda bulunmaktadır.

Alfa-sinüklein, temelde nöronların içerisinde bulunmaktadır. Nöron içerisinde,  $\alpha$ -sinüklein büyük ölçüde presinaptik olarak yerleşmektedir ve dolayısıyla, sinaptik aktivitenin 15 düzenlenmesinde bir rol oynadığı tahmin edilmektedir.  $\alpha$ -sinükleinin üç ana izoformu, belirlenmekte olup, bunların en uzun ve en yaygın formu, 140 amino asit içermektedir.

$\alpha$ -sinükleine ek olarak, Lewy cisimleri, çok sayıda molekülden oluşmakta olup, bunlardan biri, 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), bir  $\alpha$ ,  $\beta$ -doymamış hidroksialkenal (Qin ve diğerleri, 2007)'dir. HNE'nin,  $\alpha$ -sinükleini modifiye edebildiği ve dolayısıyla  $\alpha$ -sinüklein oligomerizasyonunu kolaylaştırdığı *in vitro* gösterilmektedir. Özellikle, HNE'nin, örneğin  $\alpha$ -sinükleinin çözünür büyük oligomerik formları olan, protofibrillerin oluşumunu arttırdığı ve stabilize ettiği gösterilmektedir (Qin ve diğerleri, 2007). Benzer şekilde,  $\alpha$ ,  $\beta$ -doymamış alkenal 4-okso-2-nonenal (ONE)'in aynı zamanda,  $\alpha$ -sinükleini modifiye ettiği ve dolayısıyla  $\alpha$ -sinüklein oligomerizasyonunu indüklediği gösterilmektedir (Näsström ve diğerleri 2009). Trostchansky ve diğerleri, Biochem. J. 393: 343-349, 2006, 4-HNE ile  $\alpha$ -sinükleini inkübe etmekte ve  $\alpha$ -sinükleinin biyolojik membranlarla birleşmesinin, proteini oksidasyondan ve nitrazyondan koruduğu ve dolayısıyla, agregatlar oluşturabilen protein moleküllerinin oluşumunu azalttığı sonucuna varılmaktadır. Trostchansky ve diğerleri aynı zamanda, lipit peroksidasyonu 25 ürünlerinin aynı zamanda,  $\alpha$ -sinükleini modifiye edebildiği,  $\alpha$ -sinüklein agregasyonu ve patolojisinin insan ile birlikte hayvan ve hücre modelinde oksidatif süreçlerin belgelenmesi için biyo işaretler olarak görev görebilen yeni protein eklentileri oluşturduğu sonucuna varılmaktadır. Aynı zamanda, nitratlama maddelerinin, *in vivo* uygunluğa sahip olabilen, ditirozin çapraz bağlamaları indükleyerek  $\alpha$ -sinüklein oligomerizasyonunu 35 kolaylaştırdığı *in vitro* gösterilmektedir (Souza ve diğerleri, J. Biol. Chem. 275(4): 18344-

18349, 2000).

HNE, sistein, histidin ve lizinin yan zincirleriyle reaksiyona girerken ve modifiye ederken, ONE, sistein, histidin, lizin ve arjininle reaksiyona girmekte ve modifiye etmektedir. Hem HNE hem de ONE, bu yan zincirlerin yapısı ve fiziksel özelliklerini büyük ölçüde değiştirmektedir. Dolayısıyla, HNE ve ONE ya C-3 karbon ile ya aldehit grup ile ya da bunların kombinasyonlarıyla reaksiyona girebilmektedir. Dolayısıyla, HNE, ya inter- ya da intramoleküler olarak proteinleri kovalent olarak modifiye edebilmektedir.

10 Oksidatif stres, yanlış katlanmış  $\alpha$ -sinükleinin patolojik birikimi ile karakterize edilen birçok nörodejeneratif bozukluğa dahil olmaktadır. Çeşitli reaktif oksijen türleri, hücrel membranlar veya lipoproteinler gibi lipidlerin peroksidasyonunu indükleyebilmekte ve aynı zamanda, poli-doymamış yağ asitlerinden oldukça reaktif aldehitlerin oluşumuyla sonuçlanabilmektedir (Yoritaka ve diğerleri, 1996).

15 Alzheimer hastalığı (AD) göstergesi olan beyin patolojisi, örneğin amiloyit plaklar ve nörofibriler yumaklar, DLB vakalarının yaklaşık %50'sinde görülmektedir. Paralel patolojilerin varlığı iki farklı hastalığı gösterip göstermediği veya her ilgili bozukluğun bir varyantını gösterip göstermediği açık değildir. Bazen, bu ko-patolojilerle ilgili vakalar, AD'nin bir Lewy cisimi varyantına sahip olan şekilde açılanmaktadır (Hansen ve diğerleri, 1990).

Nadiren baskın şekilde, PD ve DLB'nin kalıtsal formlarına,  $\alpha$ -sinüklein geninin nokta mutasyonları veya duplikasyonlarından olabilmektedir. Patolojik mutasyonlar A30P ve A53T (Kruger ve diğerleri, 1998) (Polymeropoulos ve diğerleri, 1998) ve gen duplikasyonunun (Chartier-Harlin ve diğerleri, 2004), familial PD'ye neden olduğu açıldıkken, bir başka  $\alpha$ -sinüklein mutasyonu E46K (Zarranz ve diğerleri, 2004) ile birlikte  $\alpha$ -sinüklein geninin triplikasyonunun (Singleton ve diğerleri, 2003) ya PD ya da DLB'ye neden olduğu belirtilmektedir.

30  $\alpha$ -sinüklein mutasyonlarının patolojik sonuçları yalnızca kısmen anlaşılmaktadır. Ancak, *in vitro* veriler, A30P ve A53T mutasyonlarının, agregasyon oranını arttırdığını göstermektedir (Conway ve diğerleri, 2000). Çok çeşitli farklılaştırılan  $\alpha$ -sinüklein türleri, agregasyon sürecinde oluşmakta olup, tümü, farklı toksik özelliklere sahip olabilmektedir.  $\alpha$ -sinükleinopatilerdeki nöropatolojik değişimlerden farklı olarak,  $\alpha$ -sinüklein proteini seviyeleri genellikle, etkilenmiş beyin bölgelerinde artmaktadır (Klucken ve diğerleri, 2006).

Gelişmiş teşhis araçları ve  $\alpha$ -sinüklein patolojisine sahip bir nörodejeneratif hastalık için bir riskin ve/veya erken evrelerinin belirlenmesi için yöntemler için bir ihtiyaç bulunmaktadır. Günümüzde, hâlihazırda beyne büyük bir hasar gerçekleştiğinde, daha ileri bir semptomatik hastalık evresi belirgin olmadan önce bir klinisyenin bir hastaya teşhisine yardımcı olmak için biyokimyasal bir yöntem bulunmamaktadır. Doğru teşhis testlerinin önemi, yeni ve erken evre terapötik olasılıkları ortaya çıktıkça daha da büyük hale gelecektir. Günümüzde, PD hastaları için yalnızca semptomatik tedavi (örneğin, beyindeki aktif dopamin kaybını yerine konulmasıyla) mevcuttur. DLB için, daha da az terapötik seçenek mevcuttur. Bununla birlikte, klinisyenler, AD için standart tedavi ile, örneğin kolinesteraz inhibitörleri ile, DLB hastalarında olası faydalı etkileri sıklıkla değerlendirmektedir ancak büyük bir gelişme görülememektedir.  $\alpha$ -sinükleinopatiler için mevcut tedavi stratejilerinin hiçbiri, ilgili altta yatan hastalık süreçlerine yönlendirilmemektedir. Ayrıca, aynı zamanda, hastalığın ilerlemesi ve tedavi etkilerinin izlenmesi için bir ihtiyaç bulunmaktadır. WO 2004/041067 ve WO 2006/020581 sayılı dokümanlar,  $\alpha$ -sinüklein beyin patolojisi bozukluklarının tedavisinde,  $\alpha$ -sinüklein veya bir kısım ile aşılamanın veya  $\alpha$ -sinükleine bir antikorun pasif immünizasyonunun kullanıldığını öğretmektedir. WO 2004/041067 ve WO 2006/020581 sayılı dokümanlar aynı zamanda,  $\alpha$ -sinüklein beyin patolojisi bozukluklarının alternatif olarak, amiloyit- $\beta$  veya bir kısım ile aşılama veya amiloyit- $\beta$ 'ya bir antikor kullanarak pasif immünizasyon ile tedavi edilebileceğini öğretmektedir. WO 2005/047860 sayılı doküman,  $\alpha$ -sinükleine bağlanan bir monoklonal antikor sağlamak ve örneğin, ELISA ile, bir örnekte  $\alpha$ -sinükleinin saptanmasında kullanılabilmektedir. WO 00/02053, serebrospinal sıvıda  $\alpha$ -sinükleinin varlığını saptanması için antikorlar kullanarak  $\alpha$ -sinüklein beyin patolojisine sahip bozuklukların teşhisinde  $\alpha$ -sinükleini bağlayan antikorların kullanıldığını öğretmektedir. Ancak, aşağıda açıkladığımız gibi, stabilize  $\alpha$ -sinükleinden üretilen antikorlar özellikle,  $\alpha$ -sinüklein beyin patolojisine sahip bozuklukların tedavisi için avantajlıdır ve daha önce açıklanmamıştır.

## **BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI**

Dolayısıyla,  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluklar, örneğin Lewy cisimleri ve/veya Lewy nöritleri şeklinde kümelenmiş çözünmez  $\alpha$ -sinüklein birikiminin beyinde mevcut olduğu  $\alpha$ -sinükleinopatiler için terapötik ve/veya teşhis yöntemlerinde kullanılmak için antikorların sağlanması mevcut buluşun bir amacıdır. Bu bozukluklar, Parkinson hastalığı (PD), Lewy cisimli demans (DLB), Alzheimer hastalığına Lewy cisimi varyantı, multipl sistem atrofisi gibi bir veya daha fazla nörodejeneratif bozukluk ve  $\alpha$ -sinüklein patolojisi ile diğer nörodejeneratif

bozuklukları içermektedir ancak bunlarla sınırlanmamaktadır

Bir yapılandırılmada, buluş, bir bireyde bir  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun tedavisinde kullanılması için ve/veya başlangıcını geciktirilmesi için bir ilaç ile ilgili olup,  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluk, Parkinson hastalığı, Lewy cisimli ve/veya Lewy nöritli demans, Alzheimer hastalığı, Down sendromu, Multipl Sistem atrofisi (MSA), Lewy cisimi patolojili diğer hastalıklar, Alzheimer hastalığı sendromu, amiyotrofik lateral skleroz, frontotemporal demans, Huntington hastalığı, prion hastalığı, Creutzfeldt Jakob hastalığı, Gerstmann-Sträussler-Scheinker sendromu, kuru, fatal familyal uykusuzluk, serebrovasküler amilodiyoz, glakom, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, psikiyatrik sendromlar, şizofreni ve şizofreni benzeri bozukluklardan oluşan gruptan seçilmektedir, ilaç, bir stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerden üretilen ve bir stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri bağlayabilen bir antikor içermektedir, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, çözünmez bir kümelenmiş forma,  $\alpha$ -sinükleinin stabilize olmayan çözünür oligomerinden daha düşük bir formasyon oranına sahiptir, burada,  $\alpha$ -sinüklein oligomeri SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ile 8'den seçilen bir sekansın  $\alpha$ -sinükleinini içermektedir ve stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, bir proteini çapraz bağlama maddesi ile çapraz bağlayarak veya bir stabilize edici maddeye bağlayarak stabilize edilmektedir.

Bir başka yapılandırılmada, buluş, bir stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerini bağlayabilen bir antikor ile ilgili olup, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, bir çözünmez kümelenmiş forma,  $\alpha$ -sinükleinin bir stabilize olmayan çözünür oligomerinden daha düşük bir formasyon oranına sahiptir, burada antikor, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerinden üretilmektedir, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ile 8'den seçilen bir sekansın  $\alpha$ -sinükleinini içermektedir ve stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, bir proteini çapraz bağlama maddesi ile çapraz bağlayarak veya bir stabilize edici maddeye bağlayarak stabilize edilmektedir.

Bir başka yapılandırılmada, buluş, bir bireyde bir  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun başlangıcını geciktirilmesi için ve/veya tedavisi için bir antikor üretim yöntemi ile ilgili olup,  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluk, Parkinson hastalığı, Lewy cisimli ve/veya Lewy nöritli demans, Alzheimer hastalığı, Down sendromu, Multipl Sistem atrofisi (MSA), Lewy cisimi patolojili diğer hastalıklar, Alzheimer hastalığı sendromu, amiyotrofik lateral skleroz, frontotemporal demans, Huntington hastalığı, prion hastalığı, Creutzfeldt Jakob hastalığı, Gerstmann-Sträussler-

Scheinker sendromu, kuru, fatal familyal uykusuzluk, serebrovasküler amiloidoz, glakom, yaşla ilişkili maküler dejenerasyonu, psikiyatrik sendromlar, şizofreni ve şizofreni benzeri bozukluklardan oluşan gruptan seçilmektedir ve burada antikor veya bir kompleks bir stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri bağlamaktadır stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, çözünemez bir kümelenmiş forma,  $\alpha$ -sinükleinin stabilize olmayan çözünür oligomerinden daha düşük bir formasyon oranına sahiptir. Yöntem, bir antijenin insan olmayan bir hayvana uygulanması ve antijene karşı oluşturulan antikorun toplanması içermekte olup, antijen, çözünemez bir kümelenmiş forma,  $\alpha$ -sinükleinin stabilize olmayan çözünür oligomerinden daha düşük bir formasyon oranına sahip olan bir stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri içermektedir, burada  $\alpha$ -sinüklein oligomeri SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ila 8'den seçilen bir sekans  $\alpha$ -sinükleinini içermektedir ve stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, bir proteini çapraz bağlama maddesi ile çapraz bağlayarak veya bir stabilize edici maddeye bağlayarak stabilize edilmektedir.

Buluşun antikoru, buluşa göre bir antikor ve insan ve/veya veteriner kullanılmak üzere için farmasötik olarak kabul edilebilen, antibakteriyel maddeler, yardımcı maddeleri tamponlar, tuzlar, pH düzenleyicileri, deterjanlar ve bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen bir veya daha fazla yardımcı madde içeren, bir antikor bileşimi şeklinde sağlanabilmektedir.

Buluşun antikorların saptama yöntemlerinde kullanılabilmektedir. Bir yapılandırılmada, buluş, çözünür  $\alpha$ -sinüklein içeren veya içerdiği düşünülen bir biyolojik örneğe buluşa göre bir antikorun eklenmesini ve antikor ve çözünür  $\alpha$ -sinüklein arasında oluşturulan herhangi bir kompleksin bir konsantrasyonunun saptanması ve ölçülmesini içeren, *in vitro* çözünür  $\alpha$ -sinükleinin saptanması için bir yöntem sağlamaktadır  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri, antikorun, saptanabilir bir işaret ile etiketlendiği, çözünür  $\alpha$ -sinüklein taşıdığı düşünülen bir bireye buluşa göre bir antikorun uygulanmasıyla ve işaretin saptanmasıyla antikor ve çözünür  $\alpha$ -sinüklein arasında oluşturulan herhangi bir kompleksin varlığını belirlenmesiyle *in vivo* saptanabilmektedir.

Buluşun antikorların ve yöntemleri,  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluklar ile ilgili tanı ve terapötik teknikler için avantajlıdır. Buluşun ek yapılandırmaları ve yönleri, ayrıntılı açıklamada açıklanmaktadır ve buluşun avantajları burada anlaşılacaktır.

## **SEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI**

Mevcut buluş ayrıca, şekillere göre açıklanmaktadır burada:

5 **Şekil 1**, Örnek 1'de açıkladığı gibi, bir ThT (Tiyoflavin T) testi ile ölçüldüğü gibi  $\alpha$ -sinükleinin yabancı tipinin ve mutasyona uğraşmış formlarının agregasyon oranlarının bir karşılaştırması göstermektedir. Tiyoflavin T,  $\alpha$ -sinükleinin kümelenmiş formları, örneğin  $\beta$ -yaprak yapısına bağlanan bir reaktiftir. Farklı  $\alpha$ -sinüklein türleri, aşağıdaki agregasyon eğilimini açıklamaktadır E46K > A30P/A53T > A53T > wt (yabancı tip) > A30P. Dolayısıyla en hızlı kümeleşen  $\alpha$ -sinüklein türü E46K olurken, A30P mutant, yabancı tip  $\alpha$ -sinüklein için olandan daha yavaş bir agregasyon oranı sergilemektedir.

10 **Şekil 2A**, 24 ve 41 saat inkübe edilen  $\alpha$ -sinüklein E46K preparatları ile tedavi edilen insan embriyonik böbrek (HEK-293) hücreleri arasında düşük bir sağ kalım göstermektedir. Yaklaşık olarak 24 saat inkübe edilen  $\alpha$ -sinüklein E46K preparatının yüksek toksisiteyi göstermektedir. İnkübe edilmemiş (zaman sıfır)  $\alpha$ -sinüklein HEK293 hücrelerine eklendiğinde, toksik etki gözlenmemektedir. **Şekil 2B**, 24 saat inkübasyondan sonra orta dereceli ThT sinyalleri sergileyen  $\alpha$ -sinüklein E46K preparatını göstermektedir, örneğin, fibrilizasyon derecesi ortadır Aksine,  $\alpha$ -sinükleinin fibriler formları içeren ve yüksek bir ThT sinyali sergileyen 41 saat inkübe edilen örnekler, neredeyse hiç toksik etki göstermemektedir.

15 **Şekil 3**, hücrelere ekzojen olarak eklenen ve 48 s inkübe edilen ONE- ve HNE-stabilize wt  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri ile tedavi edilen insan embriyonik böbrek (HEK-293) hücreleri arasında düşük bir sağ kalım göstermektedir. Kontrol yüzdesi olarak, hücre sağ kalımında büyük bir artış 3  $\mu$ M ONE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein ( $p < 0,001$ ) işlenen hücreler ve 3  $\mu$ M HNE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein ( $p < 0.0001$ ) işlenen hücreler için saptanmaktadır Veriler, araç kontrol yüzdesi olarak ifade edilmekte ve üç ayrı deney için  $\pm$  SEM ortalama değeri göstermektedir.

20 **Şekil 4**, HNE ve  $\alpha$ -sinüklein arasında 30:1'lik bir stokiyometri kullanarak 20 saat 37°C'de inkübe edilen bir HNE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein preparatının bir SEC-HPLC kromatogramını göstermektedir. 19 dk'da (**P/O**) ayrılan, ana tepe noktası  $\alpha$ -sinüklein çözünür protofibrilleri/oligomerlerine karşı gelmektedir. 37 dk'da (**M**) ayrılan ikinci tepe noktası monomerik  $\alpha$ -sinükleine karşı gelmektedir.

30 **Şekil 5**, ONE ve  $\alpha$ -sinüklein arasında 30:1'lik bir stokiyometri kullanarak 20 saat 37 °C'de inkübe edilen ONE modifiye yabancı tip  $\alpha$ -sinükleinin bir SEC-HPLC kromatogramını

göstermektedir. Bir ana tepe noktası (**P/O**), 19 dk'da gözlenmekte ve çözünür  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerlerine karşı gelmektedir. 37 dk'da (**M**) ayrılan ve  $\alpha$ -sinüklein monomerlerine karşı gelen bir ek tepe noktası gözlenmektedir.

5 **Şekil 6**, HNE ile modifiye izole çözünür  $\alpha$ -sinüklein protofibril/oligomerinin bir atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) görüntüsünü göstermektedir. Örnek olarak, bir içi boş çekirdek ve yaklaşık 50-300 nm'lik bir çapa sahip olan bir halka benzeri yapı sergileyen protofibriller/oligomerler gözlenmektedir. Ölçek çubuğu 100 nm'yi göstermektedir.

10 **Şekil 7**, ONE ile modifiye izole çözünür  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerlerinin bir AFM analizini göstermektedir. Tipik bir örnekte, bir amorf görünüm ve yaklaşık 30-150 nm'lik bir çapa sahip protofibriller/oligomerler gözlenmektedir. Ölçek çubuğu 100 nm'yi göstermektedir.

15 **Şekil 8**, HNE-modifiye doğal tip insan  $\alpha$ -sinükleininin çözünür bir protofibril/oligomer preparatına bağış bir fareden serumda (1/10000-1/270000 seyreltme) bir ELISA'yı göstermektedir. HNE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerlerini tanıyan antikorlar, serumda saptanmaktadır.

**Şekil 9**, ONE-modifiye doğal tip  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri ile bağış bir fareden serumda (1/10000-1/300000 seyreltme) bir dolaylı ELISA'yı göstermektedir.  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerlerini tanıyan antikorlar serumda saptanmaktadır.

20 **Şekil 10**, bir  $\alpha$ -sinüklein protofibril reaktif monoklonal antikorun bir ELISA'sını göstermektedir. Pozitif bir sinyal, ONE-modifiye yabancı tip  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri antijen olarak kullanıldığında 40:2 hibridomdan hücre ortamında üç seyreltisinin de tümü ile (1/9, 1/27 ve 1/82) elde edilmektedir.

## **BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI**

25 Mevcut buluş, Parkinson hastalığı (PD), Lewy cisimli demans (DLB), Alzheimer hastalığı, Lewy cismi varyantı, multipl sistem atrofisi (MSA) ve  $\alpha$ -sinüklein patolojisi ile diğer nörodejeneratif bozukluklardan biri veya daha fazlası gibi  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozuklukların teşhisi ve mücadelesi için (başlangıcının geciktirilmesi, tedavisi ve/veya önlenmesi dahil olmak üzere) çeşitli yöntemlerde kullanılmak için antikorlar (pasif immünizasyon) sağlamaktadır. Ayrıca, antikorlar, Alzheimer hastalığı, Down sendromu, amiyotrofik lateral skleroz, frontotemporal demans, Huntington hastalığı, prion hastalığı, Creutzfeldt Jakob hastalığı, Gerstmann-Sträussler-Scheinker sendromu, kuru, fatal familyal uykusuzluk, serebrovasküler amiloidoz, glakom, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, psikiyatrik sendromlar, şizofreni ve şizofreni benzeri bozukluklar gibi diğer nörodejeneratif bozuklukların başlangıcının

geciktirilmesi, tedavisi ve/veya önlenmesinde kullanılabilmektedir. Antikorlar aynı zamanda, diğerlerinin arasında, tanısal, takip veya terapi amaçları için saptama yöntemlerinde kullanılabilmektedir.

5  $\alpha$ -sinükleinopatilerde ana patoloji intraselüler olup, immün terapötik yaklaşma bir engel oluşturmaktadır. Ancak, aktif olarak indüklenen veya pasif olarak uygulanan antikorların bir bölümünün, hedef antijenlerini de intranöronal olarak bağlayabilmesi olasıdır. Ayrıca hem plazmada hem de serebrospinal sıvıda  $\alpha$ -sinükleinin belirlenmesi (El-Agnaf ve diğerleri, 2006), proteinin, yalnızca nöronlar içerisinde bulunmadığını göstermektedir. Teoriyle 10 sınırlı olarak, ekstraselüler  $\alpha$ -sinükleinin azaltılması intraselüler ve ekstraselüler protein havuzları arasındaki dengeyi kaydırabilmekte ve aynı zamanda düşük intraselüler  $\alpha$ -sinüklein ile sonuçlanabilmektedir. Kanı çözeltideki  $\alpha$ -sinükleinin, selüler membrandaki lipid çift katmanlarına girebildiğini ve dolayısıyla, içselleştirilmiş veya hücre dışına atılması hale gelebildiğini göstermektedir. Son olarak,  $\alpha$ -sinükleinin aynı zamanda, ekstraselüler alana 15 toksik etkiler uygulayabildiği göz ardı edilememektedir.

Mevcut buluş,  $\alpha$ -sinükleinin stabilize çözünür oligomerlerinin kullanılması dayanmaktadır. İnsan  $\alpha$ -sinüklein monomerlerinin moleküler ağırlığı, 14 kDa'dır. İki veya daha fazla  $\alpha$ -sinüklein monomeri kümelenebilmekte ve çok çeşitli moleküler ağırlıklarla çözünür  $\alpha$ -sinüklein 20 protofibrilleri/oligomerleri oluşturabilmektedir. Baskın bir oligomer, yaklaşık 2000 kD'lik bir moleküler ağırlığa sahiptir ve bir protofibril olarak anılmaktadır. Ancak, bu çözünür  $\alpha$ -sinüklein formları stabil değildir ve spontane bir şekilde çözünmez fibrillere polimerleşmektedir. Mevcut buluş,  $\alpha$ -sinükleinin çözünür oligomerik formları stabilize 25 etmekte ve antikor gelişimi için, tercihen oldukça aralıklı formda, stabilize çözünür oligomerleri izole etmektedir. Mevcut buluşa göre stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri, bir çözünemez kümelenmiş forma, örneğin fibrillere,  $\alpha$ -sinükleinin stabilize olmayan bir oligomerinden daha düşük bir formasyon oranı sergilemektedir. Bu formlar, yüksek bir toksisite sergilediğinden, özel bir ilgiye sahiptir.

30 Buluş,  $\alpha$ -sinükleinin çeşitli formları kullanmaktadır. Buluşta kullanılan  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri ya sentetik ya da yabani tip insan  $\alpha$ -sinükleini (SEKANS KİMLİK NUMARASI:1) veya sekanslar SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2 ila 8'de açılanan mutasyona uğramış formu(lar)ı içermektedir. İnsan  $\alpha$ -sinükleininin bu mutasyona uğramış formları ilgili mutasyonlara sahiptir A30P (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2), E46K (SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 3), A53T (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4), A30P/E46K (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5), A30P/A53T (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6), E46K /A53T (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7) ve A30P/ E46K /A53T (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8).

5 SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH GVATVAEKT  
EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP  
DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

10

**SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2**

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAP GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH  
GVATVAEKT EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL  
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

15

**SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3**

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKKGVVH  
GVATVAEKT EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL  
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

20

**SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4**

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH  
GVTTVAEKT EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL  
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

25

**SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5**

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAP GKTKEGVLYV GSKTKKGVVH  
GVATVAEKT EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL  
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

30

**SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6**

35

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAP GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH  
GVTTVAEKT EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL  
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

5

**SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7**

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKKGVVH  
GVTTVAEKT EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL  
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

10

**SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8**

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAP GKTKEGVLYV GSKTKKGVVH  
GVTTVAEKT EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL  
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

15

Ayrıca, yabancı tipdeki sekanslardan sapan sekanslarla, diğer  $\alpha$ -sinüklein formları kullanılabilmektedir. Örnek olarak, yabancı tip  $\alpha$ -sinüklein, örneğin bölgesel yönlendirilmiş mutagenез araçlarıyla, Ser/Ala'yı Cys ile değiştirerek modifiye edilebilmektedir. Bunun bir örneği, Chang, US 2006/0018918 A1 sayılı patent dokümanı tarafından açıklanmaktadır

20

Ayrıca,  $\alpha$ -sinüklein proteininin N-terminali, orta bölümü ve/veya C-terminalinden fragmentler, stabilize  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerinin yapılış için de kullanılabilmektedir. Ayrıca, 1-10, 1-25, 1-35, 1-45, 1-79 veya 1-95 uzunlukla amino asitlerle, yabancı tip veya mutant  $\alpha$ -sinüklein fragmentleri, oligomerlerin yapılış için herhangi bir kombinasyonda kullanılabilmektedir. Bu peptitler, 1-95, 61-140, 95-140, 95-130, 95-120, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130 ve 130-140 amino asit sekanslarına karşı gelebilmektedir ancak bunlarla sınırlanmamaktadır. Fragmentler aynı zamanda, tam uzunluklu  $\alpha$ -sinüklein ile kombine edilebilmektedir. Fragmentler aynı zamanda, oligomerleri yapmadan önce dallandırılmakta veya dolaştırılmaktadır.

30

Rekombinant proteinin veya sentetik peptitlerin kullanılışına ek olarak,  $\alpha$ -sinüklein doğrudan,  $\alpha$ -sinükleinopatilere sahip vakalardan *post mortem* otopsi yapılmış insan beyin dokusunda mevcut olan Lewy cisimlerinden türetilebilmektedir. Hem çözünür (örneğin, Tris-tamponlu tuz çözeltisinde çözünür preparatlar) hem de çözünmez (örneğin, Tris-tamponlu tuz

35

çözeltisinde çözünmez preparatlar)  $\alpha$ -sinüklein kısımlarını içermektedir. Bu örnek preparatları farelere ya enjekte edilmekte ya da enjeksiyondan önce kromatografik yöntemlerle parçalara ayrılmaktadır. Oluşturulan antikolar, burada daha ayrıntılı olarak açıkladığımız gibi bir pasif aşılama şemasında veya tanısal immünolojik testlerde hastaların tedavisi için kullanılmaktadır.

5

Alternatif olarak,  $\alpha$ -sinüklein, Lewy cisimlerinin görüntülediği ve hedeflendiği immünohistokimya ve lazer yakalama mikroskopisinin kombinasyonu ile izole edilebilmektedir. Örnek olarak, Lewy cismi içeren nöronlar, lazer yakalama mikroskopisi ve deniştirmeyen jel sistemlerinin kombine kullanımı ile  $\alpha$ -sinüklein içeren *post mortem* beyin dokusundan elde edilmektedir. Bu uygulama için,  $\alpha$ -sinüklein türleri, poliakrilamit jelinden ekstrakte edilmektedir (bakınız Örnek 3). Daha ayrıntılı olarak, kromatografik yöntemleri ve deniştirmeyen jel sistemlerini kullanarak,  $\alpha$ -sinüklein, yakalanan doku malzemesinden ayrılmakta ve monoklonal antikoların üretimi için farelere enjekte edilen antijenik preparatlar olarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşımla, farelerde çok farklı bir bağışıklık sağlayıcıyan elde edilmekte olup, çok farklı antijen afiniteleri ve özellikleri ile antikolar oluşturmaktadır. Son yöntem kullanıldığındaki farklıyanlara rağmen, bu yaklaşım, sentetik  $\alpha$ -sinükleini hedefleyen antikolarla hedeflenmesi mümkün olmayan, Parkinson hastalarında (Lewy cisimleri) beyinde bulunan bir  $\alpha$ -sinüklein oligomeri yapısını hedeflediğinde, avantajlı olabilmektedir. Bu fareler,  $\alpha$ -sinüklein oligomere özel monoklonal antikoların elde edilmesi için kullanılabilir.

20

Ayrıca, farelerin bağışıklanması ve monoklonal antikor gelişimi için kullanılacak  $\alpha$ -sinüklein aynı zamanda, sağlıklı bireylerden veya  $\alpha$ -sinükleinopatilere sahip hastalardan kan, serebrospinal sıvı, idrar veya tükürük gibi biyolojik dokulardan veya sıvılardan izole edilebilmektedir.

25

Çözünür oligomerik formdaki  $\alpha$ -sinükleinin stabilizasyonu, ya bir protein çapraz bağlama maddesi ile  $\alpha$ -sinüklein oligomerini çapraz bağlayarak ya da bir stabilize edici maddeye  $\alpha$ -sinüklein oligomerini bağlayarak, yapısal modifikasyonla tamamlanmaktadır. Stabilize edici madde, çözünmez fibril yapısına agregasyonun önleneyeği şekilde çözünür oligomerik formu stabilize etmektedir. Özel bir yapılandırılmada, çözünür oligomer, bir protofibrildir ve daha özel bir yapılandırılmada, protofibril, yaklaşık 2000 kD veya daha fazla bir moleküler ağırlığa sahiptir.

30

35

Özel bir yapılandırılmada, stabilize edici madde, bir hidrofobik organik maddedir. Çeşitli yapılandırılmalarda, hidrofobik organik madde, bir doymuş, doymamış veya çoklu doymamış

yağ aside veya bunların türevini veya herhangi bir kombinasyonunu, örneğin herhangi ikisi veya daha fazlasının bir kombinasyonunu içermektedir. Diğer yapılandırmalarda, hidrofobik organik madde bir reaktif aldehit içermektedir. Aldehit, örnek olarak, bir  $\alpha$ ,  $\beta$ -doymamış aldehit gibi, bir alkenal olabilmektedir. Uygun reaktif aldehitler, 4-hidroksi-2-nonenal, 4-okso-2-nonenal (ONE), malondialdehit ve akrolein içermekte ancak bunlarla sınırlanmamaktadır. Aldehit aynı zamanda, aldehit grupları bağlayan 2-25 karbon atomluk bir mono veya çoklu doymamış karbon zincirine sahip olan bir dialdehit olabilmektedir. Hidrofobik organik madde, çözünmez fibril yapıya agregasyonun önleneyeceği şekilde, çözünür oligomer yapıya stabilize etmektedir.

10

Bir başka yapılandırmada,  $\alpha$ -sinüklein, iyonik olmayan ve zwitteriyonik deterjanlar gibi ancak bunlarla sınırlanmayan hidrofobik deterjanlarla modifiye edilebilmektedir. Bu deterjanların örnekleri, Triton X-100 (polietilen glikol p-(1,1,3,3-tetrametilbütül)-fenileter), Tween-20 (Polioksietilen (20) sorbitan monolorat), Tween-80 (Polioksietilen (20) sorbitan monooleat) ve Brij deterjanları (Yağ alkollerinin Polioksietilen eterleri) gibi iyonik olmayan deterjanlar ve CHAPS (3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyo]-1-propansülfonat) gibi zwitteriyonik deterjanları içermekte ancak bunlarla sınırlanmamaktadır.

15

Diğer uygun dengeleyici maddeler, örnekleri, kolat, deoksikolat ve taurokolat ve bunların herhangi bir kombinasyonunu içeren ancak bunlarla sınırlanmayan safra asidi türevlerini içermektedir.

20

Dengeleyici madde aynı zamanda, örnekleri, trigliseritler, fosfolipitler, sfingolipitler, gangliozidler, kolesterol, kolesterol-esterler, uzun zincirli (örneğin yaklaşık 6 ila 30 karbon atomu içeren) alkoller ve yukarıdaki maddelerin herhangi bir kombinasyonunu içeren ancak bunlarla sınırlanmayan, doğal biyolojik moleküller grubundan seçilebilmektedir.

25

Stabilizasyon aynı zamanda, disüksinimidil tartrat, bis-sülfosüksinimidil suberimidat, 3,3-ditiyobis-sülfosüksinimidil propiyonat ve bunların herhangi bir kombinasyonu gibi ancak bunlarla sınırlanmayan protein çapraz bağlama maddelerini kullanarak gerçekleştirilebilmektedir.

30

Bir başka yapılandırmada, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, bir stabilize edici madde olarak 1-alfa-hidroksi-sekosterol içermektedir.

35

Stabilize edici maddeler, stabilize çözünür oligomerlerin oluşturulması için, çapraz bağlama ile,  $\alpha$ -sinüklein monomerleri ve/veya oligomerlerine veya bunların kombinasyonuna bağlanabilmektedir. Örnek olarak, HNE ve/veya ONE gibi bir reaktif aldehit, aldehit grup veya bir çift bağ veya her ikisi ile oligomerlere bağlanabilmektedir. Bu sonra, oligomerlerin çapraz bağlanmasıyla sonuçlanmaktadır HNE, örneğin, oligomerlerin histidinlerine ve lizinlerine kovalent olarak bağlanabilmektedir. Benzer şekilde, ONE, histidinlere ve lizinelere kovalent olarak bağlanabilmektedir. Aldehitler, bir Schiff bazı aracılığıyla lizine bağlanabilmektedir veya bir histidin, bir doymam karbon zincirinde bir çift bağ karbon atomunda bir nükleofilik atak ile bağlanabilmektedir. Stabilize edici madde, örneğin, HNE ve ONE gibi bir reaktif aldehit ve  $\alpha$ -sinüklein arasındaki stokiometri, 2:1 ile 50:1 veya daha yüksek bir geniş aralıkta değişebilmektedir. Özel bir yapılandırılmada, 20:1'in üzerindeki, örneğin 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 ve hatta daha yüksek HNE modifikasyon değerleri, istenen şekilde yüksek protofibril formasyonu ile bir ürün sağlamaktadır. Ayrıca, ONE ile, daha da düşük bir oran, örneğin, 5:1, örneğin 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 ve hatta daha yüksek, kullanılabilmektedir.

Aksi belirtilmedikçe, yukarıda bahsedilen stabilize edici maddelerin tümü,  $\alpha$ -sinükleine bağlanarak stabilize edici etkisini uygulamaktadır ve stabilize edici reaksiyon, örneğin, örneklerde gösterildiği gibi, inkübasyonla gerçekleştirilebilmektedir. Stabilize edici madde aynı zamanda, istendiği gibi iki veya daha fazlasının kombinasyonunda kullanılabilmektedir.

Buluşun yine bir başka yapılandırılmasında, stabilize çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri, bir veya daha fazla  $\beta$ -amiloyit ( $A\beta$ ), tau veya fosfo-tau içerebilmektedir. Bu  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri,  $\beta$ -amiloyit ( $A\beta$ ) oligomerleri, örneğin  $A\beta_{40}$  ve/veya  $A\beta_{42}$ 'den oluşan protofibrillerle  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerini kombine ederek yapılabilmektedir. Buluşun yine bir başka yapılandırılmasında, bu  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri,  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerini herhangi bir kombinasyonda  $\beta$ -amiloyit protofibrilleri ve tau ve/veya fosfo-tau ile birleştirerek yapılabilmektedir. Bir başka yapılandırılmada, bu  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri,  $\alpha$ -sinükleinin ayrı ayrı monomerleri,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , tau ve/veya fosfo-taunun herhangi bir kombinasyonunu birleştirerek, bu proteinleri oligomer formlarında herhangi bir kombinasyonda birleştirerek veya herhangi bir oligomeri monomerlerle birleştirerek yapılmaktadır. Bu karışımlar, ek bileşenlerin, örneğin Alzheimer hastalığına Lewy cismi varyantı gibi ancak bununla sınırlanmayan demans hastalarında bulunmasıyla ve dolayısıyla, bu bozuklukların antikoru veya aşığı tedavisi için terapötik olarak önemli neo-epitoplara sağlanmasıyla avantajlıdır (Tsigelny ve diğerleri 2008). Bir başka avantaj, ek bileşenlerin,  $\alpha$ -sinüklein protofibrillerinin/oligomerlerinin stabilitesini arttırmasıdır.

Burada kullanılan gibi izole terimi,  $\alpha$ -sinüklein monomeri ve reaksiyona girmemiş stabilize edici maddeyi içeren, hazırlama aracı tepkimeye giren madde ve benzerinden ayrılan stabilize çözümler  $\alpha$ -sinüklein oligomerine karşı gelmektedir.

5

Buluş, stabilize çözümler  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerini bağlayan antikorlarla ilgilidir. Stabilize çözümler  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, bu antikorların üretilmesi için bir antijen olarak kullanılmaktadır ve  $\alpha$ -sinükleinin toksik formlarına karşı özel antikorların gelişimini optimize etmektedir. Bu yöntemlerde, antijen, bir insan olmayan hayvana uygulanmaktadır ve söz konusu antijene karşı üretilen antikorlar toplanmaktadır. Terapötik etkinin maksimize edilmesi amacıyla, mevcut buluşa göre stabilize  $\alpha$ -sinüklein antijenine karşı yükselen antikorlar, vücutta bulunan çözümler  $\alpha$ -sinükleinin doğal formlarına, özellikle protofibriller dahil olmak üzere kümelenmiş çözümler formlarına karşı ancak aynı zamanda çözümler  $\alpha$ -sinüklein monomerine karşı yüksek bir reaktiviteye sahiptir. Bu antikorların seçilmesinin bir yolu, ilk olarak modifiye ve stabilize  $\alpha$ -sinükleini (özellikle oligomerler ve spesifik olarak protofibriller) iyi bağlayan antikorların taranması ve sonra, bu antikorlar arasında yabancı tip  $\alpha$ -sinükleine iyi bağlanan antikorların taranmasıdır.

10

15

20

25

30

Eldedilen antikorlar,  $\alpha$ -sinüklein fibrillere toplanmadan önce, stabilize çözümler  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerini ve özellikle çözümler  $\alpha$ -sinükleini bağlayan, monoklonal veya poliklonal antikorlar veya bunların aktif fragmentleri olabilmektedir. Özel yapılandırılmalarda, stabilize çözümler  $\alpha$ -sinüklein oligomeri antijeni, monoklonal veya poliklonal antikorların veya aktif fragmentlerin üretilmesi ve/veya gelişmesi için hibridom teknolojisi, faj görüntüleme, ribozom görüntüleme, memeli hücresi görüntüleme ve bakteriyel görüntüleme gibi yöntemlerde kullanılabilmektedir. Daha ayrıntılı olarak, monoklonal  $\alpha$ -sinüklein antikorların oluşumu için, hibridom tekniği ve/veya faj görüntüleme, ribozom görüntüleme, memeli hücresi görüntüleme veya bakteriyel görüntüleme gibi bir geleneksel teknik kullanılabilmektedir. Bu antikorlar, fare, hamster veya sıçan gibi kemirgenlerde üretilebilmektedir. Oluşturulduğunda, klonlar, ilgili antijen spesifikleri için izole edilmekte ve taranmaktadır. Tarama için, iki prensip kullanılmaktadır. İlk olarak, antikorlar, ayrıntılı  $\alpha$ -sinüklein monomerleri, protofibriller/oligomerler ve fibrillere karşı incelenmektedir.  $\alpha$ -sinükleinin bu farklı konformasyon formları stabilize çözümler  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, örnek olarak, HNE-modifiye ve/veya ONE-modifiye  $\alpha$ -sinükleini inkübe ederek ve daha sonra, HPLC ile ayrılarak veya bir santrifüj filtre cihazı kullanarak yapılabilmektedir. Fibriller, 5.000 x g'nin üzerinde inkübasyon

karşınlanmasını santrifüjlenmesi ile izole edilebilmektedir (bakınız Örnek 1). Tarama, bir enzime bağlı bağışıklık testi (ELISA) ile veya benzer yöntemlerle yapılabilmektedir. İkinci olarak, antikolar, Lewy cisimleri ve Lewy nöritleri içeren,  $\alpha$ -sinüklein transgenik hayvanlar ve/veya patojenik insan beyni doku kesitlerinden doku dilimlerinde değerlendirilmektedir.

5

Ek yapılandırmalarda, antikolar, monomerik veya kümelenmiş çözünür  $\alpha$ -sinükleinin mutasyona uğramış veya yabancı tipte veya herhangi bir kombinasyonunda hem modifiye hem de stabilize ile birlikte, modifiye edilmemiş  $\alpha$ -sinüklein ile reaksiyona sokulmaktadır

- 10 Bir yapılandırmada, buluşa göre antikor, özellikle,  $\alpha$ -sinüklein monomerlerine ve çözünmez fibrillere bağlanma gücüne kıyasla, çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerine ve daha özel bir yapılandırmada,  $\alpha$ -sinüklein protofibrillerine daha yüksek bağlanma gücüne sahiptir. Daha spesifik bir yapılandırmada,  $\alpha$ -sinüklein monomerlerine kıyasla alfa-sinüklein protofibrilleri için bağlanma gücü ( $IC_{50}$ ), örnek olarak, yaklaşık olarak 1:50 ila 2000 aralığındadır. Bir başka özel yapılandırmada, alfa-sinükleine kıyasla  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri için bağlanma gücü ( $IC_{50}$ ),  
15 örnek olarak, yaklaşık 1:2 ila 2000 aralığındadır

- Antikor, insan hastalarda antijenliğin azaltılması için insan, insanlaştırılmış veya modifiye olabilmektedir. Antijenliğin azaltılması örnek olarak, antikorun T-hücresi epitoplardan modifiye  
20 ederek veya ortadan kaldırılarak yapılabilmektedir. Bir yapılandırmada, antikor, IgG sınıfından veya daha tercih edilen şekilde IgG1 veya IgG4 alt sınıfından (insan antikorunu) seçilmektedir.

- Ek yapılandırmalarda, antikor aynı zamanda, düşük kompleman aktivitesine ve/veya değiştirilmiş Fc reseptörü bağlama özelliklerine sahip olabilmektedir. Bu, örnek olarak, ağzı  
25 zincirin (insan) amino asit sekansları 297, 322 veya 331 konumlarında antikorun Fc parçasından veya örnek olarak fare IgG'sindeki ilgili amino asitleri mutasyona uğratarak elde edilebilmektedir. Düşük kompleman aktivitesi aynı zamanda, antikoru enzimatik olarak deglikosile ederek veya teknikte bilinen tekniklere göre, başka araçlarla elde edilebilmektedir. Antikorun değiştirilmiş Fc reseptörü bağlama özellikleri, glikoproteine bağlanan oligosakkarit yapıları değiştirilerek elde edilebilmektedir (Jeffries, Nature, 2009, 8: 226-234). Antikor,  
30 örneğin, kan beyin bariyerine girişinin ve nöronal hücre alınmasını artırılması için, örneğin F(ab), F(ab)<sub>2</sub> ve DiFabody'den seçilen bir Fab fragmenti veya örneğin, scFv-Fc ve scFab'dan seçilen bir tek zincirli antikor olabilmektedir. Dolayısıyla, burada kullanılan gibi antikorun, antijen veya aktif bir fragmentten oluşan bir tam uzunluklu proteine karşı geldiği açıktır

35

Daha özel yapılandırılmalarda,  $\alpha$ -sinüklein oligomeri, SEC-HPLC ile ayrıştırılmakta ve izole edilmektedir. Fraksiyonlar, hücre kültürü modellerinde ilgili toksisite için değerlendirilmektedir ve en güçlü toksisiteye sahip antijen fraksiyonları antikor üretimi için antijenler olarak veya aktif immünizasyon için antijenler olarak seçilmektedir. Örnek preparatlar aynı zamanda doğrudan toksisitenin değerlendirilmesi için kullanılabilir ve en belli toksisiteyi gösteren örnekler avantajlı olarak, antikor seçimi ve/veya üretimi için antijen olarak veya aktif immünizasyon için antijenler olarak kullanılabilir.

$\alpha$ -sinüklein antikorları örneğin, yalnızca birkaçını belirtmek gerekirse, PD ve DLB gibi,  $\alpha$ -sinüklein patolojisiyle nörodejeneratif bozuklukların tedavi edilmesi için bir pasif immünizasyon protokolüne uygulanan, antijene karşı monoklonal veya poliklonal antikorların yükseltilmesi amacıyla, mevcut buluşa göre stabilize çözümlü  $\alpha$ -sinüklein oligomerinin bir kemirgene örneğin bir fare veya bir tavşana uygulanması bir yöntem olarak oluşturulabilmektedir. Antikorlar, bir insan hastaya uygulanmadan önce insanlaştırılabilir.

$\alpha$ -sinükleinin kümelenmiş formlarının toksisitesi, çeşitli hücre toksisite testleriyle belirlenebilmektedir (bakınız Şekiller 2 ila 3 ve Örnek 5). Kısa, bir hücre kültürü modeli, MTT'nin değerlendirilmesine, mitokondriyal işlev bozukluğunun bir ölçümüne dayanmaktadır. Diğer toksisite testleri, örneğin, hücre ölümünün veya apoptotik işaretleyicilerin ölçülmesi de kullanılabilir. Örnekleri, adenilat kinaz analizi, laktat dehidrojenaz analizi, aneksin-V renklendirmesi, kaspaz aktivitesi, PARP kelvaj ve DNA basamaklamayı içermekte ancak bunlarla sınırlanmamaktadır.

Pasif bir immünizasyon protokolünün ardından, belirli toksisite ile  $\alpha$ -sinüklein türlerine karşı özellikle çözümlü protofibriler ve diğer oligomerik  $\alpha$ -sinüklein ve  $\alpha$ -sinüklein monomerine karşı monoklonal veya poliklonal antikorlar, antikorların tekrarlayan enjeksiyonları üzerine etkilerini uygulamaktadır.

Alternatif bir yapılandırılma, çözümlü  $\alpha$ -sinükleini bağlayan antikor, kontrol insan deneklerinden veya  $\alpha$ -sinükleinopatilere sahip hastalardan beyaz kan hücrelerinden türetilen insan anti- $\alpha$ -sinüklein monoklonal antikorları olabilmektedir. Hibridomlar, belirlenmiş tekniklere göre beyaz kan hücrelerinden yapılmakta ve  $\alpha$ -sinükleine ve stabilize  $\alpha$ -sinükleine (örnek olarak çözümlü oligomerleri) bağlanmaktadır. İnsan anti- $\alpha$ -sinüklein monoklonal antikorları aynı zamanda, stabilize  $\alpha$ -sinükleine bağlanması için (örnek olarak

çözünür oligomerler) bir insan antikor kütüphanesini tarayarak elde edilebilmektedir. İnsan kontrol deneklerinden veya  $\alpha$ -sinükleinopatilere sahip hastalardan kanda bulunan çözünür  $\alpha$ -sinüklein veya  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerlerine karşı otoantikorlar aynı zamanda, kullanılmı için izole edilebilmektedir. Bu otoantikorlar, dizilenebilmekte ve örneğin verim ve ekonominin arttırılması için CHO hücrelerinde rekombinant-DNA teknolojisi ile yapılabilmektedir.

Özel bir yapılandırılmada, açıkladığı gibi antikor, örneğin uygulama için uygun bir bileşimde sağlanmaktadır. Bu bileşimler, burada açıkladığı gibi bir antikor ve farmasötik bileşimlerde geleneksel olarak kullanılan bir veya daha fazla ekisiyandır içerebilmektedir. Antikor, terapötik olarak etkili bir miktarda dahil edilmektedir. Özel bir yapılandırılmada, bileşimler, amaçlanan alını vücut ağırlığına yaklaşık 0.1-5 mg/kg veya daha ayrıntılı olarak yaklaşık 0.5-2 mg/kg'lık bir miktarda antikor içermektedir.

Uygun ekisiyanlar, bu ekisiyanları, amaçlanan alınıya bağlanarak insan ve/veya veteriner kullanılmı için farmasötik olarak kabul edilebilir olması şartıyla, bir veya daha fazla antibakteriyel madde, yardımcı maddeler, tamponlar, tuzlar, pH düzenleyiciler, deterjanlar veya bunları herhangi bir kombinasyonunu içermekte ancak bunlarla sınırlanmamaktadır. Bileşim, dondurarak kurutma sırasında ve/veya sonrasında antikorun stabilitesinin arttırılması için tek başına veya bir ekisiyan ile birlikte, dondurarak kurutulabilmektedir. Mannitol ve/veya trehaloz, dondurarak kurutma için uygun ekisiyanları sınırlanmamış olmayan örnekleridir.

Burada açıkladığı gibi antikorlar, bir bireyde bir  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğun önlenmesi, başlangıcını geciktirilmesi veya tedavi edilmesi için bir veya daha fazla yöntemde kullanılabilmektedir. Bu yöntemler, burada açıkladığı gibi bir antikorun veya aşını bireye uygulanmasını içermektedir. Birey, örneğin, bir  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluğu edindiğinden veya yüksek bir edinme riskine sahip olmasından şüphelenilen bir denektir. Bir denegin, aşağıdaki özelliklerden herhangi birini görüntüleyerek bu tür bir bozukluğa sahip olmasından şüphelenebilmektedir: erken hastalık belirtileri, pozitif beyin görüntüsü sonuçları ve/veya artan  $\alpha$ -sinüklein veya  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri seviyeleri (örneğin, burada açıkladığı gibi bir saptama yönteminde, burada açıkladığı gibi antikorları kullanarak belirlendiği gibi). Beyin görüntüleme yöntemlerinin örnekleri, burada açıkladığı gibi bir monoklonal antikoru kullanarak DaTscan (<sup>123</sup>I-Ioflupane) veya Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) görüntülemesini içermekte ancak bunlarla sınırlanmamaktadır.

$\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluk riskine sahip olan veya sahip olmasından şüphelenilen deneklerin belirlenmesiyle, burada açılanan yenilikçi tedavilerle, örneğin, buluşun antikorları ile pasif immünizasyonun kullanılmasıyla, bozukluğun daha da gelişmesi önlenmektedir veya başlangıcı veya ilerlemesi geciktirilmektedir.  $\alpha$ -sinüklein ile ilişkili bozukluk, Parkinson hastalığı (PD), Lewy cisimli demans (DLB), Alzheimer hastalığına Lewy cisimi varyantı, multipl sistem atrofisi (MSA) ve Alzheimer hastalığına Down sendromu, amiyotrofik lateral skleroz, frontotemporal demans, Huntington hastalığı, prion hastalığı, Creutzfeldt Jakob hastalığı, Gerstmann-Sträussler-Scheinker sendromu, kuru, fatal familial uykusuzluk, serebrovasküler amiloidoz, glakom, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, psikiyatrik sendromlar, şizofreni ve şizofreni benzeri bozukluklar dahil olmak üzere  $\alpha$ -sinüklein patolojisi ile diğer nörodejeneratif bozukluklar gibi nörodejeneratif bozukluklar olabilmektedir.

Burada açıldığında gibi buluşun antikorları aynı zamanda, saptama yöntemlerinde kullanılabilmekte olup, bunun özel bir örneği, antikorların, *in vitro* ve *in vivo*  $\alpha$ -sinüklein türlerinin değişmiş seviyelerinin saptanması için kullanılan tanısal immüno testleri içermektedir.  $\alpha$ -sinükleinin hedeflenen formlarının seviyeleri özellikle, farklı  $\alpha$ -sinükleinopatilere veya diğer nörodejeneratif bozukluklara sahip olan hastalardan farklı dokular ve vücut sıvılarında değişebilmektedir ve dolayısıyla, Parkinson hastalığı (PD), Lewy cisimli demans (DLB), Alzheimer hastalığına Lewy cisimi varyantı, multipl sistem atrofisi (MSA) veya  $\alpha$ -sinüklein patolojisi ile diğer nörodejeneratif bozukluklar için erken biyokimyasal işaretleyiciler işlevini görebilmektedir.

Daha ayrıntılı olarak, *in vitro*  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerinin saptanması için bir yöntem, buluşa göre antikorun, çözünür  $\alpha$ -sinüklein içeren veya içermesinde şüphelenilen bir biyolojik örneğe eklenmesini ve antikor ve çözünür  $\alpha$ -sinüklein arasında oluşturulan herhangi bir kompleksin bir konsantrasyonunun belirlenmesini ve ölçülmesini içermektedir. Biyolojik örnek, örneğin, plazma, serebrospinal sıvı (CSF) veya bir beyin biyopsisi olabilmektedir. *In vivo*  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerinin saptanması için bir yöntem, söz konusu antikorun saptanabilir bir işaretleyici ile etiketlendiği, mevcut buluşa göre bir antikorun, beyinde sağlıklı çözünür  $\alpha$ -sinüklein oligomerik seviyeleri veya türleri taşınmasından şüphelenilen bir bireye uygulanması ve işaretleyicinin saptanmasıyla antikor ve çözünür  $\alpha$ -sinüklein arasında oluşturulan herhangi bir kompleksin varlığını saptanmasını içermektedir.

Oligomere özel antikorun etiketlenmesi için, teknikte uzman bir kişi, örneğin, birkaç

belirtmek gerekirse  $^{131}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  veya  $^{58}\text{Ga}$  gibi radyoaktif ligandlar gibi, saptama yöntemi seçimine bağlı olarak, çeşitli alternatif tekniklerin kullanılabilmesini kabul edecektir. Özellikle, radyoaktif işaretli bir oligomere özel antikor ile PET'in, tanı/terapi izleme ve/veya benzeri için çok önemli olduğuna inanılmaktadır. Dolayısıyla, buluş, çeşitli tanı ve terapi izleme yöntemlerinde kullanılmak üzere geleneksel teknikleri kullanan teknikte uzman bir kişi tarafından kolay bir şekilde etiketlenen antikorlar sağlamaktadır.

Açılan yöntemler ve tekniklere göre, burada açılan antijenler ve antikorlar,  $\alpha$ -sinüklein patolojisi için hücre kültür modellerinde ve/veya transgenik hayvan modellerinde terapötik potansiyelleri için değerlendirilebilmektedir.  $\alpha$ -sinükleinopati için iki hücre kültürü modelinin örnekleri kullanılabilmektedir. İlk olarak,  $\alpha$ -sinüklein DNA'sinin yabani tipi veya mutant formlarını nöroblastoma veya nöroglıyom hücrelerine transfekte edilmektedir. Hem geçici hem de stabil transfeksiyonlar, retinoil asit ile bir nöron benzeri morfolojiye farklılaştırılan hücreler üzerinde gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde, intraselüler  $\alpha$ -sinüklein agregatlarının formasyonunun indüklenmesi mümkündür. İkinci olarak,  $\alpha$ -sinüklein DNA vektörü taşıyan lenti- ve/veya adeno ilişkili virüs (AAV), nöroblastom, nöroglıyom kültürlerine ve/veya embriyonik böbrek hücresi kültürlerine aktarılmaktadır. Viral vektörlerle transdüksiyon, daha fazla hücrenin  $\alpha$ -sinüklein agregatlarının oluşturulmasına olanak tanıyarak, genellikle daha etkili olduğunda, geleneksel transfeksiyon teknikleri için avantajlıdır.

Oluşturulan  $\alpha$ -sinüklein antikorları aynı zamanda, PD, DLB veya diğer  $\alpha$ -sinükleinopatilerin teşhis edilmesi için hasta örneklerindeki  $\alpha$ -sinüklein (özellikle protofibril/oligomer) seviyelerinin ölçülmesi için immüno bazlı testlerde kullanılabilmektedir. Tanısal testlerde uygulanan saptama yöntemleri temel olarak, enzime bağlı bağışıklık deneyi (ELISA) ve/veya Western blot gibi, immüno testlere dayanmaktadır.  $\alpha$ -sinükleinopatinin erken işaretlerine sahip hastalardan veya bu bozuklukların gelişmesi için yüksek bir riske sahip olan bireylerden çeşitli dokular,  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri veya yapısal olarak değiştirilmiş çözünür  $\alpha$ -sinükleinin diğer formlarının seviyeleri için incelenmektedir. Bu dokular, plazma, serebrospinal sıvı (CSF) ve beyin biyopsilerini içermekte ancak bunlarla sınırlanmamaktadır.

Buluşun çeşitli yönleri, aşağıdaki örneklerde gösterilmektedir.

## ÖRNEKLER

**Örnek 1.  $\alpha$ -sinükleinin yabani tip ve mutasyona uğramış formlarının agregasyon**

## kinetikleri

Farklı  $\alpha$ -sinüklein mutasyonlarının etkisi, *in vitro* incelenmektedir. Yabani tip  $\alpha$ -sinükleine ek olarak, aşağıdaki mutantlar incelenmektedir: A30P, E46K, A53T ve A30P/A53T, A30P/E46K, E46K/A53T ve A30P/E46K/A53T. Rekombinant  $\alpha$ -sinüklein, imalatçının talimatlarına göre, IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag, New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD) sistemini kullanarak ifade edilmektedir. Tüm rekombinant proteinler, 0.05 M ve 0.3 M arasında konsantrasyonda değişen NaCl ile veya onsuz, konsantrasyon olarak 10 mM ve 50 mM arasında değişen, Tris-tampon veya fosfat tamponunda çözündürülmektedir. Tüm rekombinant  $\alpha$ -sinüklein proteinleri, kullanımdan önce -80°C'de saklanmaktadır

Ek çalışmalar için, rekombinant proteinler, konsantrasyon olarak 0.05 M ve 0.3 M arasında olan NaCl ile veya NaCl'siz 3 ila 6'lık pH aralığında sodyum asetat veya sitrat tamponunda çözündürülmektedir. Başlangıç protein konsantrasyonları 35  $\mu$ M ila 750  $\mu$ M arasında değişmektedir ve her deneyde  $\alpha$ -sinüklein türlerinin tüm tipleri için benzerdir. Bazı deneylerde, tiyoflavin T (5 ila 20  $\mu$ M), 10  $\mu$ M'lik bir son  $\alpha$ -sinüklein konsantrasyonu ile başlangıç reaksiyonu karşılarına eklenmektedir.

Agregasyon kinetiklerini incelerken,  $\alpha$ -sinüklein preparatları bir düz veya yuvarlak tabanlı polipropilen 96 kuyucuklu plaka (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Almanya) veya bir düz tabanlı bağlamayan polistiren 96 kuyucuklu plaka (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Almanya) içerisinde tutulmakta ve karşılarına ile veya karşılarından 4°C ve 65°C arasında inkübe edilmektedir. Aynı deneylerde, silikonlar kaplı veya olmayan, polipropilen mikrotüpler (500 ila 2000  $\mu$ l), karşılarına ile veya karşılarından 4°C ve 65°C arasında inkübe edilmektedir. Karşılarına kullanılan çalışmalar için, ya bir polipropilen 96 kuyucuklu plaka veya bir yatay yerleştirilen mikrotüp (500 ila 2000  $\mu$ l), 300 rpm ve 900 rpm arasında değişen hızla bir Labnet P4 orbital çalkalayıcı (Labnet, Edison, NJ, ABD) veya bir Titramax 101'de (Heidolph Instruments GMBH & Co.KG, Schwabach, Almanya) inkübe edilmektedir. Tüm agregasyon çalışmalarında, kuyucuk başına 100 ila 300  $\mu$ l'lik bir son hacim kullanılmaktadır. Bir mikrotüpün kullanılan agregasyon deneylerinde, son hacim 100 ila 2000  $\mu$ l arasında değişmektedir. ThT ölçümleri için, polistiren veya polipropilen 96 kuyucuklu plakalar, bir 445 nm eksitasyon filtresi ve bir 485 nm emisyon filtresi ile donatılan, bir Wallac Victor 2'de (PerkinElmer, Waltham, MA, ABD) okunmaktadır. Bu mutasyonlardan bazılarına eşlik eden  $\alpha$ -sinükleinden sonuçlar **Şekil 1**'de gösterilmektedir.

## Örnek 2. $\alpha$ -sinüklein protofibriler/oligomerlerin sentezi

$\alpha$ -sinüklein protofibriler/oligomerik antijenin üretilmesi için (örneğin, protofibriller ve diğer oligomerleri içeren antijen), ilgili yabancı tip, mutasyona uğramış veya parçalara ayrılmış  $\alpha$ -sinüklein, yukarıda açıklanan gibi, 35 ila 750  $\mu$ M'lik bir konsantrasyonda kullanılmaktadır  $\alpha$ -sinükleinin HNE ve/veya ONE'ye konjüge edildiği örneklerde (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, ABD), bu bileşikler, 0.01 ila 65  $\mu$ M'lik bir konsantrasyonda kullanılmaktadır. Tipik bir deneyde, HNE ve/veya ONE ve  $\alpha$ -sinüklein arasındaki molar oran, 1:1 ve 100:1 arasında değişmektedir, ancak ilgili bileşiklerin oranı bu stokiometriyle sınırlanmamaktadır. Bazı deneylerde, sodyum borhidür ( $\text{NaBH}_4$ ), HNE modifiye ve/veya ONE modifiye örneklerin azaltılması için 0,1 ila 100 mM'lik bir konsantrasyonda kullanılmaktadır. Bazı durumlarda,  $\alpha$ -sinüklein amino asit, HNE modifikasyonu sırasında, HNE ile bağlanan bir stabil olmayan ve ters çevrilebilir Schiff bazı oluşturan amino asitler (lizin gibi) içerebilmektedir. Bir başka durumda,  $\alpha$ -sinüklein amino asit, ONE modifikasyonu sırasında ONE ile bağlanan bir stabil olmayan ve ters çevrilebilir Schiff bazı oluşturan amino asitler (lizin gibi) içerebilmektedir. Sodyum borhidür redüksiyonu, Schiff bazını bağlanmasını stabilize etmektedir. Örnekler, 30 dakika ila 30 gün karıştırılarak veya karıştırmadan 37°C'de inkübe edilmektedir. Örneklerin moleküler bileşiminin doğrulanması için, çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Modifiye edilmiş  $\alpha$ -sinüklein veya HNE modifiye ve/veya ONE modifiye  $\alpha$ -sinüklein veya diğer reaktif aldehytler ile modifiye edilmiş  $\alpha$ -sinüklein, herhangi bir çözünür fibrilin ortadan kaldırılması için 21 °C'de beş dakika 16.900 x g'de santrifüjlenmektedir. Üst faz sonra,  $\alpha$ -sinüklein protofibril oligomerlerin ve monomerlerin izole edilmesi için 214 nm ve 280 nm arasında (aşağıda ayrıntılı açıklanan) UV saptamasıyla bir SEC-HPLC sistemi kullanarak ayrılmaktadır. Bir başka deneyde,  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri ve monomerleri, 5 ve 1000 kDa arasında bir moleküler cutoff ile bir santrifüj filtre cihazı kullanarak ayrılmaktadır. Tipik bir deneyde, örnekler, 500  $\mu$ l HNE ve/veya ONE modifiye  $\alpha$ -sinüklein, 100 kDa'lık bir cutoff değeri ile bir Microcon santrifüj filtre cihazı (Millipore, Billerica, MA) ya da bir Vivaspin500 santrifüj cihazı (Sartorius, Goettingen, Almanya) kullanarak santrifüjlenmektedir. Örnekler, 1000 ila 15000 x g arasında değişen bir hızda 5 ila 30 dk santrifüjlenmektedir ve filtre edilmeyen kısım toplanmakta ve  $\alpha$ -sinüklein protofibrillerin/oligomerlerin çoğunluğunu içermektedir.

### *HNE-modifiye $\alpha$ -sinüklein*

Tipik bir deneyde, 140  $\mu$ M insan yabancı tip  $\alpha$ -sinükleini, 5.6 mM HNE ile (örneğin HNE ve  $\alpha$ -

sinüklein arasında 40:1'lik bir oran ile) 20 saat 37 °C'de inkübe edilmekte olup bundan sonra, bağlanmamış HNE fazlası imalatçının talimatlarına göre Zeba tuz giderme döndürme kolonları (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, ABD), Vivaspin500 santrifüj cihazı (Sartorius, Goettingen, Almanya) ya da bir Microcon santrifüj filtre cihazı (Millipore, Billerica, MA) kullanarak ortadan kaldırılmaktadır. Bu birinci HNE-modifikasyon aşamasından sonra, örnekler doğrudan analiz edilmektedir. SEC-HPLC analizinin öncesinde, tüm örnekler, 16.900 x g'da 5 dk için 22 °C'de santrifüjlenmeye tabi tutulmaktadır ve yalnızca çözünür fraksiyon, bir Superose 6 PC3.2/30 kolonunu kullanarak SEC-HPLC ile analiz edilmektedir.  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri, 19 dk'da bir tepe noktasında ayrılırken,  $\alpha$ -sinüklein monomerleri 37 dk'da ayrılmaktadır (**Şekil 4**).

#### *ONE-modifiye $\alpha$ -sinüklein*

Tipik bir deneyde, yabani tip insan  $\alpha$ -sinükleini (140  $\mu$ M), 4.2 mM ONE ile (örneğin ONE ve  $\alpha$ -sinüklein arasında 40:1'lik bir oran ile) 20 saat 37 °C'de inkübe edilmektedir ve bağlanmamış ONE fazlası imalatçının talimatlarına göre Zeba tuz giderme döndürme kolonları (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, ABD), Vivaspin500 santrifüj cihazı (Sartorius, Goettingen, Almanya) ya da bir Microcon santrifüj filtre cihazı (Millipore, Billerica, MA) kullanarak ortadan kaldırılmaktadır. SEC-HPLC analizinin öncesinde, tüm örnekler, 16.900 x g'da 5 dk için 22 °C'de santrifüjlenmeye tabi tutulmaktadır ve yalnızca çözünür fraksiyon, bir Superose 6 PC3.2/30 kolonunu kullanarak SEC-HPLC ile analiz edilmektedir.  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri, 20 dk'da ana tepe noktasında ayrılırken,  $\alpha$ -sinüklein monomerlerinin küçük bir miktarı 37 dk'da ayrılmaktadır (**Şekil 5**).

#### *HNE- ve ONE-modifiye $\alpha$ -sinüklein*

Tipik bir deneyde, yabani tip insan  $\alpha$ -sinükleini (140  $\mu$ M), 4.2 mM HNE ile ve 4.2 mM ONE ile 20 saat 37 °C'de inkübe edilmektedir ve bağlanmamış HNE ve ONE fazlası imalatçının talimatlarına göre Zeba tuz giderme döndürme kolonları (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, ABD), Vivaspin500 santrifüj cihazı (Sartorius, Goettingen, Almanya) ya da bir Microcon santrifüj filtre cihazı (Millipore, Billerica, MA) kullanarak ortadan kaldırılmaktadır. Tüm örnekler, 16.900 x g'da 5 dk için 22 °C'de santrifüjlenmeye tabi tutulmaktadır ve yalnızca çözünür fraksiyon, bir Superose 6 PC3.2/30 kolonunu kullanarak SEC-HPLC ile analiz edilmektedir.

### Örnek 3. $\alpha$ -sinüklein türlerinin HPLC ayrılması

$\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri, monomerleri ve fibrillerinin izole edilmesi için,  $\alpha$ -sinüklein yukarıda açıkladığı gibi inkübe edilmektedir. Bir Superdex 75 PC3.2/30, Superdex 200 PC3.2/30 veya bir Superose 6 PC3.2/30 kolonuna (GE Healthcare, Uppsala, İsveç) bağlanan, L-7455 modeli bir diyot dizisi dedektörüne, bir L-7200 model otomatik numune alma cihazı ve bir L-7100 model pompaya sahip olan bir Merck Hitachi D-7000 LaChrom HPLC sistemi, kromatografik ayırma ve arıtma analizi için kullanılmaktadır. Örnekler, 0,02 ml/dk ve 0,08 ml/dk arasında değişik akış hızlarında, 20-50 mM Tris pH 6,0-8,0, 0,15M NaCl ya da 20-50 mM sodyum fosfat pH 6.0-8.0, 0.15 M NaCl kullanarak ayrıştırılmaktadır. Alternatif olarak, bir Superose 6 10/300 GL, bir Superdex 200 100/300 GL veya bir Superdex 75 100/300 GL'ye bağlanan, bir L-2130 model pompa, L-7450 model bir diyot dizisi dedektörü, bir L-220 otomatik numune alma cihazına sahip olan bir Hitachi LaChrome Elite HPLC sistemi kullanılmaktadır. Örnekler, 0.1 ml/dk ve 0.5 ml/dk arasında değişik akış hızlarında, 20-50 mM Tris pH 6,0-8,0, 0,15M NaCl ya da 20-50 mM sodyum fosfat pH 6,0-8,0, 0,15 M NaCl kullanarak ayrıştırılmaktadır. Ayrıca, örnekler, 0.15M NaCl ile 3 ve 6 arasında bir pH ile bir sodyum asetat tampon veya sodyum sitrat tampon ile ayrıştırılabilmektedir. Bazı SEC-HPLC analizlerinde, %0.1 - %2.0 Tween-20 veya Tween-80, kolon matriksine  $\alpha$ -sinüklein protofibril oligomerlerinin spesifik olmayan tutunmasını azaltması için elüsyon tamponuna eklenmektedir. Kromatogramlar, 214 nm ve 280 nm arasındaki UV soğurumunun ölçülmesiyle elde edilmektedir. 20 ila 100  $\mu$ l'lik fraksiyonlar, bir Advantec SF-3120 (Advantec, Kashiwa, Japan) fraksiyon kolektöründe toplanmaktadır. 50 ila 500  $\mu$ l'lik fraksiyonlar aynı zamanda bir Bio-Rad model 2128 (Bio-Rad, Hercules, CA) fraksiyon kolektöründe toplanabilmektedir. Küresel moleküler ağırlık standartları bir standart eğrinin elde edilmesi için kullanılmakta olup, burada çeşitli  $\alpha$ -sinüklein türlerinin tutulma süreleri moleküler ağırlıkla ilişkilidir.

### Örnek 4. $\alpha$ -sinüklein protofibrillerinin/oligomerlerinin karakterizasyonu

İzole  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerlerinin morfolojisinin karakterize edilmesi için, donduruculu elektron mikroskopisi ve atomal kuvvet mikroskopisi (AFM) gerçekleştirilmektedir. 1 ila 100  $\mu$ l'lik protein alikotları 10  $\mu$ M ve 350  $\mu$ M arasında değişen bir konsantrasyona seyreltilmekte, bir mika yüzeye veya bir HOPG yüzeye (Veeco instruments SAS, Dourdan cedex, Fransa) eklenmektedir ve standart protokollere göre analiz edilmektedir. HNE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerlerinin AFM analizi, çapları 50 ila

300 nm arasında değişen halka benzeri ve daha doğrusal ve yuvarlak yapılar bir heterojen popülasyonunu ortaya çıkarmaktadır. Örnek olarak, 50 ila 300 nm arasında bir çapla, bir halka benzeri yapıle halkasal moleküler türler gözlenebilmektedir (Şekil 6). ONE-modifiye  $\alpha$ -sinükleinin AFM analizi, genişlikte yaklaşık 30 ila 150 nm'lik bir çap ile amorf yapılar ortaya çıkarmaktadır(Şekil 7).

### Örnek 5. $\alpha$ -sinükleinin toksisitesi deęerlendirmesi

*In vitro* kümelenmiş modifiye edilmemiş  $\alpha$ -sinükleinin ve HNE ve/veya ONE modifiye  $\alpha$ -sinükleinin oligomerinin etkisi, yaygın bir şekilde kullanılan MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD)-canlılık testini kullanarak bir hücre kültürü modelinde analiz edilmektedir. Çalışmada kullanılan hücre tipleri, HEK-293, SH-SY5Y hücreleri ve H4 hücrelerini içermektedir. Çalışmada kullanılan hücre ölçümü ve apoptotik işaretleyicileri ölçen diğer testler, ToxiLight (Lonza, Basel, İsviçre) ve Laktat dehidrojenaz testini (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, ABD) içermektedir. Yabani tip  $\alpha$ -sinükleinin, aşağıdaki mutantlarla kıyaslanmaktadır A30P, E46K, A53T, A30P/E46K, A30P/A53T, A30P/E46K ve A30P/E46K/A53T. Hücreler, %10 fetal sıçır serumu (Cambrex, Charles City, IA, ABD) eklenen DMEM'de (Invitrogen, La Jolla, CA, ABD) büyütülmektedir. Bir deney tipinde, hücreler, 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'de bir inkübatörde tutulmaktadır. Toksikite testine başlamadan önceki gün, HEK-293 hücreleri, 10000 hücre/kuyucuklu bir yoğunlukla 96 kuyucuklu polistiren kaplı plakalara ekilmektedir. Sonra, hücre ortamı değiştirilmekte ve hücreler, 3  $\mu$ M ila 6  $\mu$ M arasında bir son konsantrasyonda yeni şartlandırılmış ortamda seyreltilen modifiye edilmemiş  $\alpha$ -sinükleinin kümelenmiş formları ile işlenmektedir. Bir başka deney setinde, ONE- ve/veya HNE- modifiye  $\alpha$ -sinükleinin oligomeri, yeni şartlandırılmış ortamda, 3  $\mu$ M ila 6  $\mu$ M arasında bir son konsantrasyonda seyreltilmektedir. 48 saat inkübasyondan sonra, fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (Invitrogen, La Jolla, CA, ABD) seyreltilen, 35  $\mu$ M'lik bir son konsantrasyonda hücrelere eklenmektedir. 4,5 saat inkübasyondan sonra, hücreler, %50 DMF ve %20 SDS'lik bir karışım (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) işlenmektedir ve bu karışım, bir ek 24 saat inkübe edilmektedir. Son olarak, metabolize substratı ölçülmesi için, bir Spectra Max 190 spektrofotometre (Molecular Devices Corporation, CA, ABD) kullanılmaktadır ve saptama 570 nm'de gerçekleştirilmektedir.

### Örnek 6. $\alpha$ -sinükleinin protofibrilleri/oligomerleri ile bağışıklık farelerinde $\alpha$ -sinükleinin

35 *İmmünizasyon / Poliklonal antikolar*

- İmmünizasyon şemasında, Balb/C fareleri kullanılmaktadır. Birinci immünizasyon için, farelere, 50 µl Freund's tam yardımcı madde ve 50 µl HNE-modifiye ve/veya ONE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein protofibriller/oligomer preparatları (son konsantrasyon 35 µM) enjekte edilmektedir.
- 5 Başlangıç immünizasyonları için (örneğin, 3 ila 6 kez) farelere, 50 µl Freund's tam olmayan yardımcı madde ve 50 µl HNE-modifiye ve/veya ONE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein protofibriller/oligomer preparatları (son konsantrasyon 35 µM) enjekte edilmektedir. Sonraki immünizasyonlar için (örneğin 1 ila 3 kez), farelere, pH 7.4 ile, Tris-tamponlu tuz çözeltisi veya fosfat-tamponlu tuz çözeltisinde seyreltilen 50 µl HNE-modifiye ve/veya ONE-modifiye
- 10  $\alpha$ -sinüklein protofibriller/oligomer preparatları (son konsantrasyon 35 µM) enjekte edilmektedir. 50 µl HNE-modifiye ve/veya ONE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein protofibriller/oligomerik preparatları (son konsantrasyon 70 µM) içeren iki güçlendirici enjeksiyon, fareler kurban edilmeden önce gerçekleştirilmektedir.
- 15 Bağışıklık farelerden kan, HNE-modifiye (**Şekil 8**) ve ONE-modifiye (**Şekil 9**)  $\alpha$ -sinüklein protofibriller/oligomerlere reaktivite için analiz edilmektedir. Poliklonal antikor yanıtının özgüllüğü, ELISA ile analiz edilmektedir. Tipik bir deneyde, bir düztabanlı yüksek bağlayıcı 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakası 400 ng/kuyucuklu bir son konsantrasyonda monomerik  $\alpha$ -sinüklein (modifiye edilmemiş veya HNE ve/veya ONE ile modifiye edilmiş veya
- 20 diğer aldehitler), protofibriller/oligomerik  $\alpha$ -sinüklein (modifiye edilmemiş veya HNE ve/veya ONE ile modifiye edilmiş veya diğer aldehitler) veya fibriller  $\alpha$ -sinüklein ile kaplanmaktadır. Kuyucuklar, %2 BSA ile bloke edilmekte, %0.05 Tween-20/PBS ile yıkanmaktadır ve incelenen poliklonal antikorlardan hücre ortamı üst fazı (seyreltilmemiş veya 1:1 fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile seyreltilen), birincil antikorlar olarak kuyucuklara eklenmektedir.
- 25 Alkalın fosfataz-konjüge keçi anti-fare IgG/IgM antikorları (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, ABD), 1/1000'lik bir seyreltme ile ikincil antikor olarak kullanılmaktadır. İmmüno reaktivite, p-nitrofenil-fosfat (Sigma-Aldrich, MO, ABD) kullanarak görüntülenmektedir.

Serumda, özellikle  $\alpha$ -sinüklein protofibrillerini/oligomerlerini tanıyan antikorlar saptanmaktadır (**Şekiller 8 ve 9**).

#### *Hibridom / monoklonal antikorlar*

Dalak hücreleri izole edilmekte ve steril fosfat-tamponlu tuz çözeltisinde (PBS) öğütülmekte

ve bir hücrece zengin peletin toplanması için 10 dk 1200 x g'da santrifüjlenmektedir. Hücreler sonra, PBS ile yıkanmakta ve 10 dk 1200 x g'da santrifüjlenmektedir. Hücre peleti, %1 antibiyotik eklenen Dulbecco'nun minimum gerekli ortamında (DMEM, Invitrogen, La Jolla, CA, ABD) yeniden süspansiyon haline getirilmektedir. Dalak hücreleri, DMEM'de Sp2/0 hücreleri (fare miyelom hücre hattı) ile 1:1 oranında karıştırılmaktadır. Hücre füzyonunun kolaylaştırılması için, 1 ml polietilen glikol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), hücre karışımına eklenmektedir ve reaksiyon, DMEM'nin eklenmesi ile durdurulmaktadır. Hücreler toplanmaktadır ve pelet, %10 (hac/hac) fetal sıgı serumu (Cambrex, Charles City, IA, ABD) eklenen ve aynı zamanda %1 (hac/hac) sodyum piruvat (Cambrex, Charles City, IA, ABD), %1 (hac/hac) antibiyotik (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve %1 (hac/hac) L-glutamin (Cambrex, Charles City, IA, ABD) içeren DMEM'de yeniden süspansiyon haline getirilmektedir. Santrifüjlemeden sonra, son hücre peleti yeniden süspansiyon haline getirilmektedir. Oluşturulan hibridomlar tarafından üretilen antikorların incelenmesi için, bir ELISA protokolü kullanılmaktadır. Tipik bir deneyde, düz tabanlı bir yüksek bağlayıcı 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakası 400 ng/kuyucuklu bir son konsantrasyonda, monomerik  $\alpha$ -sinüklein (modifiye edilmemiş veya HNE ve/veya ONE ile modifiye edilmiş veya diğer aldehitler), oligomerik/ protofibriler  $\alpha$ -sinüklein (modifiye edilmemiş veya HNE ve/veya ONE ile modifiye edilmiş veya diğer aldehitler) veya fibriler  $\alpha$ -sinüklein ile kaplanmaktadır. Kuyucuklar, %2 BSA ile bloke edilmekte, %0.05 Tween-20/PBS ile yıkanmaktadır ve incelenen hibridomdan hücre ortamı üst fazı (seyreltilmemiş veya 1:1 fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile seyreltilen), birincil antikorlar olarak kuyucuklara eklenmektedir. Yaban turpu peroksidaz-konjüge keçi anti-fare IgG/IgM antikoru (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, ABD), 1/5000'lik bir seyreltme ile ikincil antikor olarak kullanılmaktadır. İmmüno reaktivite, geliştirilmiş bir K-Blue® substratı (TMB) kullanarak görüntülenmektedir ve reaksiyon 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile durdurulmaktadır. DMEM'e %10 fetal sıgı serumu eklenmektedir ve aynı zamanda %5 (hac/hac) BM şartlandırılmış ortam (Roche Diagnostics Scandinavia, Bromma, İsveç) ve %2 (hac/hac) HAT ortam takviyesi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) içermektedir ve hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürleme plakalarına ekilmektedir.

Hibridomlar, daha önce açıldığında gibi ONE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein protofibriler/oligomer preparatları enjekte ederek oluşturulmaktadır. Özellikle, hibridom 40:2, bir ELISA protokolünde bir ONE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein protofibriler/oligomer preparatından tanınmaktadır. Hibridomdan 40:2 hücre ortamının üst fazı 1/9, 1/27 ve 1/82'ye seyreltilmektedir ve 400 ng/kuyucuklu ONE-modifiye  $\alpha$ -sinüklein protofibrilleri/oligomerleri ile kaplanan bir düz tabanlı yüksek bağlayıcı 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakası üzerinde yukarıda açıldığında gibi

analiz edilmektedir (**Şekil 10**).

Özel örnekler ve burada açıklanan yapılandırılmalar, yalnızca tür olarak örneklendiricidir ve istemlerle açıklanan buluşu sınırlandırmaması amaçlanmamaktadır. Diğer yapılandırılmalar ve örnekler ve avantajlar, bu şartnamenin ışığında teknikte uzman kişi için anlaşılabilir olacaktır ve istenen buluşun kapsamı içerisinde yerindedir.

## REFERANSLAR

- 10 Bieschke, J., ve diğerleri 2006. Small molecule oxidation products trigger disease-associated protein misfolding. *Acc Chem Res* 39, 611-619.
- Chartier-Harlin, MC., ve diğerleri 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 1, 364,1167-9.
- Conway, K., ve diğerleri, 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both  $\alpha$ -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci ABD* 97, 571-576.
- 15 El-Agnaf, O. M., ve diğerleri, 2006. Detection of oligomeric forms of  $\alpha$ -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *Faseb J* 20, 419-425.
- Hansen, L, ve diğerleri, 1990. The Lewy body variant of Alzheimer's disease. A clinical and pathologic entity. *Neurology* 40, 1-8.
- 20 Jeffries, R. 2009 Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics *Nature* 8, 226-234. Klucken, J., ve diğerleri, 2006. Clinical and biochemical correlates of insoluble  $\alpha$ -synuclein in dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 111, 101-108.
- 25 Kruger, R. Ve diğerleri, 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding a  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18, 106-108.
- Näsström, T ve diğerleri, 2009. The lipid peroxidation metabolite 4-oxo-2-nonenal cross-links  $\alpha$ -synuclein causing rapid formation of stable oligomers. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 872-876.
- 30 Polymeropoulos, M.H., ve diğerleri, 1997. Mutation in the  $\alpha$ -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276, 2045-47.
- Qin, Z., ve diğerleri, 2007. Effect of 4-hydroxy-2-nonenal modification on  $\alpha$ -synuclein aggregation. *J Biol Chem* 282, 5862-5870.
- Shamoto-Nagai, M., ve diğerleri, 2007. In parkinsonian substantia nigra,  $\alpha$ -synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine
- 35

neurons with inhibition of proteasome activity. J Neural Transm 144, 1559-1567.  
Singleton, AB., ve diğlerleri, 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's  
disease. Science 302:841. Tsigelny, IF., ve diğlerleri, "Mechanism of hybrid oligomer  
formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's Diseases."  
5 PloS ONE Eylül 2008, cilt 3 konu 9, e3135, p1-15 www.plosone.org  
Yoritaka, A., ve diğlerleri, 1996. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal  
protein adducts in Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci ABD 93, 2696-2701.  
Zarranz, J., ve diğlerleri, 2004. The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes Parkinson  
and Lewy body dementia. Ann Neurol. 55, 164-173.

10

## SEKANS LİSTESİ

<110> BioArtic AB

15

<120> Alfa-Sinüklein İle İlişkili Bozukluklar İçin Terapötik Ve Teşhis Yöntemlerinde Kullanılma Yönelik  
Antikorlar Ve Aşlılar

<130> 4007579-178274

<150> US 61/048,865

<151> 2008-04-29

<160> 8

20

<170> Patentin versiyon 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

25

<213> Homo sapiyen

<400> 1

30

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys  
20 25 30

35

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val  
35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr  
50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys  
65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
85 90 95

5 Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile  
100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro  
115 120 125

10 Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala  
130 135 140

<210> 2  
<211> 140  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

15 <400> 2

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Pro Gly Lys  
20 25 30

20 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val  
35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr  
50 55 60

25 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys  
65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile  
100 105 110

30 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro  
115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala  
130 135 140

35 <210> 3  
<211> 140  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 3

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val





Val His Gly Val Thr Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr  
 50 55 60  
 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys  
 65 70 75 80  
 5 Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
 85 90 95  
 Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile  
 100 105 110  
 10 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro  
 115 120 125  
 Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala  
 130 135 140

<210> 7  
 <211> 140  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapien  
 <400> 7

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

<210> 8  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 8

5 Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Pro Gly Lys  
20 25 30

10 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Lys Gly Val  
35 40 45

Val His Gly Val Thr Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr  
50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys  
65 70 75 80

15 Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile  
100 105 110

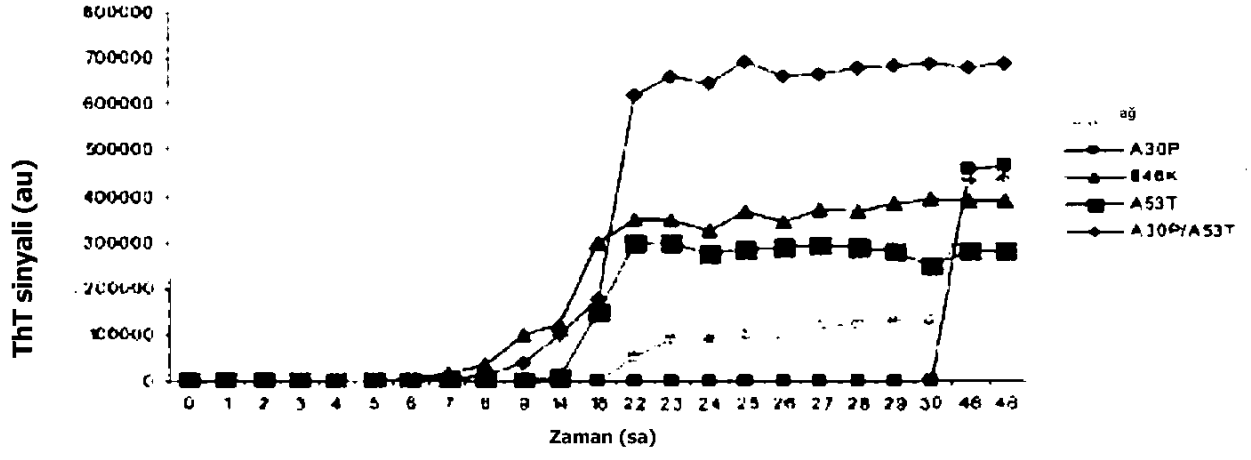
20 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro  
115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala  
130 135 140

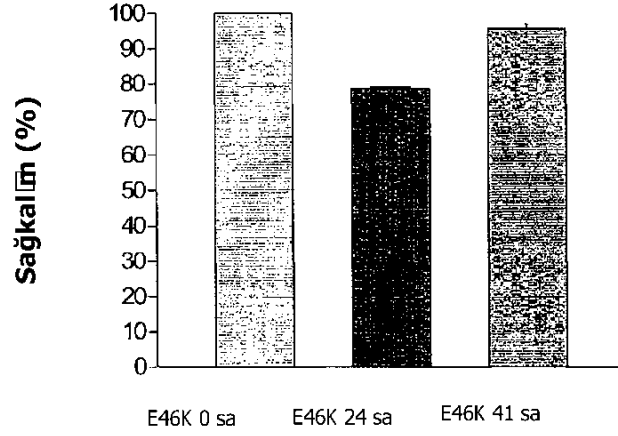
25

30

Şekil 1

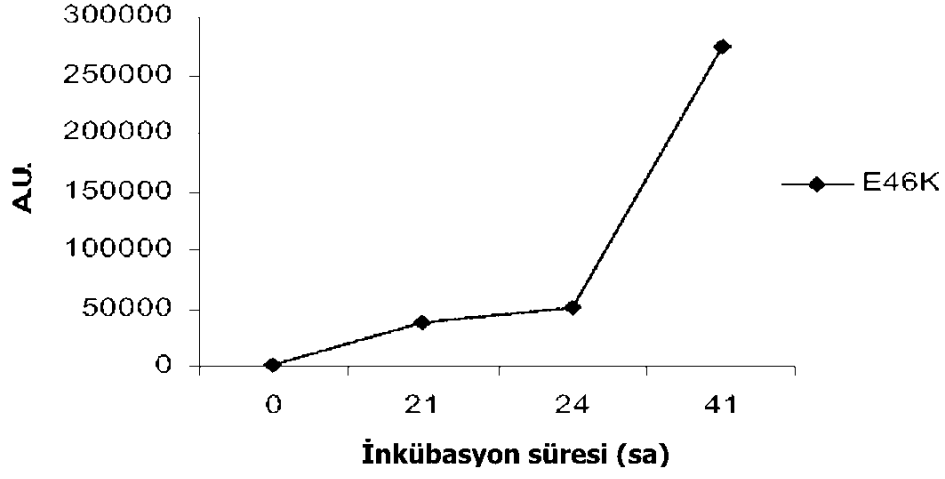


Şekil 2A

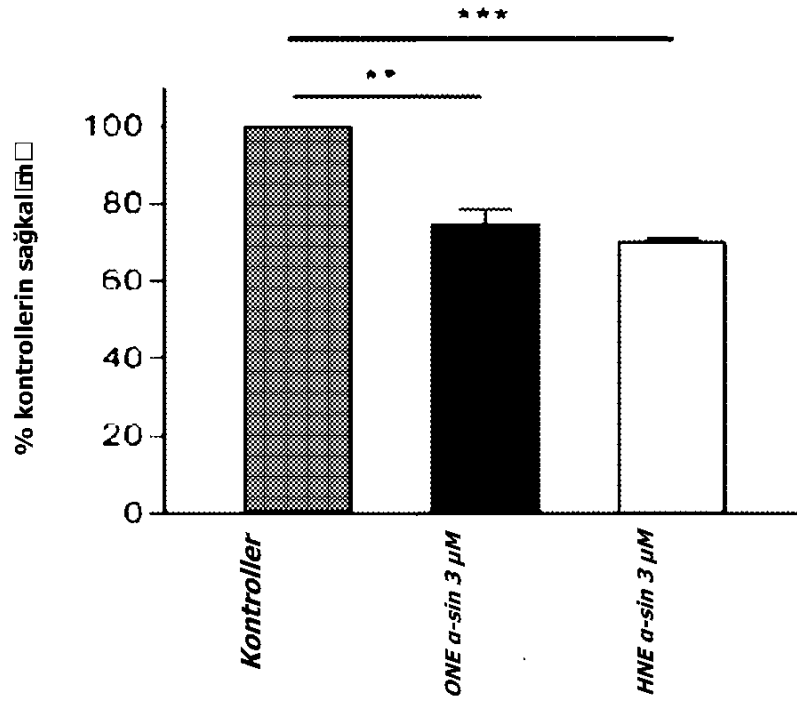


İnkübasyon süresi (sa)

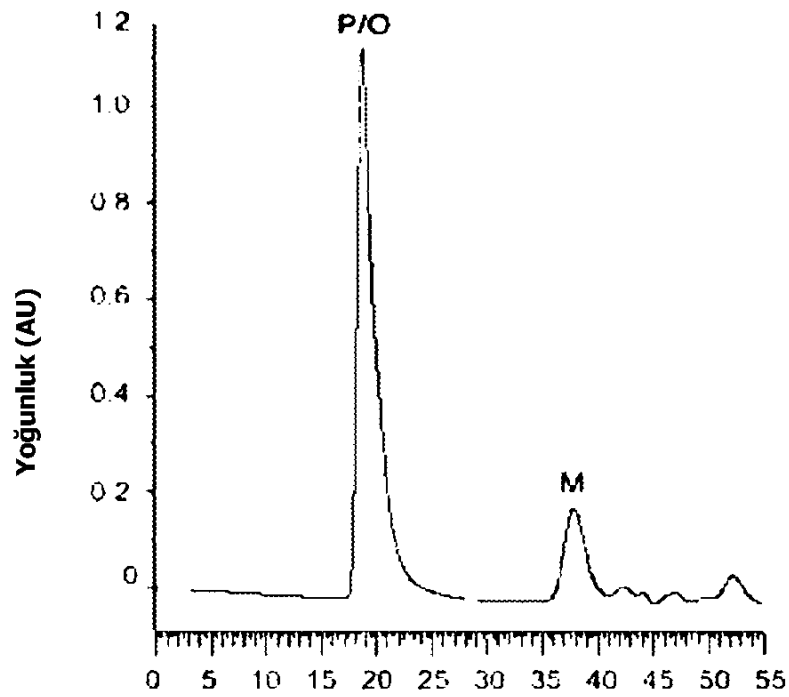
Şekil 2B



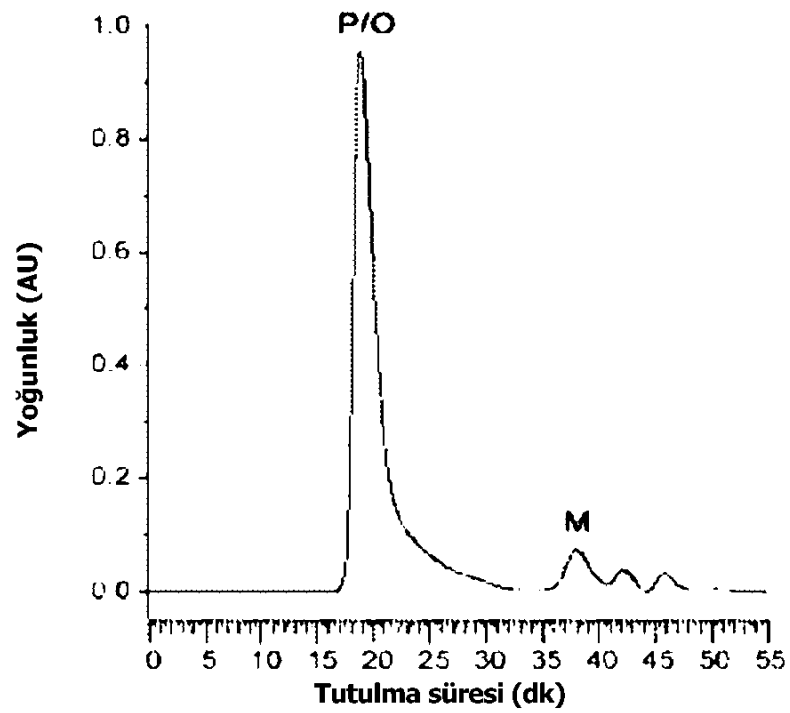
Şekil 3



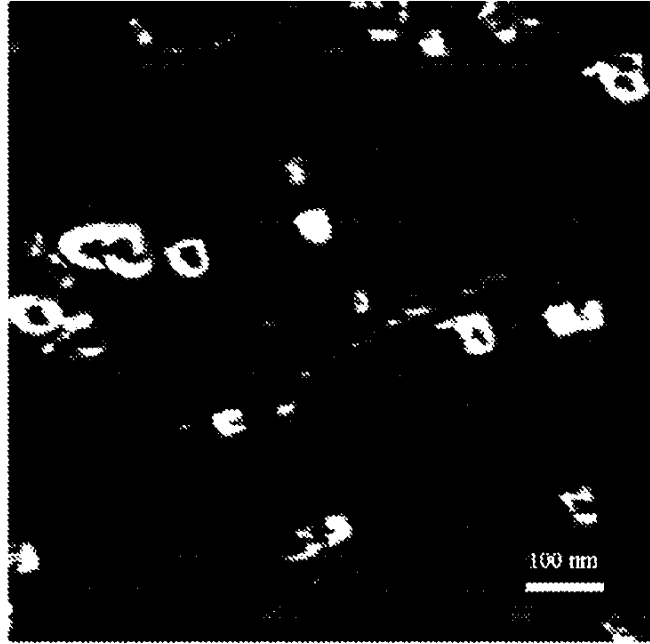
Şekil 4



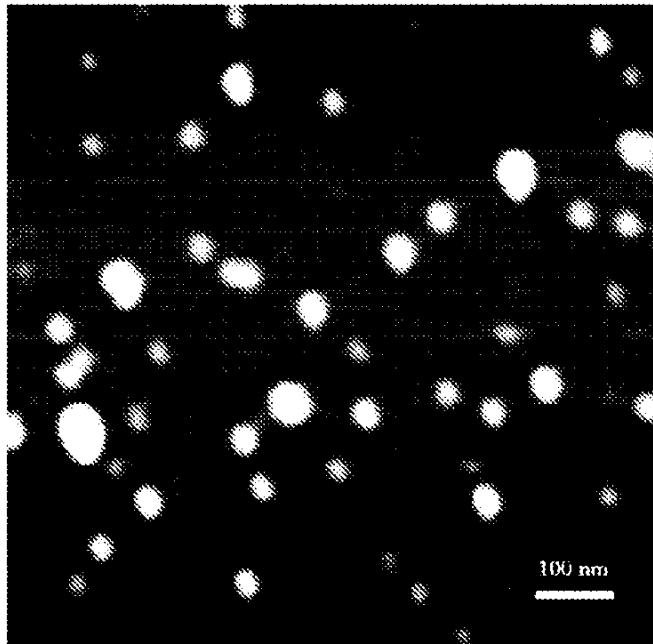
Şekil 5

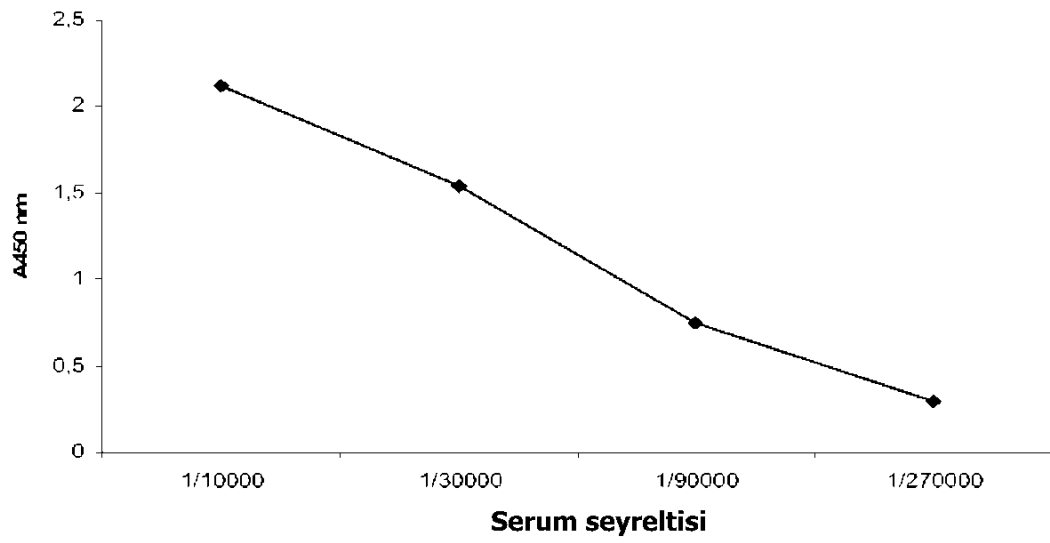
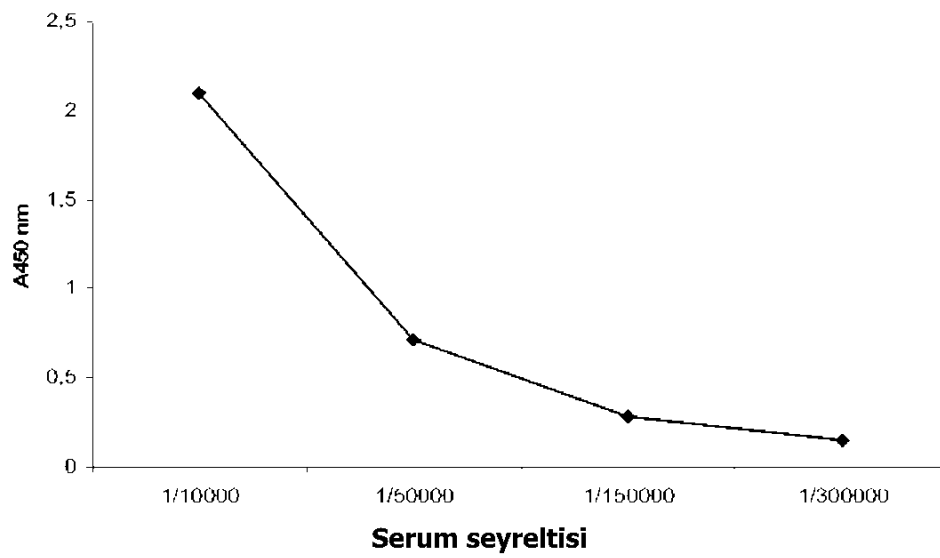


Şekil 6



Şekil 7



**Şekil 8****Şekil 9**

Şekil 10

