

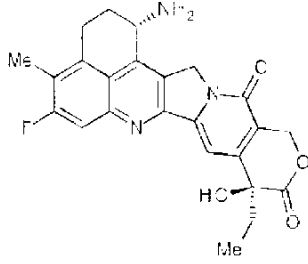
**ÖZET****ANTI-TROP2 ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATI**

Anti-tümör etki ve güvenlik açılarından mükemmel olan, bir mükemmel terapötik etkiye  
5 sahip olan bir anti-tümör ilaç sağlamak amaçlanır. Burada aşağıdaki formül ile temsil  
edilen bir anti-tümör bileşiğinin aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıya sahip olan  
bir bağlayıcı vasıtasıyla bir anti-TROP2 antikoruna konjuge edildiği bir antikor-ilaç  
konjugatı sağlanır:  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ , burada anti-TROP2  
antikoru  $L^1$ 'in ucuna bağlanır ve anti-tümör bileşiği bir bağlama pozisyonu olarak  
10 pozisyon 1'deki amino grubunun nitrojen atomu ile  $-(CH_2)n^2-C(=O)-$  kısmının karbonil  
grubuna bağlanır.

## İSTEMLER

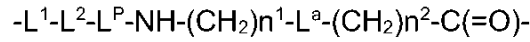
1. Bir antikor-ilaç konjugatı olup, burada aşağıdaki formül ile temsil edilen bir anti-tümör bileşiği:

5



aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıya sahip olan bir bağlayıcı vasıtasıyla anti-TROP2 antikorunun bir menteşe parçasında bulunan bir disülfid bağ kısmında oluşturulan bir tiyoeter bağ ile bir anti-TROP2 antikoruna konjuge edilir:

10



15

burada anti-TROP2 antikoru L<sup>1</sup>'in ucuna bağlanır, anti-tümör bileşiği bağlama pozisyonu olarak pozisyon 1'deki amino grubunun nitrojen atomu ile -(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)- kısmının karbonil grubuna bağlanır,

burada

n<sup>1</sup>, 0 ila 6 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

20

n<sup>2</sup>, 0 ila 5 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

L<sup>1</sup>, -(Süksinimid-3-il-N)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(=O)-'yu temsil eder,

burada n<sup>3</sup>, 2 ila 8 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

L<sup>2</sup>, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sup>n<sup>4</sup></sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-'yu veya bir tekli bağı temsil eder,

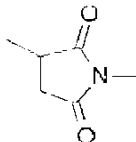
burada n<sup>4</sup>, 1 ila 6 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

25

L<sup>P</sup>, -GGFG-'nin bir tetrapeptit rezidüsünü temsil eder,

L<sup>a</sup>, -O-'yu veya bir tekli bağı temsil eder ve

-(Süksinimid-3-il-N)-, aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıya sahiptir:



bu, bunun pozisyon 3'ünde anti-TROP2 antikoruna bağlanır ve pozisyon 1'deki nitrojen atomu üzerinde bu yapıyı içeren bağlayıcı yapıdaki bir metilen grubuna bağlanır,

burada anti-TROP2 antikoru bunun ağır zincir değişken bölgesinde SEQ ID NO: 23'ün amino asit dizisinden oluşan CDRH1, SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisinden oluşan CDRH2 ve SEQ ID NO: 25'in amino asit dizisinden oluşan CDRH3 ve bunun hafif zincir değişken bölgesinde SEQ ID NO: 26'nın amino asit dizisinden oluşan CDRL1, SEQ ID NO: 27'nin amino asit dizisinden oluşan CDRL2 ve SEQ ID NO: 28'in amino asit dizisinden oluşan CDRL3 içerir.

10

2. İstem 1'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_n^1-L^a-(CH_2)_n^2-C(=O)-$ 'ya bağlanmış bir ilaca sahip olan ilaç-bağlayıcı yapı kısmı, aşağıdaki gruptan seçilen bir ilaç-bağlayıcı yapıdır:

15

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-D X),

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

20

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

25

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-C H<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

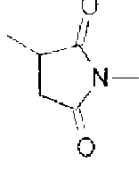
30

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX) ve

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX);

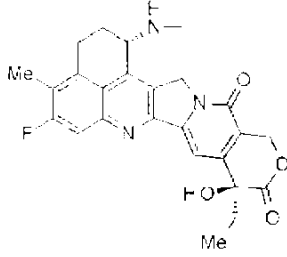
35

burada -(Süksinimid-3-il-N)-, aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıya sahiptir:



5 bu, bunun pozisyon 3'ünde anti-TROP2 antikoruna bağlanır ve pozisyon 1'deki nitrojen atomu üzerinde bu yapıyı içeren bağlayıcı yapıdaki bir metilen grubuna bağlanır,

- (NH-DX), aşağıdaki formül ile temsil edilen bir grubu temsil eder:



10

burada pozisyon 1'deki amino grubunun nitrojen atomu bir bağlama pozisyonudur ve

-GGFG-, -Gly-Gly-Phe-Gly-'nin bir tetrapeptit rezidüsünü temsil eder.

15 3. İstem 2'ye göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada ilaç-bağlayıcı yapı kısmı aşağıdaki gruptan seçilen bir ilaç-bağlayıcı yapıdır:

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
(NH-DX),

20 - (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-  
C(=O)-(NH-DX) ve

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

25 4. İstem 3'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada ilaç-bağlayıcı yapı kısmı aşağıdaki bileşiktir:

- (Süksinimidil-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

5. İstem 3'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada ilaç-bağlayıcı yapı kısmı aşağıdaki bileşiktir:

- (Süksinimidil-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

10 6. İstem 3'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada ilaç-bağlayıcı yapı kısmı aşağıdaki bileşiktir:

- (Süksinimidil-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

15

7. İstemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada anti-TROP2 antikorunu aşağıdaki gruptan seçilen bir ağır zincir ve bir hafif zincir içerir; SEQ ID NO: 12'nin pozisyonları 20 ila 140 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi, SEQ ID NO: 14'ün pozisyonları 20 ila 140 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi, SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 140 arasındaki pozisyonlarının amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 20'nin pozisyonları 21 ila 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 16'nin pozisyonları 20 ila 140 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 22'nin pozisyonları 21 ila 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi.

30

8. İstemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada anti-TROP2 antikorunu aşağıdaki gruptan seçilen bir ağır zincir ve bir hafif zincir içerir; SEQ ID NO: 12'nin pozisyonları 20 ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir, SEQ ID NO: 14'ün pozisyonları 20

35

- ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir, SEQ ID NO: 14'ün pozisyonları 20 ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 20'nin pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir ve
- 5 SEQ ID NO: 16'nin pozisyonları 20 ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 22'nin pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir.
- 10 9. İstemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada anti-TROP2 antikoruna SEQ ID NO: 12'nin pozisyonları 20 ila 140 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi içerir.
- 15 10. İstemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada anti-TROP2 antikoruna SEQ ID NO: 12'nin pozisyonları 20 ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir içerir.
- 20 11. İstem 8'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, anti-TROP2 antikoruna ağır zincirin karboksil ucunda bir lizin rezidüsünden yoksundur.
- 25 12. İstem 10'a göre antikor-ilaç konjugatı olup, anti-TROP2 antikoruna ağır zincirin karboksil ucunda bir lizin rezidüsünden yoksundur.
- 30 13. İstemler 1 ila 12'den herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada her bir antikor için konjuge edilmiş seçilmiş bir ilaç-bağlayıcı yapının birimlerinin bir ortalama sayısı 2 ila 8 olan bir aralık içindedir.
14. İstemler 1 ila 12'den herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada her bir antikor için konjuge edilmiş seçilmiş bir ilaç-bağlayıcı yapının birimlerinin bir ortalama sayısı 3 ila 8 olan bir aralık içindedir.

15. Bir ilaç olup, istemler 1 ila 14'ten herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatını, bunun bir tuzunu veya bunun bir hidratını içerir.
- 5 16. Bir anti-tümör ilacı ve/veya anti-kanser ilacı olup, istemler 1 ila 14'ten herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatını, bunun bir tuzunu veya bunun bir hidratını içerir.
- 10 17. İstem 16'ya göre anti-tümör ilacı ve/veya anti-kanser ilacı olup, akciğer kanserinin, böbrek kanserinin, ürotelyal kanserin, kolorektal kanserin, prostat kanserinin, gliyoblastom multiformun, overyan kanserin, pankreatik kanserin, meme kanserinin, melanomun, karaciğer kanserinin, idrar kesesi kanserinin, gastrik kanserin, servikal kanserin, baş ve boyun kanserinin veya özofajiyal kanserin tedavisinin bir yönteminde kullanım içindir.
- 15 18. Bir farmasötik bileşim olup, bir aktif bileşen olarak istemler 1 ila 14'ten herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatını, bunun bir tuzunu veya bunun bir hidratını ve bir farmasötik olarak kabul edilebilir formülasyon bileşeni içerir.
- 20 19. İstem 18'e göre farmasötik bileşim olup, akciğer kanserinin, böbrek kanserinin, ürotelyal kanserin, kolorektal kanserin, prostat kanserinin, gliyoblastom multiformun, overyan kanserin, pankreatik kanserin, meme kanserinin, melanomun, karaciğer kanserinin, idrar kesesi kanserinin, gastrik kanserin, servikal kanserin, baş ve boyun kanserinin veya özofajiyal kanserin tedavisinin bir yönteminde kullanım içindir.

## TARİFNAME

### ANTI-TROP2 ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATI

#### **Teknik Alan**

5

Mevcut buluş, bir bağlayıcı yapı kısmı vasıtasıyla bir anti-TROP2 antikoru konjuge edilmiş bir anti-tümör ilacına sahip olan, bir anti-tümör ilacı olarak yararlı olan, bir antikor-ilaç konjugatı ile ilgilidir.

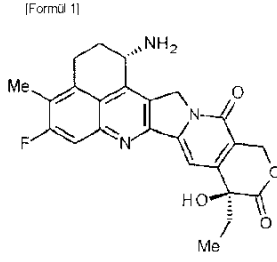
#### **10 Tekniğin Alt-yapısı**

Bir antikora konjuge edilmiş sitotoksitesi olan bir ilaca sahip olan, antijeni kanser hücrelerinin bir yüzeyi üzerinde eksprese edilen ve aynı zamanda hücrel içselleştirme yapabilen bir antijeni de bağlayabilen ve bundan dolayı ilacı selektif bir şekilde kanser hücrelerine aktarabilen ve böylelikle kanser hücrelerinde ilacın birikmesine neden olması ve kanser hücrelerini öldürmesi beklenen bir antikor-ilaç konjugatı (ADC) (bakınız, Patent-dışı Literatür 1 ila 3). Bir ADC olarak, burada kalikeamisinin bir anti-CD33 antikoru konjuge edildiği Mylotarg (Gemtuzumab ozogamisin (tescilli marka)), akut miyeloid lösemi için bir terapötik ajan olarak onaylanır. İlaveten, burada auristatin E'nin bir anti-CD30 antikoru konjuge edildiği Adcetris (Brentuksimab vedotin (tescilli marka)) yakın tarihlerde, Hodgkin lenfoması ve Anaplastik büyük hücreli lenfoma için bir terapötik ajan olarak onaylanmıştır (bakınız, Patent-dışı Literatür 4). Şimdiye kadar onaylanmış olan ADC'lere dâhil edilen ilaçlar DNA'yı veya tübülini hedef alır.

25

Bir anti-tümör, düşük-moleküler-ağırlıklı bileşiklere ilişkin, kamptotesin türevleri, bir anti-tümör etki göstermek için topoizomeraz I'i inhibe eden bileşikler, bilinir. Bunlar arasında, aşağıdaki formül ile sunulan bir anti-tümör bileşiği (ekzatekan, kimyasal adı: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-floro-2,3-dihidro-9-hidroksi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-10,13(9H,15H)-dion), kamptotesinin bir suda çözünebilir türevidir (Patent Literatürü 1 ve 2):

30



Klinik koşullarda güncel olarak kullanılan irinotekandan farklı olarak, bu bileşik bir anti-tümör etki uygulamak için bir enzim tarafından bir aktivasyon gerektirmez. İlaveten, topoizomerez I üzerindeki inhibitör aktivite, aynı zamanda klinik koşullarda da kullanılan irinotekanın ve topotekanın bir ana farmasötik olarak etkin maddesi olan SN-38'e kıyasla daha yüksektir ve çeşitli kanser hücrelerine karşı daha yüksek *in vitro* sitosidal aktivite elde edilir. Özel olarak, bu P-glikoproteininin ekspresyonundan dolayı SN-38'e veya benzerlerine dirence sahip olan kanser hücrelerine karşı etki gösterir. İlaveten, bir insan tümörü subkütan olarak nakledilmiş fare modelinde, bu bir güçlü anti-tümör etki göstermiştir ve bundan dolayı klinik çalışmalar geçirmiştir ancak henüz pazara koyulmamıştır (bakınız, Patent-dışı Literatürler 5 ila 10). Ekzatekanın bir ADC olarak etkili bir şekilde etki edip etmediği belirsizliğini korur.

DE-310, burada ekzatekanın bir GGFG peptit aralayıcı vasıtasıyla bir biyolojik olarak parçalanabilen karboksimetildekstran polialkol polimerine konjuge edildiği bir komplekstir (Patent Literatürü 3 ve Patent-dışı Literatürler 30 ve 31). GGFG tetrapeptidini içeren peptit aralayıcılar Patent-dışı Literatür 32'de tartışılır. Ekzatekanı bir polimer ön-ilacın bir formuna dönüştürme ile, bir yüksek kanda alıkonulma özelliği idame ettirilebilir ve ayrıca bir tümör alanına bir yüksek hedeflenebilen özellik tümör içinde yeni oluşturulan kan damarlarının artırılmış geçirgenliğinden ve tümör dokularında alıkonulma özelliğinden yararlanma ile pasif bir şekilde artırılır. DE-310 ile, peptit aralayıcının enzim tarafından bir klevajı yoluyla, ekzatekan ve bir amino grubuna bağlanmış glisini olan ekzatekan bir ana etkin madde olarak sürekli bir şekilde salınır. Sonuç olarak, farmakokinetikler iyileştirilir. Klinik-dışı çalışmalarda çeşitli tümör değerlendirme modellerine göre buna dâhil edilen ekzatekanın toplam miktarının tek başına ekzatekanın uygulanması durumuna kıyasla daha düşük olmasının rağmen, DE-310'un tek başına uygulanan ekzatekana kıyasla daha yüksek etkililiğe sahip olduğu bulunmuştur. DE-310 için bir klinik çalışma gerçekleştirilmiştir ve aynı zamanda burada ana etkin maddenin normal dokulara kıyasla bir tümörde biriktiğini öne süren bir raporun var olduğu etkili olgular da konfirme edilmiştir, bununla birlikte, burada aynı

zamanda DE-310'un ve ana etkin maddenin bir tümör içinde birikiminin insanlarda normal dokulardaki birikimden çok farklı olmadığını ve böylelikle insanlarda herhangi bir pasif hedeflemenin gözlemlenmediği bir rapor da vardır (bakınız, Patent-dışı Literatürler 11 il 14). Sonuç olarak, DE-310 da ticarileştirilmemiştir ve ekzatekanın bu  
5 tarz hedeflemeye yönlendirilmiş bir ilaç olarak etkili bir şekilde etki edip etmediği belirsizliğini korur.

DE-310 ile ilgili bir bileşik olarak, burada  $-NH-(CH_2)_4-C(=O)-$  ile temsil edilen bir yapı kısmının bir aralayıcı yapı olarak kullanılan  $-GGFG-NH-(CH_2)_4-C(=O)-$  oluşturmak için -  
10 GGFG-aralayıcı ve ekzatekan arasına yerleştirildiği bir kompleks de bilinir (Patent Literatürü 4). Bununla birlikte, söz konusu kompleksin anti-tümör etkisi hiç bir şekilde bilinmez.

İnsan TROP2'si (TACSTD2: tümör-ilişkili kalsiyum sinyali ileticisi 2, GA733-1, EGP-1,  
15 M1S1; bundan sonra, hTROP2 olarak ifade edilir), 323 amino asit rezidüsünden oluşan bir tek-geçişli transmembran tipi 1 hücre membranı proteindir. İnsan trofoblastları ve kanser hücreleri için ortak olan, immün dirence dâhil edilen bir hücre membranı proteininin varlığı (Patent-dışı Literatürü 15) önceden öne sürülmüş iken, bir insan koryokarsinomu hücre hattında bir hücre membranı proteinine karşı bir monoklonal  
20 antikor (162-25.3 veya 162-46.2) tarafından tanınan bir antijen molekülü tanımlanmıştır ve insan trofoblastlarında eksprese edilmiş moleküllerin biri olarak TROP2 olarak gösterilmiştir (Patent-dışı Literatür 16). Bu molekül ayrıca daha sonra, başka araştırmacılar tarafından da bulunmuştur ve aynı zamanda bir gastrik kanser hücresi hattı ile immünizasyon ile elde edilen bir fare monoklonal antikor GA733 tarafından  
25 tanınan bir tümör antijeni GA733-1 (Patent-dışı Literatür 17) veya küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri ile immünizasyon ile elde edilen bir fare monoklonal antikor RS7-3G11 tarafından tanınan bir epitelyal glikoprotein (EGP-1; Patent-dışı Literatür 18) olarak da gösterilmiştir. 1995'te, bununla birlikte, TROP2 geni klonlanmıştır ve bu moleküllerin tümünün özdeş moleküller olduğu konfirme edilmiştir  
30 (Patent-dışı Literatür 19). hTROP2'nin DNA dizisi ve amino asit dizisi bir halka açık veri tabanında mevcuttur ve bunlara, örneğin, NM\_002353 ve NP\_002344 Erişim Numaraları (NCBI) altında, refere edilebilir.

hTROP2 geni, yaklaşık %50'lik homolojiye sahip olan insan TROP-1 (EpcAM, EGP-2,  
35 TACSTD1) geni ile birlikte, TACSTD gen familyasını oluşturur (Patent-dışı Literatür 21).

hTROP2 proteini, N-ucu 26 amino asitlik rezidüden oluşan bir sinyal dizisi, 248 amino asitlik rezidüden oluşan bir ekstraselüler alan, 23 amino asitlik rezidüden oluşan bir transmembran alan ve 26 amino asitlik rezidüden oluşan bir intraselüler alan ile oluşturulur. Ekstraselüler alan, dört N-bağlı glikosilasyon yerlerine sahiptir ve bunların yaklaşık 10 kD olan bir görünür moleküler ağırlığa artı 35 kD olan teorik hesaplanan değere sahip olduğu bilinir (Patent-dışı Literatür 19).

Şimdiye kadar ne hTROP2'nin bir fizyolojik ligandı tanımlanmıştır ne de bunun moleküler fonksiyonları ortaya çıkarılmıştır. hTROP2'nin, tümör hücrelerinde kalsiyum sinyallerini ilettiği bulunmuştur (Patent-dışı Literatür 20). Buna ek olarak, hTROP2 bir  $Ca^{2+}$ -bağımlı kinaz olan protein kinazı C tarafından bir intraselüler rezidü serin 303'te fosforile edilir (Patent-dışı Literatür 18) ve intraselüler alanda bir  $PIP_2$ -bağlama dizisine sahiptir, bu tümör hücrelerinde sinyalleme fonksiyonlarını öne sürer (Patent-dışı Literatür 22).

Klinik örneklerin kullanıldığı immünohistokimyasal analizde, hTROP2'nin çeşitli epitelyal hücre karsinomlarında aşırı-eksprese edildiği ve tümör dokularına kıyasla bir düşük ekspresyon düzeyinde normal dokuların sınırlı tiplerinde epitelyal hücrelerde eksprese edildiği bulunmuştur (Patent-dışı Literatürler 23 ila 27). Aynı zamanda, hTROP2'nin ekspresyonunun kolorektal kanserin (Patent-dışı Literatür23), gastrik kanserin (Patent-dışı Literatür24), pankreatik kanserin (Patent-dışı Literatür25), oral kanserin (Patent-dışı Literatür26) ve gliyomun (Patent-dışı Literatür27) kötü prognozu ile korele olduğu bildirilmiştir.

Kolorektal kanser hücrelerinin kullanıldığı modellerden, ilaveten hTROP2'nin ekspresyonunun immün-yetmez farelerde tümör hücrelerinin iskeleden-bağımsız hücre büyümesine ve tümörjenezde dâhil edildiği bildirilmiştir (Patent-dışı Literatür 28).

Patent-dışı Literatür 29 ve Patent Literatürü 10, bir ilaca (SN-38) konjuge edilmiş bir anti-TROP2 antikoru (hRS7) içeren antikor-ilaç konjugatlarını açıklar. Patent Literatürü 13, kansere karşı kullanım için, kamptotesini içeren, anti-tümör ajanları ile, antikor hRS7'yi içeren, EPG-1 (anti-TROP2) antikorlarının konjugatlarını açıklar. Patent Literatürü 14, hRS7'nin ve SN38'in ilave konjugatlarını açıklar. Patent-dışı Literatür 6, kamptotesin ekzatekanın (DX-8951) preparasyonunu ve bir anti-kanser ajanı olarak bunun yararını tarif eder ve bunun SN-38'e kıyasla daha güçlü olduğunu gösterir.

Kanser ile ilişkiyi öne süren bu tarz bilgiye yanıtta, şimdiye kadar birden fazla anti-hTROP2 antikoru belirlenmiştir ve bunların anti-tümör etkileri için çalışılmıştır. Bu antikolar arasında, burada, örneğin, çıplak fare ksenogreft modellerinde kendi içinde anti-tümör aktivite gösteren bir konjuge edilmemiş antikor (Patent Literatürleri 5 ila 8) aynı zamanda bir sitotoksik ilaç ile ADC olarak anti-tümör aktivite gösteren bir antikor (Patent Literatürleri 9 ila 12), açıklanır. Bununla birlikte, bunların aktivitesinin gücü ve kapsamı hâlâ yetersizdir ve bir terapötik hedef olarak hTROP2 için tatmin edilmemiş tıbbi ihtiyaçlar vardır.

10

### **Alıntı Listesi**

#### **Patent Literatürü**

15

Patent Literatürü 1: Japon Patent Yayınlanmış Patent No. 5-59061

Patent Literatürü 2: Japon Patent Yayınlanmış Patent No. 8-337584

Patent Literatürü 3: Uluslararası Yayın No. WO 1997/46260

Patent Literatürü 4: Uluslararası Yayın No. WO 2000/25825

Patent Literatürü 5: Uluslararası Yayın No. WO 2008/144891

20

Patent Literatürü 6: Uluslararası Yayın No. WO 2011/145744

Patent Literatürü 7: Uluslararası Yayın No. WO 2011/155579

Patent Literatürü 8: Uluslararası Yayın No. WO 2013/077458

Patent Literatürü 9: Uluslararası Yayın No. WO 2003/074566

Patent Literatürü 10: Uluslararası Yayın No. WO 2011/068845

25

Patent Literatürü 11: Uluslararası Yayın No. WO 2013/068946

Patent Literatürü 12: U.S. Patent No. 7999083

Patent Literatürü 13: U.S. 2008/131363 A1

Patent Literatürü 14: U.S. 2011/293513 A1

30

#### **Patent Dışı Literatür**

Patent Dışı Literatür 1: Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

Patent Dışı Literatür 2: Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

- Patent Dışı Literatür 3: Damle N.K., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2004) 4, 1445-1452.
- Patent Dışı Literatür 4: Senter P. D., et al., *Nature Biotechnology* (2012) 30, 631-637.
- 5 Patent Dışı Literatür 5: Kumazawa, E., Tohgo, A., *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1998) 7, 625-632.
- Patent Dışı Literatür 6: Mitsui, I., et al., *Jpn J. Cancer Res.* (1995) 86, 776-782.
- Patent Dışı Literatür 7: Takiguchi, S., et al., *Jpn J. Cancer Res.* (1997) 88, 760-769.
- 10 Patent Dışı Literatür 8: Joto, N. et al., *Int J Cancer* (1997) 72, 680-686.
- Patent Dışı Literatür 9: Kumazawa, E. et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1998) 42, 210-220.
- Patent Dışı Literatür 10: De Jager, R., et al., *Ann N Y Acad Sci* (2000) 922, 260-273.
- 15 Patent Dışı Literatür 11: Inoue, K. et al., *Polymer Drugs in the Clinical Stage*, Edited by Maeda et al. (2003), 145-153.
- Patent Dışı Literatür 12: Kumazawa, E. et al., *Cancer Sci* (2004) 95, 168-175.
- Patent Dışı Literatür 13: Soepenbergl, O. et al., *Clinical Cancer Research*, (2005) 11, 703-711.
- 20 Patent Dışı Literatür 14: Wente M. N. et al., *Investigational New Drugs* (2005) 23, 339-347.
- Patent Dışı Literatür 15: Faulk WP, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*75(4), 1947-1951 (1978).
- Patent Dışı Literatür 16: Lipinski M, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8), 5147-5150 (1981).
- 25 Patent Dışı Literatür 17: Linnenbach A J, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(1), 27-31 (1989).
- Patent Dışı Literatür 18: Basu A, et al., *Int. J. Cancer*, 62(4), 472-479 (1995).
- Patent Dışı Literatür 19: Fornaro M, et al., *Int. J. Cancer*, 62(5), 610-618 (1995).
- 30 Patent Dışı Literatür 20: Ripani E, et al., *Int. J. Cancer*, 76(5), 671-676 (1998).
- Patent Dışı Literatür 21: Calabrese G, et al., *Cytogenet. Cell Genet.*, 92(1-2), 164-165 (2001).
- Patent Dışı Literatür 22: El Sewedy T, et al., *Int. J. Cancer*, 75(2), 324-330 (1998).

Patent Dışı Literatür 23: Ohmachi T, et al., Clin. Cancer Res., 12(10), 3057-3063 (2006).

Patent Dışı Literatür 24: Muhlmann G, et al., J. Clin. Pathol., 62(2), 152-158 (2009).

5 Patent Dışı Literatür 25: Fong D, et al., Br. J. Cancer, 99(8), 1290-1295 (2008).

Patent Dışı Literatür 26: Fong D, et al., Mod. Pathol., 21(2), 186-191 (2008).

Patent Dışı Literatür 27: Ning S, et al., Neurol. Sci., 34(10), 1745-1750 (2013).

Patent Dışı Literatür 28: Wang J, et al., Mol. Cancer Ther., 7(2), 280-285 (2008).

10 Patent Dışı Literatür 29: Cardillo T M, et al., Clin. Cancer Res., 17(10); 3157-3169 (2011).

Patent Dışı Literatür 30: Ochi Y, et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 55(4): 323-332 (2005).

15 Patent Dışı Literatür 31: Wentz M N, et al., Investigational New Drugs, 23(4), 339-347 (2005).

Patent Dışı Literatür 32: Shiose Y, et al, Bioconjugate Chem., 20(1), 60-70 (2009).

## **Buluşun Kısa Açıklaması**

20

### **Teknik Problem**

Bir antikor tarafından tümörün tedavisine ilişkin, bir yetersiz anti-tümör etki, antikor bir antijenin tümör hücrelerini bağladığını fark ettiğinde bile, gözlemlenebilir ve bu, burada bir daha etkili anti-tümör antikorunun gerekli olduğu bir durumdur. İlaveten, çok sayıda anti-tümör düşük-moleküler-ağırlıklı bileşik, bileşikler bir mükemmel anti-tümör etkiye sahip olsa bile, yan etki ve toksisite gibi güvenlik açısından bir probleme sahiptir, bu güvenliği ilaveten güçlendirme ile bir üstün terapötik etki başarmak için bir konu olarak kalır. Böylelikle, mevcut buluşun bir amacı, anti-tümör etki ve güvenlik açılarından mükemmel olan, bir mükemmel terapötik etkiye sahip olan bir anti-tümör ilaç sağlamaktır.

35 Buluşun sahipleri, bir anti-tümör bileşiği ekzatekan, tümör hücrelerini hedef alabilen, tümör hücrelerini tanıyabilen bir özelliğe, tümör hücrelerini bağlayabilen bir özelliğe, tümör hücreleri içine içselleştirmenin bir özelliğine veya benzerlerine sahip olan, anti-

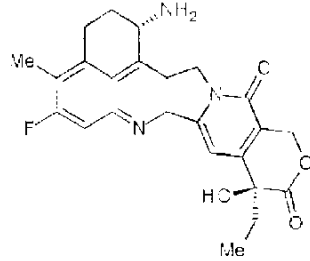
TROP2 antikoruna konjugasyon ile, bir bağlayıcı yapı kısmı vasıtasıyla, bir antikor-ilaç konjugatına dönüştürüldüğünde, antikora göre sitosomal aktivitenin edinilebileceğini, anti-tümör bileşiğinin tümör hücrelerinde bileşiğin anti-tümör etkisini spesifik bir şekilde göstermek için tümör hücrelerine daha kesin bir şekilde aktarılabilceğini ve böylelikle anti-tümör etkinin kesin bir şekilde gösterilebileceğini ve anti-tümör bileşiğinin bir dozunun tek başına bileşiği uygulamanın bir durumuna kıyasla azaltılabileceğini ve böylelikle anti-tümör bileşiğinin normal hücreler üzerindeki bir etkisinin hafifletilebileceğini böylece daha yüksek güvenliğin sağlanabileceğini düşünmüştür.

10 Bu bağlantıda, buluşun sahipleri bir spesifik yapısı olan bir bağlayıcı oluşturmuştur ve burada anti-TROP2 antikorunun ve ekzatekanın bağlayıcı vasıtasıyla bir diğerine konjuge edildiği bir antikor-ilaç konjugatı elde etmeyi başarmıştır ve böylece mevcut buluşu tamamlamak için konjugat tarafından gösterilen bir mükemmel anti-tümör etkiyi konfirme etmiştir.

15

Spesifik olarak, mevcut buluş aşağıdakiler ile ilgilidir:

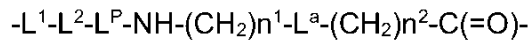
[1] Bir antikor-ilaç konjugatı olup, burada aşağıdaki formül ile temsil edilen bir anti-tümör bileşiği:



20

aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıya sahip olan bir bağlayıcı vasıtasıyla anti-TROP2 antikorunun bir menteşe parçasında bulunan bir disülfid bağ kısmında oluşturulan bir tiyoeter bağ ile bir anti-TROP2 antikoruna konjuge edilir:

25



30

burada anti-TROP2 antikoru L1'in ucuna bağlanır, anti-tümör bileşiği bağlama pozisyonu olarak pozisyon 1'deki amino grubunun nitrojen atomu ile  $-(CH_2)n^2-C(=O)-$  kısmının karbonil grubuna bağlanır,

burada

$n^1$ , 0 ila 6 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

$n^2$ , 0 ila 5 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

$L^1$ , -(Süksinimid-3-il-N)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(=O)-'yu temsil eder,

5 burada  $n^3$ , 2 ila 8 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

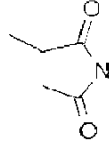
$L^2$ , -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sup>n<sup>4</sup></sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-'yu veya bir tekli bağı temsil eder,

burada  $n^4$ , 1 ila 6 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

$L^P$ , -GGFG-'nin bir tetrapeptit rezidüsünü temsil eder,

$L^a$ , -O-'yu veya bir tekli bağı temsil eder ve

10 -(Süksinimid-3-il-N)-, aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıya sahiptir:



bu, bunun pozisyon 3'ünde anti-TROP2 antikoruna bağlanır ve pozisyon 1'deki nitrojen atomu üzerinde bu yapıyı içeren bağlayıcı yapıdaki bir metilen grubuna bağlanır,

15 burada anti-TROP2 antikoru bunun ağır zincir değişken bölgesinde SEQ ID NO: 23'ün amino asit dizisinden oluşan CDRH1, SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisinden oluşan CDRH2 ve SEQ ID NO: 25'in amino asit dizisinden oluşan CDRH3 ve bunun hafif zincir değişken bölgesinde SEQ ID NO: 26'nın amino asit dizisinden oluşan CDRL1, SEQ ID NO: 27'nin amino asit dizisinden oluşan CDRL2 ve SEQ ID NO: 28'in amino asit dizisinden oluşan CDRL3 içerir.

20

[2] [1]'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ 'ya bağlanmış bir ilaca sahip olan ilaç-bağlayıcı yapı kısmı, aşağıdaki gruptan seçilen bir ilaç-bağlayıcı yapıdır:

25

○ (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

○ (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

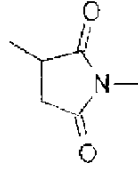
○ (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

30

○ (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

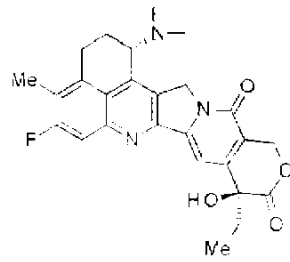
○ (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

- 5
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), ve
  - (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX); burada -(Süksinimid-3-il-N)-, aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıya sahiptir:



bu, bunun pozisyon 3'ünde anti-TROP2 antikoruyla bağlanır ve pozisyon 1'deki nitrojen atomu üzerinde bu yapıyı içeren bağlayıcı yapıdaki bir metilen grubuna bağlanır,

(NH-DX), aşağıdaki formül ile temsil edilen bir grubu temsil eder:



burada pozisyon 1'deki amino grubunun nitrojen atomu bir bağlama pozisyonudur

-GGFG-, -Gly-Gly-Phe-Gly-'nin bir tetrapeptit rezidüsünü temsil eder.

- 25 [3] [2]'ye göre antikoru-ilaç konjugatı olup, burada ilaç-bağlayıcı yapı kısmı aşağıdaki gruptan seçilen bir ilaç-bağlayıcı yapıdır:

- a. (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

b. (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), ve

c. (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

5 [4] [3]'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada ilaç-bağlayıcı yapı kısmı aşağıdaki bileşiktir:

d. (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

10 [5] [3]'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada ilaç-bağlayıcı yapı kısmı aşağıdaki bileşiktir:

e. (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

[6] [3]'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada ilaç-bağlayıcı yapı kısmı aşağıdaki bileşiktir:

15 f. (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

[7] [1] ila [6] arasındakilerin herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada anti-TROP2 antikoruna aşağıdaki gruptan seçilen bir ağır zincir ve bir hafif zincir içerir;

20 SEQ ID NO: 12'nin pozisyonları 20 ila 140 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi, SEQ ID NO: 14'ün pozisyonları 20 ila 140 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 25 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi, SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 140 arasındaki pozisyonlarının amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 20'nin pozisyonları 21 ila 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 16'nin pozisyonları 20 ila 140 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 22'nin pozisyonları 21 ila 30 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi.

[8] [1] ila [6] arasındakilerin herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada anti-TROP2 antikoruna aşağıdaki gruptan seçilen bir ağır zincir ve bir hafif zincir içerir;

- SEQ ID NO: 12'nin pozisyonları 20 ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir,
- 5 SEQ ID NO: 14'ün pozisyonları 20 ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir,
- SEQ ID NO: 14'ün pozisyonları 20 ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 20'nin pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir ve
- 10 SEQ ID NO: 16'nın pozisyonları 20 ila 470 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 22'nin pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir.
- [9] [1] ila [6] arasındakilerin herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada anti-TROP2 antikoruna SEQ ID NO: 12'nin pozisyonları 20 ila 140
- 15 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 129 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi içerir.
- [10] [1] ila [6] arasındakilerin herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada anti-TROP2 antikoruna SEQ ID NO: 12'nin pozisyonları 20 ila 470
- 20 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir ve SEQ ID NO: 18'in pozisyonları 21 ila 234 arasındaki amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir içerir.
- [11] [8]'e göre antikor-ilaç konjugatı olup, anti-TROP2 antikoruna ağır zincirin karboksil ucunda bir lizin rezidüsünden yoksundur.
- 25 [12] [10]'a göre antikor-ilaç konjugatı olup, anti-TROP2 antikoruna ağır zincirin karboksil ucunda bir lizin rezidüsünden yoksundur.
- [13] [1] ila [12] arasındakilerin herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada her bir antikor için konjuge edilmiş seçilmiş bir ilaç-bağlayıcı yapının birimlerinin bir ortalama sayısı 2 ila 8 olan bir aralık içindedir.
- 30 [14] [1] ila [12] arasındakilerin herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatı olup, burada her bir antikor için konjuge edilmiş seçilmiş bir ilaç-bağlayıcı yapının birimlerinin bir ortalama sayısı 3 ila 8 olan bir aralık içindedir.
- [15] Bir ilaç olup, [1] ila [14] arasındakilerin herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatını, bunun bir tuzunu veya bunun bir hidratını içerir.

[16] Bir anti-tümör ilacı ve/veya anti-kanser ilacı olup, [1] ila [14] arasındaki herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatını, bunun bir tuzunu veya bunun bir hidratını içerir.

5 [17] [16]'ya göre anti-tümör ilacı ve/veya anti-kanser ilacı olup, , akciğer kanserinin, böbrek kanserinin, ürotelyal kanserin, kolorektal kanserin, prostat kanserinin, gliyoblastom multiformun, ovaryan kanserin, pankreatik kanserin, meme kanserinin, melanomun, karaciğer kanserinin, idrar kesesi kanserinin, gastrik kanserin, servikal kanserin, baş ve boyun kanserinin veya özofajiyal kanserin tedavisinin bir yönteminde kullanım içindir.

10 [18] Bir farmasötik bileşim olup, bir aktif bileşen olarak [1] ila [14] arasındaki herhangi birine göre antikor-ilaç konjugatını, bunun bir tuzunu veya bunun bir hidratını ve bir farmasötik olarak kabul edilebilir formülasyon bileşeni içerir.

15 [19] [18]'e göre farmasötik bileşim olup, akciğer kanserinin, böbrek kanserinin, ürotelyal kanserin, kolorektal kanserin, prostat kanserinin, gliyoblastom multiformun, ovaryan kanserin, pankreatik kanserin, meme kanserinin, melanomun, karaciğer kanserinin, idrar kesesi kanserinin, gastrik kanserin, servikal kanserin, baş ve boyun kanserinin veya özofajiyal kanserin tedavisinin bir yönteminde kullanım içindir.

## 20 **Buluşun Avantajlı Etkileri**

Bir spesifik yapısı olan bir bağlayıcı vasıtasıyla konjuge edilmiş bir anti-tümör bileşiği ekzatekana sahip olan bir anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı ile, bir mükemmel anti-tümör etki ve güvenlik sağlanabilir.

25

### **Şekillerin Kısa Açıklaması**

[Şekil 1] Şekil 1, bir TINA1 antikoru ağır zincirinin bir nükleotid dizisini (SEQ ID NO: 7) ve bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 8) gösterir.

30 [Şekil 2] Şekil 2, bir TINA1 antikoru hafif zincirinin bir nükleotid dizisini (SEQ ID NO: 9) ve bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 10) gösterir.

[Şekil 3] Şekil 3, bir hTINA1-H1 ağır zincirinin bir nükleotid dizisini (SEQ ID NO: 11) ve bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 12) gösterir.

35 [Şekil 4] Şekil 4, bir hTINA1-H2 ağır zincirinin bir nükleotid dizisini (SEQ ID NO: 13) ve bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 14) gösterir.

[Şekil 5] Şekil 5, bir hTINA1-H3 ağır zincirinin bir nükleotid dizisini (SEQ ID NO: 15) ve bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 16) gösterir.

[Şekil 6] Şekil 6, bir hTINA1-L1 hafif zincirinin bir nükleotid dizisini (SEQ ID NO: 17) ve bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 18) gösterir.

5 [Şekil 7] Şekil 7, bir hTINA1-L2 hafif zincirinin bir nükleotid dizisini (SEQ ID NO: 19) ve bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 20) gösterir.

[Şekil 8] Şekil 8, bir hTINA1-L3 hafif zincirinin bir nükleotid dizisini (SEQ ID NO: 21) ve bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 22) gösterir.

10 [Şekil 9] Şekil 9, bir TINA1 antikorunun CDRH1'inin bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 23), bunun CDRH2'sinin bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 24), bunun CDRH3'ünün bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 25), bunun CDRL1'inin bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 26), bunun CDRL2'sinin bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 27) ve bunun CDRL3'ünün bir amino asit dizisini (SEQ ID NO: 28) gösterir.

15 [Şekil 10] Şekil 10, bir anti-CD9 antikorunun, bir anti-CD46 antikorunun, bir anti-CD55 antikorunun, bir anti-CD59 antikorunun, bir anti-CD71 antikorunun, bir anti-CD73 antikorunun, bir anti-CD147 antikorunun, bir anti-CD276 antikorunun, bir anti-EpCAM antikorunun, bir anti-EGFR antikorunun ve bir anti-TROP2 antikorunun (TINA1 antikorunun) hücre içselleştirme yetisini gösterir.

20 [Şekil 11] Şekil 11, bir anti-CD59 antikorunun, bir anti-CD71 antikorunun, bir anti-EGFR antikorunun, bir anti-EpCAM antikorunun ve bir anti-TROP2 antikorunun (TINA1 antikorunun) hücre içselleştirme yetisini gösterir.

[Şekil 12] Şekil 12, çeşitli anti-TROP2 antikorlarının hücre içselleştirme yetisini gösterir.

25 [Şekil 13] Şekil 13, bir antikor-ilaç konjugatının (1), (6) veya (12) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan kolorektal kanser hücresi hattı COLO205 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

[Şekil 14] Şekil 14, bir antikor-ilaç konjugatının (1), (6) veya (12) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı BxPC-3 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

30 [Şekil 15] Şekil 15, bir antikor-ilaç konjugatının (1), (6) veya (12) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı Capan-1 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

[Şekil 16] Şekil 16, bir antikör-ilaç konjugatının (2), (5), (7) veya (10) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan kolorektal kanser hücresi hattı COLO205 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

5 [Şekil 17] Şekil 17, bir antikör-ilaç konjugatının (2), (5), (7) veya (10) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı BxPC-3 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

[Şekil 18] Şekil 18, bir antikör-ilaç konjugatının (3), (4), (8) veya (9) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan kolorektal kanser hücresi hattı COLO205 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

10 [Şekil 19] Şekil 19, bir antikör-ilaç konjugatının (3), (4), (8) veya (9) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı BxPC-3 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

[Şekil 20] Şekil 20, bir antikör-ilaç konjugatının (3), (4), (8) veya (9) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan ovaryan kanser hücresi hattı NIH:OVCAR-3 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

15 [Şekil 21] Şekil 21, bir antikör-ilaç konjugatının (3), (4), (8) veya (9) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan gastrik kanser hücresi hattı NCI-N87 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

[Şekil 22] Şekil 22, bir antikör-ilaç konjugatının (3), (4), (8) veya (9) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan akciğer kanseri hücre hattı NCI-H292 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

20 [Şekil 23] Şekil 23, bir antikör-ilaç konjugatının (3), (4), (8) veya (9) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan boğaz kanseri hücre hattı FaDu üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

25 [Şekil 24] Şekil 24, bir antikör-ilaç konjugatının (3), (4), (8) veya (9) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı CFPAC-1 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

[Şekil 25] Şekil 25, bir antikör-ilaç konjugatının (8) veya (13) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı CFPAC-1 üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

30 [Şekil 26] Şekil 26, bir antikör-ilaç konjugatının (8) veya (13) BALB/c-nu/nu farelerine subkütan olarak nakledilmiş bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı HPAC üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

[Şekil 27] Şekil 27, bir antikor-ilaç konjugatının (8) veya (13) NOD-scid farelerinin üzerine subkütan olarak nakledilmiş insan özofajiyal kanser dokuları üzerindeki anti-tümör etkisini gösterir.

## 5 Uygulamaların Açıklaması

Bundan sonra, mevcut buluşu gerçekleştirmek için tercih edilen modlar şekillere atfen tarif edilecektir. Aşağıda tarif edilen uygulamalar mevcut buluşun uygulamalarının tipik örnekleri olarak verilir ve mevcut buluşun kapsamını sınırlandırması amaçlanmaz.

10

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikor-ilaç konjugatı, burada bir anti-TROP2 antikorunun bir bağlayıcı yapı kısmı vasıtasıyla bir anti-tümör bileşiğine konjuge edildiği ve burada aşağıda detaylı bir şekilde açıklanan bir anti-tümör ilacıdır.

## 15 [Antikor]

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikor-ilaç konjugatında kullanılan anti-TROP2 antikorunu herhangi bir türden türetilebilir ve türün tercih edilen örnekleri memelileri, sıçanları, fareleri ve tavşanları içerebilir. İnsan türü dışındaki türlerden türetildiği durumda, bu tercihen bir iyi bilinen teknik kullanılarak kimerize edilir veya beşerileştirilir. Mevcut buluşun antikorunu bir poliklonal antikor veya bir monoklonal antikor olabilir ve tercihen bir monoklonal antikordur.

25 Anti-TROP2 antikorunu, tümör hücrelerini hedef alabilir, yani, bir tümör hücrelerini fark edebilmenin bir özelliğine, bir tümör hücrelerini bağlayabilmenin bir özelliğine, bir tümör hücreleri içine içselleştirmenin bir özelliğine veya benzerlerine sahiptir ve anti-tümör aktiviteye sahip olan bir bileşiğine bir bağlayıcı vasıtasıyla konjugasyon ile bir antikor-ilaç konjugatına dönüştürülebilir.

30 Antikorun tümör hücrelerine karşı bağlama aktivitesi akış sitometrisi kullanılarak konfirme edilebilir. Antikorun tümör hücreleri içine içselleştirmesini konfirme etmek için yöntemin örnekleri (1) hücrelere katılmış olan bir antikorunu terapötik antikorunu bağlayan (flüoresan olarak etiketlenmiş) bir sekonder antikor kullanarak bir flüoresans mikroskobu altında görselleştirmenin bir analizini (Cell Death and Differentiation (2008) 35 15, 751-761), (2) hücrelere katılmış olan bir flüoresans yoğunluğunu terapötik antikorunu

bağlayan (flüoresan olarak etiketlenmiş) bir sekonder antikor kullanarak ölçmenin bir analizini (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, December 2004) veya (3) burada toksinin hücre büyümesini inhibe etmek için hücrelere katılım üzerine salındığı, terapötik antikorunu bağlayan bir immünotoksin kullanılan bir Mab-ZAP analizini (Bio Techniques 28: 162-165, January 2000) içerebilir. Difteri toksininin bir katalitik bölgesinin ve protein G'nin bir rekombinant kompleks proteini immünotoksin olarak kullanılabilir.

10 Antikor-ilaç konjugatına konjuge edilmiş olan ilaç bir anti-tümör etki uygulandığından, antikorun kendisinin bir anti-tümör etkiye sahip olması tercih edilir ancak esansiyel değildir. Anti-tümör bileşiğinin tümör hücreleri üzerinde sitosidal aktivitesini spesifik olarak ve selektif bir şekilde uygulaması amacıyla, antikorun tümör hücrelerine göç etmek için içselleştirme özelliğine sahip olması önemlidir ve aynı zamanda tercih edilir.

15 Anti-TROP2 antikorunu teknikte genel olarak gerçekleştirilen, hayvanları bir antijenik polipeptit ile immünize etmeyi ve *in vivo* üretilen antikorları toplamayı ve saflaştırmayı içeren, bir yöntem kullanılarak elde edilebilir. Antijenin orijini insanlar ile sınırlandırılmaz ve hayvanlar bir insan-olmayan hayvandan, örneğin, bir fareden, bir sıçandan ve benzerinden, türetilen bir antijen ile immünize edilebilir. Bu durumda, elde edilen 20 heterolog antijeni bağlayan antikorların insan antijenleri ile çapraz-reaktivitesi bir insan hastalığına uygulanabilir olan bir antikor için taramak amacıyla test edilebilir.

Alternatif olarak, antijene karşı antikorlar üreten antikor üreten hücreler, sonrasında monoklonal antikorların elde edilebileceği hibridomları oluşturmak üzere teknikte bilinen 25 bir yöntem (örneğin Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; ve Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) göre miyelom hücreleri ile kaynaştırılır.

Antijen, antijenik proteini şifreleyen bir geni üretmek için konak hücrelere genetik olarak 30 mühendislik uygulama ile elde edilebilir. Spesifik olarak, antijen geninin ekspresyonuna izin veren vektörler hazırlanır ve konak hücrelere transfer edilir böylece gen eksprese edilir. Bu şekilde eksprese edilen antijen saflaştırılabilir. Antikor ayrıca, hayvanları yukarıda tarif edilen genetik olarak mühendislik uygulanmış antijen eksprese eden hücreler veya antijeni eksprese eden bir hücre hattı ile immünize etmenin bir yöntemi 35 kullanılarak da elde edilebilir.

Anti-TROP2 antikoru teknikte bilinen bir prosedür ile elde edilebilir.

5 Mevcut buluşta kullanılabilen anti-TROP2 antikoru özel olarak sınırlandırılmaz ve, örneğin, mevcut başvurunun Dizi Listesi'nde gösterilen amino asit dizileri ile belirtilenler tercihen kullanılabilir. Mevcut buluşta kullanılan anti-TROP2 antikoru tercihen aşağıda tarif edildiği şekilde özelliklere sahiptir.

(1) Aşağıdaki özelliklere sahip olan bir antikor:

10

(a) TROP2'yi spesifik olarak bağlama ve

(b) TROP2'yi bağlama ile TROP2-eksprese eden hücrelerde bir içselleştirme aktivitesine sahip olma.

(2) (1)'e göre antikor olup, burada TROP2, insan TROP2'sidir.

15

(3) (1)'e veya (2)'ye göre antikor olup, burada antikor, ağır zincir tamamlayıcılık belirleme bölgeleri olarak SEQ ID NO: 23 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren CDRH1'e, SEQ ID NO: 24 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren CDRH2'ye ve SEQ ID NO: 25 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren CDRH3'e ve hafif zincir tamamlayıcılık belirleme bölgeleri olarak SEQ ID NO: 26 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren CDRL1'e, SEQ ID NO: 27 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren CDRL2'ye ve SEQ ID NO: 28 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren CDRL3'e sahiptir.

20

(4) (1) ile (3)'ün herhangi birine göre antikor olup, burada bunun sabit bölgesi bir insan-kaynaklı sabit bölgedir.

25

(5) (1) ile (4)'ün herhangi birine göre antikor olup, burada antikor bir beşerileştirilmiş antikordur.

30

(6) (5)'e göre antikor olup, burada antikor (a) SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ile 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisinden, (b) SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ile 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisinden, (c) SEQ ID NO: 16'da amino asit pozisyonları 20 ile 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisinden, (d) (a) ile (c) arasındaki dizilerin herhangi birine en az %95'lik veya daha yüksek homolojiye sahip olan bir amino asit dizisinden ve (e) (a) ile (c) arasındaki dizilerin herhangi birinden en az bir amino asidin silinmeleri, değiştirilmeleri veya eklenmeleri ile türetilen bir amino asit dizisinden oluşan gruptan seçilen bir amino asit dizisi içeren bir ağır zincir değişken bölgesine ve (f) SEQ ID NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ile 129

35

- arasında tarif edilen bir amino asit dizisinden, (g) SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisinden, (h) SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisinden, (i) (f) ile (h) arasındaki dizilerin herhangi birine en az %95'lik veya daha yüksek homolojiye sahip olan bir amino asit dizisinden ve (j) (f) ile (h) arasındaki dizilerin herhangi birinden en az bir amino asidin silinmeleri, değiştirilmeleri veya eklenmeleri ile türetilen bir amino asit dizisinden oluşan gruptan seçilen bir amino asit dizisi içeren bir hafif zincir değişken bölgesine sahiptir.
- 5
- 10 (7) (6)'ya göre antikor olup, burada antikor SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 16'da amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 16'da
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

- amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 16'da amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden oluşan gruptan seçilen bir ağır zincir değişken bölgesine ve bir hafif zincir değişken bölgesine sahiptir.
- 5
- 10 (8) (7)'ye göre antikör olup, burada antikör SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 16'da amino asit pozisyonları 20 ila 140 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincir değişken bölgesinden ve SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21 ila 129 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincir değişken bölgesinden oluşan gruptan seçilen bir ağır zincir değişken bölgesine ve bir hafif zincir değişken bölgesine sahiptir.
- 15
- 20
- 25
- 30 (9) (6)'ya veya (7)'ye göre antikör olup, burada antikör SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21
- 35

ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ I NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 16'da amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ I NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 16'da amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden ve SEQ ID NO: 16'da amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden oluşan gruptan seçilen bir ağır zincir ve bir hafif zincir içerir.

(10) (6)'ya veya (7)'ye göre antikör olup, burada antikör SEQ ID NO: 12 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, antikör SEQ ID NO: 12 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20 ile temsil edilen amino asit dizisi içeren bir hafif zincirden, antikör SEQ ID NO: 12 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 14 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 14 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20 ile temsil edilen amino asit dizisi içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 14 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 16 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18 ile temsil

5 edilen amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 16 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20 ile temsil edilen amino asit dizisi içeren bir hafif zincirden, ve SEQ ID NO: 16 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22 ile temsil edilen amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden oluşan gruptan seçilen bir ağır zincir ve bir hafif zincir içerir.

10 (11) (8)'e göre antikor olup, burada antikor SEQ ID NO: 12'de amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ I NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ I NO: 18'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden, SEQ ID NO: 14'te amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden ve SEQ ID NO: 16'da amino asit pozisyonları 20 ila 470 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'de amino asit pozisyonları 21 ila 234 arasında tarif edilen bir amino asit dizisini içeren bir hafif zincirden oluşan gruptan seçilen bir ağır zincir ve bir hafif zincir içerir.

15 (12) (1) ila (11) arasındakilerin herhangi birine göre antikor olup, burada antikor ağır zincirin karboksil ucunda bir lizin rezidüsünden yoksundur.

20 (13) (1) ila (12) arasındakilerin herhangi birine göre antikor üretmek için bir yöntem ile elde edilen bir antikor olup, yöntem aşağıdaki adımları içerir: antikoru şifreleyen bir polinükleotidi içeren bir ekspresyon vektörü ile transforme edilmiş bir konak hücreyi kültürlenme ve söz konusu antikoru önceki adımda elde edilen kültürlerden toplama.

30 Bundan sonra, buluşta kullanılan anti-TROP2 antikoru tarif edilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "kanser" ve "tümör" terimleri aynı anlamda kullanılır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "gen" terimi yalnızca DNA'yı değil aynı zamanda bunun mRNA'sını, bunun cDNA'sını ve bunun cRNA'sını da içerir.

35

Burada kullanıldığı şekliyle, "polinükleotid" terimi, bir nükleik asit ile aynı anlamda kullanılır ve ayrıca DNA'yı, RNA'yı, probları, oligonükleotidleri ve primerleri de içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "polipeptit" ve "protein" terimleri ayırım olmadan kullanılır.

5

Burada kullanıldığı şekliyle, "hücre" terimi ayrıca, bir hayvan bireydeki hücreleri ve kültürlenmiş hücreleri de içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "TROP2" terimi, TROP2 proteini ile aynı anlamda kullanılır.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, "CDR" terimi bir tamamlayıcılık belirleme bölgesini (CDR) ifade eder. Bir antikor molekülünün ağır ve hafif zincirinin her birinin üç tamamlayıcılık belirleme bölgesine (CDR'lere) sahip olduğu bilinir. CDR aynı zamanda hiper-değişken alan olarak da adlandırılır ve bir antikoron ağır ve hafif zincirinin her birinin bir değişken bölgesinde bulunur. Bu, bunun primer yapısında olağan dışı bir şekilde yüksek değişkenliğe sahip olan bir yerdir ve ağır ve hafif polipeptit zincirinin her birinin primer yapısında üç ayrı CDR vardır. Bu spesifikasyonda, bir antikoron CDR'lerine gelince, ağır zincirin CDR'leri ağır zincirin amino asit zincirinin amino-ucu tarafından CDRH1, CDRH2 ve CDRH3 ile temsil edilir ve hafif zincirin CDR'leri hafif zincirin amino asit zincirinin amino-ucu tarafından CDRL1, CDRL2 ve CDRL3 ile temsil edilir. Bu yerler tersiyer yapısında bir diğerine yakındır ve antikoron bağladığı bir antijen için özgülüğü belirler.

15

20

Burada kullanıldığı şekliyle "hibridizasyon zorlu koşullar altında gerçekleştirilir" ifadesi, burada hibridizasyonun tanımlamanın hibridizasyonu piyasada satılan bir hibridizasyon çözeltisi ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech, Inc. tarafından üretilmiştir) içinde 68°C'de gerçekleştirme ile veya hibridizasyonu 0,7 ila 1,0 M NaCl varlığında üzerine immobilize edilmiş DNA'ya sahip olan bir filtreyi kullanarak 68°C'de gerçekleştirme akabinde 0,1 ila 2 x SSC çözeltisini (1 x SSC çözeltisi, 150 mM NaCl'den ve 15 mM sodyum sitrattan oluşur) kullanarak 68°C'de yıkamayı gerçekleştirme ile başarılabilirdiği koşullar altında veya buna eş-değer olan koşullar altında gerçekleştirildiği bir prosesi ifade eder.

25

30

## 1. TROP2

35

TROP2, insan trofoblastlarında eksprese edilen TACSTD familyasının bir üyesidir ve insan trofoblastları ve kanser hücreleri için ortak olan, immün dirence dâhil edilen bir tek-geçişli transmembran tipi 1 hücre membranı proteinidir.

- 5 Buluşta kullanılacak olan TROP2 proteinine gelince, TROP2 proteini bir insanın veya bir insan-olmayan memelinin (örneğin, bir sıçanın veya bir farenin) TROP2-eksprese eden hücrelerinden doğrudan saflaştırılabilir ve kullanılabilir veya yukarıda tarif edilen hücrelerin bir hücre membranı fraksiyonu hazırlanabilir ve kullanılabilir. İlâveten, TROP2 bunun *in vitro* sentezi veya genetik mühendisliği yoluyla bunun bir konak hücre
- 10 içinde üretimi ile elde edilebilir. Genetik mühendisliğinde, spesifik olarak, TROP2 cDNA'sı TROP2 cDNA'sını eksprese edebilen bir vektöre entegre edildikten sonra, TROP2 proteini bunu bir enzim, bir substrat ve transkripsiyon ve translasyon için gerekli olan bir enerji maddesi içeren bir çözelti içinde sentezleme ile veya TROP2'yi bir başka prokaryotik veya ökaryotik transforme edilmiş konak hücre içinde eksprese
- 15 etme ile elde edilebilir. Alternatif olarak, yukarıda tarif edilen genetik olarak mühendislik uygulanmış TROP2-eksprese eden hücreler veya TROP2 eksprese eden bir hücre hattı TROP2 proteini olarak kullanılabilir.

- 20 TROP2'nin DNA dizisi ve amino asit dizisi bir halka açık veri tabanında mevcuttur ve örneğin, NM\_002353 ve NP\_002344 (NCBI) Erişim Numaraları (NCBI) altında, refere edilebilir.

- İlaveten, burada TROP2'nin yukarıda tarif edilen amino asit dizilerinin herhangi birinde bir veya bir kaç amino asidin sübstüte edildiği, silindiği ve/veya eklendiği bir amino asit
- 25 dizisinden oluşan ve aynı zamanda proteininkine eş-değer olan bir biyolojik aktiviteye de sahip olan bir protein de TROP2'ye dâhil edilir.

- İnsan TROP2 proteini N-ucu 26 amino asitlik rezidüden oluşan bir sinyal dizisi, 248 amino asitlik rezidüden oluşan bir ekstraselüler alan, 23 amino asitlik rezidüden oluşan
- 30 bir transmembran alan ve 26 amino asitlik rezidüden oluşan bir intraselüler alan ile oluşturulur.

## 2. Anti-TROP2 antikorunun üretilmesi

Buluşun TROP2'sine karşı antikor teknikte genel olarak gerçekleştirilen, bir hayvanı TROP2 veya TROP2'nin amino asit dizisinden seçilen bir keyfi polipeptit ile immünize etmeyi ve *in vivo* üretilen antikoru toplamayı ve saflaştırmayı içeren bir yöntem kullanılarak elde edilebilir. Bir antijen olarak kullanılacak olan TROP2'nin biyolojik türleri  
5 insan ile sınırlandırılmaz ve bir hayvan insanlar dışındaki bir hayvandan, örneğin, bir fareden veya bir sıçandan, türetilen TROP2 ile immünize edilebilir. Bu durumda, elde edilen heterolog TROP2'yi ve insan TROP2'sini bağlayan bir antikor arasındaki çapraz-reaktiviteyi inceleme ile, bir insan hastalığı için uygulanabilen bir antikor seçilebilir.

10 İlaveten, bir monoklonal antikor TROP2'ye karşı bir antikor üreten antikor-üreten hücreleri bir bilinen yöntemle göre (örneğin, Kohler ve Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) miyelom hücreleri ile kaynaştırma ile oluşturulmuş olan bir hibridomdan elde edilebilir.

15

Bir antijen olarak kullanılacak olan TROP2 TROP2 genini genetik mühendisliğini kullanarak bir konak hücre içinde eksprese etme ile elde edilebilir.

20 Spesifik olarak, TROP2 genini eksprese edebilen bir vektör üretilir ve elde edilen vektör geni eksprese etmek için bir konak hücreye transfekte edilir ve akabinde eksprese edilen TROP2 saflaştırılır.

25 Alternatif olarak, yukarıda tarif edilen genetik olarak mühendislik uygulanmış TROP2-eksprese eden hücreler veya TROP2'yi eksprese eden bir hücre hattı TROP2 proteini olarak kullanılabilir. Bundan sonra, TROP2'ye karşı bir antikor elde etmenin bir yöntemi spesifik olarak tarif edilir.

### **(1) Antijenin preparasyonu**

30 Anti-TROP2 antikorunu üretmek için kullanılacak olan antijenin örnekleri, TROP2'yi veya TROP2'nin ardışık en az 6 amino asidini içeren bir kısmi amino asit dizinden oluşan bir polipeptidi veya buna verilen bir amino asit dizisini veya taşıyıcıyı ekleme ile elde edilen bir türevi içerir.

TROP2 insan tümör dokularından veya tümör hücrelerinden doğrudan saflaştırılabilir ve kullanılabilir. İlâveten, TROP2 bunu *in vitro* sentezleme ile veya bunu genetik mühendisliği ile bir konak hücre içinde üretme ile elde edilebilir.

5 Genetik mühendisliğine ilişkin, spesifik olarak TROP2 cDNA'sı TROP2 cDNA'sını eksprese edebilen bir vektöre entegre edildikten sonra, antijen bunu bir enzim, bir substrat ve transkripsiyon ve translasyon için gerekli olan bir enerji maddesi içeren bir çözelti içinde sentezleme ile veya TROP2'yi bir başka prokaryotik veya ökaryotik transforme edilmiş konak hücre içinde eksprese etme ile elde edilebilir.

10

İlâveten, antijen ayrıca bir membran proteini olan TROP2'nin ekstraselüler alanını bir uygun konak-vektör sistemi içinde bir antikorun sabit bölgesine bağlama ile elde edilen bir füzyon proteinini eksprese etme ile bir sekreter protein olarak da elde edilebilir.

15 TROP2 cDNA'sı, örneğin, burada bir polimeraz zincir reaksiyonunun (bundan sonra "PCR" olarak ifade edilir; bakınız, Saiki, R. K. et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489) bir şablon olarak TROP2 cDNA'sı eksprese eden bir cDNA kütüphanesi ve TROP2 cDNA'sını spesifik olarak çoğaltan primerler kullanılarak gerçekleştirildiği PCR olarak adlandırılan bir yöntem, ile elde edilebilir.

20

Polipeptidin *in vitro* sentezine gelince, örneğin, Roche Diagnostics, Inc. tarafından üretilen Rapid Translation System (RTS) emsallendirilebilir ancak bununla sınırlandırılmaz.

25 Prokaryotik konak hücrelerin örnekleri *Escherichia coli*'yi ve *Bacillus subtilis*'i içerir. Konak hücreleri bir hedef gen ile transforme etmek amacıyla, konak hücreler bir replikon, yani, konak ile uyumlu olan bir türden türetilen bir replikasyon orijini, ve bir regülatör dizi içeren bir plazmid vektörü ile transforme edilir. İlâveten, vektör tercihen transforme edilmiş hücreye fenotipik selektivite empoze edebilen bir diziye sahiptir.

30

Ökaryotik konak hücrelerin örnekleri, omurgalı hücrelerini, böcek hücrelerini ve maya hücrelerini içerir. Omurgalı hücreler olarak, örneğin, simian COS hücreleri (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu), mürin fibroblastları NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) ve Çin hamsteri over

35

hücrelerinin (CHO hücreleri; ATCC: CCL-61) dihidrofolat redüktaz-kusurlu suşları

(Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) ve benzerleri sıklıkla kullanılır, bununla birlikte, hücreler bunlarla sınırlandırılmaz.

5 Bu şekilde elde edilen transformant teknikte genel olarak gerçekleştirilen bir yöntemle göre kültürlenebilir ve transformantı kültürlenme ile, bir hedef polipeptit intraselüler olarak veya ekstraselüler olarak üretilir.

10 Kültürleme için kullanılacak olan bir uygun vasat kullanılan konak hücrelere göre teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından yaygın bir şekilde kullanılan çeşitli kültür vasatlarından seçilebilir. *Escherichia coli* kullanıldığında, örneğin, gerektiği üzere bir antibiyotik, örneğin, ampisilin veya IPMG ile takviye edilmiş bir LB vasatı kullanılabilir.

15 Bu tarz kültürleme yoluyla transformant tarafından intraselüler olarak veya ekstraselüler olarak üretilen bir rekombinant protein, proteinin fiziksel veya kimyasal özelliğinden yararlanan bilinen çeşitli ayırma yöntemlerinin herhangi biri ile ayrılabilir ve saflaştırılabilir.

20 Yöntemlerin spesifik örnekleri, bir yaygın protein çöktürücüsü ile muameleyi, ultrafiltrasyonu, sıvı kromatografisinin çeşitli tiplerini, örneğin, moleküler elek kromatografisini (jel filtrasyonunu), adsorpsiyonu, kromatografiyi, iyon değişim kromatografisini ve afinite kromatografisini, diyalizi ve bunların bir kombinasyonunu içerir.

25 İlaveten, altı histidin rezidüel bir etiketi eksprese edilecek olan bir rekombinant proteine tutturma ile, protein bir nikel afinite kolonu ile etkili bir şekilde saflaştırılabilir. Alternatif olarak, IgG Fc bölgesini eksprese edilecek olan bir rekombinant proteine tutturma ile, protein bir protein A kolonu ile etkili bir şekilde saflaştırılabilir.

30 Yukarıda tarif edilen yöntemleri birleştirme ile, bir hedef polipeptidin bir büyük miktarı yüksek verimde ve yüksek saflıkta kolaylıkla üretilebilir.

35 Yukarıda tarif edilen transformantın kendisi ayrıca antijen olarak da kullanılabilir. Alternatif olarak, TROP2 eksprese eden bir hücre hattı antijen olarak kullanılabilir. TROP2'yi eksprese ettiği sürece mevcut buluşa göre hücre hattının bu hücre hatları ile sınırlandırılmamasına rağmen, bu tarz bir hücre hattının örnekleri, insan akciğer

kanseri hatları NCI-H322'yi, PC14'ü, NCIH-H2122'yi ve LCAM1'i, bir insan prostat kanseri hattı PC3'ü, insan pankreatik kanser hatları BxPC-3'ü, Capan-1'i ve PK-1'i, bir insan ovaryan kanser hattı SKOV3'ü ve bir insan kolorektal kanser hattı COLO205'i içerebilir.

5

## **(2) Anti-TROP2 monoklonal antikorunun üretilmesi**

TROP2'yi spesifik olarak bağlayan antikorun örnekleri TROP2'yi spesifik olarak bağlayan bir monoklonal antikoru içerir ve bu tarz antikoru elde etmenin bir yöntemi aşağıda tarif edildiği şekildedir.

10

Bir monoklonal antikorun üretimi genel olarak aşağıdaki operasyonel adımları gerektirir:

- (a) bir antijen olarak kullanılacak olan bir biyopolimeri saflaştırma veya antijen-eksprese eden hücreleri hazırlama;
- (b) bir hayvanı antijenin enjeksiyonu ile immünize etme ile antikor-üreten hücreleri hazırlama, kan alma, dalağın kesip çıkarıldığı zamanı belirlemek için bunun antikor titresini analiz etme;
- (c) miyelom hücreleri hazırlama (bundan sonra "miyelom" olarak ifade edilir);
- (d) antikor-üreten hücreleri miyelom ile kaynaştırma;
- (e) bir arzu edilen antikoru üreten hibridomların bir grubunu tarama;
- (f) hibridomları tek hücre klonlarına bölme (klonlama);
- (g) opsiyonel olarak, monoklonal antikorun bir büyük miktarını üretmek için hibridomu kültürleme veya hibridom ile implante edilmiş bir hayvanı büyütme;
- (h) bu şekilde üretilen monoklonal antikoru biyolojik aktivite ve bağlama özgüllüğü için inceleme veya bunu bir etiketlenmiş reaktif olarak özellikler için analiz etme ve benzerleri.

15

20

25

30

Bundan sonra, bir monoklonal antikor üretmenin yöntemi yukarıdaki adımları izleyerek detaylı bir şekilde tarif edilecektir, bununla birlikte, yöntem bununla sınırlandırılmaz ve örneğin, dalak hücreleri ve miyelom dışındaki antikor-üreten hücreler kullanılabilir.

### **(a) Antijenin saflaştırılması**

Antijen olarak, yukarıda tarif edildiği üzere yöntem ile hazırlanan TROP2 ve bunun bir parsiyel peptidi kullanılabilir.

5 İlaveten, TROP2 eksprese eden rekombinant hücrelerden hazırlanan bir membran fraksiyonu veya TROP2 eksprese eden rekombinant hücrelerin kendisi ve aynı zamanda teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinen bir yöntem ile kimyasal olarak sentezlenen buluşun proteininin bir parsiyel peptidi de antijen olarak kullanılabilir.

10 İlaveten, TROP2 eksprese eden bir hücre hattı da antijen olarak kullanılabilir.

### **(b) Antikor-üreten hücrelerin preparasyonu**

15 Adım (a)'da elde edilen antijen bir adjuvan, örneğin, Freund komplet veya inkomplekt adjuvanı veya yardımcı ajan, örneğin, alüminyum potasyum sülfat, ile karıştırılır ve elde edilen karışım bir deneysel hayvanı immünize etmek için bir immünojen olarak kullanılır. Bir alternatif yöntemde, deneysel hayvan bir immünojen olarak antijen-eksprese eden hücreler ile immünize edilir. Deneysel hayvan olarak, bir bilinen hibridom üretim yönteminde kullanılan herhangi bir hayvan herhangi bir engel olmadan 20 kullanılabilir. Spesifik olarak, örneğin, bir fare, bir sıçan, bir keçi, koyun, sığır, bir at veya benzerleri kullanılabilir. Bununla birlikte, ekstrakte edilmiş antikor-üreten hücreler ile kaynaştırılacak olan miyelom hücrelerinin mevcudiyetinin kolaylığı bakış açısıyla, bir fare veya bir sıçan tercihen immünize edilecek olan hayvan olarak kullanılır.

25 İlaveten, kullanılacak olan bir farenin veya bir sıçanın suşu özel olarak sınırlandırılmaz ve bir fare durumunda, örneğin, çeşitli suşlar, örneğin, A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB ve 129 ve benzerleri kullanılabilir ve bir sıçan durumunda, örneğin, Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer ve benzerleri kullanılabilir.

30

Bu fareler ve sıçanlar deneysel hayvanların besleyicilerinden/dağıtıcılarından, örneğin, CLEA Japan, Inc. ve Charles River Laboratories Japan, Inc. firmalarından, elde edilebilir.

Aşağıda tarif edilen miyelom hücreleri ile kaynaştırmanın uygunluğu dikkate alındığında, bir fare durumunda, BALB/c suşu ve bir sıçan durumunda, Wistar ve Low suşları immünize edilecek olan hayvan olarak özel olarak tercih edilir.

- 5 İlaveten, insanlar ve fareler arasındaki antijenik homoloji dikkate alındığında, oto-antikorları uzaklaştırmak için azaltılmış biyolojik fonksiyona sahip olan bir fare, yani, bir otoimmün hastalığı olan bir fare, kullanmak da tercih edilir.

10 İmmünizasyon zamanında bu tarz farenin veya sıçanın yaşı tercihen 5 ila 12 haftadır, daha tercihen 6 ila 8 haftadır.

Örneğin, bir hayvanı TROP2 ile veya bunun bir rekombinantı ile immünize etmek amacıyla, örneğin, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. ve Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois  
15 (1964) kaynaklarında, detaylı bir şekilde tarif edilen bir bilinen yöntem veya benzerleri kullanılabilir.

20 Bu immünizasyon yöntemleri arasında, mevcut buluşta bir tercih edilen spesifik yöntem, örneğin, aşağıdaki şekildedir.

Yani, ilk olarak, antijen görevi gören bir membran proteini fraksiyonu veya antijeni eksprese etmeye neden olan hücreler bir hayvana intradermal olarak veya intraperitoneal olarak uygulanır. Bununla birlikte, uygulamanın her iki yolunun  
25 kombinasyonu immünizasyon etkililiğini arttırmak için tercih edilir ve intradermal uygulama birinci yarıda gerçekleştirildiğinde ve intraperitoneal uygulama son yarıda veya yalnızca son dozlamda gerçekleştirildiğinde, immünizasyon etkililiği özel olarak artırılabilir.

30 Antijenin uygulama planlaması immünize edilecek olan hayvanın tipine, münferit farklılığa veya benzerlerine bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Bununla birlikte, genel olarak, burada antijenin uygulama sıklığının 3 ila 6 kere aralığında olduğu ve dozlam aralığının 2 ila 6 hafta aralığında olduğu bir uygulama planlaması tercih edilir ve burada antijenin uygulama sıklığının 3 ila 4 kere aralığında olduğu ve dozlam aralığının 2 ila 4 hafta  
35 aralığında olduğu bir uygulama planlaması daha çok tercih edilir.

İlaveten, antijenin dozu hayvanın tipine, münferit farklılıklara veya benzerlerine bağlı olarak çeşitlilik gösterir, bununla birlikte, doz genel olarak 0,05 ila 5 mg'a, tercihen yaklaşık 0,1 ila 0,5 mg'a, ayarlanır.

5

Bir destekleyici immünizasyon, yukarıda tarif edildiği üzere antijenin uygulanmasından 1 ila 6 hafta, tercihen 1 ila 4 hafta, daha tercihen 1 ila 3 hafta sonra gerçekleştirilir. İmmünojen hücreler olduğunda,  $1 \times 10^6$  ila  $1 \times 10^7$  hücre kullanılır.

10

Destekleyici immünizasyonu gerçekleştirme zamanında antijenin dozu, hayvanın tipine veya boyuna veya benzerlerine bağlı olarak çeşitlilik gösterir, bununla birlikte, örneğin, bir fare, durumunda, doz genel olarak 0,05 ila 5 mg'a, tercihen 0,1 ila 0,5 mg'a, daha tercihen yaklaşık 0,1 ila 0,2 mg'a, ayarlanır. İmmünojen hücreler olduğunda,  $1 \times 10^6$  ila  $1 \times 10^7$  hücre kullanılır.

15

Dalak hücrelerini veya antikor-üreten hücreleri içeren lenfositler destekleyici immünizasyondan 1 ila 10 gün, tercihen 2 ila 5 gün, daha tercihen 2 ila 3 gün sonra immünize edilmiş hayvandan aseptik olarak uzaklaştırılır. Bu sırada, antikor titresini ölçülür ve bir yeterli bir şekilde arttırılmış antikor titresine sahip olan bir hayvan antikor-üreten hücrelerin bir tedarik kaynağı olarak kullanıldığında, müteakip prosedür daha etkili bir şekilde gerçekleştirilebilir.

20

Burada kullanılacak olan antikor titresini ölçmenin yönteminin örnekleri bir RIA yöntemini ve bir ELISA yöntemini içerir ancak yöntem bunlarla sınırlandırılmaz.

25

Örneğin, bir ELISA yöntemi kullanıldığında, buluşta antikor titresinin ölçümü aşağıda tarif edildiği üzere prosedürlere göre gerçekleştirilebilir.

30

İlk olarak, bir saflaştırılmış veya kısmen saflaştırılmış antijen bir katı fazın yüzeyine, örneğin, ELISA için bir 96-kuyucuklu plakaya, adsorbe edilir ve buna adsorbe edilmiş herhangi bir antijene sahip olmayan katı fazın yüzeyi antijen ile ilgili olmayan bir protein, örneğin, bovin serum albümini (BSA), ile kaplanır. Yüzeyi yıkadıktan sonra, yüzey, örnek içindeki antikorun antijeni bağlamasına olanak sağlamak için bir primer antikor olarak bir seri olarak seyreltilmiş örnek (örneğin, fare serumu) ile temas ettirilir.

İlaveten, bir sekonder antikor olarak, bir fare antikoruna karşı bir enzim ile etiketlenmiş bir antikor eklenir ve fare antikorunu bağlamasına izin verilir. Yıkamadan sonra, enzim için bir substrat eklenir ve absorbansta substratın parçalanması veya benzerleri ile indüklenen renk gelişiminden dolayı gerçekleşen bir değişim ölçülür ve antikor titresi 5 ölçüme göre hesaplanır.

Antikor üreten hücrelerin, immünize edilmiş bir hayvanın dalak hücrelerinden veya lenfositlerinden ayrılması, bilinen bir yönteme (örneğin Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511; Milstein et al., Nature 10 (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature (1977), 266, p. 495) göre yürütülebilir. Örneğin, dalak hücreleri durumunda, burada antikor-üreten hücrelerin bir paslanmaz çelik elek ile filtrasyon yoluyla hücreleri elde etmek için dalağı homojenize etme ve hücreleri Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) içinde süspanse etme ile ayrıldığı bir genel yöntem kullanılabilir.

15

**(c) Miyelom hücrelerinin (bundan sonra, "miyelom" olarak ifade edilir) preparasyonu**

Hücre füzyonu için kullanılacak olan miyelom hücreleri özel olarak sınırlandırılmaz ve 20 uygun hücreler bilinen hücre hatlarından seçilebilir. Bununla birlikte, bir hibridom kaynaştırılmış hücrelerden seçildiğinde uygunluk dikkate alındığında, seleksiyon prosedürü belirlenmiş olan bir HGPRT (hipoksantin-guanin fosforibosil transferaz) kusurlu suş kullanmak tercih edilir.

25 Daha spesifik olarak, HGPRT-kusurlu suşun örnekleri, farelerden türetilen X63-Ag8(X63)'ü, NS1-ANS/1(NS1)'i, P3X63-Ag8.U1(P3U1)'i, X63-Ag8.653(X63.653)'ü, SP2/0-Ag14(SP2/0)'i, MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)'yi, FO'yu, S149/5XXO'yu ve BU.1'i; sıçanlardan türetilen 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)'ü ve insanlardan türetilen U266AR(SKO- 007)'yi, GM1500-GTG-A12(GM1500)'ü, UC729-6'yı, LICR-LOW-HMy2(HMy2)'yi ve 30 8226AR/NIP4-1(NP41)'i içerir. Bu HGPRT-kusurlu suşlara, örneğin, ATCC'den veya benzerlerinden, erişilebilir.

Bu hücre suşları bir uygun vasat, örneğin, bir 8-azaguanin vasatı (glutamin, 2-merkaptotanol, gentamisin ve fetal buzağı serumu (bundan sonra "FBS" olarak ifade 35 edilir) ile takviye edilmiş bir RPMI 1640 vasatına 8-azaguanin ekleme ile elde edilen bir

vasat), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) veya Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), içinde alt-kültürlerir. Bu durumda, hücre füzyonunu gerçekleştirmeden 3 ila 4 gün önce, hücreler hücre füzyonu gününde en az  $2 \times 10^7$  hücreyi garanti etmek için bir normal vasat (örneğin, %10 FCS içeren (Ajinomoto Co., Ltd. tarafından üretilmiş) bir ASF104 vasatı) içinde alt-kültürlerir.

#### **(d) Hücre füzyonu**

Antikor üreten hücreler ile miyelom hücreleri arasındaki füzyon, bilinen bir yöntemle göre (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), vb.) hücrelerin hayatta kalma oranının aşırı derecede düşürülmeyeceği koşullar altında gerçekleştirilebilir.

15

Bu tarz bir yöntem olarak, örneğin, burada antikor-üreten hücrelerin ve miyelom hücrelerinin bir yüksek konsantrasyonda bir polimer, örneğin, polietilen glikol, içeren bir çözelti içinde karıştırıldığı bir kimyasal yöntem, elektrik stimülasyonu kullanılan bir fiziksel yöntem veya benzerleri kullanılabilir. Bu yöntemler arasında, kimyasal yöntemin bir spesifik örneği aşağıda tarif edildiği şekildedir.

20

Yani, polietilen glikolün bir yüksek konsantrasyonda bir polimer içeren çözelti içinde kullanıldığı durumda, antikor-üreten hücreler ve miyelom hücreleri 1500 ila 6000 aralığında, daha tercihen 2000 ila 4000 aralığında, bir moleküler ağırlığa sahip olan bir polietilen glikol çözeltisi içinde 30 ila 40°C aralığında, tercihen 35 ila 38°C aralığında, olan bir sıcaklıkta, ila 10 dakika, tercihen 5 ila 8 dakika, boyunca karıştırılır.

25

#### **(e) Hibridomların bir grubunun seleksiyonu**

Yukarıda tarif edilen hücre füzyonu ile elde edilen hibridomları seçmenin yöntemi özel olarak sınırlandırılmaz. Genel olarak, bir HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin) seleksiyon yöntemi (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550) kullanılır.

30

Bu yöntem, hibridomlar aminopterin varlığında sağ kalamayan bir HGPRT-kusurlu suşun miyelom hücreleri kullanılarak elde edildiğinde etkilidir. Yani, kaynaştırılmamış hücreleri ve hibridomları bir HAT vasatı içinde kültürlenme ile, yalnızca aminopterin dirençli hibridomların selektif bir şekilde sağ kalmasına ve çoğalmasına izin verilir.

5

#### **(f) Tek hücre klonuna bölme (klonlama)**

Hibridomlar için bir klonlama yöntemi olarak, bir bilinen yöntem, örneğin, bir metilselüloz yöntemi, bir yumuşak agar yöntemi veya bir sınırlayıcı seyreltme yöntemi, kullanılabilir (bakınız, örneğin, Barbara, B. M. ve Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Bu yöntemler arasında, özel olarak, bir üç-boyutlu kültür yöntemi, örneğin, bir metilselüloz yöntemi, tercih edilir. Örneğin, hücre füzyonu ile üretilen hibridomların grubu bir metilselüloz vasatı, örneğin, ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies, Inc. tarafından üretilmiştir, #03804), içinde süspansiyon edilir ve kültürlenir. Akabinde, oluşturulan hibridom kolonileri toplanır, böylece monoklonal hibridomlar elde edilebilir. Toplanan ilgili hibridom kolonileri kültürlenir ve bir elde edilen hibridom kültür süpernatantı içinde bir kararlı antikor titresine sahip olduğu konfirme edilmiş olan bir hibridom bir TROP2 monoklonal antikor-üreten hibridom suşu olarak seçilir.

20

Bu şekilde oluşturulan hibridom suşunun örnekleri, TROP2 hibridomu TINA1'i içerir. Bu spesifikasyonda, TROP2 hibridomu TINA1 tarafından üretilen bir antikor bir "TINA1 antikor" veya basit bir şekilde "TINA1" olarak ifade edilir.

25

TINA1 antikorunun ağır zincir değişken bölgesi Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 2 ile temsil edilen bir amino asit dizisine sahiptir. İlâveten, TINA1 antikorunun hafif zincir değişken bölgesi Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 4 ile temsil edilen bir amino asit dizisine sahiptir.

#### **(g) Monoklonal antikorun hibridomu kültürlenme ile preparasyonu**

30

Bu şekilde seçilen hibridomu kültürlenme ile, bir monoklonal antikor etkili bir şekilde elde edilebilir. Bununla birlikte, kültürlemeden önce, bir hedef monoklonal antikor üreten bir hibridomun taranmasını gerçekleştirmek tercih edilir.

35

Bu tarz taramada, bir bilinen yöntem kullanılabilir.

Buluşta antikor titresinin ölçümü, örneğin, yukarıda tarif edilen madde (b)'de açıklanan bir ELISA yöntemi, ile gerçekleştirilebilir.

- 5 Yukarıda tarif edilen yöntem ile elde edilen hibridom -80°C'de veya altında sıvı nitrojen içinde veya bir dondurucu içinde bir dondurulmuş hâlde saklanabilir.

Klonlamanın tamamlanmasından sonra, vasat bir HAT vasatından bir normal vasata değiştirilir ve hibridom kültürlenir.

10

Büyük-ölçekte kültür, bir büyük kültür şişesi kullanarak rotasyon kültürü ile veya spin edici kültür ile gerçekleştirilir. Büyük-ölçekte kültür ile elde edilen süpernatanttan, buluşun proteinini spesifik olarak bağlayan bir monoklonal antikor teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinen bir yöntem, örneğin, jel filtrasyonu, kullanılarak saflaştırma ile elde edilebilir.

15

İlaveten, hibridom hibridomu çoğaltmak için hibridom ile aynı suştan (örneğin, yukarı tarif edilen BALB/c) bir farenin veya bir Nu/Nu farenin abdominal kavitesine enjekte edilir, böylece buluşun monoklonal antikorunu büyük bir miktarda içeren assitler elde edilebilir.

20

Hibridomun abdominal kaviteye uygulandığı durumda, bir mineral yağ, örneğin, 2,6,10,14-tetrametil pentadekan (pristan) bundan 3 ila 7 gün önce uygulandığında, assitlerin daha büyük bir miktarı elde edilebilir.

25

Örneğin, bir immunosüpresan T hücreleri inaktive etmek için hibridom ile aynı suştan bir farenin abdominal kavitesine önceden enjekte edilir. Bundan 20 gün sonra,  $10^6$  ila  $10^7$  hibridom klon hücresi bir serumsuz vasat (0,5 ml) içinde süspanse edilir ve süspanسیون farenin abdominal kavitesine uygulanır. Genel olarak, abdomen genişletildiğinde ve assitler ile doldurulduğunda, assitler fareden toplanır. Bu yöntem ile, monoklonal antikor kültür çözeltisindeki kıyasla yaklaşık 100 kat veya çok daha yüksek olan bir konsantrasyonda elde edilebilir.

30

Yukarıda tarif edilen yöntem ile elde edilen monoklonal antikor, örneğin, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978), kaynağında, tarif edilen bir yöntem ile saflaştırılabilir.

- 5 Bu şekilde elde edilen monoklonal antikor TROP2 için yüksek antijen özgüllüğüne sahiptir.

#### **(h) Monoklonal antikorun analizi**

- 10 Bu şekilde elde edilen monoklonal antikorun izotipi ve alt-sınıfı aşağıda olduğu şekilde belirlenebilir.

İlk olarak, tanımlama yönteminin örnekleri bir Ouchterlony yöntemini, bir ELISA yöntemini ve bir RIA yöntemini içerir.

15

Bir Ouchterlony yöntemi basittir ancak monoklonal antikorun konsantrasyonu düşük olduğunda, bir kondensasyon operasyonu gereklidir.

- 20 Diğer taraftan, bir ELISA yöntemi veya bir RIA yöntemi kullanıldığında, kültür süpernatantını bir antijen-adsorbe edilmiş katı faz ile doğrudan reaksiyona sokma ve sekonder antikorlar olarak immünoglobülin izotiplerinin ve alt-sınıflarının çeşitli tiplerine karşılık gelen antikorları kullanma ile, monoklonal antikorun izotipi ve alt-sınıfı tanımlanabilir.

- 25 Buna ek olarak, bir daha basit yöntem olarak, piyasada satılan bir tanımlama kiti (örneğin, Bio-Rad Laboratories, Inc. tarafından üretilen Mouse Typer Kit) veya benzerleri de kullanılabilir.

- 30 İlaveten, bir proteinin kantitatif belirlenmesi Folin Lowry yöntemi veya 280 nm'deki absorbansı temel alan bir hesaplama yöntemi ( $1,4 (OD\ 280) = \text{İmmünoglobülin } 1\ \text{mg/ml}$ ) ile gerçekleştirilebilir.

- 35 İlaveten, monoklonal antikor (2)'deki (a) ile (h) arasındaki adımları yeniden gerçekleştirme ile ayrı bir şekilde ve bağımsız bir şekilde elde edildiğinde bile, TINA1 antikorunununkiye eş-değer olan bir sitotoksik aktiviteye sahip olan bir antikor elde etmek

mümkündür. Bu tarz bir antikorun bir örneği olarak, TINA1 antikoruna ile aynı epitopu bağlayan bir antikor emsallendirilebilir. Bir yeni üretilmiş monoklonal antikor TINA1 antikorunun bağladığı bir parsiyel peptidi veya bir parsiyel tersiyer yapıyı bağladığında, monoklonal antikorun TINA1 antikoruna ile aynı epitopu bağladığı belirlenebilir. İlaveten, monoklonal antikorun TROP2'yi bağlama için TINA1 antikoruna ile rekabet ettiğini (yani, monoklonal antikorun TINA1 antikoruna ve TROP2 arasındaki bağlamayı inhibe ettiğini) konfirme etme ile, spesifik epitop dizisi veya yapısı belirlenmemiş olsa bile, monoklonal antikorun anti-TROP2 antikoruna ile aynı epitopu bağladığı belirlenebilir. Monoklonal antikorun anti-TROP2 antikoruna ile aynı epitopu bağladığı konfirme edildiğinde, monoklonal antikorun TINA1 antikorunununkine eş-değer olan antijen-bağlama afinitesine ve bir biyolojik aktiviteye sahip olması güçlü bir şekilde beklenir.

### (3) Diğer antikorlar

Buluşun antikoruna yalnızca, TROP2'ye karşı yukarıda tarif edilen monoklonal antikoruna değil aynı zamanda insanlara heterolog antijenisiteyi azaltma amacıyla yapay modifikasyon ile elde edilen bir rekombinant antikor, örneğin, bir kimerik antikor, bir beşerileştirilmiş antikor ve bir insan antikoruna, da içerir. Bu antikorlar bir bilinen yöntem kullanılarak üretilir.

20

Kimerik antikor olarak, burada antikor değişken ve sabit bölgelerinin farklı türlerden türetildiği bir antikoruna, örneğin, burada bir fare- veya sıçan-kaynaklı antikor değişken bölgesinin bir insan-kaynaklı antikoruna sabit bölgesine bağlandığı bir kimerik antikor emsallendirilebilir (bakınız, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

25

Beşerileştirilmiş antikor olarak, yalnızca bir tamamlayıcılık belirleme bölgesini (CDR) bir insan-kaynaklı antikora entegre etme ile elde edilen bir antikor (bakınız, Nature (1986) 321, pp. 522-525) ve çerçevenin aynı zamanda CDR dizisinin amino asit rezidülerinin bir parçasını bir CDR-greft etme yöntemi ile bir insan antikoruna greft etme ile elde edilen bir antikor (WO 90/07861 Numaralı Uluslararası Yayın) emsallendirilebilir.

30

Bununla birlikte, TINA1 antikorundan türetilen beşerileştirilmiş antikor, beşerileştirilmiş antikor TINA1 antikorunun CDR dizilerinin 6 tipinin tümüne sahip olduğu sürece, bir spesifik beşerileştirilmiş antikor ile sınırlandırılmaz. TINA1 antikorunun ağır zincir değişken bölgesi, Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 23 ile temsil edilen bir amino asit

35

- dizisinden oluşan CDRH1'e (TAGMQ), Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 24 ile temsil edilen bir amino asit dizisinden oluşan CDRH2'ye (WINTHSGVPKYAEDFKG) ve Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 25 ile temsil edilen bir amino asit dizisinden oluşan CDRHe'e (SGFGSSYWYFDV) sahiptir. İlâveten, TINA1 antikorunun hafif zincir değişken bölgesi,
- 5 Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 26 ile temsil edilen bir amino asit dizisinden oluşan CDRL1'e (KASQDVSTAVA), Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 27 ile temsil edilen bir amino asit dizisinden oluşan CDRL2'e (SASYRYT) ve Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 28 ile temsil edilen bir amino asit dizisinden oluşan CDRL3'e (QQHYITPLT) sahiptir.
- 10 Bir fare antikoruna TINA1'in beşerileştirilmiş antikorunun bir örneği olarak, (1) Dizi Listesi'ndeki SEQ ID NO: 12'nin, 14'ün veya 16'nın 20 ila 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinin, (2) yukarıdaki tarif edilen amino asit dizisi (1) ile en az %95'lik veya daha fazla olan bir homolojiye sahip olan bir amino asit dizisinin ve (3) burada yukarıda tarif edilen amino asit dizisi (1) içindeki bir veya bir kaç
- 15 amino asidin silindiği, sübstüte edildiği veya eklendiği bir amino asit dizisinin herhangi birinden oluşan bir ağır zincir değişken bölgesi içeren bir ağır zincirin ve (4) Dizi Listesi'ndeki SEQ ID NO: 18'in, 20'nin veya 22'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinin, (5) yukarıdaki tarif edilen amino asit dizisi (4) ile en az %95'lik veya daha fazla olan bir homolojiye sahip olan bir amino asit
- 20 dizisinin ve (6) burada yukarıda tarif edilen amino asit dizisi (5) içindeki bir veya bir kaç amino asidin silindiği, sübstüte edildiği veya eklendiği bir amino asit dizisinin herhangi birinden oluşan bir hafif zincir değişken bölgesi içeren bir hafif zincirin bir keyfi kombinasyonu emsallendirilebilir.
- 25 Burada kullanıldığı şekliyle, "bir kaç" terimi, 1 ila 10'u, 1 ila 9'u, 1 ila 8'i, 1 ila 7'yi, 1 ila 6'yi, 1 ila 5'i, 1 ila 4'ü, 1 ila 3'ü veya 1'i veya 2'yi ifade eder.

Bu spesifikasyonda amino asit sübstütüsyonu olarak, bir konservatif amino asit sübstütüsyonu tercih edilir. Konservatif amino asit sübstütüsyonu, amino asit yan

30 zincirleri ile ilgili olan amino asitlerin bir grubu içinde gerçekleşen bir sübstütüsyonu ifade eder. Tercih edilen amino asit grupları aşağıdaki şekildedir: bir asidik grup (aspartik asit ve glutamik asit); bir bazik grup (lizin, arjinin ve histidin); bir polar-olmayan grup (alanin, valin, lösin, izolösin, prolin, fenilalanin, metiyonin ve triptofan) ve bir yüksüz polar familya (glisin, asparajin, glutamin, sistein, serin, treonin ve tirozin). Daha

35 çok tercih edilen amino asit grupları aşağıdaki şekildedir: bir alifatik hidroksi grup (serin

ve treonin); bir amid-içeren grup (asparajin ve glutamin); bir alifatik grup (alanin, valin, lösin ve izolösin) ve bir aromatik grup (fenilalanin, triptofan ve tirozin). Bu tarz bir amino asit sübstütüsyonu tercihen, orijinal amino asit dizisine sahip olan bir dizinin özelliklerini bozmayan bir aralık içinde gerçekleştirilir.

5

Yukarıda tarif edilen bir ağır zincirin ve bir hafif zincirin bir tercih edilen kombinasyonuna sahip olan bir antikor olarak, SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan

bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor ve SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 140 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor emsallendirilebilir.

İlaveten, yukarıda tarif edilen bir ağır zincirin ve bir hafif zincirin bir daha çok tercih edilen kombinasyonuna sahip olan bir antikor olarak, SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit

dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor ve SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor  
5 emsallendirilebilir.

Yukarıda tarif edilen bir ağır zincirin ve bir hafif zincirin bir üstün tercih edilen kombinasyonuna sahip olan bir antikor olarak, SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi  
10 içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden  
15 oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor  
20 ve SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken bölgeyi içeren bir hafif zincirden oluşan bir antikor  
25 emsallendirilebilir.

İlaveten, yukarıda tarif edilen bir ağır zincirin ve bir hafif zincirin bir başka daha çok tercih edilen kombinasyonuna sahip olan bir antikor olarak, SEQ ID NO: 12'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 12'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 12'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden  
30 oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden  
35 oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden

ve SEQ ID NO: 20'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 16'nın bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 16'nın bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor ve SEQ ID NO: 16'nın bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor emsallendirilebilir.

10

Yukarıda tarif edilen bir ağır zincirin ve bir hafif zincirin bir üstün tercih edilen kombinasyonuna sahip olan bir antikor olarak, SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor ve SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 470 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor emsallendirilebilir.

25

İlaveten, yukarıda tarif edilen bir ağır zincirin ve bir hafif zincirin bir daha üstün tercih edilen kombinasyonuna sahip olan bir antikor olarak, SEQ ID NO: 12'nin 20 ila 469 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 469 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 18'in 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor; SEQ ID NO: 14'ün 20 ila 469 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan

35

5 bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 20'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor ve SEQ ID NO: 16'nın 20 ila 469 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincirden ve SEQ ID NO: 22'nin 21 ila 234 arasındaki amino asit pozisyonlarından oluşan bir amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincirden oluşan bir antikor emsallendirilebilir.

10 Yukarıda tarif edilen ağır zincir amino asit dizisi ile bir yüksek homolojiye sahip olan bir dizi yukarıda tarif edilen hafif zincir amino asit dizisi ile bir yüksek homolojiye sahip olan bir dizi ile birleştirme ile, yukarıda tarif edilen antikorların her birininkine eş-değer olan bir biyolojik aktiviteye sahip olan bir antikor seçmek mümkündür. Bu tarz bir homoloji genel olarak, %80 veya daha yüksek olan bir homolojidir, tercihen %90 veya daha yüksek olan bir homolojidir, daha tercihen %95 veya daha yüksek olan bir homolojidir, en tercihen %99 veya daha yüksek olan bir homolojidir. İlâveten, burada 15 ağır zincir veya hafif zincir amino asit dizisinde bir ila bir kaç amino asit rezidüsünün sübstüte edildiği, silindiği veya eklendiği bir amino asit dizisini birleştirme ile, yukarıda tarif edilen antikorların her birininkine eş-değer olan bir biyolojik aktiviteye sahip olan bir antikor seçmek de mümkündür.

20 İki amino asit dizisi arasındaki homoloji Blast algoritması versiyon 2.2.2'nin (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller ve David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) varsayılan parametreleri kullanılarak belirlenebilir. Blast algoritması ayrıca, 25 [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) sitesine erişim ile İnternet aracılığıyla da kullanılabilir.

30 Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 12, 14 veya 16 ile temsil edilen ağır zincir amino asit dizisinde, 1 ila 19 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisi bir sinyal dizisidir, 20 ila 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisi bir değişken bölgedir ve 141 ila 470 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisi bir sabit bölgedir. SEQ ID NO: 12'nin, 14'ün ve 16'nın dizisi sırasıyla Şekil 3'te, 4'te ve 5'te gösterilir.

35 İlâveten, Dizi Listesi'nde SEQ ID NO: 18, 20 veya 22 ile temsil edilen hafif zincir amino asit dizisinde, 1 ila 20 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisi

bir sinyal dizisidir, 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisi bir değişken bölgedir ve 130 ila 234 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir amino asit dizisi bir sabit bölgedir. SEQ ID NO: 18'in, 20'nin ve 22'nin dizisi sırasıyla Şekil 6'da, 7'de ve 8'de gösterilir.

5

İlaveten, buluşun antikorunu, TROP2'yi bağlayan bir insan antikorunu içerir. Bir anti-TROP2 insan antikorunu, bir insan kromozomundan türetilen bir antikorun yalnızca bir dizisine sahip olan bir insan antikorunu ifade eder. Anti-TROP2 insan antikorunu, bir insan antikorunun ağır ve hafif zincir genlerini içeren bir insan kromozomu fragmanına sahip olan bir insan antikorunu üreten farenin kullanıldığı bir yöntem ile elde edilebilir. (bakınız Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, pp. 722-727, vb.).

10  
15

Bu tarz bir insan antikorunu üreten fare spesifik olarak aşağıda olduğu şekilde oluşturulabilir. Burada endojen immünoglobülin ağır ve hafif zincir gen lokuslarının bozulduğu ve bunun yerine, bir maya yapay kromozom (YAC) vektörü veya benzerleri vasıtasıyla insan immünoglobülin ağır ve hafif zincir gen lokuslarının uygulandığı bir genetik olarak modifiye edilmiş hayvan bir nakavt hayvan ve bir transgenik hayvan üretme ve bu hayvanları çiftleştirme ile oluşturulur.

20

İlaveten, bir rekombinant DNA tekniğine göre, bir insan antikorunun bu tarz bir ağır zincirinin ve bir hafif zincirinin her birini şifreleyen cDNA'ları ve tercihen bu tarz cDNA'ları içeren bir vektörü kullanma ile, ökaryotik hücreler transforme edilir ve bir rekombinant insan monoklonal antikorunu üreten bir transformant hücre kültürlenir böylece antikor ayrıca kültür süpernatantından da elde edilebilir.

25

Burada, konak olarak, örneğin, ökaryotik hücreler, tercihen memeli hücreleri, örneğin, CHO hücreleri, lenfositler veya miyelom hücreleri, kullanılabilir.

30

Ayrıca, bir insan antikor kütüphanesinden seçilen bir faj gösteriminden derive edilen insan antikorunun elde edilmesine yönelik bir yöntem de bilinmektedir (bakınız Weir, D. M. *Handbook of Experimental Immunology* Vol. I. II. III., Blackwell Scientific

35

Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), vb.).

5 Örneğin, burada bir insan antikorunun bir değişken bölgesinin bir tek-zincirli antikor (scFv) olarak bir fajın yüzeyi üzerinde eksprese edildiği ve bir antijeni bağlayan bir fajın seçildiği bir faj gösterim yöntemi (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116) kullanılabilir.

10 Bir antijeni bağlamaya göre seçilen fajın genini analiz etme ile, bir antijeni bağlayan bir insan antikorunun değişken bölgesini şifreleyen bir DNA dizisi belirlenebilir.

15 Bir antijeni bağlayan scFv'nin DNA dizisi belirlendiğinde, bir insan antikoru diziyi içeren bir ekspresyon vektörünü hazırlama ve bunu eksprese etmek için vektörü bir uygun konak içine uygulama ile elde edilebilir (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388 Numaralı Uluslararası Yayınlar; Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455; Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

20 Bir yeni üretilmiş insan antikoru TINA1 antikorunun bağladığı bir parsiyel peptidi veya bir parsiyel tersiyer yapıyı bağladığında, insan antikorunun TINA1 antikoru ile aynı epitopu bağladığı belirlenebilir. İlaveten, insan antikorunun TROP2'yi bağlama için TINA1 antikoru ile rekabet ettiğini (yani, insan antikorunun TINA1 antikoru ve TROP2 arasındaki bağlamayı inhibe ettiğini) konfirme etme ile, spesifik epitop dizisi veya yapısı belirlenmemiş olsa bile, insan antikorunun TINA1 antikoru ile aynı epitopu bağladığı  
25 belirlenebilir. İnsan antikorunun TINA1 antikoru ile aynı epitopu bağladığı konfirme edildiğinde, insan antikorunun TINA1 antikorunkine eş-değer olan bir biyolojik aktiviteye sahip olması güçlü bir şekilde beklenir.

30 Yukarıda tarif edilen yöntem ile elde edilen kimerik antikorlar, beşerileştirilmiş antikorlar veya insan antikorları bir bilinen yöntem veya benzerleri ile bir antijeni bağlama özelliği için değerlendirilir ve bir tercih edilen antikor seçilebilir.

35 Antikorların özelliklerinin karşılaştırılmasında kullanım için bir başka indeksin bir örneği olarak, antikorların kararlılığı emsallendirilebilir. Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) proteinlerin bağlı konformasyonel kararlılığının bir avantajlı indeksi olarak kullanılacak

olan bir termal denatürasyon orta-nokta sıcaklığını ( $T_m$ ) çabuk bir şekilde ve kesin bir şekilde ölçebilen bir cihazdır. DSC kullanarak  $T_m$  değerlerini ölçme ve değerleri karşılaştırma ile, termal kararlılıktaki bir farklılık karşılaştırılabilir. Antikorların saklama kararlılığının antikorların termal kararlılığı ile biraz korelasyon gösterdiği bilinir (Lori Burton et al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, pp. 265-273) ve bir tercih edilen antikor bir indeks olarak termal kararlılığı kullanma ile seçilebilir. Antikorları seçmek için başka indekslerin örnekleri aşağıdaki özellikleri içerir: bir uygun konak hücredeki verim yüksektir ve bir sulu çözelti içindeki çökebilirlik düşüktür. Örneğin, en yüksek verimi gösteren bir antikor her zaman en yüksek termal kararlılığı göstermez ve bundan dolayı yukarıda tarif edilen indeksleri temel alan kapsamlı değerlendirme yapma ile, insanlara uygulama için en uygun olan bir antikoru seçmek gerekir.

Mevcut buluşa, antikorun bir modifiye edilmiş varyantı da dâhil edilir. Modifiye edilmiş varyant mevcut buluşun antikorunu kimyasal veya biyolojik modifikasyona tabi tutma ile elde edilen bir varyantı ifade eder. Kimyasal olarak modifiye edilmiş varyantın örnekleri, bir kimyasal kısmı bir amino asit iskeletine bağlama ile kimyasal olarak modifiye edilmiş varyantları, bir N-bağlı veya O-bağlı karbonhidrat zinciri ile kimyasal olarak modifiye edilmiş varyantları vb. içerir. Biyolojik olarak modifiye edilmiş varyantın örnekleri, post-translasyonel modifikasyon (örneğin, N-bağlı veya O-bağlı glikosilasyon, N- veya C-ucu işleme, deamidasyon, aspartik asidin izomerizasyonu veya metiyoninin oksidasyonu) ile elde edilen varyantları ve burada bir metiyonin rezidüsünün bir prokaryotik konak hücrede eksprese edilme ile N ucuna eklenmiş olduğu varyantları içerir.

İlaveten, buluşun antikorunun veya bir antijeninin saptanmasına veya izolasyonuna olanak sağlamak amacıyla bu şekilde etiketlenmiş olan bir antikor, örneğin, bir enzim ile etiketlenmiş antikor, bir flüoresans ile etiketlenmiş antikor ve bir afinite ile etiketlenmiş antikor da modifiye edilmiş varyantın anlamına dâhil edilir. Buluşun antikorunun bu tarz bir modifiye edilmiş varyantı, antikorun kararlılığını ve kanda alıkonulmasını iyileştirme, bunun antijenisitesini azaltma, bir antikoru veya bir antijeni saptama veya izole etme ve benzerleri için kullanışlıdır.

İlaveten, buluşun antikoruna bağlanmış (glikosilasyon, defukosilasyon, vb.) bir glikanın modifikasyonunu regüle etme ile, bir antikor-bağımlı hücrel sitotoksik aktiviteyi güçlendirmek mümkündür. Antikorların bir glikanının modifikasyonunu regüle etmek

için teknik olarak, WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140 Numaralı Uluslararası Yayınlar, vb. bilinir. Bununla birlikte, teknik bunlarla sınırlandırılmaz. Mevcut buluşun antikorunda, burada bir glikanın modifikasyonunun regüle edildiği bir antikor da dâhil edilir.

5

Bir antikorun ilk olarak bir antikor genini izole etme ve akabinde geni bir uygun konak içine uygulama ile üretildiği durumda, bir uygun konağın ve bir uygun ekspresyon vektörünün bir kombinasyonu kullanılabilir. Antikor geninin spesifik örnekleri bu spesifikasyonda tarif edilen bir antikorun bir ağır zincir dizisini şifreleyen bir genin ve bunun bir hafif zincir dizisini şifreleyen bir genin bir kombinasyonunu içerir. Bir konak hücreye transforme edildiğinde, ağır zincir dizisi genini ve hafif zincir dizisi genini aynı ekspresyon vektörüne ve aynı zamanda ayrı ayrı farklı ekspresyon vektörlerine yerleştirmek mümkündür.

10

15

Ökaryotik hücrelerin konakçı olarak kullanıldığı durumda, hayvan hücreleri, bitki hücreleri ve ökaryotik mikroorganizmalar kullanılabilir. Hayvan hücreleri olarak, memeli hücreleri örneğin maymun COS hücreleri (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), mürin fibroblastları NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) ve Çin hamsteri ovaryum hücrelerinin (CHO hücreleri; ATCC: CCL-61) dihidrofolat redüktaz-eksik suşları (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) örnek olarak verilebilir.

20

Prokaryotik hücrelerin kullanıldığı durumda, örneğin, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* emsallendirilebilir.

25

Bir arzu edilen antikor genini transformasyon yoluyla bu hücrelere uygulama ve bu şekilde transforme edilen hücreleri *in vitro* kültürleme ile, antikor elde edilebilir. Yukarıda tarif edilen kültür yönteminde, verim bazen antikorun dizisine bağlı olarak çeşitlilik gösterebilir ve bundan dolayı, bir eş-değer bağlama aktivitesine sahip olan antikorlar arasında bir indeks olarak verimi kullanarak bir farmasötik olarak kolaylıkla üretilen bir antikoru seçmek mümkündür. Bundan dolayı, mevcut buluşun antikoruna, bir antikoru üretmenin, transforme edilmiş konak hücreyi kültürlemenin bir adımını ve bir arzu edilen antikoru kültürleme adımında elde edilen bir kültürlenmiş üründen toplamanın bir adımını içermeye ile karakterize edilen, bir yöntem ile elde edilen bir antikor da dâhil edilir.

30

35

Bir kültürlenmiş memeli hücresinde üretilen bir antikorun ağır zincirinin karboksil ucundaki bir lizin rezidüsünün silindiği bilinir (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)) ve aynı zamanda bir kültürlenmiş memeli hücresinde üretilen bir antikorun ağır zincirinin karboksil ucundaki iki amino asit rezidüsünün (glisinin ve lizinin) silindiği ve karboksil ucunda yeni konumlandırılmış olan bir prolin rezidüsünün amidatlandığı da bilinir (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Bununla birlikte, ağır zincir dizisinin bu tarz silinmesi ve modifikasyonu antikorun antijen-bağlama afinitesini ve efektör fonksiyonunu (bir komplemanın aktivasyonunu, antikor-bağımlı hücrel toksisiteyi, vb.) etkilemez. Bundan dolayı, mevcut buluşa göre antikora, ayrıca bu tarz modifikasyona tabi tutulmuş bir antikor ve antikorun bir fonksiyonel fragmanı da dâhil edilir ve burada ağır zincirin karboksil ucunda bir veya iki amino asidin silinmiş olduğu bir silinme varyantı, silinme varyantının amidasyonu ile elde edilen bir varyant (örneğin, burada karboksil ucu prolin rezidüsünün amidatlanmış olduğu bir ağır zincir) ve benzerleri de kapsanır. Buluşa göre antikorun ağır zincirinin karboksil ucunda bir silinmeye sahip olan silinme varyantı tipi, antijen-bağlama afinitesi ve efektör fonksiyon korunduğu sürece, yukarıdaki varyantlar ile sınırlandırılmaz. Buluşa göre antikoru oluşturan iki ağır zincir, bir tam-boy ağır zincirden ve yukarıda tarif edilen silinme varyantından oluşan gruptan seçilen bir tipte olabilir veya bunlardan seçilen kombinasyon hâlindeki iki tipten olabilir. Her bir silinme varyantının miktarının oranı buluşa göre antikoru üreten kültürlenmiş memeli hücrelerinin tipinden ve kültür koşullarından etkilenebilir, bununla birlikte, karboksil ucunda bir amino asit rezidüsünün buluşa göre antikora ana bileşenler olarak dâhil edilen iki ağır zincirin her ikisinin de silinmiş olduğu bir durum emsallendirilebilir.

25

Buluşun antikorunun izotipi olarak, örneğin, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) emsallendirilebilir ve tercihen IgG1 veya IgG2 emsallendirilebilir.

Antikorun biyolojik aktivitesi olarak, genel olarak bir antijen-bağlama aktivitesi, bir antijeni eksprese eden hücrelerde antijeni bağlama ile içselleştirmenin bir aktivitesi, bir antijenin aktivitesini nötralize etmenin bir aktivitesi, bir antijenin aktivitesini güçlendirmenin bir aktivitesi, bir antikor-bağımlı hücrel sitotoksisite (ADCC) aktivitesi, bir kompleman-bağımlı sitotoksisite (CDC) aktivitesi ve bir antikor-bağımlı hücre-aracılı fagositoz (ADCP) aktivitesi emsallendirilebilir. Mevcut buluşun antikorunun fonksiyonu TROP2'yi bir bağlama aktivitesidir, tercihen TROP2-eksprese eden hücrelerde

35

TROP2'yi bağlama ile içselleştirmenin bir aktivitesidir. İlâveten, mevcut buluşun antikoru bir hücre içselleştirme aktivitesine ek olarak bir ADCC aktivitesine, bir CDC aktivitesine ve/veya bir ADCP aktivitesine sahip olabilir.

- 5 Elde edilen antikor homojenliğe kadar saflaştırılabilir. Antikorum ayrılması ve saflaştırılması bir geleneksel protein ayırma ve saflaştırma yöntemi kullanılarak gerçekleştirilebilir. Örneğin, antikor kolon kromatografisini, filtre filtrasyonunu, ultrafiltrasyonu, tuz ile çökeltmeyi, diyalizi, preparatif poliakrilamid jel elektroforezini, izoelektrik odaklanma elektroforezini ve benzerlerini uygun bir şekilde seçme ve
- 10 birleştirme ile ayrılabilir ve saflaştırılabilir (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow ve David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) ancak yöntem bunlarla sınırlandırılmaz.

15

Bu tarz kromatografinin örnekleri, afinite kromatografisini, iyon değişim kromatografisini, hidrofobik kromatografiyi, jel filtrasyon kromatografisini, ters faz kromatografiyi ve adsorpsiyon kromatografisini içerir.

- 20 Bu tarz kromatografi sıvı kromatografiyi, örneğin, HPLC'yi veya FPLC'yi, kullanarak gerçekleştirilebilir.

- Afinite kromatografisinde kullanılacak olan bir kolon olarak, bir Protein A kolonu ve bir Protein G kolonu emsallendirilebilir. Örneğin, bir Protein A kolonu kullanılan bir kolon
- 25 olarak, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) ve benzerleri emsallendirilebilir.

İlaveten, üzerine immobilize edilmiş bir antijene sahip olan bir taşıyıcı kullanılarak, antikor ayrıca antikorum antijeni bağlama özelliğinden yararlanılarak da saflaştırılabilir.

30 **[Anti-tümör bileşiği]**

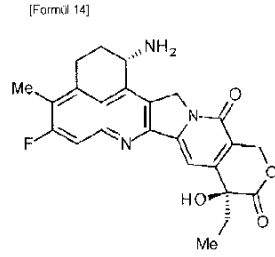
- Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatına konjuge edilecek olan anti-tümör bileşiği açıklanır. Mevcut buluşta kullanılan anti-tümör bileşiği, bu bir anti-tümör etkiye ve bir bağlayıcı yapıya bağlamaya olanak sağlayan bir sübstütent grubuna veya bir
- 35 parsiyel yapıya sahip olan bir bileşik olduğunda, özel olarak sınırlandırılmaz. Bir kısım

veya tüm bağlayıcı tümör hücrelerinde yarıldığında, anti-tümör bileşik kısmı anti-tümör bileşiğin anti-tümör etkisini göstermek için salınır. Bağlayıcı ilacı bir bağlama pozisyonundan yarıldığından, anti-tümör bileşik bunun içsel anti-tümör etkisini göstermesi için bunun modifiye edilmemiş yapısı hâlinde salınır.

5

Mevcut buluşta kullanılan anti-tümör bileşiği olarak, ekzatekan (((1S,9S)-1-amino-9-etil-5-floro-2,3-dihidro-9-hidroksi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-10,13(9H,15H)-dion; aşağıdaki formülde gösterilir), kamptotesin türevlerinin biri tercihen kullanılabilir.

10



15

Bir mükemmel anti-tümör etkiye sahip olmasına rağmen, ekzatekan bir anti-tümör ilaç olarak ticarileştirilmemiştir. Bileşik bir bilinen yöntem ile kolaylıkla elde edilebilir ve pozisyon 1'deki amino grubu tercihen bağlayıcı yapıyı bir bağlama pozisyonu olarak kullanılabilir. İlâveten, ekzatekanın ayrıca bağlayıcının parçası hâlâ ona tutturulmuş iken tümör hücrelerinde salınabilmesine rağmen; bu, bu tarz yapı içinde bile bir mükemmel anti-tümör etki gösteren bir mükemmel bileşiktir.

20

Ekzatekan bir kamptotesin yapısına sahip olduğundan, dengenin bir sulu asidik ortamda (örneğin, pH 3 veya civarında) bir kapalı lakton halkası (kapalı halka) taşıyan bir yapıya doğru kaydığı ancak bunun bir sulu bazik ortamda (örneğin, pH 10 ve civarında) bir açık lakton halkası (açık halka) taşıyan bir yapıya doğru kaydığı bilinir. Kapalı halka yapısına ve açık halka yapısına karşılık gelen bir ekzatekan rezidüsü ile uygulanmış olan bir ilaç konjugatının ayrıca aynı anti-tümör etkiye sahip olması da beklenir ve bu hâllerin herhangi birinin mevcut buluşun kapsamı içinde olduğunu söylemeye gerek yoktur.

25

30

Anti-tümör bileşiğinin diğer örnekleri doksorubisini, daunorubisini, mitomisin C'yi, bleomisini, siklositidini, vinkristini, vinblastini, metotreksatı, platinyum-temelli anti-tümör ajanı (sisplatin veya bunun türevlerini), taksolü veya bunun türevlerini ve kamptotesini

veya bunun türevlerini (6-87746 Numaralı Yayınlanmış Japon Patentinde tarif edilen anti-tümör ajanını) içerebilir.

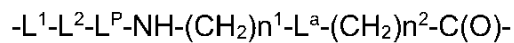
Antikor-ilaç konjugatına ilişkin, her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin sayısı etkinlik ve güvenlik üzerinde bir etkiye sahip olan bir kilit faktördür. Antikor-ilaç konjugatının üretilmesi, konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin bir sabit sayısına sahip olmak amacıyla reaksiyon için ham materyallerin ve reaktiflerin kullanım miktarlarını içeren reaksiyon koşulunu tanımlama ile gerçekleştirilir ve antikor-ilaç konjugatı genel olarak, bir düşük-moleküler-ağırlıklı bileşiğin kimyasal reaksiyonundan farklı olarak, konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin farklı sayılarını içeren bir karışım olarak elde edilir. Bir antikor molekülünde konjuge edilmiş ilaçların sayısı ortalama değer, yani, konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin ortalama sayısı, ile ifade edilir veya belirtilir. Bir prensip olarak spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin sayısı, burada bunun konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin farklı sayısına sahip olan bir antikor-ilaç konjugatı karışıma dâhil edilen konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin bir spesifik sayısına sahip olan bir antikor-ilaç konjugatını temsil ettiği bir durum dışında bir ortalama değer anlamına gelir. Bir antikor molekülüne konjuge edilmiş ekzatekan moleküllerinin sayısı kontrol edilebilir ve her bir antikor için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin bir ortalama sayısı olarak, yaklaşık 1 ila 10 ekzatekan bağlanabilir. Tercihen bu 2 ila 8 aralığındadır ve daha tercihen 3 ila 8 aralığındadır. Aynı zamanda, teknikte uzmanlığı olan bir kişi mevcut başvurunun Örnekleri'nin açıklamasına göre ilaç moleküllerinin bir gerekli sayısını bir antikor molekülüne konjuge etmek için bir reaksiyon tasarlayabilir ve bir kontrol edilmiş sayıda ekzatekan molekülüne sahip olan bir antikor-ilaç konjugatı elde edebilir.

25

### **[Bağlayıcı yapı]**

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikor-ilaç konjugatına ilişkin, bir anti-tümör bileşiğini anti-TROP2'ye konjuge etmek için bağlayıcı yapı açıklanır. Bağlayıcı aşağıdaki formülün bir yapısına sahiptir:

30



Antikor L<sup>1</sup>'in ucuna (L<sup>2</sup>'ye bağlantının karşı ucuna) bağlanır ve anti-tümör bileşiği kısmının karbonil grubuna bağlanır.

35

$n^1$ , 0 ila 6 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder ve tercihen 1 ila 5 aralığındaki ve daha tercihen 1 ila 3 aralığındaki bir tam sayıdır.

### 1. $L^1$

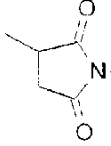
5

$L^1$ , **-(Süksinimid-3-il-N)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(O)-** yapısı ile temsil edilir.

Yukarıda,  $n^3$ , 2 ila 8 aralığındaki bir tam sayıdır ve **-(Süksinimid-3-il-N)-** aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıya sahiptir:

10

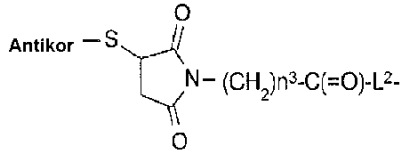
[Formula 15]



15

Yukarıdaki parsiyel yapının pozisyon 3'ü, anti-TROP2 antikoru bir bağlama pozisyonudur. Pozisyon 3'te anti-TROP2 antikoru bağ tiyoeter oluşumu ile bağlama ile karakterize edilir. Yapı kısmının pozisyon 1'indeki nitrojen atomu, yapıyı içeren bağlayıcı içinde bulunan metilenin karbon atomuna bağlanır. Spesifik olarak, **-(Süksinimid-3-il-N)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(=O)-L<sup>2</sup>-** aşağıdaki formül ile temsil edilen bir yapıdır (burada, "antikor-S" bir antikordan köken alır).

[Formül 16]



20

Formülde,  $n^3$ , 2 ila 8 aralığında ve tercihen 2 ila 5 aralığında olan bir tam sayıdır.

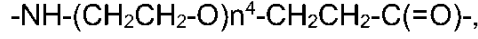
$L^1$ 'in spesifik örnekleri aşağıdakileri içerebilir:

25

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

### 2. $L^2$

$L^2$ , aşağıdaki yapı ile temsil edilen bir bağlayıcıdır:



L<sup>2</sup>, bulunmayabilir ve bu tarz bir durumda, L<sup>2</sup>, bir tekli bağıdır. Yukarıda, n<sup>4</sup>, 1 ila 6 aralığında ve tercihen 2 ila 4 aralığında olan bir tam sayıdır. L<sup>2</sup>, bunun uç amino grubunda L<sup>1</sup>'e bağlanır ve diğer uca bunun karbonil grubunda L<sup>P</sup>'ye bağlanır.

L<sup>2</sup>'nin spesifik örnekleri aşağıdakileri içerebilir:

- 10             $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 15             $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$   
                   $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ .

### 3. L<sup>P</sup>

L<sup>P</sup>, -GGFG-'nin bir tetrapeptit rezidüsüdür (burada G = glisindir (Gly); F = fenilalanindir (Phe)).

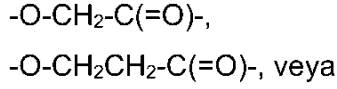
### 20    4. L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-C(=O)-

L<sup>a</sup> in L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-C(=O)- içindeki L<sup>1</sup>, bir -O- yapısıdır veya bir tekli bağıdır. n<sup>2</sup>, 0 ila 5 aralığında, daha tercihen 0 ila 3 aralığında, daha tercihen 0 veya 1 olan bir tam sayıdır.

L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-C(=O)- örnekleri, aşağıdaki yapılara sahip olanları içerebilir:

- 25             $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 30             $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
                   $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 35             $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ .

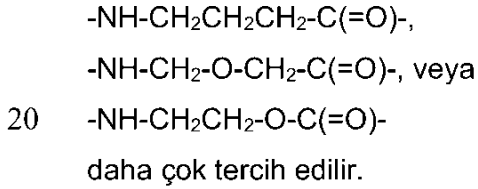
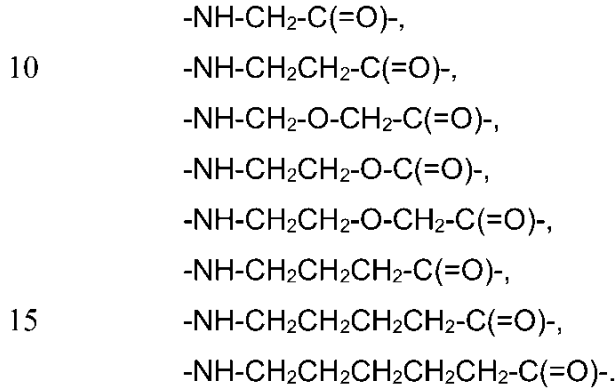
Bunlardan



L<sup>a</sup>'nin tek bir bağ olduğu ve n<sup>2</sup>'nin 0 olduğu durumlarda tercih edilir.

5

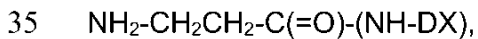
Bağlayıcı içinde -NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n2</sup>-C(=O)- ile temsil edilen yapının spesifik örnekleri aşağıdakileri içerebilir:

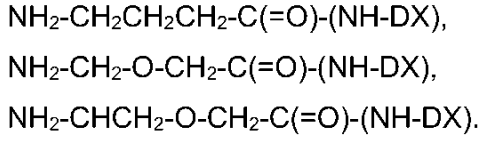


Bağlayıcıda, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n2</sup>-C(=O)- zincir uzunluğu tercihen, 4 ila 7 atomluk bir zincir uzunluğudur ve daha tercihen 5 veya 6 atomluk bir zincir uzunluğudur.

25

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatına ilişkin, anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı tümör hücrelerinin içine transfer edildiğinde, bağlama kısmının yarıldığı ve NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n2</sup>-C(=O)-(NH-DX) ile temsil edilen bir yapıya sahip olan ilaç türevinin bir anti-tümör etki eksprese etmek için salındığı düşünülür. Mevcut buluşun antikoru-ilaç konjugatından salma ile bir anti-tümör etki gösteren anti-tümör türevinin örnekleri, burada bağlayıcının -NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n2</sup>-C(=O)- ile temsil edilen yapısının bir uç amino grubuna sahip olduğu bir yapı kısmına sahip olan bir anti-tümör türevi içerir ve özel olarak tercih edilenler aşağıdakileri içerir:





- 5 Aynı zamanda,  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$  durumunda, molekül içindeki aminal yapı kararsız olduğundan, bunun yine aşağıdaki  $\text{HO-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ 'i salmak için bir kendi kendine parçalanma geçirdiği konfirme edilmiştir. Bu bileşikler ayrıca tercihen, mevcut buluşun anti-ilaç konjugatının bir üretim ara-ürünü olarak da kullanılabilir.
- 10 Burada ekzatekanın bir ilaç olarak kullanıldığı mevcut buluşun anti-ilaç konjugatı için, aşağıdaki yapıya sahip olan  $[-\text{L}^1\text{-L}^2\text{-L}^p\text{-NH-(CH}_2)_n\text{-L}^a\text{-(CH}_2)_n\text{-C(=O)-(NH-DX)}]$  ilaç-bağlayıcı yapı kısmının bir antikora bağlanması tercih edilebilir. Her bir antikör için söz konusu ilaç-bağlayıcı yapı kısmının ortalama konjuge edilmiş sayısı 1 ila 10 aralığında olabilir. Tercihen, bu 2 ila 8 aralığındadır ve daha tercihen 3 ila 8 aralığındadır.
- 15
- $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
  - $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
  - $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
  - $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
- 20
- $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
  - $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
- 25
- $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
  - $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
  - $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
- 30
- $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,
  - $(\text{Süksinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ .

Bunlar arasında, daha çok tercih edilenler aşağıdakilerdir:

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 5 • (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-(NH-DX),
- 10 • (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Özel olarak tercih edilenler aşağıdakilerdir:

- 15 • (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-(NH-DX).
- 20

Mevcut buluşun antikor-ilaç konjugatında anti-TROP2 antikorunu ve bir ilacı konjuge etmek için bağlayıcı yapıya istinaden, tercih edilen bağlayıcı yukarıda açıklanan bağlayıcının her bir parçası için gösterilen tercih edilen yapıları bağlama ile yapılabilir.

- 25 Bağlayıcı yapı için olduğu gibi, aşağıdaki yapıya sahip olanlar tercihen kullanılabilir. Aynı zamanda, yapının sol ucu antikor ile bir bağlama pozisyonudur ve sağ ucu ilaç ile bir bağlama pozisyonudur.

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- 30 • (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- 5 • (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.
- 10

Bunlar arasında, daha çok tercih edilenler aşağıdakilerdir:

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- 15 • (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-,
- 20 • (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

Özel olarak tercih edilenler aşağıdakileri içerir:

- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- 25 • (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Süksinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-.

### 30 [Üretim Yöntemi]

Sonra, mevcut buluşun antikor-ilaç konjugatını veya bunun bir üretim ara ürününü üretmek için temsil yöntem için açıklamalar verilir. Aynı zamanda, bileşik burada aşağıda, her bir reaksiyon formülünde gösterilen bileşik numarası ile tarif edilir. Spesifik olarak, bunlar "formül (1)'in bileşiği" bir "bileşik (1)" veya benzerleri olarak ifade edilir.

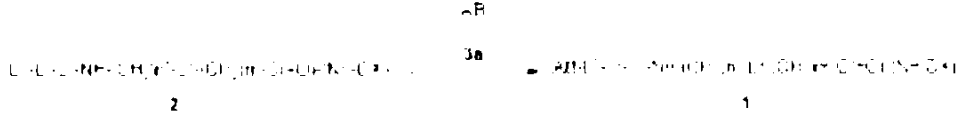
35 Bunlar dışında numaralar taşıyan bileşikler de benzer şekilde tarif edilir.

## 1. Üretim yöntemi 1

Formül (1) ile temsil edilen, tiyoeter vasıtasıyla ilaç-bağlayıcı yapıya bağlanan antikor-ilaç konjugatı, örneğin, aşağıdaki yöntem ile üretilir.

5

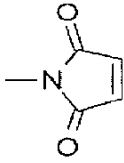
[Formül 17]



[Formülde, AB, bir sülfidril grubuna sahip olan bir antikorı temsil eder ve L<sup>1</sup>, burada bağlayıcı ucun bir maleimidil grubu olduğu L<sup>1</sup> bağlayıcı yapısını temsil eder (formülü aşağıda gösterilir)

10

[Formül 18]

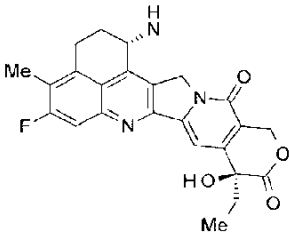


(formülde, nitrojen atomu bağlama pozisyonudur)

ve spesifik olarak burada L<sup>1</sup>'in -(Süksinimid-3-il-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(=O)-'su içindeki -(Süksinimid-3-il-N)- kısmının bir maleimidil grubu olduğu bir grubu temsil eder. İlaveten,

15

[Formül 19]



20

ve bu ekzatekanın pozisyon 1'indeki amino grubunun bir hidrojen atomunu uzaklaştırma ile türetilen bir grubu temsil eder.]

İlaveten, yukarıdaki reaksiyon formülünde formül (1)'in bileşiği, burada ilaçtan bağlayıcı uca karşılık gelen bir yapı kısmının bir antikoru bağladığı bir yapı olarak yorumlanır. Bununla birlikte, bu uygunluk için verilen tek açıklamadır ve gerçekte burada birden fazla yapı kısmının bir antikor molekülüne bağlandığı çok sayıda durum vardır. Bu

5 aşağıda tarif edilen üretim yönteminin açıklaması için de geçerlidir.

Antikor-ilaç konjugatı (1), aşağıda tarif edilen yöntem ile elde edilebilen bileşiği (2) bir sülfidril grubuna sahip olan antikor (3a) ile reaksiyona sokma ile üretilir.

10 Bir sülfidril grubuna sahip olan antikor (3a) teknikte iyi bilinen bir yöntem ile elde edilebilir (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). Örnekler aşağıdakileri içerir: Traut reaktifi antikorun amino grubu ile reaksiyona sokulur; N-süksinimidil S-asetiltiyoalkanoatlar antikorun amino grubu ile reaksiyona sokulur bunu hidroksilamin ile reaksiyon izler; N-süksinimidil 3-

15 (piridilditiyo)propiyonat ile reaksiyona sokulduktan sonra, antikor bir indirgeme ajanı ile reaksiyona sokulur; antikor bir sülfidril grubu oluşturmak amacıyla antikor içindeki bir menteşe parçasındaki disülfid bağını indirgemek için bir indirgeme ajanı, örneğin, ditiyotretol, 2-merkaptoetanol ve tris(2-karboksietil)fosfin hidroklorür (TCEP), ile reaksiyona sokulur ancak bu bunlarla sınırlandırılmaz.

20

Spesifik olarak, antikor içindeki bir menteşe parçasındaki her bir disülfid için bir indirgeme ajanı olarak TCEP'in 0,3 ila 3 molar eş-değerini kullanarak ve bir şelatlama ajanı içeren bir tampon çözeltisi içinde antikor ile reaksiyona sokarak, antikor içindeki menteşe parçasında kısmen veya tamamen indirgenmiş disülfide sahip olan antikor

25 elde edilebilir. Şelatlama ajanlarının örnekleri, etilendiamin tetraasetik asidi (EDTA) ve dietilentriamin pentaasetik asidi (DTPA), içerir. Bu 1 mM ila 20 mM aralığındaki konsantrasyonda kullanılabilir. Kullanılabilen tampon çözeltisinin örnekleri, bir sodyum fosfat, sodyum borat veya sodyum asetat çözeltisini içerir. Spesifik olarak, antikoru 4°C ila 37°C'de 1 ila 4 saat boyunca TCEP ile reaksiyona sokma ile, kısmen veya tamamen

30 indirgenmiş sülfidril grubuna sahip olan antikor (3a) elde edilebilir.

Aynı zamanda, bir ilaç-bağlayıcı kısma bir sülfidril grubu eklemek için reaksiyon gerçekleştirme ile, ilaç-bağlayıcı kısmı bir tiyoeter bağı ile konjuge edilebilir.

Bir sülfidril grubuna sahip olan her bir antikor (3a) için bileşiğin (2) 2 ila 20 molar eş-değeri kullanılarak, burada her bir antikor için 2 ila 8 ilaç molekülünün konjuge edildiği antikor-ilaç konjugatı (1) üretilebilir. Spesifik olarak, bunun içinde çözündürülmüş bileşiği (2) içeren çözeltinin bir sülfidril grubuna sahip olan antikoru (3a) içeren bir tampon çözeltisine eklenmesi reaksiyon için yeterlidir. Burada, kullanılabilen tampon çözeltisinin örnekleri, sodyum asetat çözeltisini, sodyum fosfatı ve sodyum boratı içerir. Reaksiyon için pH, 5 ila 9 aralığındadır ve daha tercihen reaksiyon pH 7'ye yakın pH'ta gerçekleştirilir. Bileşiği (2) çözündürmek için çözücünün örnekleri, bir organik çözücüyü, örneğin, dimetil sülfoksidi (DMSO), dimetilformamidi (DMF), dimetil asetamidi (DMA) ve N-metil-2-piridonu (NMP), içerir.

Bunun içinde çözündürülmüş bileşiği (2) içeren organik çözücü çözeltisinin bir sülfidril grubuna sahip olan antikoru (3a) içeren bir tampon çözeltisine hacim/hacim %1 ila 20'de eklenmesi reaksiyon için yeterlidir. Reaksiyon sıcaklığı 0 ila 37°C aralığındadır, daha tercihen 10 ila 25°C aralığındadır ve reaksiyon süresi 0,5 ila 2 saat aralığındadır. Reaksiyon reaksiyona sokulmamış bileşiğin (2) reaktivitesini bir tiyol-içeren reaktif ile deaktive etme ile sonlandırılabilir. Tiyol-içeren reaktifin örnekleri, sisteini ve N-asetil-L-sisteini (NAC) içerir. Daha spesifik olarak, NAC'ın 1 ila 2 molar eş-değeri kullanılan bileşiğe (2) eklenir ve oda sıcaklığında 10 ila 30 dakika boyunca inkübe etme ile, reaksiyon sonlandırılabilir.

Üretilen antikor-ilaç konjugatı (1), konsantrasyondan sonra, tampon değişimine, saflaştırmaya ve aşağıda tarif edilen ortak prosedürlere göre antikorun konsantrasyonunun ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin ortalama sayısının ölçümüne, antikor-ilaç konjugatının (1) tanımlanmasına tabi tutulabilir.

#### **Ortak prosedür A: Antikorun veya antikor-ilaç konjugatının sulu çözeltisinin konsantrasyonu**

30

Bir Amicon Ultra (50,000 MWCO, Millipore Corporation) kaba, antikorun veya antikor-ilaç konjugatının bir çözeltisi eklenmiştir ve antikorun veya antikor-ilaç konjugatının çözeltisi bir sentrifüj (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.) kullanılarak sentrifügasyon (2000 G ila 3800 G'de 5 ila 20 dakika boyunca sentrifüj) ile konsantre edilmiştir.

35

### **Ortak prosedür B: Antikor konsantrasyonunun ölçümü**

Bir UV dedektör (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) kullanılarak, antikor konsantrasyonunun ölçümü üretici tarafından tanımlanan yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Bu sırada, her bir antikor için farklı olan 280 nm absorpsiyon kat sayısı kullanılmıştır (1,3 mLmg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> ila 1,8 mLmg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

### **Ortak prosedür C-1: Antikor için Tampon Değişimi**

10 Sephadex G-25 taşıyıcı kullanılan NAP-25 kolonu (Kat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) üretici tarafından tanımlanan yöntemle göre sodyum klorür (137 mM) ve etilen diamin tetraasetik asit (EDTA, 5 mM) içeren fosfat tamponu (10 mM, pH 6,0; bu, spesifikasyonda PBS6,0/EDTA olarak ifade edilir) ile dengelenmiştir. Antikoru sulu çözeltisi tek NAP-25 kolonu 2,5 mL olan bir miktarda uygulanmıştır ve akabinde 3,5 mL PBS6,0/EDTA ile ayrıştırılan fraksiyon (3,5 mL) toplanmıştır. Elde edilen fraksiyon Ortak prosedür A ile konsantre edilmiştir. Ortak prosedür B'yi kullanarak antikoru konsantrasyonu ölçüldükten sonra, antikor konsantrasyonu PBS6,0/EDTA kullanılarak 10 mg/mL'ye ayarlanmıştır.

### **20 Ortak prosedür C-2: Antikor için Tampon Değişimi**

Sephadex G-25 taşıyıcı kullanılan NAP-25 kolonu (Kat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) üretici tarafından tanımlanan yöntemle göre sodyum klorür (50 mM) ve EDTA (2 mM) içeren fosfat tamponu (50 mM, pH 6,5; bu, spesifikasyonda PBS6,5/EDTA olarak ifade edilir) ile dengelenmiştir. Antikoru sulu çözeltisi tek NAP-25 kolonu 2,5 mL olan bir miktarda uygulanmıştır ve akabinde 3,5 mL PBS6,5/EDTA ile ayrıştırılan fraksiyon (3,5 mL) toplanmıştır. Elde edilen fraksiyon Ortak prosedür A ile konsantre edilmiştir. Ortak prosedür B'yi kullanarak antikoru konsantrasyonu ölçüldükten sonra, antikor konsantrasyonu PBS6,5/EDTA kullanılarak 20 mg/mL'ye ayarlanmıştır.

### **Ortak prosedür D: Antikor-ilaç konjugatının saflaştırılması**

NAP-25 kolonu piyasada satılan fosfat tamponu (PBS7,4, Kat. No. 10010-023, Invitrogen), sodyum klorür (137 mM) içeren sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH 6,0;

PBS6,0 olarak ifade edilir) ve sorbitol (%5) içeren asetat tamponu(10 mM, pH 5,5; bu, spesifikasyonda ABS olarak ifade edilir) arasından seçilen herhangi bir tampon ile dengelenmiştir. Antikor-ilaç konjugatı reaksiyonunun sulu çözeltisi NAP-25 kolonu yaklaşık 1,5 mL olan bir miktarda uygulanmıştır ve akabinde antikor fraksiyonunu toplamak için üretici tarafından tanımlanan bir miktarda tampon ile ayrıştırılmıştır. Toplanan fraksiyon yeniden NAP-25 kolonuna uygulanmıştır ve tampon ile ayrıştırmak için jel filtrasyon saflaştırma prosesini toplamda 2 ila 3 kere tekrar etme ile, konjuge edilmemiş ilaç bağlayıcıyı ve bir düşük-moleküler-ağırlıklı bileşiği (tris(2-karboksietil)fosfin klorür (TCEP), N-asetil-L-sistein (NAC) ve dimetil sülfoksit) içermeyen antikor-ilaç konjugatı elde edilmiştir.

**Ortak prosedür E: Antikor-ilaç konjugatında antikor konsantrasyonunun ve her bir antikor molekülü (1) için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin ortalama sayısının ölçümü**

15

Antikor-ilaç konjugatında konjuge edilmiş ilaç konsantrasyonu antikor-ilaç konjugatının bir sulu çözeltisinin 280 nm ve 370 nm olan iki dalga boyunda UV absorbansını ölçme, akabinde aşağıda gösterilen hesaplamayı gerçekleştirme ile hesaplanabilir.

20

Herhangi bir dalga boyundaki toplam absorbans bir sistemde bulunan her bir ışık-absorbe eden kimyasal türün absorbansının toplamına eşit olduğundan (absorbansın toplanabilirliği), antikorun ve ilacın molar absorpsiyon kat sayıları antikor ve ilaç arasındaki konjugasyondan önce ve sonra aynı kaldığında, antikor-ilaç konjugatında antikor konsantrasyonu ve ilaç konsantrasyonu aşağıdaki denklemler ile ifade edilir.

25

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad (\text{Denklem 1})$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad (\text{Denklem 2})$$

Yukarıda,  $A_{280}$  antikor-ilaç konjugatının bir sulu çözeltisinin 280 nm'deki absorbansını temsil eder,  $A_{370}$  antikor-ilaç konjugatının bir sulu çözeltisinin 370 nm'deki absorbansını temsil eder,  $A_{A,280}$  bir antikorun 280 nm'deki absorbansını temsil eder,  $A_{A,370}$  bir antikorun 370 nm'deki absorbansını temsil eder,  $A_{D,280}$  bir konjugat öncülünün 280 nm'deki absorbansını temsil eder,  $A_{D,370}$  bir konjugat öncülünün 370 nm'deki absorbansını temsil eder,  $\epsilon_{A,280}$  bir antikorun 280 nm'deki molar absorpsiyon kat sayısını temsil eder,  $\epsilon_{A,370}$  bir antikorun 370 nm'deki molar absorpsiyon kat sayısını

temsil eder,  $\epsilon_{D,280}$  bir konjugat öncülünün 280 nm'deki molar absorpsiyon kat sayısını temsil eder,  $\epsilon_{D,370}$  bir konjugat öncülünün 370 nm'deki molar absorpsiyon kat sayısını temsil eder,  $C_A$  bir antikor-ilaç konjugatında antikor konsantrasyonunu temsil eder ve  $C_D$  bir antikor-ilaç konjugatında ilaç konsantrasyonunu temsil eder.

5

Yukarıdaki  $\epsilon_{A,280}$ 'e,  $\epsilon_{A,370}$ 'e,  $\epsilon_{D,280}$ 'e ve  $\epsilon_{D,370}$ 'e gelince, önceden hazırlanan değerler (hesaplamaya göre tahmin edilen değer veya bileşiğin UV ölçümü ile elde edilen ölçüm değeri) kullanılır. Örneğin,  $\epsilon_{A,280}$  bir bilinen hesaplama yöntemi (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) kullanılarak bir antikorun amino asit dizisinden tahmin edilebilir.  $\epsilon_{A,370}$

10

genel olarak, sıfırdır.  $\epsilon_{D,280}$  ve  $\epsilon_{D,370}$ , içinde kullanılacak olan konjugat öncülünün belirli bir molar konsantrasyonda çözündürüldüğü bir çözeltinin absorbansını ölçme ile Lambert-Beer kuralına (Absorbans = molar konsantrasyon x molar absorpsiyon kat sayısı x hücre yol uzunluğu) göre elde edilebilir.  $A_{280}$ 'i ve antikor-ilaç konjugatının bir sulu çözeltisinin  $A_{280}$ 'ini ölçme ve değerleri kullanarak eş-zamanlı denklemler (I)'i ve (II)'yi çözme ile,  $C_A$  ve  $C_D$  elde edilebilir. İlaveten,  $C_D$ 'yi  $C_A$ 'ya bölme ile, her bir antikor için konjuge edilmiş ilacın ortalama sayısı elde edilebilir.

15

### **Ortak prosedür F: Antikor-ilaç konjugatında her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin ortalama sayısının ölçümü - (2)**

20

Antikor-ilaç konjugatında her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin ortalama sayısı ayrıca, yukarıda bahsedilen Ortak prosedür E'ye ek olarak, aşağıda tarif edilen bir yöntem kullanılarak yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi ile de belirlenebilir.

25

#### **[F-1. HPLC analizi için örneğin preparasyonu (antikor-ilaç konjugatının indirgenmesi)]**

30

Bir antikor-ilaç konjugatı çözeltisi (yaklaşık 1 mg/mL, 60  $\mu$ L) bir sulu ditiyotreitol (DTT) çözeltisi (100 mM, 15  $\mu$ L) ile karıştırılır. Karışım antikor-ilaç konjugatının L zinciri ve H zinciri arasındaki disülfid bağına yarmak için 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilir. Elde edilen örnek HPLC analizi için kullanılır.

#### **[F-2. HPLC analizi]**

35

HPLC analizi aşağıdaki ölçüm koşulları altında gerçekleştirilir:

- HPLC sistemi: Agilent 1290 HPLC system (Agilent Technologies, Inc.)  
 Dedektör: UV absorpsiyon spektrometresi (ölçüm dalga boyu: 280 nm)  
 Kolon: PLRP-S (2,1 x 50 mm, 8 µm, 1000 angstrom; Agilent Technologies, Inc.,  
 5 P/N PL1912-1802)  
 Kolon sıcaklığı: 80°C  
 Mobil faz A: %0,04 sulu trifloroasetik asit (TFA) çözeltisi  
 Mobil faz B: %0,04 TFA içeren asetonitril çözeltisi  
 Gradyan program: %29-%36 (0 dk-12,5 dk), %36-%42 (12,5-15 dk), %42-%29  
 10 (15 dk-15,1 dk), %29-%29 (15,1 dk-25 dk)

**Örnek enjeksiyon hacmi: 15 µL**

**[F-3. Veri analizi]**

- [F-3-1] Bir konjuge edilmemiş antikorun bir L zinciri ( $L_0$ ) ve bir H zinciri ( $H_0$ ) ile  
 15 karşılaştırıldığında, bir ilaç-konjuge edilmiş L zinciri (bir ilaç molekülüne  
 bağlanmış L zinciri:  $L_1$ ) ve H zincirleri (bir ilaç molekülüne bağlanmış H zinciri:  
 $H_1$ , iki ilaç molekülüne bağlanmış H zinciri:  $H_2$ ; üç ilaç molekülüne bağlanmış H  
 zinciri:  $H_3$ ) konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin sayısı ile orantılı olarak daha  
 yüksek hidrofobisite gösterir ve böylelikle bir daha büyük alıkonulma süresine  
 20 sahiptir. Bu zincirler bundan dolayı  $L_0$  ve  $L_1$  veya  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$  ve  $H_3$  sırasında  
 ayrıştırılır. Saptama pikleri  $L_0$  ve  $H_0$  ile alıkonulma sürelerinin karşılaştırılması ile  
 $L_0$ 'ın,  $L_1$ 'in,  $H_0$ 'ın,  $H_1$ 'in,  $H_2$ 'nin ve  $H_3$ 'ün herhangi birine tayin edilebilir.  
 [F-3-2] İlaç bağlayıcı UV absorpsiyonuna sahip olduğundan, pik alan değerleri L  
 zincirinin ve H zincirinin ve ilaç bağlayıcının molar absorpsiyon kat sayıları  
 25 kullanılarak aşağıdaki ifadeye göre konjuge edilmiş ilaç bağlayıcı moleküllerin  
 sayısına yanıtta düzeltilir.

[Ifade 1]

L zincirinin ( $L_i$ ) pik alanının düzeltilen değeri

= Pik alan

$$\times \frac{L \text{ zincirinin molar ekstinksiyon kat say } s}{L \text{ zincirinin molar ekstinksiyon kat say } s + \text{Konjuge ilaç moleküllerinin sayısı } x \text{ ilaç bağlayıcının molar ekstinksiyon kat sayısı}}$$

[Ifade 2]

H zincirinin ( $H_i$ ) pik alanının düzeltilen değeri

= Pik alan

$$\times \frac{H \text{ zincirinin molar ekstinksiyon kat say } s}{H \text{ zincirinin molar ekstinksiyon kat say } s + \text{Konjuge ilaç moleküllerinin sayısı} \times \text{ilaç bağlayıcının molar ekstinksiyon kat sayısı}}$$

5 burada, her bir antikorun L zincirinin veya H zincirinin molar ekstinksiyon kat sayısına (280 nm) gelince, bir bilinen hesaplama yöntemi (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) ile her bir antikorun L zincirinin veya H zincirinin amino asit dizisinden tahmin edilen bir değer kullanılabilir. hTINA durumunda, 34690 olan bir molar ekstinksiyon kat sayısı ve 95000 olan bir molar ekstinksiyon kat sayısı bunun amino asit dizisine göre, sırasıyla, L zinciri ve H zinciri için tahmin edilen değerler olarak kullanılmıştır. İlaç bağlayıcının molar ekstinksiyon kat sayısına (280 nm) gelince, içinde maleimid grubunun her bir ilaç bağlayıcının merkaptolanol veya N-asetilsistein ile reaksiyonu ile süksinimid tiyoetere dönüştürülmüş olduğu bir bileşiğin ölçülen molar ekstinksiyon kat sayısı (280 nm) kullanılmıştır.

10 [F-3-3] Her bir zincirin pik alan oranı (%) aşağıdaki ifadeye göre pik alanlarının düzeltilmiş değerlerinin toplamı için hesaplanır.

[Ifade 3]

$$\begin{aligned} \text{L zincirinin pik alan oranı} &= \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100 \\ \text{H zincirinin pik alan oran} &= \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100 \end{aligned}$$

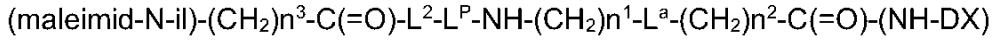
$A_{Li}$ ,  $A_{Hi}$ :  $L_i$ 'nin ve  $H_i$ 'nin ilgili pik alanlarının düzeltilmiş değerleri

20 [F-3-4] Antikor-ilaç konjugatında her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin ortalama sayısı aşağıdaki ifadeye göre hesaplanır.

Konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin ortalama sayısı =  $L_0$  pik alan oranı x 0 +  $L_0$  pik alan oranı x 1 +  $H_0$  pik alan oranı x 0 +  $H_1$  pik alan oranı x 1 +  $H_2$  pik alan oranı x 2 +  $H_3$  pik alan oranı x 3) / 100 x 2

5

Üretim yöntemi 1'de formül (2) ile temsil edilen bileşik aşağıdaki formül ile temsil edilen bir bileşiktir:



10

Formülde,

$n^3$ , 2 ila 8 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

$\text{L}^2$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 'yu veya bir tekli bağı temsil eder,

15

burada  $n^4$ , 1 ila 6 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

$\text{L}^P$ ,  $-\text{GGFG}$ 'nin bir tetrapeptit rezidüsünü temsil eder,

$n^1$ , 0 ila 6 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

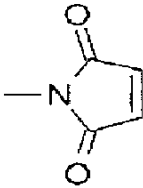
$n^2$ , 0 ila 5 aralığındaki bir tam sayıyı temsil eder,

$\text{L}^a$ ,  $-\text{O}$ 'yu veya bir tekli bağı temsil eder,

20

(maleimid-N-il)-, aşağıdaki formül ile temsil edilen bir maleimidil grubudur (2,5-diokso-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il grubudur):

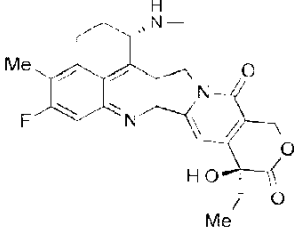
[Formül 20]



25

Burada nitrojen atomu, bir bağlama pozisyonudur,  $-(\text{NH-DX})$ , aşağıdaki formül ile temsil edilen bir gruptur:

[Formül 21]



burada pozisyon 1'deki amino grubunun nitrojen atomu bir bağlama pozisyonudur.

5

$L^2$ , bir tekli bağ veya  $-NH-(CH_2CH_2-O)^{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$  olduğunda, burada  $n^4$ 'ün 2 ile 4 aralığındaki bir tam sayı olduğu bir bileşik bir üretim ara ürünü olarak tercih edilir.

İlaveten,  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$  için olduğu gibi,  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$  veya  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  yapısına sahip olan bir bileşik bir üretim ara ürünü olarak tercih edilir.  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$  veya  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2$  yapısına sahip olan bir bileşik daha çok tercih edilir.

İlaveten, formül (2) ile temsil edilen bileşikte, burada  $n^3$ 'ün 2 ile 5 aralığındaki bir tam sayı,  $L^2$ 'nin bir tekli bağ ve  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$ 'nin  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$  veya  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  olduğu bir bileşik bir üretim ara ürünü olarak tercih edilir. Burada  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$ 'nin  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$  veya  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  olduğu bir bileşik daha çok tercih edilir. Burada  $n^3$ 'ün 2 veya 5 olan bir tam sayı olduğu bir bileşik ilaveten tercih edilir.

İlaveten, formül (2) ile temsil edilen bileşikte, burada  $n^3$ 'ün 2 ile 5 aralığındaki bir tam sayı,  $L^2$ 'nin  $-NH-(CH_2CH_2-O)^{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$  olduğu,  $n^4$ 'ün 2 ile 4 aralığındaki bir tam sayı olduğu ve  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$ 'nin  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$  veya  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  olduğu bir bileşik bir üretim ara ürünü olarak tercih edilir. Burada  $n^4$ 'ün 2 ile 4 aralığındaki bir tam sayı olduğu bir bileşik daha çok tercih edilir. Burada  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$ 'nin  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$  veya  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  olduğu bir bileşik ilaveten tercih edilir.

30

Mevcut buluşun bileşiminin üretiminde kullanışlı olan bu tarz tercih edilen ara ürünler olarak, aşağıdakiler emsallendirilebilir:

- 5 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 10 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 15 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 20 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 25 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 30 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 35 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

- (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
 5 (NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
 GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-  
 C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 10 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-  
 O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı, üretim ara ürünü bileşiklerinin yukarıda tarif edilen grubundan seçilen bir ilaç-bağlayıcı bileşiği bir anti-TROP2  
 15 antikoru veya bunun bir reaktif türevi ile reaksiyona sokma ve anti-TROP2 antikorusunun bir menteşe parçasında bulunan bir disülfid bağda bir tiyoeter bağ oluşturma ile üretilebilir. Bu durumda, anti-TROP2 antikorusunun bir reaktif türevi tercihen kullanılır. Özel olarak, anti-TROP2 antikorusunu indirgeme ile elde edilen bir reaktif türev tercih edilir.

20

Aşağıdakiler üretim ara ürünleri olarak daha çok tercih edilen bileşiklerdir:

- (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 25 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
 (NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 30 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-  
 35 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

5 Ara ürün bileşiklerinin yukarı tarif edilen grubu arasında, aşağıdaki formül ile temsil edilen bir bileşik bir ilaveten tercih edilen bileşiktir:

(maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 10 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX) veya  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

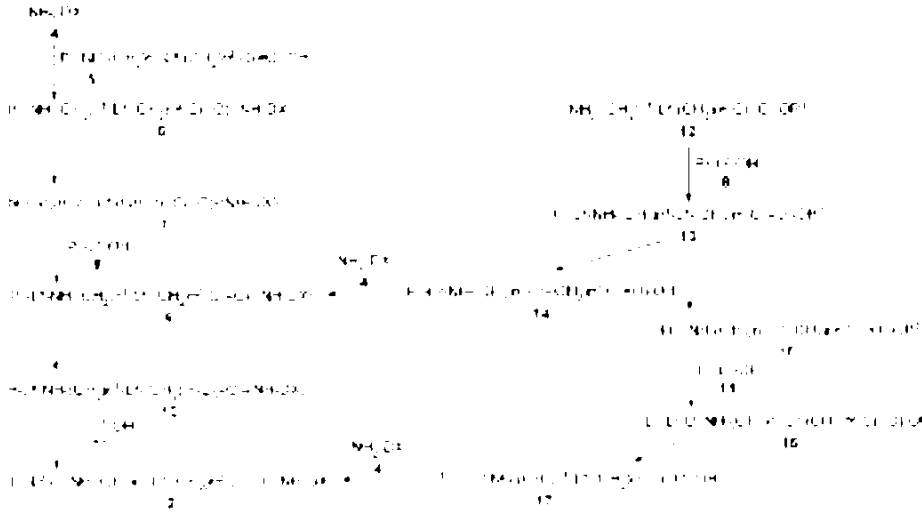
15 Konjugatın miktarını güvenceye almak için, bir eş-değer sayıda (örn., yaklaşık ± 1) ilaca sahip olacak şekilde benzer üretim koşulları altında elde edilmiş olan birden fazla konjugat yeni lotlar hazırlamak için karıştırılabilir. Bu durumda, ilaçların ortalama sayısı karıştırmadan önce konjugatlardaki ilaçların ortalama sayıları arasındadır.

## 2. Üretim yöntemi 2

20

Önceki üretim yönteminde kullanılan bir ara ürün olarak formül (2) ile temsil edilen bileşik ve bunun bir farmakolojik olarak kabul edilebilir tuzu, örneğin, aşağıdaki yöntem ile üretilebilir.

25 [Formül 22]



Formülde L<sup>1</sup>, bir maleimidil grubunu temsil eder ve P<sup>1</sup>'in, P<sup>2</sup>'nin ve P<sup>3</sup>'ün her biri bir koruma grubunu temsil eder.

Bileşik (6), karboksilik asidi (5) bir aktif estere, karma asit anhidride, asit halide veya benzerlerine türevlendirme ve bunu bir baz varlığında NH<sub>2</sub>-DX (4) veya bunun bir farmakolojik olarak kabul edilebilir tuzu ile reaksiyona sokma ile üretilebilir. NH<sub>2</sub>-DX (4), ekzatekanı (kimyasal adı: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-floro-2,3-dihidro-9-hidroksi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-10,13(9H,15H)-dion) temsil eder.

Peptit sentezi için yaygın bir şekilde kullanılan reaksiyon reaktifleri ve koşulları reaksiyona için kullanılabilir. Burada çeşitli aktif ester çeşitleri vardır. Örneğin, bu, fenoller, örneğin, p-nitrofenölü, N-hidroksi benzotriazolü, N-hidroksi süksinimidi veya benzerlerini, bir yoğunlaştırma ajanı, örneğin, N,N'-disikloheksilkarbodiimid veya 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür, kullanarak karboksilik asit (5) ile reaksiyona sokma ile üretilebilir. İlâveten, aktif ester ayrıca, karboksilik asidin (5) pentaflorofenil trifloroasetat veya benzerleri ile bir reaksiyonu; karboksilik asidin (5) 1-benzotriazolil oksitripirrolidinofosfonyum hekzaflorofosfit bir reaksiyonu; karboksilik asidin (5) dietil siyanofosfonat ile bir reaksiyonu (tuzla çözünme yöntemi); karboksilik asidin (5) trifenilfosfin ve 2,2'-dipiridil disülfid ile bir reaksiyonu (Mukaiyama yöntemi); karboksilik asidin (5) bir triazin türevi, örneğin, 4-(4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinyum klorür (DMTMM) ile bir reaksiyonu veya benzerleri ile de üretilebilir. İlâveten, reaksiyon ayrıca, örn., bununla karboksilik aside (5) bir baz varlığında asit

halid, örneğin, tiyonil klorür veya okzalil klorür, ile muamele edildiği bir asit halid yöntemi, ile de gerçekleştirilebilir.

- 5 Yukarıda olduğu şekilde elde edilen karboksilik asidin (5) aktif esterini, karma asit anhidridini veya asit halidini  $-78^{\circ}\text{C}$  ila  $150^{\circ}\text{C}$  aralığındaki bir reaksiyon sıcaklığında bir inert çözücü içinde bir uygun baz varlığında bileşik (4) ile reaksiyona sokma ile, bileşik (6) üretilebilir. Aynı zamanda, "inert çözücü", bunun için çözücünün kullanıldığı bir hedef reaksiyonu inhibe etmeyen bir çözücüyü gösterir.
- 10 Yukarıda tarif edilen her bir adım için kullanılan bazın spesifik örnekleri, bir alkali metalin veya bir toprak alkali metalin, sodyum karbonatı, potasyum karbonatı, sodyum etoksidi, potasyum bütoksidi, sodyum hidroksidi, potasyum hidroksidi, sodyum hidridi ve potasyum hidridi, içeren, karbonatı, alkoksidi, hidroksidi veya hidridi, n-bütül lityumu içeren bir alkil lityum, lityum diizopropilamidi içeren dialkilamino lityum ile temsil edilen
- 15 organometalik bazı; bissililaminin, lityum bis(trimetilsilil)amidi, içeren organometalik bazını ve tersiyer amini veya nitrojen-içeren heterosiklik bileşiği, örneğin, pyridini, 2,6-lütidini, kollidini, 4-dimetilaminopiridini, trietilamini, N-metilmorfolini, diizopropiletilamini ve diazabisiklo[5.4.0]undek-7-eni (DBU), içeren, organik bazı içerebilir.
- 20 Mevcut buluşun reaksiyonu için kullanılan inert çözücünün örnekleri, bir halojenlenmiş hidrokarbon çözücüyü, örneğin, diklorometanı, kloroformu ve karbon tetraklorürü; bir eter çözücüyü, örneğin, tetrahidrofüranı, 1,2-dimetoksietanı ve dioksanı; bir aromatik hidrokarbon çözücüyü, örneğin, benzeni ve tolüeni ve bir amid çözücüyü, örneğin, N,N-dimetilformamidi, N,N-dimetilasetamidi ve N-metilpirrolidin-2-onu içerir. Bunlara ek
- 25 olarak, bir sülfoksit çözücü, örneğin, dimetil sülfoksit ve sülfolan; bir keton çözücü, örneğin, aseton ve metil etil keton ve bir alkol çözücü, örneğin, metanol ve etanol bazı durumlarda kullanılabilir. İlâveten, bu çözücüler kullanım için karıştırılabilir.

- Bileşiğin (6) uç amino grubu için, koruma grubuna  $P^1$  gelince, peptit sentezi için genel
- 30 olarak kullanılan bir amino grubu için bir koruma grubu, örneğin, ter-bütüloksi karbonil grubu, 9-florenilmetiloksi karbonil grubu ve benziloksi karbonil grubu, kullanılabilir. Bir amino grubu için başka koruma grubunun örnekleri, bir alkanoil grubunu, örneğin, asetil grubunu; bir alkoksikarbonil grubunu, örneğin, metoksikarbonil grubunu ve etoksikarbonil grubunu; bir arilmetoksi karbonil grubunu, örneğin,
- 35 parametoksibenziloksi karbonil grubunu ve para (veya orto)nitroibenziloksi karbonil

grubunu; bir arilmetil grubunu, örneğin, benzil grubunu ve trifenil metil grubunu; bir aroil grubunu, örneğin, benzoil grubunu ve bir aril sülfonil grubunu, örneğin, 2,4-dinitrobenzen sülfonil grubunu ve ortonitrobenzen sülfonil grubunu içerebilir. Koruma grubu P<sup>1</sup>, örn., korunacak olan bir amino grubuna sahip olan bir bileşiğin özelliklerine, göre seçilebilir.

Elde edilen bileşiğin (6) uç amino grubu için koruma grubunun P<sup>1</sup> koruyucu grubunu uzaklaştırma ile, bileşik (7) üretilebilir. Bu koruyucu grubun uzaklaştırılması için, reaktifler ve koşullar koruma grubuna bağlı olarak seçilebilir.

10

Bileşik (9), P<sup>2</sup> ile korunmuş N ucuna sahip olan peptit karboksilik asidi (8) bir aktif estere, karma asit anhidride veya benzerlerine türevlendirme ve bunu elde edilen bileşik (7) ile reaksiyona sokma ile üretilebilir. Peptit karboksilik asit (8) ve bileşik (7) arasında bir peptit bağı oluşturmak için kullanılan reaksiyon koşulları, reaktifler, baz ve inert çözücü uygun bir şekilde seçilebilir ve bileşiğin (6) sentezi için tarif edilenlerden kullanılabilir. Koruma grubu P<sup>2</sup> uygun bir şekilde seçilebilir ve bileşiğin (6) koruma grubu için tarif edilenlerden kullanılabilir ve seleksiyon, örn., korunacak olan bir amino grubuna sahip olan bileşiğin özelliklerine, göre yapılabilir. Bu genel olarak peptit sentezi için kullanıldığından, Elongasyon için peptit karboksilik asidi (8) oluşturan amino asidin veya peptidin reaksiyonunu ve koruyucu grubunun uzaklaştırılmasını sıralı bir şekilde tekrar etme ile, bileşik (9) da üretilebilir.

15

20

Elde edilen bileşiğin (9) amino grubu için koruma grubunun P<sup>2</sup> koruyucu grubunu uzaklaştırma ile, bileşik (10) üretilebilir. Bu koruyucu grubun uzaklaştırılması için, reaktifler ve koşullar koruma grubuna bağlı olarak seçilebilir.

25

Bileşiği (2) karboksilik asidi (11) bir aktif estere, karma asit anhidride, asit halide veya benzerlerine türevlendirme ve bunu elde edilen bileşik (10) ile reaksiyona sokma ile üretmek mümkündür. Karboksilik asit (11) ve bileşik (10) arasında bir peptit bağı oluşturmak için kullanılan reaksiyon koşulları, reaktifler, baz ve inert çözücü uygun bir şekilde seçilebilir ve bileşiğin (6) sentezi için tarif edilenlerden kullanılabilir.

30

Bileşik (9) ayrıca, örneğin, aşağıdaki yöntem ile de üretilebilir.

Bileşik (13), P<sup>2</sup> ile korunmuş N ucuna sahip olan peptit karboksilik asidi (8) bir aktif estere, karma asit anhidride veya benzerlerine türevlendirme ve bunu P<sup>3</sup> ile korunmuş karboksi grubuna sahip olan amin bileşiği (12) ile bir baz varlığında reaksiyona sokma ile üretilebilir. Peptit karboksilik asit (8) ve bileşik (12) arasında bir peptit bağı  
5 oluşturmak için kullanılan reaksiyon koşulları, reaktifler, baz ve inert çözücü uygun bir şekilde seçilebilir ve bileşiğin (6) sentezi için tarif edilenlerden kullanılabilir.

Bileşiğin (13) amino grubu için koruma grubu P<sup>2</sup> yaygın bir şekilde kullanılan bir koruma grubu ile korunabilir.

10

Spesifik olarak, bir hidroksil grubu için koruma grubunun örnekleri, bir alkoksümetil grubunu, örneğin, metoksümetil grubunu; bir arilmetil grubunu, örneğin, benzil grubunu, 4-metoksibenzil grubunu ve trifenilmetil grubunu; bir alkanoil grubunu, örneğin, asetil grubunu; bir aroil grubunu, örneğin, benzoil grubunu ve bir silil grubunu, örneğin, ter-  
15 bütül difenilsilil grubunu içerir. Karboksi grubu, örn., bir alkil grubu, örneğin, metil grubu, etil grubu ve ter-bütül grubu, bir allil grubu veya bir arilmetil grubu, örneğin, benzil grubu, ile bir ester olarak, korunabilir. Bir amino grubu için koruma grubunun örnekleri, örneğin, bir alkiloksi karbonil grubunu, örneğin, ter-bütüloksi karbonil grubunu, metoksikarbonil grubunu ve etoksikarbonil grubunu; alliloksikarbonil grubunu veya bir  
20 arilmetoksi karbonil grubunu, örneğin, 9-florenilmetiloksi karbonil grubunu, benziloksi karbonil grubunu, parametoksibenziloksi karbonil grubunu ve para (veya orto)nitrobenziloksi karbonil grubunu; bir alkanoil grubunu, örneğin, asetil grubunu; bir arilmetil grubunu, örneğin, benzil grubunu ve trifenil metil grubunu; bir aroil grubunu, örneğin, benzoil grubunu ve bir aril sülfonil grubunu, örneğin, 2,4-dinitrobenzen sülfonil  
25 grubunu veya ortonitrobenzen sülfonil grubunu, içerir.

Bir karboksi grubu için koruma grubuna P<sup>3</sup> gelince, organik sentetik kimyada, özel olarak, peptit sentezinde, bir karboksi grubu için bir koruma grubu olarak yaygın bir şekilde kullanılan bir koruma grubu kullanılabilir. Spesifik örnekleri, bir alkil grubu,  
30 örneğin, bir metil grubu, bir etil grubu veya bir ter-bütül grubu olan esterleri, allil esterleri ve benzil esterleri içerir ve koruma grubu yukarıda tarif edilen koruma gruplarından uygun bir şekilde seçilebilir. Bu tarz durumda, bir amino grubu için koruma grubunun ve bir karboksi grubu için koruma grubunun tercihen bir farklı yöntem veya farklı koşullar ile uzaklaştırılmış olanlar olabilmesi tercih edilir. Örneğin, bir temsili örnek, burada  
35 P<sup>2</sup>'nin bir ter-bütüloksi karbonil grubu olduğu ve P<sup>3</sup>'ün bir benzil grubu olduğu bir

kombinasyonu içerir. Koruma grupları, örn., korunacak olan bir amino grubuna ve bir karboksi grubuna sahip olan bir bileşiğin özelliklerine, göre yukarıda bahsedilenlerden seçilebilir. Koruma gruplarının uzaklaştırılması için, reaktifler ve koşullar koruma grubuna bağlı olarak seçilebilir.

5

Elde edilen bileşiğin (13) karboksi grubu için koruma grubunun P<sup>3</sup> koruyucu grubunu uzaklaştırma ile, bileşik (14) üretilebilir. Bu koruyucu grubun uzaklaştırılması için, reaktifler ve koşullar koruma grubuna bağlı olarak seçilebilir.

10 Bileşik (9), bileşiği (14) bir aktif estere, karma asit anhidride, asit halide veya benzerlerine türevlendirme ve bileşik (4) ile bir baz varlığında reaksiyona sokma ile üretilebilir. Reaksiyon için, peptit sentezi için genel olarak kullanılan reaksiyon reaktifleri ve koşulları da kullanılabilir ve reaksiyon için reaksiyon koşulları, reaktifler, baz ve inert çözücü bileşiğin (6) sentezi için tarif edilenlerden uygun bir şekilde seçilebilir.

15

Bileşik (2) ayrıca, örneğin, aşağıdaki yöntem ile de üretilebilir.

20 Bileşiğin (13) amino grubu için koruma grubunun P<sup>2</sup> koruyucu grubunu uzaklaştırma ile, bileşik (15) üretilebilir. Bu koruyucu grubun uzaklaştırılması için, reaktifler ve koşullar koruma grubuna bağlı olarak seçilebilir.

25 Bileşik (16) karboksilik asit türevini (11) aktif estere, karma asit anhidride, asit halide veya benzerlerine türevlendirme ve bunu elde edilen bileşik (15) ile bir baz varlığında reaksiyona sokma ile üretilebilir. Peptit karboksilik asit (11) ve bileşik (15) arasında bir amid bağı oluşturmak için kullanılan reaksiyon koşulları, reaktifler, baz ve inert çözücü bileşiğin (6) sentezi için tarif edilenlerden uygun bir şekilde seçilebilir.

30 Elde edilen bileşiğin (16) karboksi grubu için koruma grubunun koruyucu grubunu uzaklaştırma ile, bileşik (17) üretilebilir. Bu koruyucu grubun uzaklaştırılması, bileşiği (14) üretmek için karboksi grubunda koruyucu grubun uzaklaştırılmasına benzer bir şekilde gerçekleştirilebilir.

35 Bileşik (2), bileşiği (17) aktif estere, karma asit anhidride, asit halide veya benzerlerine türevlendirme ve bunu bileşik (4) ile bir baz varlığında reaksiyona sokma ile üretilebilir. Reaksiyon için, peptit sentezi için genel olarak kullanılan reaksiyon reaktifleri ve

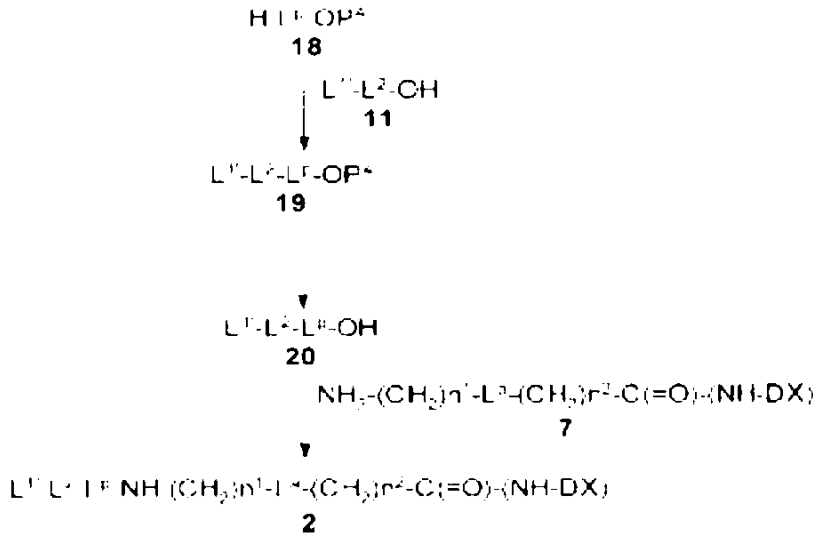
koşulları da kullanılabilir ve reaksiyon için reaksiyon koşulları, reaktifler, baz ve inert çözücü bileşiğin (6) sentezi için tarif edilenlerden uygun bir şekilde seçilebilir.

### 3. Üretim yöntemi 3

5

Bir ara ürünün formül (2) ile temsil edilen bileşiği ayrıca aşağıdaki yöntem ile de üretilebilir.

[Formül 23]



- 10 Formülde, L<sup>1</sup>, burada ucun bir maleimidil grubuna dönüştürüldüğü bir yapıya sahip olan L<sup>1</sup>'e karşılık gelir ve P<sup>4</sup>, bir koruma grubunu temsil eder.

15 Bileşik (19), bileşiği (11) aktif estere, karma asit anhidride veya benzerlerine türevlendirme ve bunu P<sup>4</sup> ile korunmuş C ucuna sahip olan peptit karboksilik asit (18) ile bir baz varlığında reaksiyona sokma ile üretilebilir. Peptit karboksilik asit (18) ve bileşik (11) arasında bir peptit bağı oluşturmak için kullanılan reaksiyon koşulları, reaktifler, baz ve inert çözücü bileşiğin (6) sentezi için tarif edilenlerden uygun bir şekilde seçilebilir. Bileşiğin (18) karboksi grubu için koruma grubu P<sup>4</sup> yukarıda tarif edilen koruma grubundan uygun bir şekilde seçilebilir.

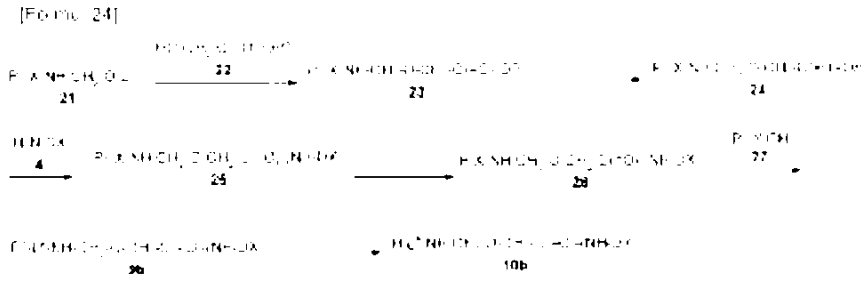
20

Elde edilen bileşiğin (19) karboksi grubu için koruma grubunun koruyucu grubunu uzaklaştırma ile, bileşik (20) üretilebilir. Bu koruyucu grubun uzaklaştırılması, bileşiği (14) üretmek için karboksi grubunda koruyucu grubun uzaklaştırılmasına benzer bir şekilde gerçekleştirilebilir.

Bileşik (2), elde edilen bileşiği (20) aktif estere, karma asit anhidride veya benzerlerine türevlendirme ve bunu bileşik (7) ile reaksiyona sokma ile üretilebilir. Reaksiyon için, peptit sentezi için genel olarak kullanılan reaksiyon reaktifleri ve koşulları da kullanılabılır ve reaksiyon için reaksiyon koşulları, reaktifler, baz ve inert çözücü bileşiğin (6) sentezi için tarif edilenlerden uygun bir şekilde seçilebilir.

#### 4. Üretim yöntemi 4

10 Burada aşağıda, Üretim yöntemi 2'de tarif edilen üretim ara ürününde (10)  $n^1 = 1$ 'e,  $L^1 = O$ 'ya sahip olan bileşiği (10b) üretmek için yöntem detaylı bir şekilde tarif edilir. Formül (10b) ile temsil edilen bileşik, bunun bir tuzu veya bir solvatu, örneğin, aşağıdaki yöntemle göre üretilebilir.



Formülde,  $L^P$ , yukarıda tanımlandığı şekildedir, L, bir alkanoil grubu, örneğin, bir asetil grubu veya bir alaşım grubu, örneğin, bir benzoil grubu, bir hidrojen atomu veya benzerleri olan bir açil grubunu temsil eder, X'in ve Y'nin her biri 1 ila 3 amino asitten oluşan bir oligopeptidi temsil eder,  $P^{5'}$ 'in ve  $P^{7'}$ 'nin her biri bir amino grubu için bir koruma grubunu temsil eder ve  $P^6$ , bir karboksi grubu için bir koruma grubunu temsil eder.

25 Formül (21) ile temsil edilen bir bileşik 2002-60351 Numaralı Yayınlanmış Japon Patentinde veya literatürde (J. Org. Chem., Vol. 51, page 3196, 1986) tarif edilen yöntemi kullanma veya uygulama ile ve gerektiğinde, koruma gruplarının uzaklaştırılmasını veya fonksiyonel grupların modifikasyonunu gerçekleştirme ile üretilebilir. Alternatif olarak, bu ayrıca bir korunmuş uç amino grubuna sahip olan bir amino aside veya korunmuş amino grubuna sahip olan oligopeptidin asit amidine 30 aldehit veya keton ile muamele etme ile de elde edilebilir.

Bileşiği (21) bir hidrosil grubuna sahip olan bileşik (22) ile bir asit veya bir baz varlığında bir inert çözücü içinde soğutma sıcaklık koşulları altındaki sıcaklık ile oda sıcaklığı arasındaki bir sıcaklıkta reaksiyona sokma ile, bileşik (23) üretilebilir.

5

Burada kullanılabilen asidin örnekleri, inorganik asidi, örneğin, hidroflorik asidi, hidrojen klorürü, sülfürik asidi, nitrik asidi, fosforik asidi ve borik asidi; bir organik asidi, örneğin, asetik asidi, sitrik asidi, paratolüen sülfonik asidi ve metansülfonik asidi ve bir Lewis asidini, örneğin, tetrafloroboratu, çinko klorürü, kalay klorürü, alüminyum klorürü ve demir klorürü içerebilir. Bunlar arasında, sülfonik asitler, özel olarak, paratolüen sülfonik asit tercih edilebilir. Baza gelince, yukarıda bahsedilen bazın herhangi biri uygun bir şekilde seçilebilir ve kullanılabilir. Bunların tercih edilen örnekleri, bir alkali metal alkoksidini, örneğin, potasyum ter-bütioksidi; bir alkali metal hidroksidini, örneğin, sodyum hidroksidi ve potasyum hidroksidi; alkali metal hidridini, örneğin, sodyum hidridi ve potasyum hidridi; dialkilamino lityum, örneğin, lityum diizopropilamid, ile temsil edilen organometalik bazı ve bissililaminin, örneğin, lityum bis(trimetilsilil)amidin, organometalik bazını içerir. Reaksiyon için kullanılacak olan çözücünün örnekleri, bir eter çözücüyü, örneğin, tetrahidrofüranı ve 1,4-dioksanı ve bir aromatik hidrokarbon çözücüyü, örneğin, benzeni ve tolüeni, içerir. Bu çözücüler su ile bir karışım olarak hazırlanabilir. İlaveten, bu bir amino grubunun korunması için yaygın bir şekilde kullanılan bir grup olduğunda, P<sup>5</sup> ile emsallendirildiği üzere bir amino grubu için koruma grubu özel olarak sınırlandırılmaz. Temsili örnekler, Üretim yöntemi 2'de tarif edilen bir amino grubu için koruma gruplarını içerir. Bununla birlikte, mevcut reaksiyonda, bu burada P<sup>5</sup> ile emsallendirildiği üzere bir amino grubu için koruma grubunun yarılp çıkarıldığı bir durum olabilir. Bu tarz durumda, bu, koruma grubunu yeniden uygulamak için gerekli olabileceğinden, bir amino grubunu korumak için bir uygun reaktif ile bir reaksiyon gerçekleştirmek gerekli olabilir.

Bileşik (24), bileşiğin (23) koruma grubunu P<sup>6</sup> uzaklaştırma ile üretilebilir. Burada, P<sup>6</sup> ile emsallendirildiği üzere bir karboksi grubu için koruma grubunun temsili örnekleri Üretim yöntemi 2'de tarif edilir ve bir uygun olanı bunlardan seçilebilir. Bileşikte (23), bir amino grubu için koruma grubunun P<sup>5</sup> ve bir karboksi grubu için koruma grubunun P<sup>6</sup> bir farklı yöntem veya farklı koşullar ile uzaklaştırılabilen koruma grupları olması tercih edilebilir. Örneğin, bir temsili örnek, burada P<sup>5</sup>'in bir 9-florenilmetiloksi karbonil grubu ve P<sup>6</sup>'nın bir benzil grubu olduğu bir kombinasyonu içerir. Koruma grupları, öm., korunacak olan

35

bir amino grubuna ve bir karboksi grubuna sahip olan bir bileşiğin özelliklerine, göre seçilebilir. Koruma gruplarının uzaklaştırılması için, reaktifler ve koşullar koruma grubuna göre seçilir.

- 5 Bileşik (26) karboksilik asidi (24) aktif estere, karma asit anhidride, asit halide veya benzerlerine türevlendirme veya bunu bileşiği (25) üretmek için bileşik (4) veya bunun bir farmakolojik olarak kabul edilebilir tuzu ile reaksiyona sokma akabinde elde edilen bileşiğin (25) koruma grubunu P<sup>5</sup> uzaklaştırma ile üretilebilir. Bileşik (4) ve karboksilik asit (24) arasındaki reaksiyon ve koruma grubunu P<sup>6</sup> uzaklaştırmak için reaksiyon için,
- 10 Üretim yöntemi 2 için tarif edilenler ile aynı reaktifler ve reaksiyon koşulları kullanılabilir.

- Bileşik (10b), bileşiği (26) bileşiği (9b) üretmek için korunmuş uç amino grubuna sahip olan bir amino asit veya korunmuş amino grubuna sahip olan oligopeptit (27) ile reaksiyona sokma ve elde edilen bileşiğin (9b) koruma grubunu P<sup>7</sup> uzaklaştırma ile
- 15 üretilebilir. P<sup>7</sup> ile temsil edildiği üzere bir amino grubu için koruma grubu, bu genel olarak bir amino grubunun korunması için kullanıldığında, özel olarak sınırlandırılmaz. Bunun temsili örnekleri, Üretim yöntemi 2'de tarif edilen bir amino grubu için koruma gruplarını içerir. Koruma grubunu uzaklaştırmak için, reaktifler ve koşullar koruma grubuna göre seçilir. Bileşik (26) ve bileşik (27) arasındaki reaksiyon için, peptit sentezi
- 20 için yaygın bir şekilde kullanılan reaksiyon reaktifleri ve koşulları kullanılabilir. Yukarıda bahsedilen yöntem ile üretilen bileşik (10b), yukarıda tarif edilen yöntemle göre mevcut buluşun bileşiğine (1) türevlendirilebilir.

- Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı, bu hava içinde bırakıldığında veya,
- 25 örneğin, saflaştırma için, yeniden-kristallendirildiğinde, adsorpsiyon suyuna sahip olacak şekilde nemi absorbe edebilir veya bir hidrata dönüşebilir ve bu tarz bir bileşik ve su içeren bir tuz da mevcut buluşa dâhil edilir.

- Çeşitli radyoaktif veya radyoaktif-olmayan izotoplar ile etiketlenmiş bir bileşik de
- 30 mevcut buluşa dâhil edilir. Mevcut buluşun antikoru-ilaç konjugatını oluşturan bir veya birden fazla atom doğal-olmayan oranda bir atomik izotop içerebilir. Atomik izotopun örnekleri, döteryumu (<sup>2</sup>H), trityumu (<sup>3</sup>H), iyodin-125'i (<sup>125</sup>I), ve karbon-14'ü (<sup>14</sup>C) içerir. İlaveten, mevcut buluşun bileşiği bir radyoaktif izotop, örneğin, trityum (<sup>3</sup>H), iyodin-125 (<sup>125</sup>I), karbon-14 (<sup>14</sup>C), bakır-64 (<sup>64</sup>Cu), zirkonyum-89 (<sup>89</sup>Zr), iyodin-124 (<sup>124</sup>I), florin-18
- 35 (<sup>18</sup>F), indiyum-111 (<sup>111</sup>I), karbon-11 (<sup>11</sup>C) ve iyodin-131 (<sup>131</sup>I), ile radyoaktif olarak

etiketlenebilir. Bir radyoaktif izotop ile etiketlenmiş bileşik, bir terapötik veya profilaktik ajan, araştırma için bir reaktif, örneğin, bir analiz reaktifi ve tanı için bir ajan, örneğin, bir *in vivo* tanısal görüntüleme ajanı, olarak yararlıdır. Radyoaktivite ile ilgili olmadan, mevcut buluşun antikoru-ilaç konjugatının herhangi bir izotop varyant tipi mevcut buluşun kapsamı içindedir.

### [İlaçlar]

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı kanser hücrelerine karşı bir sitotoksik aktivite gösterir ve böylelikle, bu bir ilaç olarak, özel olarak kanser için bir terapötik ajan ve/veya profilaktik ajan olarak, kullanılabilir.

Yani, mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı, kanseri tedavi etmek için bir ana yöntem olan kemoterapi için bir ilaç olarak selektif bir şekilde kullanılabilir ve sonuç olarak, kanser hücrelerinin geliştirilmesini geciktirebilir, bunun büyümesini inhibe edebilir ve ilaveten kanser hücrelerini öldürebilir. Bu kanser hastalarının kanserden kaynaklanan semptomlardan arınmış olmasına olanak sağlayabilir veya kanser hastalarının QOL'sinde iyileşme sağlayabilir ve kanser hastalarının yaşamlarını sürdürme ile bir terapötik etki elde edebilir. Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı kanser hücrelerini öldürmeyi tamamlamasa bile, bu kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etme veya kontrol etme ile, bunların daha uzun-sürelili sağ kalımını sağlarken, kanser hücrelerinin daha yüksek QOL'sini sağlayabilir.

Bu tarz ilaç terapisinde, bu tek başına bir ilaç aynı zamanda adjuvan terapide bir ilave terapi ile kombinasyon hâlinde bir ilaç olarak kullanılabilir ve cerrahi operasyon, radyoterapi, hormon terapisi veya benzerleri ile birleştirilebilir. İlaveten, bu ayrıca neoadjuvan terapide ilaç terapisi için bir ilaç olarak da kullanılabilir.

Yukarıda tarif edildiği üzere terapötik kullanıma ek olarak, çok ufak metastatik kanser hücrelerinin büyümesini baskılamamanın ve bu kanser hücrelerini bağlama ile bunları ilaveten öldürmenin bir etkisi ayrıca, antikorum antijeni bağlama özelliğinden dolayı da beklenebilir. Özel olarak, TROP2'nin ekspresyonu primer kanser hücrelerinde konfirme edildiğinde, kanser metastazının inhibisyonu veya bir profilaktik etki mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatını uygulama ile beklenebilir. Örneğin, metastazın seyirinde bir vücut sıvısı içindeki kanser hücrelerini inhibe etmenin ve öldürmenin bir

etkisi veya herhangi bir dokuda implantasyondan hemen sonra çok ufak kanser hücrelerini inhibe etmenin ve öldürmenin, bir etkisi beklenebilir. İlaveten, kanser metastazının inhibisyonu veya bir profilaktik etki, özel olarak, kanserin cerrahi yolla çıkarılmasından sonra, beklenebilir. Bu doğrultuda, kanser metastazını inhibe etmenin bir etkisi beklenebilir.

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatının hastalara sistemik terapi olarak uygulanması ile ve ilave olarak kanser dokularına lokal uygulama ile bir terapötik etki uygulaması beklenebilir.

10

Buna karşı mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatının kullanılabildiği kanser tipinin örnekleri, akciğer kanserini, böbrek kanserini, ürotelyal kanseri, kolorektal kanseri, prostat kanserini, gliyoblastom multiformu, overyan kanseri, pankreatik kanseri, meme kanserini, melanomu, karaciğer kanserini, idrar kesesi kanserini, gastrik kanseri, servikal kanseri, baş ve boyun kanserini veya özofajiyal kanseri içerir, bununla birlikte, bu, bir tedavi süjesi olarak bir kanser hücresinde, antikor-ilaç konjugatı içindeki antikorun tanıyabileceği bir protein eksprese eden bir kanser hücresi olduğu sürece, bunlarla sınırlandırılmaz.

20 Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı tercihen bir memeliye uygulanabilir ancak bu daha tercihen bir insana uygulanır.

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatını içeren bir farmasötik bileşiminde kullanılan maddeler, dozaj veya uygulama konsantrasyonu bakış açısıyla, teknikte genel olarak kullanılan formülasyon katkı maddelerinden veya benzerlerinden uygun bir şekilde seçilebilir ve uygulanabilir.

Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı en az bir farmasötik olarak uygun içerik maddesi içeren bir farmasötik bileşim olarak uygulanabilir. Örneğin, yukarıdaki farmasötik bileşim tipik olarak, en az bir farmasötik taşıyıcı (örneğin, sterilize edilmiş sıvı) içerir. Burada, sıvı, örneğin, suyu veya sıvı yağı (petrol yağını veya hayvan orijinli, bitki orijinli veya sentetik orijinli yağı), içerir. Sıvı yağ, örneğin, yer fıstığı yağı, soya fasulyesi yağı, mineral yağ veya susam yağı, olabilir. Yukarıdaki farmasötik bileşim intravenöz olarak uygulandığında, su bir daha tipik taşıyıcıdır. Salin çözeltisi, bir sulu dekstroz çözeltisi ve bir sulu gliserol çözeltisi de bir sıvı taşıyıcı olarak, özel olarak, bir

enjeksiyon çözeltisi için, kullanılabilir. Bir uygun farmasötik vehikül teknikte bilinir. Arzu edildiğinde, yukarıdaki bileşim ayrıca bir iz miktarda bir nemlendirme ajanı, bir emülsifiye etme ajanı veya bir pH tamponlama ajanı da içerebilir. Uygun farmasötik taşıyıcının örnekleri E. W. Martin tarafından "Remington's Pharmaceutical Sciences" 5 kaynağında açıklanır. Formülasyonlar bir uygulama moduna karşılık gelir.

Çeşitli aktarım sistemleri bilinir ve bunlar mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatını uygulamak için kullanılabilir. Uygulama yolunun örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, intradermal, intramüsküler, intraperitoneal, intravenöz ve subkütan 10 yolları içerir. Uygulama, örneğin, enjeksiyon veya bolus enjeksiyon ile yapılabilir. Bir spesifik tercih edilen uygulamaya göre, antikoru-ilaç konjugatının uygulanması enjeksiyon ile gerçekleştirilir. Parenteral uygulama bir tercih edilen uygulama yoludur.

Bir temsili uygulamaya göre, farmasötik bileşim, geleneksel prosedürlere göre, insana 15 intravenöz uygulama için uygun olan bir farmasötik bileşim olarak, reçete edilir. İntravenöz uygulama için bileşim tipik olarak, bir steril ve izotonik sulu tampon çözeltisi içindeki bir çözeltidir. Gerekli olduğunda, ilaç bir çözündürme ajanı ve enjeksiyon yerinde ağrıyı hafifletmek için lokal anestetikler (örneğin, lignokain) içerebilir. Genel olarak, yukarıdaki içerik maddesi münferit olarak, aktif ajanın bir miktarına sahip olan 20 bir ampul veya bir tek dozluk paket içinde sızdırmaz hâle getirme ile elde edilen bir kap içine dâhil edilen liyofilize edilmiş pudranın veya bir anhidroz konsantrenin herhangi biri olarak veya bir birim dozaj formu içinde bir karışım olarak sağlanır. İlaç enjeksiyon ile uygulama formunda olduğunda, bu steril farmasötik gradda su veya salin içeren bir enjeksiyon şişesinden uygulanabilir. İlaç enjeksiyon ile uygulandığında, steril 25 enjeksiyonluk suyun veya salinin bir ampülü, yukarıda bahsedilen içerik maddelerinin uygulamadan önce birbiri ile karıştırıldığı şekilde sağlanabilir.

Mevcut buluşun farmasötik bileşimi, yalnızca mevcut başvurunun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatını içeren bir farmasötik bileşim veya anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı ve 30 konjugat dışında en az bir kanser tedavi etme ajanı içeren bir farmasötik bileşim olabilir. Mevcut buluşun anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı başka kanser tedavi etme ajanı ile uygulanabilir. Anti-kanser etki bu doğrultuda güçlendirilebilir. Bu tarz amaç için kullanılan bir başka anti-kanser ajanı bir bireye antikoru-ilaç konjugatı ile eş-zamanlı olarak, antikoru-ilaç konjugatından ayrı olarak veya antikoru-ilaç konjugatını takiben 35 uygulanabilir ve bu her biri için uygulama aralığını çeşitlendirerek uygulanabilir. Kanser

tedavi etme ajanının örnekleri, abraxsanı, paklitakseli, sisplatini, gemitabini, irinotekani (CPT-11), paklitakseli, pemetreksedi, sorafenibi, vinorelbini, WO 2003/038043 Numaralı Uluslararası Yayın'da tarif edilen ilaçları, LH-RH analoglarını (löprorelini, goserelini veya benzerlerini), estramustin fosfatı, östrojen antagonistini (tamoksifeni, raloksifeni veya benzerlerini) ve bir aromataz inhibitörünü (anastrozolü, letrozolü, eksemestani veya benzerlerini) içerir ancak bu bir anti-tümör aktiviteye sahip olan bir ilaç olduğu sürece, sınırlandırılmaz.

Farmasötik bileşim, arzu edilen bileşime ve gerekli olan saflığa sahip olan bir formülasyon olarak bir liyofilizasyon formülasyonu veya bir sıvı formülasyon hâlinde formüle edilebilir. Bir liyofilizasyon formülasyonu olarak formüle edildiğinde, bu teknikte kullanılan uygun formülasyon katkı maddeleri içeren bir formülasyon olabilir. Ayrıca, bir sıvı formülasyon için, bu teknikte kullanılan çeşitli formülasyon katkı maddeleri içeren bir sıvı formülasyon olarak da formüle edilebilir.

Farmasötik bileşimin bileşimi ve konsantrasyonu uygulama yöntemine göre çeşitlilik gösterebilir. Bununla birlikte, mevcut buluşun farmasötik bileşimine dâhil edilen anti-TROP2 antikoru-ilaç konjugatı, antikoru-ilaç konjugatı bir antijen için daha yüksek afiniteye, yani, antijen için ayrılma sabiti (yani, Kd değeri) açısından daha yüksek afiniteye (= daha düşük Kd değerine), sahip olduğunda, bir küçük dozajda bile farmasötik etki gösterebilir. Böylelikle, antikoru-ilaç konjugatının dozajını belirlemek için, dozaj antikoru-ilaç konjugatı ve antijen arasındaki afinite ile ilgili olan bir durum bakış açısıyla belirlenebilir. Mevcut buluşun antikoru-ilaç konjugatı bir insana uygulandığında, örneğin, yaklaşık 0,001 ila 100 mg/kg bir kere uygulanabilir veya 1 ila 180 gün boyunca bir kerelik bir aralık ile bir kaç kere uygulanabilir.

### Örnekler

Mevcut buluş spesifik olarak aşağıda gösterilen örnekler bakış açısıyla tarif edilir. Bununla birlikte, mevcut buluş bunlarla sınırlandırılmaz. İlaveten, bu hiç bir suretle bir sınırlandırılmış şekilde yorumlanmaz. İlaveten, spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, spesifikasyonda tarif edilen reaktif, çözücü ve başlangıç materyali bir ticari tedarikçiden kolaylıkla elde edilebilir.

**[Örnek 1: Farenin immünizasyonu ve hibridomun elde edilmesi]**

**1-1) Fare immünizasyonunda kullanılacak olan hücrenin preparasyonu**

5 x 10<sup>6</sup> NCI-H322 hücresi (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı, ATCC CRL-5806; ATCC: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu) 5 gün boyunca bir RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) vasatı (10 ml) içinde kültürlenmiştir, akabinde geri-kazanılmıştır, PBS (fosfat-tamponlu salin) ile iki kere yıkanmıştır ve PBS (500 µl) içinde yeniden-süspansiyon edilmiştir.

**10 1-2) Farenin immünizasyonu**

Birinci immünizasyon için, her bir BALB/c faresi (6 haftalık) NCI-H322 hücreleri (1 x 10<sup>7</sup> hücre) ile intraperitoneal olarak immünize edilmiştir. İkinci ile beşinci immünizasyonlar için, fare 1-haftalık aralıklarla 1 x 10<sup>6</sup> NCI-H322 hücresi ile intraperitoneal olarak immünize edilmiştir. Altıncı (son) immünizasyon için, fare kuyruk veni vasıtasıyla ve her bir yol için 1 x 10<sup>6</sup> hücre/200 µl PBS'de NCI-H322 hücreleri ile intraperitoneal olarak immünize edilmiştir. Dalak hücreleri nihai immünizasyonun 3 gün sonra kesip çıkarılmıştır.

**20 1-3) İmmünize edilmiş farenin dalak hücrelerinin preparasyonu**

İmmünize edilmiş farenin dalağı kesip çıkarılmıştır, akabinde öğütülmüştür ve bir RPMI 1640 %10 FBS (fetal bovin serumu)(+) vasatı içinde süspansiyon edilmiştir. Hücre süspansiyonu bir hücre süzgecinden (100 µm, BD Falcon) geçirilmiştir ve akabinde oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 1500 rpm'de sentrifüj edilmiştir ve süpernatant dökülmüştür. Bir Tris-NH<sub>4</sub>Cl çözeltisi (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, %0,83 NH<sub>4</sub>Cl; 10 mL) rezidüye eklenmiştir, bunu oda sıcaklığında 5 dakika boyunca muamele izlemiştir. Bir RPMI 1640 FBS(+) vasatı (10 ml) hücre süspansiyonuna eklenmiştir ve karışım bir hücre süzgecinden geçirilmiştir ve akabinde oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 1500 rpm'de sentrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüştür ve dalak hücreleri bir RPMI 1640 FBS(-) vasatı (10 ml) içinde yeniden-süspansiyon edilmiştir.

**1-4) Miyelom hücrelerinin preparasyonu**

P3U1 hücreleri (fare miyelom hücre hattı) geri-kazanılmıştır ve oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 1500 rpm'de sentrifüj edilmiştir. bir EDTA (%0,02) çözeltisi (10 ml) P3U1 hücrelerine eklenmiştir, bunu 37°C'de 5 dakika boyunca muamele izlemiştir. P3U1 hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 1500 rpm'de sentrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüştür ve bir RPMI 1640 FBS(-) vasatı (10 ml) içinde yeniden-süspanse edilmiştir.

### 1-5) Hücre füzyonu

10 Dalak hücreleri ve miyelom hücreleri 5:1 olan bir oranda karıştırılmıştır ve sentrifüj edilmiştir (1200 rpm, 5 dakika). Çökeltilmiş fraksiyonda elde edilen hücreler iyice kabartılmıştır ve akabinde kademeli olarak polietilen glikol-4000 (PEG-4000; 1 mL) karıştırarak yaklaşık 1 dakika boyunca buna eklenmiştir. Akabinde, bir RPMI vasatı (1 mL) 1 dakikalık aralık ile bir kaç kere hücre içeren sıvıya eklenmiştir ve bir RPMI vasatı  
15 akabinde 50 mL'lik toplam miktarı ayarlamak için buna eklenmiştir. Hücre süspansiyonu sentrifüj edilmiştir (900 rpm, 5 dakika) ve çökeltilmiş fraksiyonda elde edilen hücreler hafif bir derecede kabartılmıştır ve akabinde nazik bir şekilde bir HAT vasatı (%10 fetal bovin serumu ve HAT Vasatı Takviyesi ile takviye edilmiş RPMI 1640 vasatı; 100 mL) içinde süspanse edilmiştir. Süspansiyon kültür için bir 96-kuyucuklu  
20 plakaya 200 µL/kuyucuk olacak şekilde dağıtılmıştır ve 37°C'lik bir %5'lik CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde %50'lik konflüansa kadar kültürlenmiştir.

### 1-6) Hibridomun varyant adenovirüs FZ33 kullanılarak taranması

25 NCI-H322 hücreleri bir 96-kuyucuklu plakaya  $5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir ve 37°C'de 48 saat boyunca kültürlenmiştir. Hücreler 150 µl/kuyucuk PBS ile iki kere yıkanmıştır ve her bir hibridom kültür süpernatantı (50 µl) her bir kuyucuğa eklenmiştir ve 4°C'de 1 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur. Hücreler 150 µl/kuyucuk PBS ile iki kere yıkanmıştır. Bir adenovirüs Ax3CAZ3-FZ33 (bir antikor bağlaması  
30 amacıyla Z33 lifi ile modifiye edilmiş β-galaktosidaz-ekspres eden adenovirüs (bakınız, 2012/0237518 Numaralı ABD Patent Başvuru Yayını)) bir RPMI1640(-) vasatı ile  $3 \times 10^6$  vp/100 µl ( $1 \times 10^3$  vp/hücre) olan bir konsantrasyona seyreltilmiştir ve 100 µl/kuyucuk olacak şekilde buna eklenmiştir. 4°C'de 1 saat boyunca reaksiyondan sonra, hücreler 150 µl/kuyucuk PBS ile iki kere yıkanmıştır. Bir RPMI1640 FBS(+)  
35 vasatı 100 µl/kuyucuk olacak şekilde buna eklenmiştir ve hücreler 37°C'de 24 saat

boyunca kültürlenmiştir. Galacto-Light Plus Reporter Gene Assay System (Applied Biosystems, Inc.) kullanılarak  $\beta$ -Gal raportör gen analizi ile muamele edilmiş olan NCI-H322 hücreleri 200  $\mu$ l/kuyucuk PBS ile yıkanmıştır. Lysis Solution 50  $\mu$ l/kuyucuk olacak şekilde buna eklenmiştir ve karışım oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bırakılmıştır.

5 Bu hücre lizatı (10  $\mu$ L) Galacton-Plus Galacto Reaction Buffer Diluent ile 100-kat seyreltilmiştir, akabinde bir Beyaz mikro-kuyucuklu SH 96 kuyucuklu plakaya (Nunc/Thermo Fisher Scientific, Inc.) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur. Accelerator II, 150  $\mu$ l/kuyucuk olacak şekilde buna eklenmiştir. Kemilüminesans bir çoklu-etiket sayıcı Wallac 1420 ARVOsx (PerkinElmer, Inc.)

10 kullanılarak 5 saniye boyunca ölçülmüştür ve NCI-H322 hücrelerinde virüsün enfektif dozu RLU (lüminesansın miktarı) olarak her bir saniye için ortalama değer ile gösterilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen hibridom grubunun taranmasında, ölçüm değeri (RLU) 5000 RLU veya daha yüksek olan bir klon tüm gruptan seçilmiştir (minimum: 1383 RLU, ortalama: 10914 RLU, maksimum: 78746 RLU). İlk olarak,

15 primer tarama olarak, 81 pozitif kuyucuk bir hücre füzyonu ile elde edilen 960 hibridom kuyucuğundan seçilmiştir. Validasyon taraması olarak, analiz ilaveten primer taramadaki ile aynı yaklaşım ile iki kopya hâlinde gerçekleştirilmiştir. Testlerin her ikisinde de 5000 RLU veya daha yüksek olan bir ölçüm değeri göstermiş olan bir kuyucuk pozitif olarak addedildiğinde, 52 pozitif kuyucuk primer taramada elde edilen

20 81 kuyucuktan seçilmiştir. Seçilmiş klonlar 44 monoklonal hibridom hücre hattı oluşturmak için 2 ila 4 kere alt-klonlanmıştır.

### **[Örnek 2: Antikoron hibridomdan saflaştırılması]**

25 Pristan (2,6,10,14-tetrametilpentadekan; 0,5 ml) peşin olarak her bir 8- ila 10-haftalık fareye veya çıplak fareye intraperitoneal olarak uygulanmıştır, bu akabinde 2 hafta boyunca yükseltilmiştir. Örnek 1'de elde edilen her bir monoklonal antikör-üreten hibridom fareye intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. 10 ila 21 gün sonra, hibridomun assitik kanserasyona neden olmasına izin verilmiştir ve assitler akabinde

30 toplanmıştır. Elde edilen assitler katı maddeyi uzaklaştırmak için sentrifüj edilmiştir. Akabinde, antikörler %40 ila 50 amonyum sülfat ile tuzla çökeltme, bir kaprilik asit çökeltme yöntemi, bir DEAE-Sefaroz kolonu ve bir protein G kolonu ile saflaştırılmıştır ve IgG veya IgM fraksiyonları toplanmıştır ve saflaştırılmış monoklonal antikörler olarak kullanılmıştır.

### [Örnek 3: Hibridom tarafından üretilen antikorun bağladığı antijenin tanımlanması]

Bir antijen TINA1, Örnek 2'de hazırlanan hibridom tarafından üretilen bir antikor, için  
5 tanımlanmıştır.

#### 3-1) Biotin ile etiketlenmiş hücre yüzeyi proteininin TINA1 antikorunu kullanılarak immüno-çökeltilmesi

10  $5 \times 10^6$  NCI-H322 hücresi geri-kazanılmıştır ve PBS ile üç kere yıkanmıştır. EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Inc.) 0,1 mg/ml olan bir konsantrasyonda PBS içinde süspansiyon edilmiştir. NCI-H322 hücreleri biyotin/PBS çözeltisi içinde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca döndürülmüştür, akabinde 100 mM glisin/PBS çözeltisi (25 ml) ile iki kere yıkanmıştır ve akabinde PBS (25 ml) ile üç kere  
15 yıkanmıştır. Bu şekilde yıkanmış hücreler bir lizis tamponu (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH, 7,6, %1 NP-40 + Proteaz inhibitörü, 1 tablet/50 ml Tam EDTA içermeyen (Hoffmann-La Roche Ltd.); 2 ml) içinde yeniden-süspansiyon edilmiştir ve bunlara 4°C'de 30 dakika boyunca muamele edilmiştir. Bir Protein G Sefarozu (Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Japan Corporation)) tamponunu bir lizis tamponu ile  
20 değiştirme ile elde edilen Protein G Sefaroz/lizis tamponu (%50 bulamaç; 30 µl) hücre lizatına eklenmiştir ve karışım 4°C'de 1 saat boyunca döndürülmüştür ve akabinde bir süpernatantı geri-kazanmak için 4°C'de 5 dakika boyunca sentrifüj edilmiştir. TINA1 antikorunu (3 µg) süpernatanta eklenmiştir ve karışım 4°C'de 1 saat boyunca döndürülmüştür. Akabinde, Protein G Sefaroz/lizis tamponu (%50 bulamaç; 60 µl) buna  
25 eklenmiştir ve karışım 4°C'de 2 saat boyunca döndürülmüştür. Protein G Sefaroz bir lizis tamponu (1 ml) ile altı kere yıkanmıştır ve akabinde 1 x SDS örnek tamponu/%5 2-ME (2-merkaptoetanol) tamponu (62,5 mM Tris-HCl (25°C'de pH 6,8), (ağ/hacim) %2 SDS, %10 gliserol ve (ağ/hacim) %0,01 fenol kırmızısı) içinde yeniden-süspansiyon edilmiştir. Süspansiyona 100°C'de 5 dakika boyunca muamele edilmiştir ve çözelti  
30 akabinde geri-kazanılmıştır ve SDS-PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) için bir örnek olarak kullanılmıştır.

#### 3-2) SDS-PAGE ve Western blotlama

3-1)'de hazırlanan SDS-PAGE örneği Ready Gels J %5-20 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) kullanılarak 20 mA'de elektrofore edilmiştir ve akabinde jelden membrana 0,1 mA/cm<sup>2</sup>'de blotlanmıştır. Membran PBS-T (PBS(-)-%0,05 Tween 20) ile 5 dakika boyunca yıkanmıştır ve akabinde 1 saat boyunca bloke edilmiştir. Membran PBS-T ile 5 dakika boyunca üç kere yıkanmıştır ve akabinde Streptavidin-yaban turpu peroksidaz konjugatı (Amersham Biosciences Corp.; kullanım için PBS-T ile 2000-kat seyreltilmiş) ile 1 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur. Membran PBS-T ile 10 dakika boyunca dört kere yıkanmıştır ve akabinde bir hedef bant ECL Western blotlama saptama reaktifleri (Amersham Biosciences Corp.) ve Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences Corp.) kullanılarak saptanmıştır. Örnek 3-1)'in prosedürleri ile biyotin ile etiketlenmiş NCI-H322 hücreleri antijeninin TROP2 olduğu hâlihazırda kütle spektrometrisi ile bulunmuş olan bir KCI7A3 antikoru veya TINA1 antikoru ile immüno-çökeltmeye tabi tutulmuştur ve elde edilen immüno-çökeltmiş ürünler DTT varlığında veya yokluğunda SDS-PAGE ve Western blotlama ile analiz edilmiştir. KCI7A3 antikorunun veya TINA1 antikorunun kullanıldığı her bir durumda, DTT yokluğunda bir bant 46 kDa'luk bir moleküler ağırlıkta saptanmıştır ve DTT ile takviye edilmiş örneklerde bir bant 37 kDa'luk bir moleküler ağırlıkta saptanmıştır.

### 3-3) FACS analizi

20

TINA1 antikorunun antijeninin TROP2 olduğu bant paterninden tahmin edildiğinden, cDNA'nın gen transferi ile aşırı-ekspresyon analizi kütle spektrometrisi olmadan gerçekleştirilmiştir. FACS analizinin bir sonucu olarak, TINA1 antikoru insan TROP2'sini eksprese eden CHOK1 hücrelerinde bir güçlü pozitif yanıt göstermiştir, bu TINA1 antikorunun antijeninin TROP2 olduğunu gösterir. Benzer FACS analizi, bir akciğer kanseri hücre hattı PC14, bir akciğer kanseri hücre hattı NCI-H322, bir akciğer kanseri hücre hattı NCI-H2122, bir akciğer kanseri hücre hattı LCAM1, bir akciğer kanseri hücre hattı LC2/ad, bir pankreatik kanser hücresi hattı MIAPaCa2, bir pankreatik kanser hücresi hattı PK-1, bir prostat kanseri hücre hattı PC3, bir kolorektal kanser hücresi hattı HCT116, bir melanom hücre hattı A375, bir ovaryan kanser hücresi hattı SKOV3, bir hematopietik tümör hücresi hattı RPMI8226, bir hematopietik tümör hücresi hattı K562, PBMC (insan periferik kan mononükleer hücreleri) ve insan plateleti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen akciğer kanseri hücre hatlarının tümü TROP2-pozitifdir ve akciğer kanseri için olanlar dışındaki hücre

30

hatları gibi PC3, PK1 ve SKOV3 pozitifdir. Diğer taraftan, normal kan hücrelerinin tümü negatifdir.

#### **[Örnek 4: Antikor içselleştirme aktivitesinin ölçümü]**

5

##### **4-1) Antikor içselleştirme aktivitesi değerlendirme sistemi**

10 Bir rekombinant füzyon proteini DT3C, bir antikorun içselleştirme aktivitesini ve immünotoksin aktivitesini ölçmek amacıyla üretilmiştir. Bu DT3C, difteri toksininin (DT) bir katalitik alanına ve protein G'nin üç antikor-bağlama bölgesine sahip olan bir proteindir. DT3C spesifik olarak bir antikorun bir Fc kısmını bağlar, kararludur ve hücrelere alındığında protein sentezini inhibe etme ile hücre ölümünü indükler. Bu sistemin kullanılması ile, antikorun içselleştirme aktivitesi ve immünotoksin tarafından bunun sitosidal etkisi aynı zamanda gözlemlenebilir (Yamaguchi, M., Hamada, H. et al., 15 Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) 600-603).

##### **4-2) İçselleştirme aktivitesinin ve immünotoksin aktivitesinin DT3C kullanılarak değerlendirilmesi**

20 4 µg/mL DT3C bir 96-kuyucuklu plakaya 25 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir, ilaveten Örnek 1'in yöntemi veya buna eş-değer olan bir yöntem ile elde edilen 11 hibridomun kültür süpernatantlarının her biri plakaya 25 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir ve plaka oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. TINA1 antikor-üreten hibridom dışındaki hibridomlar tarafından üretilen antikorlar tarafından 25 tanınan antijenlerin peşin olarak CD9, CD46, CD55, CD59, CD71, CD73, CD147, CD276, EpCAM veya EGFR olduğu konfirme edilmiştir. NCI-H322 hücrelerinin 2 x 10<sup>4</sup> hücre/mL'si (%20 Düşük IgG FBS ile takviye edilmiş RPMI1640 vasatı) 50 µL/kuyucuk olacak şekilde buna ekilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyondan sonra, hücreler 37°C'lik bir CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 3 gün boyunca kültürlenmiştir. 30 Kültürden sonra, süpernatant uzaklaştırılmıştır ve %10 WST-%10FBS-RPMI1640 plakaya 100 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir. 37°C'lik bir CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 1 saat boyunca inkübasyondan sonra, canlı hücrelerin sayısı bir mikro-plaka okuyucu (OD<sub>450</sub> ila OD<sub>640</sub>, infinite 200, Tecan Trading AG) kullanılarak ölçülmüştür. Değerlendirilen hibridom hücrelerinin kültür süpernatantları arasında, CD59'a, CD71'e,

EGFR'ye, EpCAM'a veya TROP2'ye karşı antikörlerin güçlü içselleştirme aktivitesine ve immünotoksin aktivitesine sahip olduğu konfirme edilmiştir (Şekil 10).

**4-3) CD59'a, CD71'e, EGFR'ye, EpCAM'a veya TROP2'ye karşı antikörler arasında içselleştirme aktivitesindeki ve immünotoksin aktivitesindeki farklılık**

DT3C'nin her bir seyreltilmiş çözeltisi (0, 0,004, 0,04, 0,4, 4 veya 40 µg/mL) bir 96-kuyucuklu plakaya 25 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir, akabinde her bir antikör (40 µg/mL) plakaya 25 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir ve plaka oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İlaveten, NCI-H322 hücrelerinin  $2 \times 10^4$  hücre/mL'si (%20 Düşük IgG FBS ile takviye edilmiş RPMI1640 vasatı) 50 µL/kuyucuk olacak şekilde buna eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyondan sonra, hücreler 37°C'lik bir CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 3 gün boyunca kültürlenmiştir. Kültürden sonra, süpernatant uzaklaştırılmıştır ve %10 WST-%10FBS-RPMI1640 plakaya 100 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir. 37°C'lik bir CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 1 saat boyunca inkübasyondan sonra, canlı hücrelerin sayısı bir mikro-plaka okuyucu (OD<sub>450</sub> ila OD<sub>640</sub>) kullanılarak ölçülmüştür. Değerlendirilen antikörler arasına, TINA1, TROP2'ye karşı bir antikör, en güçlü içselleştirme aktivitesine ve immünotoksin aktivitesine sahiptir (Şekil 11).

20

**4-4) Anti-TROP2 antikörünün klonları arasında içselleştirme aktivitesindeki ve immünotoksin aktivitesindeki farklılık**

Örnek 1'in yöntemi veya buna eş-değer olan bir yöntem ile elde edilen anti-TROP2 antikörleri TINA1 (immünojen: akciğer kanser hattı NCI-H322), KCL7A3 ve KCL2D6 (immünojen: pankreatik kanser hücresi hattı KCL-MOH1), Pr1E11 ve Pr8H10 (immünojen: prostat kanseri hücre hattı Pc-1) ve NY16 ve NY17 (immünojen: pankreatik kanser hücresi hattı PK-1) ve piyasada satılan 77220 (R&D Systems Inc.) Örnek 4-3)'teki ile aynı şekilde bunların içselleştirme aktivitesi ve immünotoksin aktivitesi için değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, 8 anti-TROP2 antikörü arasından, TINA1 antikörü en güçlü aktiviteye sahiptir (Şekil 12).

**[Örnek 5: TINA1 antikörü geninin değişken bölgesini-şifreleyen cDNA'sının nükleotid dizisinin belirlenmesi ve kimerik TINA1 (bundan sonra, cTINA1 olarak ifade edilir) antikörünün üretilmesi]**

35

## **5-1) TINA1 antikorunun geninin değişken bölgesini-şifreleyen cDNA'sının nükleotid dizisinin belirlenmesi**

### **5 5-1-1) TINA1 antikorunun üreten hibridomdan mRNA'nın preparasyonu**

TINA1 antikorunun değişken bölgelerini şifreleyen cDNA'ları çoğaltmak için, mRNA TINA1 antikorunun üreten hibridomdan mRNA Isolation kit (Roche Applied Science) kullanılarak hazırlanmıştır.

10

### **5-1-2) cDNA'nın (5'-RACE-Ready cDNA) Sentezi**

cDNA (5'-RACE-Ready cDNA) 5-1-1)'de hazırlanan mRNA (100 ng) ve SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc.) kullanılarak sentezlenmiştir.

15

### **5-1-3) TINA1 antikorunun ağır zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA'nın 5'-RACE PCR ile çoğaltılması ve dizinin belirlenmesi**

UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE cDNA Amplification Kit'e dâhil edilmiştir) ve 5'-AGAGTTCCAGGTCAAGGTCAGG-3' (SEQ ID NO: 33: primer mG2aVR2) olan bir diziyeye sahip olan bir oligonükleotid ağır zincir geninin değişken bölge cDNA'sını PCR ile çoğaltmak için primerler olarak kullanılmıştır. SMARTer RACE cDNA Amplification Kit'e (Clontech Laboratories, Inc.) dâhil edilen UPM kullanılmıştır ve mG2aVR2 bir veri tabanında bir fare ağır zincir (IgG2a) sabit bölgesinin dizisinden tasarlanmıştır.

25

TINA1 antikorunun ağır zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA bu primer seti ve bir şablon olarak Örnek 5-1-2)'de sentezlenen cDNA (5'-RACE-Ready cDNA) kullanılarak 5'-RACE PCR ile çoğaltılmıştır. Bu PCR, polimeraz olarak KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.) kullanılarak touchdown PCR programında SMARTer RACE cDNA Amplification Kit'inin (Clontech Laboratories, Inc.) manüeline göre gerçekleştirilmiştir.

30

5'-RACE PCR ile çoğaltılmış ağır zincir değişken bölgesini-şifreleyen cDNA MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN N.V.) kullanılarak saflaştırılmıştır ve akabinde Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen Corp.) kullanılarak klonlanmıştır. Klonlanmış ağır

35

zincir değişken bölgesini-şifreleyen cDNA'nın nükleotid dizisi dizileme ile analiz edilmiştir. Kullanılan dizileme primerleri bir veri tabanında bir fare ağır zincir sabit bölgesinin dizisinden tasarlanan yukarıda tarif edilen primer mG2aVR2'dir ve NUP'dir (Nested Universal Primer A: SMARTer RACE cDNA Amplification Kit'e dâhil edilmiştir).

5

Dizileme analizi bir gen dizisi analiz aparatı ("ABI PRISM 3700 DNA Analyzer" veya "Applied Biosystems 3730xl Analyzer", Applied Biosystems, Inc.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve dizileme reaksiyonu Gene Amp 9700'ü (Applied Biosystems, Inc.) kullanmıştı.

10

TINA1 antikorunun ağır zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA'nın belirlenmiş nükleotid dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 1'inde gösterilir ve bu yolla şifrelenen amino asit dizisi SEQ ID NO: 2'de gösterilir.

#### 15 **5-1-4) TINA1 antikorunun hafif zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA'nın 5'-RACE PCR ile çoğaltılması ve dizinin belirlenmesi**

UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE cDNA Amplification Kit'e dâhil edilmiştir) ve 5'-AGTCCAACTGTTTCAGGACGCCATTTTGTTCG-3' (SEQ ID NO: 34: primer mKVR2) olan bir diziye sahip olan bir oligonükleotid hafif zincir geninin değişken bölge cDNA'sını PCR ile çoğaltmak için primerler olarak kullanılmıştır. SMARTer RACE cDNA Amplification Kit'e (Clontech Laboratories, Inc.) dâhil edilen UPM kullanılmıştır ve mKVR2 bir veri tabanında bir fare hafif zincir (IgG2a) sabit bölgesinin dizisinden tasarlanmıştır.

25

TINA1 antikorunun hafif zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA bu primer seti ve bir şablon olarak Örnek 5-1-2)'de sentezlenen cDNA (5'-RACE-Ready cDNA) kullanılarak 5'-RACE PCR ile çoğaltılmıştır. Bu PCR, polimeraz olarak KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.) kullanılarak touchdown PCR programında SMARTer RACE cDNA Amplification Kit'inin (Clontech Laboratories, Inc.) manüeline göre gerçekleştirilmiştir.

30

5'-RACE PCR ile çoğaltılmış hafif zincir değişken bölgesini-şifreleyen cDNA MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN N.V.) kullanılarak saflaştırılmıştır ve akabinde Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen Corp.) kullanılarak klonlanmıştır. Klonlanmış hafif

zincir değişken bölgesini-şifreleyen cDNA'nın nükleotid dizisi dizileme ile analiz edilmiştir.

5 Kullanılan dizileme primerleri bir veri tabanında bir fare hafif zincir sabit bölgesinin dizisinden tasarlanan yukarıda tarif edilen primer mKVR2'dir ve NUP'dir.

Dizileme analizi ve dizileme reaksiyonu yukarıda tarif edilen aparatı kullanmıştır.

10 TINA1 antikorunun hafif zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA'nın belirlenmiş nükleotid dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 3'ünde gösterilir ve bu yolla şifrelenen amino asit dizisi SEQ ID NO: 4'te gösterilir.

## **5-2) cTINA1 antikorunun saflaştırılması**

15 **5-2-1) Kimerik ve beşerileştirilmiş antikor hafif zincir ekspresyon vektörü pCMA-LK'nın yapılması**

20 Bir plazmidi pcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen Corp.) restriksiyon enzimleri XbaI ve PmeI ile sindirme ile elde edilen yaklaşık 5,4 kb'lik bir fragman ve SEQ ID NO: 5'te gösterilen bir insan κ zinciri salgılama sinyalini ve bir insan κ zinciri sabit bölgesini şifreleyen bir DNA dizisi içeren bir DNA fragmanı pcDNA3.3/LK'yı üretmek için In-Fusion Advantage PCR cloning kit (Clontech Laboratories, Inc.) kullanılarak bağlanmıştır.

25 pcDNA3.3/LK aşağıda tarif edilen bir primer seti kullanılan PCR'da bir şablon olarak kullanılmıştır. Elde edilen yaklaşık 3,8 kb'lik fragman fosforile edilmiştir ve akabinde CMV promotörüne downstream olan bir sinyal dizisine, bir klonlama yerine ve insan κ zinciri sabit bölge genine sahip olan bir kimerik ve beşerileştirilmiş antikor hafif zincir ekspresyon vektörü pCMA-LK yapmak için kendi kendine bağlanmıştır.

30

Primer seti

5'-tataccgtcgacctctagctagagcttggc-3' (SEQ ID NO: 35: primer 3.3-F1)

5'-gctatggcagggcctgccgccccgacgttg-3' (SEQ ID NO: 36: primer 3.3-R1)

### 5-2-2) Kimerik ve beşerileştirilmiş antikor IgG1-tipi ağır zincir ekspresyon vektörü pCMA-G1'in yapılması

Xbal ve Pmel ile sindirim ile bir insan  $\kappa$  zinciri salgılama sinyalini ve bir insan  $\kappa$  zinciri sabit bölgesini şifreleyen DNA dizisinden yoksun olan pCMA-LK'nın bir DNA fragmanı ve SEQ ID NO: 6'da gösterilen bir insan ağır zincir sinyal dizisinin ve bir insan IgG1 sabit bölgesinin amino asitlerini şifreleyen bir DNA dizisi içeren bir DNA fragmanı, CMV promotörüne downstream olan bir sinyal dizisine, bir klonlama yerine ve insan IgG1 ağır zincir sabit bölgesine sahip olan bir kimerik ve beşerileştirilmiş antikor IgG1-tipi ağır zincir ekspresyon vektörü pCMA-G1'i yapmak için In-Fusion Advantage PCR cloning kit (Clontech Laboratories, Inc.) kullanılarak bağlanmıştır.

### 5-2-3) cTINA1 antikor ağır zincir ekspresyon vektörünün yapılması

TINA1 antikorunun ağır zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA'yı içeren bir DNA fragmanı, bir şablon olarak Örnek 5-1-3)'te elde edilen ağır zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.) ve aşağıda tarif edilen bir primer seti kullanılarak çoğaltılmıştır ve bir cTINA1 antikor ağır zincir ekspresyon vektörü yapmak için In-Fusion HD PCR klonlama kiti (Clontech Laboratories, Inc.) kullanılarak kimerik ve beşerileştirilmiş IgG1-tipi ağır zincir ekspresyon vektörü pCMA-G1'in bir restriksiyon enzimi BlnI ile yarılmış yerine yerleştirilmiştir. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-G1/cTINA1" olarak gösterilmiştir. cTINA1 antikor ağır zincirinin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 7'de gösterilir ve bu yolla şifrelenen amino asit dizisi SEQ ID NO: 8'de gösterilir. SEQ ID NO: 7'nin nükleotid dizisi ve SEQ ID NO: 8'in amino asit dizisi ayrıca Şekil 1'de de tarif edilir.

cTINA1 antikor ağır zinciri için primer seti

5'-CCAGATGGGTGCTGAGCCAGATCCAGTTGGTGACGTCTGGACCTGAG-3' (SEQ ID NO: 37: primer TINA1H-F)

5'-CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACGGTGACCGCGGTCCCTGCGCCCCAGAC-3' (SEQ ID NO: 38: primer TINA1H-R)

### 5-2-4) cTINA1 antikor hafif zincir ekspresyon vektörünün yapılması

35

TINA1 antikorunun hafif zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA'yı içeren bir DNA fragmanı, bir şablon olarak Örnek 5-1-4)'te elde edilen hafif zincir değişken bölgesini-şifreleyen cDNA, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.) ve aşağıda tarif edilen bir primer seti kullanılarak çoğaltılmıştır ve bir cTINA1 antikoru hafif zincir ekspresyon vektörü  
 5 yapmak için In-Fusion HD PCR klonlama kiti (Clontech Laboratories, Inc.) kullanılarak kimerik ve beşerileştirilmiş antikor hafif zincir ekspresyon genel-amaçlı vektörü pCMA-LK'nın bir restriksiyon enzimi BsiWI ile yarılmış yerine yerleştirilmiştir. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-LK/cTINA1" olarak gösterilmiştir. cTINA1 antikoru hafif zincirinin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 9'da gösterilir ve bu yolla şifrelenen amino asit  
 10 dizisi SEQ ID NO: 10'da gösterilir. SEQ ID NO: 9'un nükleotid dizisi ve SEQ ID NO: 10'un amino asit dizisi ayrıca Şekil 2'de de tarif edilir.

cTINA1 antikoru hafif zinciri için primer seti

15 5'-ATCTCCGGCGCGTACGGCGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC-3' (SEQ ID NO: 39: primer TINA1L-F)  
 5'-GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGC-3' (SEQ ID NO: 40: primer TINA1L-R)

## 20 **5-2-5) cTINA1 antikorunun küçük-ölçekte üretimi**

FreeStyle 293F hücreleri (Invitrogen Corp.) manüele göre alt-kültürlenmiştir ve kültürlenmiştir.

25 Logaritmik büyüme fazındaki  $1 \times 10^7$  FreeStyle 293F hücresi (Invitrogen Corp.) bir FreeStyle 293 ekspresyon vasatı (Invitrogen Corp.) ile 9,6 mL'ye seyreltilmiştir, akabinde bir 30 mL'lik Square Storage Bottle (Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Inc.) içine ekilmiştir ve akabinde 37°C'lik bir %8'lik CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 1 saat boyunca 90 rpm'de sallama ile kültürlenmiştir. Polietilenimin (Polyscience #24765; 30 µg) Opti-Pro  
 30 SFM (Invitrogen Corp.; 200 µL) içinde çözündürülmüştür. Akabinde, PureLink HiPure Plasmid kit (Invitrogen Corp.) kullanılarak hazırlanmış olan hafif zincir ekspresyon vektörü (6 µg) ve ağır zincir ekspresyon vektörü (4 µg) Opti-Pro SFM'ye (Invitrogen Corp.; 200 µl) eklenmiştir. Ekspresyon vektörü/Opti-Pro SFM karıştırılmış çözeltisi (200 µl), polietilenimin/Opti-Pro SFM karıştırılmış çözeltisi (200 µl) eklenmiştir ve karışım  
 35 nazik bir şekilde karıştırılmıştır, 5 dakika boyunca ilaveten bırakılmıştır ve akabinde

FreeStyle 293F hücreleri eklenmiştir. Kültürü 37°C'lik bir %8'lik CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 90 rpm'de 7 gün boyunca sallama ile elde edilen bir kültür süpernatantı Minisart-Plus filtre (Sartorius AG) vasıtasıyla filtreden geçirilmiştir ve değerlendirme için bir örnek olarak kullanılmıştır.

5

pCMA-G1/cTINA1 ve pCMA-LK/cTINA1 kombinasyonu ile elde edilen insan kimerik TINA1 antikoru bir "cTINA1 antikoru" olarak gösterilmiştir.

## **[Örnek 6: Fare anti-TROP2 monoklonal antikorunun beşerileştirilmiş antikorunun tasarımı]**

10

### **6-1) TINA1'in beşerileştirilmiş versiyonunun tasarımı**

#### **6-1-1) TINA1'in değişken bölgesinin moleküler modellemesi**

15

TINA1'in değişken bölgelerinin moleküler modellemesi teknikte homoloji modellemesi (Methods in Enzymology, 203, 121-153 (1991)) olarak bilinen bir yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Yukarıda belirlenen TINA1'in değişken bölgeleri Protein Data Bank'da kayıtlı olan insan immünoglobülin değişken bölgelerinin primer dizileri (X-ışını kristal yapılarından türetilen üç-boyutlu yapılar mevcuttur) ile karşılaştırılmıştır (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)). Sonuç olarak, 1ZEA benzer bir şekilde bunların çerçevelerinde bir silinmeye sahip olan antikorlar arasında TINA1'in ağır zincir değişken bölgesine en yüksek dizi homolojisine sahip olan biri olarak seçilmiştir. Ayrıca, 3IU4 de TINA1'in hafif zincir değişken bölgesine en yüksek dizi homolojisine sahip olan biri olarak seçilmiştir. Çerçeve bölgelerinin üç-boyutlu yapıları, TINA1'in ağır zincirine ve hafif zincirine karşılık gelen 1ZEA ve 3IU4 koordinatlarını birleştirme ile bir "çerçeve modeli" olarak hazırlanmıştır. Bunu takiben, her bir CDR'nin tipik konformasyonu çerçeve modeline katılmıştır.

20

25

30

Son olarak, dezavantajlı interatomik teması dâhil etmemek için enerji hesaplaması, enerji açısından TINA1 değişken bölgelerinin olası moleküler modellerini elde etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu prosedürler piyasada satılan bir protein üç-boyutlu yapı tahmin programı Discovery Studio (Accelrys, Inc.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

35

#### **6-1-2) Beşerileştirilmiş TINA1 için amino asit dizisinin tasarımı**

Beşerileştirilmiş TINA1 antikorunu teknikte CDR greftleme olarak bilinen bir yöntem ile yapılmıştır (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Bir akseptör antikor, çerçeve bölgelerindeki amino asitlerin homolojisine göre seçilmiştir. TINA1'in çerçeve bölgelerinin dizileri antikor amino asit dizilerinin Kabat veri tabanında (Nuc. Acid Res., 29, 205-206 (2001)) kayıtlı olan tüm insan çerçevelerinin dizileri ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, bir HuPR1A3 antikorunu çerçeve bölgelerine ilişkin bunun %74'lük dizi homolojisinden dolayı bir akseptör olarak seçilmiştir. HuPR1A3'teki çerçeve bölgelerinin amino asit rezidüleri, burada arasındaki eşleşmeyen amino asitlerin pozisyonlarını tanımlamak için TINA1'in çerçeve bölgelerinin amino asit rezidüleri ile hizalanmıştır. Bu rezidülerin pozisyonları yukarıda yapılan TINA1'in üç-boyutlu modeli kullanılarak analiz edilmiştir. Akabinde, Akabinde, akseptör üzerine grefte edilecek olan donör rezidüleri Queen et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)) tarafından sağlanan kriterlere göre seçilmiştir. Bu şekilde seçilmiş bazı donör rezidüleri aşağıdaki Örneklerde tarif edildiği üzere beşerileştirilmiş TINA1 dizisini yapmak için akseptör antikora transfer edilmiştir.

## 6-2) TINA1 ağır zincirinin beşerileştirilmesi

### 6-2-1) hTINA1-H1-tipi ağır zincir:

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 8'inde gösterilen TINA1 ağır zincirine ilişkin amino asit pozisyonu 21'in (izolösin) valin ile, amino asit pozisyonu 28'in (prolin) alanin ile, amino asit pozisyonu 30'un (lösin) valin ile, amino asit pozisyonu 35'in (glutamik asit) alanin ile, amino asit pozisyonu 36'nın (treonin) serin ile, amino asit pozisyonu 38'in (arjinin) lizin ile, amino asit pozisyonu 39'un (izolösin) valin ile, amino asit pozisyonu 57'nin (glutamin) arjinin ile, amino asit pozisyonu 58'in (lizin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 59'un (metiyonin) alanin ile, amino asit pozisyonu 62'nin (lizin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 65'in (lizin) glutamik asit ile, amino asit pozisyonu 67'nin (izolösin) metiyonin ile, amino asit pozisyonu 87'nin (fenilalanin) valin ile, amino asit pozisyonu 88'in (alanin) treonin ile, amino asit pozisyonu 89'un (fenilalanin) izolösin ile, amino asit pozisyonu 91'in (lösin) alanin ile, amino asit pozisyonu 92'nin (glutamik asit) aspartik asit ile, amino asit pozisyonu 95'in (alanin) treonin ile, amino asit pozisyonu 102'nin (izolösin) lösin ile, amino asit pozisyonu 104'ün (asparajin) serin ile, amino asit pozisyonu 107'nin (asparajin) serin ile, amino asit pozisyonu 111'in (treonin) alanin ile,

amino asit pozisyonu 112'nin (treonin) valin ile, amino asit pozisyonu 114'ün (fenilalanin) tirozin ile, amino asit pozisyonu 132'nin (alanin) glutamin ile ve amino asit pozisyonu 135'in (alanin) lösün ile değiştirilmesini içermeye tasarlanan bir beşerileştirilmiş TINA1 ağır zinciri bir "hTINA1-H1-tipi ağır zincir" olarak gösterilmiştir.

5

hTINA1-H1-tipi ağır zincirin amino asit dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 12'sinde tarif edilir. SEQ ID NO: 12'nin amino asit dizisinde 1 ile 19 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi, 20 ile 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi ve 141 ile 470 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisine, ağır zincir değişken bölgesine ve ağır zincir sabit bölgesine karşılık gelir. SEQ ID NO: 12'nin amino asit dizisini şifreleyen nükleotid dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 11'inde tarif edilir. SEQ ID NO: 11'in nükleotid dizisinde 1 ile 57 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi, 58 ile 420 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi ve 421 ile 1410 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisini, ağır zincir değişken bölge dizisini ve ağır zincir sabit bölge dizisini şifreler. SEQ ID NO: 11'in nükleotid dizisi ve SEQ ID NO: 12'nin amino asit dizisi ayrıca Şekil 3'te de tarif edilir.

10

15

#### **6-2-2) hTINA1-H2-tipi ağır zincir:**

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 8'inde gösterilen TINA1 ağır zincirine ilişkin amino asit pozisyonu 21'in (izolösün) valin ile, amino asit pozisyonu 28'in (prolin) alanin ile, amino asit pozisyonu 30'un (lösün) valin ile, amino asit pozisyonu 35'in (glutamik asit) alanin ile, amino asit pozisyonu 36'nın (treonin) serin ile, amino asit pozisyonu 38'in (arjinin) lizin ile, amino asit pozisyonu 39'un (izolösün) valin ile, amino asit pozisyonu 57'nin (glutamin) arjinin ile, amino asit pozisyonu 58'in (lizin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 59'un (metiyonin) alanin ile, amino asit pozisyonu 62'nin (lizin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 65'in (lizin) glutamik asit ile, amino asit pozisyonu 67'nin (izolösün) metiyonin ile, amino asit pozisyonu 87'nin (fenilalanin) valin ile, amino asit pozisyonu 88'in (alanin) treonin ile, amino asit pozisyonu 89'un (fenilalanin) izolösün ile, amino asit pozisyonu 92'nin (glutamik asit) aspartik asit ile, amino asit pozisyonu 95'in (alanin) treonin ile, amino asit pozisyonu 102'nin (izolösün) lösün ile, amino asit pozisyonu 104'ün (asparajin) serin ile, amino asit pozisyonu 107'nin (asparajin) serin ile, amino asit pozisyonu 111'in (treonin) alanin ile, amino asit pozisyonu 112'nin (treonin) valin ile, amino asit pozisyonu 114'ün (fenilalanin) tirozin ile, amino asit pozisyonu 132'nin (alanin) glutamin ile ve amino asit pozisyonu 135'in (alanin) lösün ile değiştirilmesini

30

35

içerme ile tasarlanan bir beşerileştirilmiş TINA1 ağır zinciri bir "hTINA1-H2-tipi ağır zincir" olarak gösterilmiştir.

hTINA1-H2-tipi ağır zincirin amino asit dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 14'ünde tarif edilir. SEQ ID NO: 14'ün amino asit dizisinde 1 ila 19 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi, 20 ila 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi ve 141 ila 470 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisine, ağır zincir değişken bölgesine ve ağır zincir sabit bölgesine karşılık gelir. SEQ ID NO: 14'ün amino asit dizisini şifreleyen nükleotid dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 13'ünde tarif edilir. SEQ ID NO: 13'ün nükleotid dizisinde 1 ila 57 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi, 58 ila 420 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi ve 421 ila 1410 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisini, ağır zincir değişken bölge dizisini ve ağır zincir sabit bölge dizisini şifreler. SEQ ID NO: 13'ün nükleotid dizisi ve SEQ ID NO: 14'ün amino asit dizisi ayrıca Şekil 4'te de tarif edilir.

### **6-2-3) hTINA1-H3-tipi ağır zincir:**

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 8'inde gösterilen TINA1 ağır zincirine ilişkin amino asit pozisyonu 28'in (prolin) alanin ile, amino asit pozisyonu 30'un (lösin) valin ile, amino asit pozisyonu 36'nın (treonin) serin ile, amino asit pozisyonu 38'in (arjinin) lizin ile, amino asit pozisyonu 39'un (izolösin) valin ile, amino asit pozisyonu 58'in (lizin) glutamin ile, asit pozisyonu 65'in (lizin) glutamik asit ile, amino asit pozisyonu 67'nin (izolösin) metiyonin ile, amino asit pozisyonu 87'nin (fenilalanin) valin ile, amino asit pozisyonu 88'in (alanin) treonin ile, amino asit pozisyonu 92'nin (glutamik asit) aspartik asit ile, amino asit pozisyonu 95'in (alanin) treonin ile, amino asit pozisyonu 102'nin (izolösin) lösin ile, amino asit pozisyonu 104'ün (asparajin) serin ile, amino asit pozisyonu 107'nin (asparajin) serin ile, amino asit pozisyonu 111'in (treonin) alanin ile, amino asit pozisyonu 112'nin (treonin) valin ile, amino asit pozisyonu 114'ün (fenilalanin) tirozin ile, amino asit pozisyonu 132'nin (alanin) glutamin ile ve amino asit pozisyonu 135'in (alanin) lösin ile değiştirilmesini içerme ile tasarlanan bir beşerileştirilmiş TINA1 ağır zinciri bir "hTINA1-H3-tipi ağır zincir" olarak gösterilmiştir.

hTINA1-H3-tipi ağır zincirin amino asit dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 16'sında tarif edilir. SEQ ID NO: 16'nın amino asit dizisinde 1 ila 19 arasındaki amino asit

rezidülerinden oluşan bir dizi, 20 ila 140 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi ve 141 ila 470 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisine, ağır zincir değişken bölgesine ve ağır zincir sabit bölgesine karşılık gelir. SEQ ID NO: 16'nın amino asit dizisini şifreleyen nükleotid dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 5  
15'inde tarif edilir. SEQ ID NO: 15'in nükleotid dizisinde 1 ila 57 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi, 58 ila 420 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi ve 421 ila 1410 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisini, ağır zincir değişken bölge dizisini ve ağır zincir sabit bölge dizisini şifreler. SEQ ID NO: 15'in nükleotid dizisi ve SEQ ID NO: 16'nın amino asit dizisi ayrıca Şekil 5'te de tarif edilir.

10

### **6-3) TINA1 hafif zincirinin beşerileştirilmesi**

#### **6-3-1) hTINA1-L1-tipi hafif zincir:**

15 Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 10'unda gösterilen TINA1 hafif zincirine ilişkin amino asit pozisyonu 23'ün (valin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 28'in (histidin) prolin ile, amino asit pozisyonu 29'un (lizin) serin ile, amino asit pozisyonu 30'un (fenilalanin) serin ile, amino asit pozisyonu 31'in (metiyonin) lösin ile, amino asit pozisyonu 33'ün (treonin) alanin ile, amino asit pozisyonu 40'ın (serin) treonin ile, amino asit pozisyonu 20  
62'nin (glutamin) lizin ile, amino asit pozisyonu 63'ün (serin) alanin ile, amino asit pozisyonu 80'in (aspartik asit) serin ile, amino asit pozisyonu 83'ün (treonin) serin ile, amino asit pozisyonu 90'ın (alanin) aspartik asit ile, amino asit pozisyonu 93'ün (fenilalanin) lösin ile, amino asit pozisyonu 98'in (valin) lösin ile, amino asit pozisyonu 100'ün (alanin) prolin ile, amino asit pozisyonu 103'ün (lösin) fenilalanin ile, amino asit  
25 pozisyonu 120'nin (alanin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 126'nın (lösin) izolösin ile ve amino asit pozisyonu 129'un (alanin) treonin ile değiştirilmesini içermeye tasarlanan bir beşerileştirilmiş TINA1 hafif zinciri bir "hTINA1-L1-tipi hafif zincir" olarak gösterilmiştir.

30 hTINA1-L1-tipi hafif zincirin amino asit dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO. 18'inde tarif edilir. SEQ ID NO: 18'in amino asit dizisinde 1 ila 20 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi, 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi ve 130 ila 234 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisine, hafif zincir değişken bölgesine ve hafif zincir sabit bölgesine karşılık gelir. SEQ  
35 ID NO: 18'in amino asit dizisini şifreleyen nükleotid dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO:

17'sinde tarif edilir. SEQ ID NO: 17'nin nükleotid dizisinde 1 ila 60 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi, 61 ila 387 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi ve 388 ila 702 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisini, hafif zincir değişken bölge dizisini ve hafif zincir sabit bölge dizisini şifreler. SEQ ID NO: 5 17'nin nükleotid dizisi ve SEQ ID NO: 18'in amino asit dizisi ayrıca Şekil 6'da da tarif edilir.

### **6-3-2) hTINA1-L2-tipi hafif zincir:**

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 10'unda gösterilen TINA1 hafif zincirine ilişkin amino asit pozisyonu 28'in (histidin) prolin ile, amino asit pozisyonu 29'un (lizin) serin ile, amino asit pozisyonu 30'un (fenilalanin) serin ile, amino asit pozisyonu 31'in (metiyonin) lösin ile, amino asit pozisyonu 33'ün (treonin) alanin ile, amino asit pozisyonu 40'ın (serin) treonin ile, amino asit pozisyonu 62'nin (glutamin) lizin ile, amino asit pozisyonu 63'ün (serin) alanin ile, amino asit pozisyonu 80'in (aspartik asit) serin ile, amino asit pozisyonu 83'ün (treonin) serin ile, amino asit pozisyonu 90'ın (alanin) aspartik asit ile, amino asit pozisyonu 93'ün (fenilalanin) lösin ile, amino asit pozisyonu 98'in (valin) lösin ile, amino asit pozisyonu 100'ün (alanin) prolin ile, amino asit pozisyonu 103'ün (lösin) fenilalanin ile, amino asit pozisyonu 120'nin (alanin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 126'nın (lösin) izolösin ile ve amino asit pozisyonu 129'un (alanin) treonin ile 20 değiştirilmesini içermeye tasarlanan bir beşerileştirilmiş TINA1 hafif zinciri bir "hTINA1-L2-tipi hafif zincir" olarak gösterilmiştir.

hTINA1-L2-tipi hafif zincirin amino asit dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 20'sinde tarif edilir. SEQ ID NO: 20'nin amino asit dizisinde 1 ila 20 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi, 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi ve 130 ila 234 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisine, hafif zincir değişken bölgesine ve hafif zincir sabit bölgesine karşılık gelir. SEQ ID NO: 20'nin amino asit dizisini şifreleyen nükleotid dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 19'unda tarif edilir. SEQ ID NO: 19'un nükleotid dizisinde 1 ila 60 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi, 61 ila 387 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi ve 388 ila 702 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisini, hafif zincir değişken bölge dizisini ve hafif zincir sabit bölge dizisini şifreler. SEQ ID NO: 30 19'un nükleotid dizisi ve SEQ ID NO: 20'nin amino asit dizisi ayrıca Şekil 7'de de tarif edilir.

### 6-3-3) hTINA1-L3-tipi hafif zincir:

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 10'unda gösterilen TINA1 hafif zincirine ilişkin amino asit pozisyonu 28'in (histidin) prolin ile, amino asit pozisyonu 29'un (lizin) serin ile, amino asit pozisyonu 30'un (fenilalanin) serin ile, amino asit pozisyonu 31'in (metiyonin) lösin ile, amino asit pozisyonu 33'ün (treonin) alanin ile, amino asit pozisyonu 40'in (serin) treonin ile, amino asit pozisyonu 62'nin (glutamin) lizin ile, amino asit pozisyonu 63'ün (serin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 80'in (aspartik asit) serin ile, amino asit pozisyonu 83'ün (treonin) serin ile, amino asit pozisyonu 90'ın (alanin) aspartik asit ile, amino asit pozisyonu 93'ün (fenilalanin) lösin ile, amino asit pozisyonu 98'in (valin) lösin ile, amino asit pozisyonu 100'ün (alanin) prolin ile, amino asit pozisyonu 103'ün (lösin) fenilalanin ile, amino asit pozisyonu 120'nin (alanin) glutamin ile, amino asit pozisyonu 126'nın (lösin) izolösin ile ve amino asit pozisyonu 129'un (alanin) treonin ile değiştirilmesini içermeye tasarlanan bir beşerleştirilmiş TINA1 hafif zinciri bir "hTINA1-L3-tipi hafif zincir" olarak gösterilmiştir.

hTINA1-L3-tipi hafif zincirin amino asit dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 22'sinde tarif edilir. SEQ ID NO: 22'nin amino asit dizisinde 1 ila 20 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi, 21 ila 129 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi ve 130 ila 234 arasındaki amino asit rezidülerinden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisine, hafif zincir değişken bölgesine ve hafif zincir sabit bölgesine karşılık gelir. SEQ ID NO: 22'nin amino asit dizisini şifreleyen nükleotid dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 21'inde tarif edilir. SEQ ID NO: 21'in nükleotid dizisinde 1 ila 60 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi, 61 ila 387 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi ve 388 ila 702 arasındaki nükleotidlerden oluşan bir dizi sırasıyla, sinyal dizisini, hafif zincir değişken bölge dizisini ve hafif zincir sabit bölge dizisini şifreler. SEQ ID NO: 21'in nükleotid dizisi ve SEQ ID NO: 22'nin amino asit dizisi ayrıca Şekil 8'de de tarif edilir.

**[Örnek 7: hTINA1 antikoru ekspresyon vektörünün yapılması ve antikorun üretilmesi]**

#### 7-1) hTINA1 ağır zincir ekspresyon vektörünün yapılması

7-1-1) hTINA1-H1 ekspresyon vektörünün yapılması

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 11'i ile temsil edilen hTINA1-H1'in nükleotid dizisinin 36 ila 437 arasındaki nükleotid pozisyonlarında gösterilen bir hTINA1-H1 değişken bölgesini-şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı sentezlenmiştir (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). hTINA1-H1'in değişken bölgesini şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı, bir şablon olarak sentezlenen DNA fragmanı, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.) ve aşağıda tarif edilen bir primer seti kullanılarak çoğaltılmıştır ve bir hTINA1-H1 ekspresyon vektörü yapmak için In-Fusion HD PCR klonlama kiti (Clontech Laboratories, Inc.) kullanılarak kimerik ve beşerleştirilmiş IgG1-tipi ağır zincir ekspresyon vektörü pCMA-G1'in bir restriksiyon enzimi BlnI ile yarılmış yerine yerleştirilmiştir. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-G1/hTINA1-H1" olarak gösterilmiştir.

#### Primer seti

15

5'-agctcccagatgggtgctgagc-3' (SEQ ID NO: 41: primer EG-Inf-F)

5'-gggcccttggtggaggctgagc-3' (SEQ ID NO: 42: primer EG1-Inf-R)

#### 7-1-2) hTINA1-H2 ekspresyon vektörünün yapılması

20

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 13'ü ile temsil edilen hTINA1-H2'nin nükleotid dizisinin 36 ila 437 arasındaki nükleotid pozisyonlarında gösterilen bir hTINA1-H2 değişken bölgesini-şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı sentezlenmiştir (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) ve bir hTINA1-H2 ekspresyon vektörü Örnek 7-1-1)'deki ile aynı şekilde yapılmıştır. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-G1/hTINA1-H2" olarak gösterilmiştir.

25

#### 7-1-3) hTINA1-H3 ekspresyon vektörünün yapılması

30

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 15'i ile temsil edilen hTINA1-H3'ün nükleotid dizisinin 36 ila 437 arasındaki nükleotid pozisyonlarında gösterilen bir hTINA1-H3 değişken bölgesini-şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı sentezlenmiştir (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) ve bir hTINA1-H3 ekspresyon vektörü Örnek 7-1-1)'deki ile aynı şekilde yapılmıştır. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-G1/hTINA1-H3" olarak gösterilmiştir.

35

## 7-2) hTINA1 hafif zincir ekspresyon vektörünün yapılması

### 7-2-1) hTINA1-L1 ekspresyon vektörünün yapılması

5

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 17'si ile temsil edilen hTINA1-L1'in nükleotid dizisinin 38 ila 492 arasındaki nükleotid pozisyonlarında gösterilen bir hTINA1-L1 değişken bölgesini-şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı sentezlenmiştir (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). hTINA1-L1'in değişken bölgesini şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı, bir şablon olarak sentezlenen DNA fragmanı, KOD-Plus-(Toyobo Co., Ltd.) ve aşağıda tarif edilen bir primer seti kullanılarak çoğaltılmıştır ve bir hTINA1-L1 ekspresyon vektörü yapmak için In-Fusion HD PCR klonlama kiti (Clontech Laboratories, Inc.) kullanılarak kimerik ve beşerleştirilmiş antikor hafif zincir ekspresyon vektörü pCMA-LK'nın bir restriksiyon enzimi BsiWI ile yarılmış yerine yerleştirilmiştir. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-LK/hTINA1-L1" olarak gösterilmiştir.

Primer seti

20 5'-ctgtggatctccggcgcgtacggc-3' (SEQ ID NO: 43: primer CM-LKF)  
5'-ggagggggcggccaccgtacg-3' (SEQ ID NO: 44: primer KCL-Inf-R)

### 7-2-2) hTINA1-L2 ekspresyon vektörünün yapılması

25 Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 19'u ile temsil edilen hTINA1-L2'nin nükleotid dizisinin 38 ila 402 arasındaki nükleotid pozisyonlarında gösterilen bir hTINA1-L2 değişken bölgesini-şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı sentezlenmiştir (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) ve bir hTINA1-L2 ekspresyon vektörü Örnek 7-2-1)'deki ile aynı şekilde yapılmıştır. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-LK/hTINA1-30 L2" olarak gösterilmiştir.

### 7-2-3) hTINA1-L3 ekspresyon vektörünün yapılması

Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 21'i ile temsil edilen hTINA1-L3'ün nükleotid dizisinin 38 ila 35 402 arasındaki nükleotid pozisyonlarında gösterilen bir hTINA1-L3 değişken bölgesini-

şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı sentezlenmiştir (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) ve bir hTINA1-L3 ekspresyon vektörü Örnek 7-2-1)'deki ile aynı şekilde yapılmıştır. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-LK/hTINA1-L3" olarak gösterilmiştir.

5

### **7-3) hTINA1 antikorunun üretimi ve saflaştırılması**

#### **7-3-1) hTINA1 antikorunun küçük-ölçekte üretimi**

10 Her bir antikor Örnek 5-2-5)'teki ile aynı şekilde üretilmiştir.

pCMA-G1/hTINA1-H1 ve pCMA-LK/hTINA1-L1 kombinasyonu ile elde edilen hTINA1 antikoru "hTINA1-H1L1" olarak gösterilmiştir; pCMA-G1/hTINA1-H2 ve pCMA-LK/hTINA1-L1 kombinasyonu ile elde edilen hTINA1 antikoru "hTINA1-H2L1" olarak gösterilmiştir; pCMA-G1/hTINA1-H2 ve pCMA-LK/hTINA1-L2 kombinasyonu ile elde edilen hTINA1 antikoru "hTINA1-H2L2" olarak gösterilmiştir ve pCMA-G1/hTINA1-H3 ve pCMA-LK/hTINA1-L3 kombinasyonu ile elde edilen hTINA1 antikoru "hTINA1-H3L3" olarak gösterilmiştir.

#### **20 7-3-2) hTINA1 antikorunun üretimi**

hTINA1-H1L1, hTINA1-H2L1, hTINA1-H2L2 ve hTINA1-H3L3 aşağıdaki yöntem ile üretilmiştir.

25 FreeStyle 293F hücreleri (Invitrogen Corp.) manüele göre alt-kültürlenmiştir ve kültürlenmiştir. Logaritmik büyüme fazındaki  $1,2 \times 10^9$  FreeStyle 293F hücresi (Invitrogen Corp.) 3 L'lik Fernbach Erlenmeyer Flask'ına (Corning Inc.) ekilmiştir akabinde bir FreeStyle 293 ekspresyon vasatı (Invitrogen Corp.) ile  $1,0 \times 10^6$  hücre/ml'ye seyreltilmiştir ve akabinde 37°C'lik bir %8'lik CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 1 saat  
30 boyunca 90 rpm'de sallama ile kültürlenmiştir. Polietilenimin (Polyscience #24765; 3,6 mg) Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml) içinde çözündürülmüştür. Akabinde, PureLink HiPure Plasmid kit (Invitrogen Corp.) kullanılarak hazırlanmış olan hafif zincir ekspresyon vektörü (0,8 mg) ve ağır zincir ekspresyon vektörü (0,4 mg) Opti-Pro SFM'ye (Invitrogen Corp.; 20 ml) eklenmiştir. Ekspresyon vektörü/Opti-Pro SFM  
35 karıştırılmış çözeltisi (20 ml), polietilenimin/Opti-Pro SFM karıştırılmış çözeltisi (20 ml)

eklenmiştir ve karışım nazik bir şekilde karıştırılmıştır, 5 dakika boyunca ilaveten bırakılmıştır ve akabinde FreeStyle 293F hücreleri eklenmiştir. Kültürü 37°C'lik bir %8'lik CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 90 rpm'de 7 gün boyunca sallama ile elde edilen bir kültür süpernatantı Disposable Capsule Filter (ADVANTEC #CCS-045-E1H) vasıtasıyla  
5 filtrelen geçirilmiştir.

### 7-3-3) hTINA1 antikorunun saflaştırılması

Her bir antikor yukarıda 7-3-2)'de elde edilen kültür süpernatantından rProtein A afinite kromatografisi (4 ila 6°C) ve seramik hidroksiapatit (oda sıcaklığı) kullanılan iki adım ile saflaştırılmıştır. rProtein A afinite kromatografisi saflaştırmasından ve seramik hidroksiapatit saflaştırmasından sonraki tampon değiştirme adımları 4 ila 6°C'de gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, kültür süpernatantı PBS ile dengelenmiş olan MabSelect SuRe'e (GE Healthcare Japan Corporation tarafından üretilmiştir, HiTrap kolonu)  
10 uygulanmıştır. Kolona tam kültür süpernatantının girişinden sonra, kolon kolon hacminin en az iki katı olan bir miktarda PBS ile yıkanmıştır. Sonra, antikor-içeren fraksiyonlar 2 M'lık arjinin hidroklorür çözeltisi (pH 4,0) ile elüsyon ile toplanmıştır. Fraksiyonların diyaliz (Thermo Fisher Scientific, Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) ile PBS ile tamponu-değiştirilmiştir ve akabinde bu 5 mM'lık sodyum fosfat ve 50 mM  
15 MES (pH 7,0) olan bir tampon ile 5-kat seyreltilmiştir. Elde edilen antikor çözeltisi 5 mM NaPi, 50 mM MES ve 30 mM NaCl (pH 7,0) olan bir tampon ile dengelenmiş olan bir seramik hidroksiapatit kolona (Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale CHT Type-I Hydroxyapatite Column) uygulanmıştır. Antikor-içeren fraksiyonlar sodyum klorür kullanılarak lineer konsantrasyon gradyan elüsyonu ile toplanmıştır. Fraksiyonların  
20 tamponu diyaliz (Thermo Fisher Scientific, Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) ile HBSor (25 mM histidin/%5 sorbitol, pH 6,0) ile değiştirilmiştir. Son olarak, fraksiyonlar konsantre edilmiştir ve Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN 20 (moleküler ağırlık kesim-değeri: UF10K, Sartorius AG, 4°C) kullanılarak 20 mg/ml veya daha yüksek olan bir IgG konsantrasyonuna ayarlanmıştır ve bir saflaştırılmış örnek olarak kullanılmıştır.

30

### [Referans Örnek 1: hRS7 antikoru ekspresyon vektörünün saflaştırılması ve antikorun üretimi]

hRS7 antikoru WO 2003/074566 Numaralı Uluslararası Yayın'da tarif edilen bir hafif zincirin ve bir ağır zincirin amino asit dizilerine göre üretilmiştir.  
35

### 1-1) hRS7 antikorunun ağır zincir ekspresyon vektörünün yapılması

5 Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 29'u ile temsil edilen hRS7 antikorunun ağır zincirinin nükleotid dizisinin 36 ila 437 arasındaki nükleotid pozisyonlarında gösterilen bir hRS7 antikorunun ağır zincir değişken bölgesini-şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı sentezlenmiştir (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) ve bir hRS7 antikorunun ağır zincir ekspresyon vektörü Örnek 7-1-1)'deki ile aynı şekilde yapılmıştır. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-G1/hRS7" olarak gösterilmiştir. hRS7 antikorunun ağır zincirinin amino asit dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 30'unda gösterilir.

### 1-2) hRS7 antikorunun hafif zincir ekspresyon vektörünün yapılması

15 Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 31'i ile temsil edilen hRS7 antikorunun hafif zincirinin nükleotid dizisinin 38 ila 402 arasındaki nükleotid pozisyonlarında gösterilen bir hRS7 antikorunun hafif zincir değişken bölgesini-şifreleyen DNA dizisini içeren bir DNA fragmanı sentezlenmiştir (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) ve bir hRS7 antikorunun hafif zincir ekspresyon vektörü Örnek 7-2-1)'deki ile aynı şekilde yapılmıştır. Elde edilen ekspresyon vektörü "pCMA-LK/hRS7" olarak gösterilmiştir. hRS7 antikorunun hafif zincirinin amino asit dizisi Dizi Listesi'nin SEQ ID NO: 32'sinde gösterilir.

### 1-3) hRS7 antikorunun üretilmesi ve saflaştırılması

#### 1-3-1) hRS7 antikorunun üretilmesi

25

hRS7 antikorunun, pCMA-G1/hRS7 ve pCMA-LK/hRS7 kombinasyonu ile Örnek 7-3-2)'deki ile aynı şekilde üretilmiştir.

#### 1-3-2) hRS7 antikorunun saflaştırılması

30

Antikor 1-3-1)'de elde edilen kültür süpernatantından Örnek 7-3-3)'teki ile aynı şekilde saflaştırılmıştır.

### [Örnek 8: hTINA1 antikorunun ve hRS7 antikorunun antijen-bağlama afinitesinin ölçülmesi]

35

### 8-1) Küçük ölçekte üretilen antikor (kültür süpernatantı) kullanılarak antijen-bağlama afinitesinin ölçülmesi

- 5 Her bir antikor, bir ligand olarak antikoru bir immobilize edilmiş anti-insan IgG (Fab) antikoru üzerinde yakalamanın yakalama yöntemi ve antijeni bir analit olarak analiz etme ile Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) kullanılarak bir antijen (Rekombinant İnsan TROP-2 Fc kimerası) için bunun ayrılma sabiti için analiz edilmiştir. Anti-insan IgG (Fab) antikorumun yaklaşık 2000 RU'su (Human Fab capture
- 10 kit, GE Healthcare Japan Corporation) amin kuplaj yöntemi ile bir sensör çipi CM5'e (BIAcore, Inc.) kovalent olarak bağlanmıştır. Benzer bir şekilde, bu antikor bir referans akış hücresi üzerine immobilize edilmiştir. Kullanılan yürütme tamponu, HBS-EP+'dır (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, %0,05 Sürfaktan P20). Antikoru içeren kültür süpernatantı 80 saniye boyunca anti-insan IgG (Fab) antikoru-immobilize
- 15 edilmiş çip üzerine eklenmiştir ve akabinde, antijenin seri seyreltmelerinin (1 ila 1000 nM) her biri 300 saniye boyunca 30 µL/dk olan bir akış hızında buna eklenmiştir. Bunu takiben, ayrılma fazı 600 saniye boyunca takip edilmiştir. %20'lik DMSO içeren 10 mM Gly-HCl (pH 1,5) 60 saniye boyunca 10 µL/dk olan bir akış hızında bir yenileme çözeltisi olarak buna eklenmiştir. Veriler, bir birleşme hız sabiti  $k_{on}$ 'u, bir ayrılma hız sabiti  $k_{off}$ 'u
- 20 ve bir ayrılma sabitini ( $K_D$ ;  $K_D = k_{off}/k_{on}$ ) hesaplamak için analitik yazılımın Bivalent bağlama modeli (BIAevaluation yazılımı, versiyon 4.1) kullanılarak analiz edilmiştir.

[Tablo 1]

	Adı	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	6.3E-08
2	hTINA1-H2L1	6.9E-08
3	hTINA1-H2L2	7.1E-08
4	hTINA1-H3L3	5.8E-08
5	cTINA1	5.6E-08

- 25 Antikor örneği olarak kültür süpernatantı kullanılan bağlama aktivitesi

### 8-2) Antijen-bağlama afinitesinin saflaştırılmış antikor kullanılarak ölçülmesi

Her bir antikor, bir ligand olarak antikoru bir immobilize edilmiş anti-insan IgG (Fab) antikoru üzerinde yakalamanın yakalama yöntemi ve antijeni bir analit olarak analiz etme ile Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) kullanılarak bir antijen

5 (Rekombinant İnsan TROP-2 Fc kimerası) için bunun ayrılma sabiti için analiz edilmiştir. Anti-insan IgG (Fab) antikorunun yaklaşık 2000 RU'su (Human Fab capture kit, GE Healthcare Japan Corporation) amin kuplaj yöntemi ile bir sensör çipi CM5'e (BIAcore, Inc.) kovalent olarak bağlanmıştır. Benzer bir şekilde, bu antikor bir referans akış hücresi üzerine immobilize edilmiştir. Kullanılan yürütme tamponu, HBS-EP+'dır

10 (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, %0,05 Sürfaktan P20). Antikor 1 dk boyunca anti-insan IgG (Fab) antikoru-immobilize edilmiş çip üzerine eklenmiştir ve akabinde, antijenin seri seyreltmelerinin (1 ila 1000 nM) her biri 300 saniye boyunca 30 µL/dk olan bir akış hızında buna eklenmiştir. Bunu takiben, ayrılma fazı 600 saniye boyunca takip edilmiştir. Bir yürütme tamponu ile seyreltilmiş 25 mM NaOH 3 saniye

15 boyunca 100 µl/dk olan bir akış hızında bir yenileme çözeltisi olarak buna iki kere eklenmiştir. Veriler yukarıdaki ile aynı şekilde analiz edilmiştir.

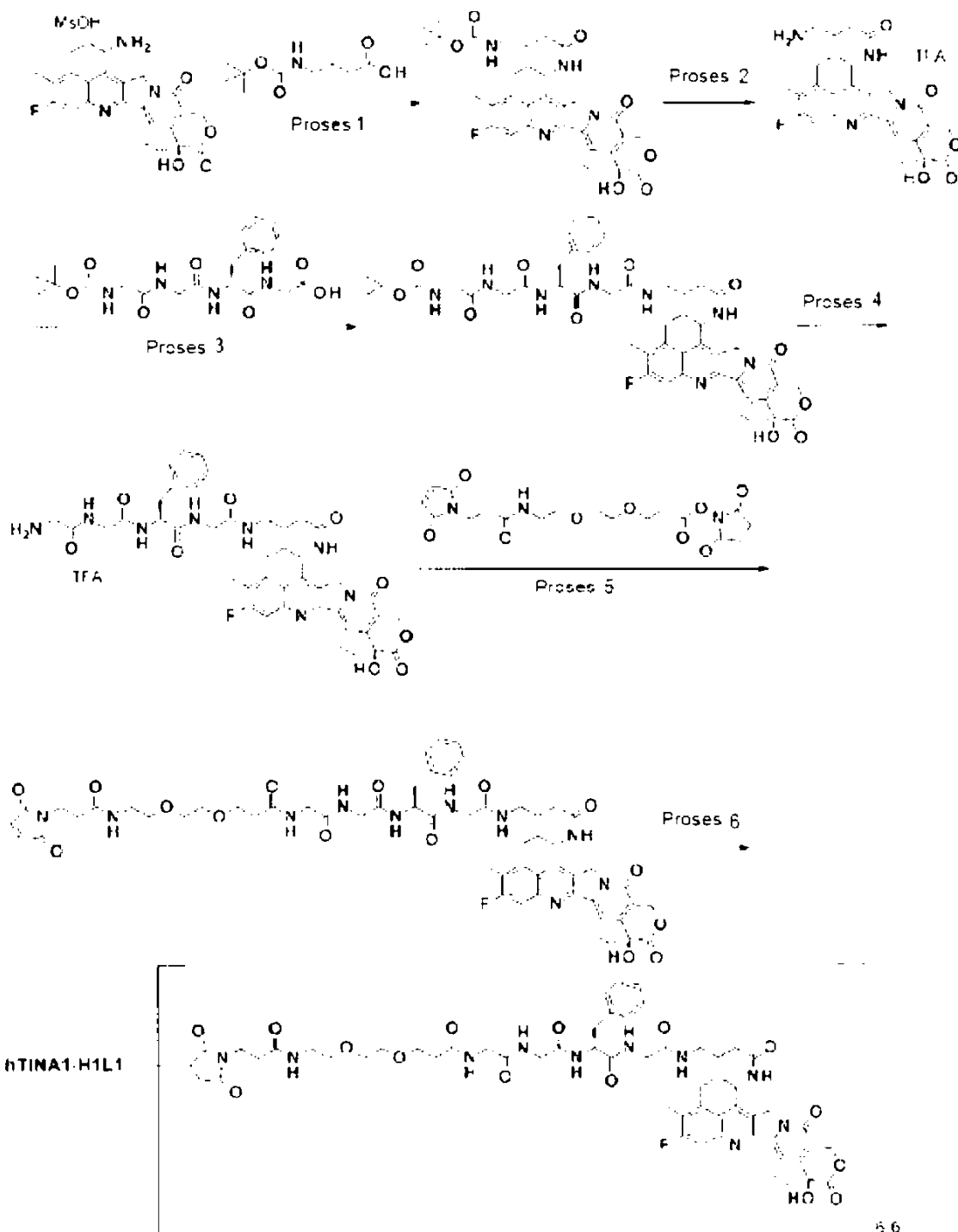
[Tablo 2]

	Adı	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	2.7E-08
2	hTINA1-H2L1	3.0E-08
3	hTINA1-H2L2	2.7E-08
4	hTINA1-H3L3	1.5E-08
5	hRS7	3.0E-10

20 Antikor örneği olarak saflaştırılmış antikor kullanılan bağlama aktivitesi ölçümü

### [Örnek 9: hTINA1-H1L1 ADC (1) üretimi]

[Formul 25]



- 5 **Proses 1: tert-Bütil (4-(((1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-dikso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino)-4-okzobütil)karbamat**

4-(ter-Bütoksikarbonilamino)bütanoik asit (0,237 g, 1,13 mmol) diklorometan (10 mL) içinde çözüldürülmüştür, N-hidroksisüksinimid (0,130 g, 1,13 mmol) ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür (0,216 g, 1,13 mmol) eklenmiştir ve 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon çözeltisi, ekzatekan mesilat (0,500 g, 0,94 mmol) ve trietilamin (0,157 mL, 1,13 mmol) ile doldurulmuş bir N,N-dimetilformamid çözeltisine (10 mL) damla damla eklenmiştir ve oda sıcaklığında 1 gün boyunca karıştırılmıştır. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve elde edilen rezidü söz konusu bileşiği (0,595 g, kantitatif) elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [kloroform - kloroform : metanol = (hacim/hacim) 8 : 2] ile saflaştırılmıştır.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.87 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.31 (9H, s), 1.58 (1H, t, J=7.2 Hz), 1.66 (2H, t, J=7.2 Hz), 1.89-1.82 (2H, m), 2.12-2.21 (3H, m), 2.39 (3H, s), 2.92 (2H, t, J=6.5 Hz), 3.17 (2H, s), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.24 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.59-5.55 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.78 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.30 (1H, s), 7.79 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.40 (1H, d, J=8.6 Hz).

MS (APCI) m/z: 621 (M+H)<sup>+</sup>.

**Proses 2: 4-Amino-N-[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]bütaneamid trifloroasetat**

Yukarıda Proses 1'de elde edilen bileşik (0,388 g, 0,61 mmol) diklorometan (9 mL) içinde çözüldürülmüştür. Trifloroasetik asit (9 mL) eklenmiştir ve bu 4 saat boyunca karıştırılmıştır. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve elde edilen rezidüler söz konusu bileşiği (0,343 g, kantitatif) elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [kloroform - kloroformun bölüntülenmiş organik katmanı : metanol : su = (hacim/hacim/hacim) 7 : 3 : 1] ile saflaştırılmıştır.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.87 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.79-1.92 (4H, m), 2.10-2.17 (2H, m), 2.27 (2H, t, J=7.0 Hz), 2.40 (3H, s), 2.80-2.86 (2H, m), 3.15-3.20 (2H, m), 5.15 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.26 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.54-5.61 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.32 (1H, s), 7.72 (3H, brs), 7.82 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.54 (1H, d, J=8.6 Hz).

MS (APCI) m/z: 521 (M+H)<sup>+</sup>.

**Proses 3: N-(ter-Bütoksikarbonil)glisilglisil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino)-4-oksobütülglisinamid**

N-(ter-Bütoksikarbonil)glisilglisil-L-fenilalanilglisin (0,081 g, 0,19 mmol) diklorometan (3 mL) içinde çözüldürülmüştür, N-hidroksisüksinimid (0,021 g, 0,19 mol) ve 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür (0,036 g, 0,19 mmol) eklenmiştir ve akabinde 3,5 saat karıştırılmıştır. Reaksiyon çözeltisi, yukarıda Proses 2'de elde edilen bileşik (0,080 g, 0,15 mmol) ile doldurulmuş bir N,N-dimetilformamid çözeltisine (1,5 mL) damla damla eklenmiştir ve oda sıcaklığında 4 saat boyunca karıştırılmıştır.

5 Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve elde edilen rezidüler söz konusu bileşiği (0,106 g, %73) elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [kloroform - kloroform : metanol = (hacim/hacim) 8 : 2] ile saflaştırılmıştır.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.87 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.36 (9H, s), 1.71 (2H, m), 1.86 (2H, t, J=7.8 Hz), 2.15-2.19 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.77 (1H, dd, J=12.7, 8.8 Hz), 10 3.02 (1H, dd, J=14.1, 4.7 Hz), 3.08-3.11 (2H, m), 3.16-3.19 (2H, m), 3.54 (2H, d, J=5.9 Hz), 3.57-3.77 (4H, m), 4.46-4.48 (1H, m), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.25 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.55-5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.00 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.17-7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.71 (1H, t, J=5.7 Hz), 7.80 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.92 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.15 (1H, d, J=8.2 Hz), 8.27 (1H, t, J=5.5 Hz), 8.46 (1H, d, J=8.2 Hz).

15 MS (APCI) m/z: 939 (M+H)<sup>+</sup>.

**Proses 4: Glisilglisil-L-fenilalanil-N-(4-[[[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino}-4-oksobütil)glisinamid trifloroasetat**

20 Yukarıda Proses 3'te elde edilen bileşik (1,97 g, 2,10 mmol) diklorometan (7 mL) içinde çözündürülmüştür. Trifloroasetik asit (7 mL) eklenmesinden sonra, bu 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve bu azeotropik distilasyon için tolüen ile doldurulmuştur. Elde edilen rezidüler söz konusu bileşiği (1,97 g, %99) elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [kloroform - kloroformun 25 bölüntülenmiş organik katmanı : metanol : su = (hacim/hacim/hacim) 7 : 3 : 1] ile saflaştırılmıştır.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.87 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.71-1.73 (2H, m), 1.82-1.90 (2H, m), 2.12-2.20 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.75 (1H, dd, J=13.7, 9.4 Hz), 3.03-3.09 (3H, m), 3.18-3.19 (2H, m), 3.58-3.60 (2H, m), 3.64 (1H, d, J=5.9 Hz), 3.69 (1H, d, J=5.9 Hz), 3.72 (1H, d, J=5.5 Hz), 3.87 (1H, dd, J=16.8, 5.9 Hz), 4.50-4.56 (1H, m), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.25 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.55-5.60 (1H, m), 7.17-7.27 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.78-7.81 (2H, m), 7.95-7.97 (3H, m), 8.33-8.35 (2H, m), 8.48-8.51 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 839 (M+H)<sup>+</sup>.

**Proses 5: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-Diokso-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]amino)etoksi)etoksi]propanoil}glisilglisil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino)-4-oksoobütil)glisinamid**

Yukarıda Proses 4'te elde edilen bileşiğin (100 mg, 0,119 mmol) bir N,N-dimetilformamid (1,20 mL) çözeltisine, diizopropiletilamin (20,8 µL, 0,119 mmol) ve N-süksinimidil 3-(2-(2-(3-maleinimidpropanamid)etoksi)etoksi)propanoat (50,7 mg, 0,119 mmol) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve elde edilen rezidüler söz konusu bileşiği (66,5 g, %48) bir solgun sarı renkte katı madde olarak elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [kloroform - kloroform : metanol = (hacim/hacim) 5 : 1] ile saflaştırılmıştır.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.85 (3H, t, J = 7.4 Hz), 1.65-1.74 (2H, m), 1.77-1.90 (2H, m), 2.07-2.19 (4H, m), 2.30 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.33-2.36 (2H, m), 2.38 (3H, s), 2.76 (1H, dd, J = 13.7, 9.8 Hz), 2.96-3.18 (9H, m), 3.42-3.44 (4H, m), 3.53-3.76 (10H, m), 4.43 (1H, td, J = 8.6, 4.7 Hz), 5.14 (1H, d, J = 18.8 Hz), 5.23 (1H, d, J = 18.8 Hz), 5.38 (1H, d, J = 17.2 Hz), 5.42 (1H, d, J = 17.2 Hz), 5.52-5.58 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.98 (2H, s), 7.12-7.17 (1H, m), 7.18-7.25 (4H, m), 7.29 (1H, s), 7.69 (1H, t, J = 5.5 Hz), 7.78 (1H, d, J = 11.3 Hz), 7.98-8.03 (2H, m), 8.11 (1H, d, J = 7.8 Hz), 8.16 (1H, t, J = 5.7 Hz), 8.23 (1H, t, J = 5.9 Hz), 8.44 (1H, d, J = 9.0 Hz).

MS (APCI) m/z: 1149 (M+H)<sup>+</sup>.

**Proses 6: Antikor-ilaç konjugatı (1)**

25

Antikorum indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (10,0 mL) bir 50 mL'lik tüpe toplanmıştır ve bir sulu 10 mM TCEP çözeltisi (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; her bir antikor molekülü için 4,6 eş-değer) ve bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL) ile doldurulmuştur. Çözeltinin 7,4 ± 0,1 olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikor içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ 37°C'de 1 saat boyunca inkübe etme ile indirgenmiştir.

35

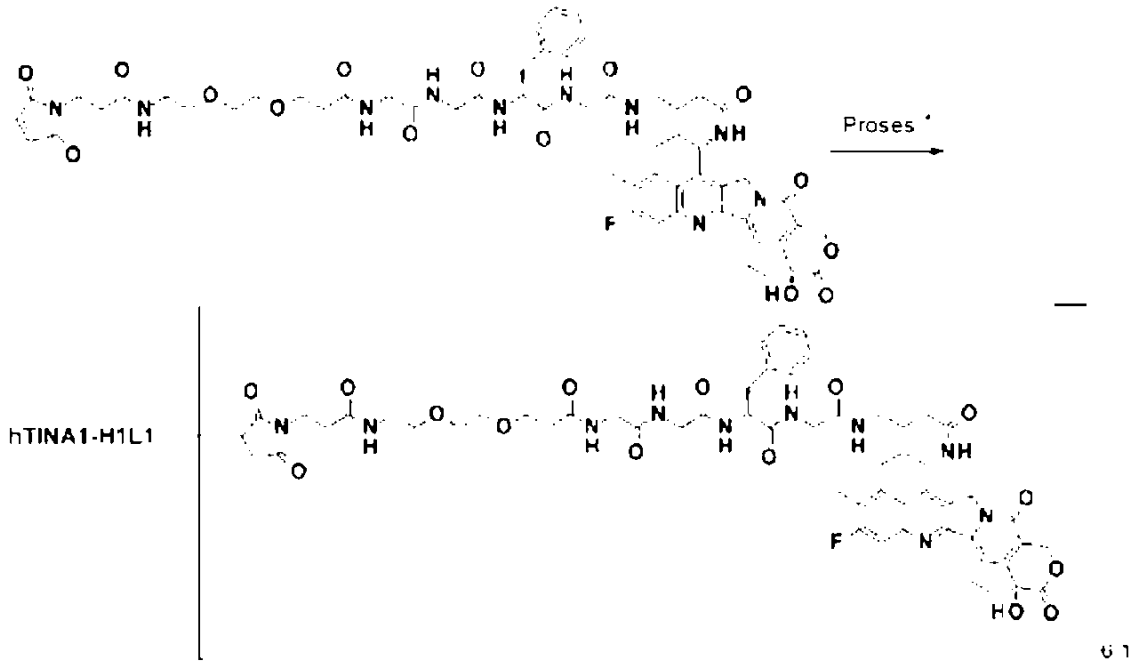
Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti oda sıcaklığındaki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, buna bir dimetil sülfoksit (0,567) eklenmiştir. Bunu takiben, yukarıda Proses 5'te elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,635 mL; her bir antikor molekülü için 9,2 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için oda sıcaklığında 40 dakika boyunca bir tüp rotatör (MTR-103, AS ONE Corporation tarafından üretilmiştir) kullanılarak karıştırılmıştır. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,127 mL; her bir antikor molekülü için 18,4 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

Saflaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin 35,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür E kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

Antikor konsantrasyonu: 2,70 mg/mL, antikor verimi: 94,5 mg (%95) ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı (n): 6,6.

#### **[Örnek 10: hTINA1-H1L1 ADC (2) üretimi]**

25 [Formül 26]



### Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (2)

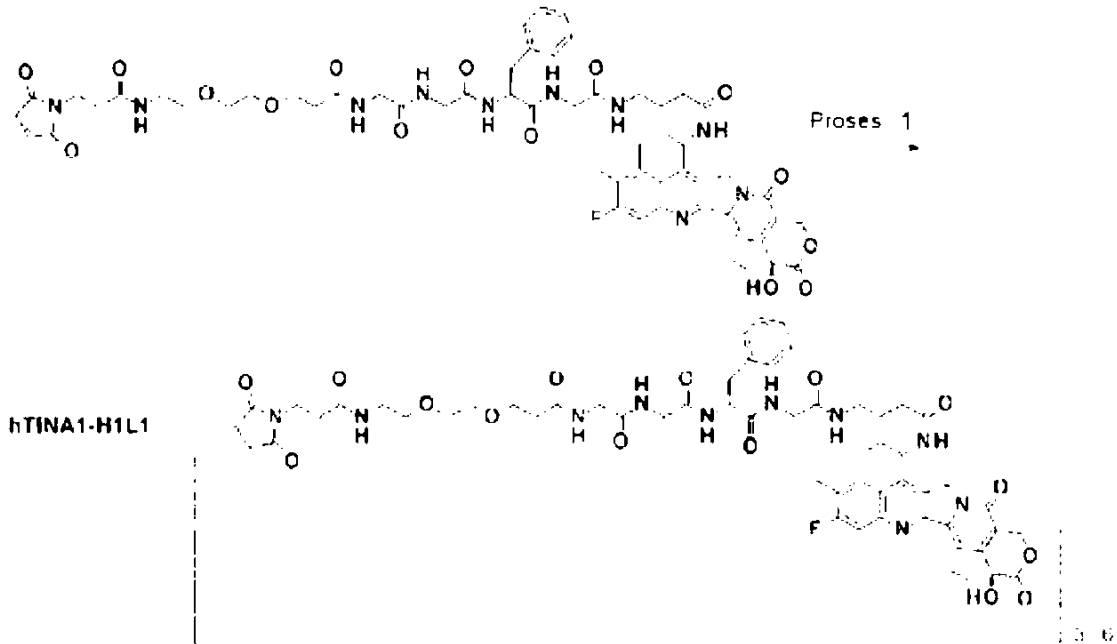
- 5 Antikörün indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikör konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (2,0 mL) bir 4 mL'lik tüpe toplanmıştır ve bir sulu 10 mM TCEP çözeltisi (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
- 10 (0,0690 mL; her bir antikör molekülü için 5,0 eş-değer) ve bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 mL) ile doldurulmuştur. Çözeltinin  $7,4 \pm 0,1$  olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikör içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca inkübe etme ile indirgenmiştir.
- 15 Antikör ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti  $15^{\circ}\text{C}$ 'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, buna Örnek 9'un Proses 5'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,127 mL; her bir antikör molekülü için 9,2 eş-değer) kademeli olarak damla damla eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antiköre konjuge etmek için  $15^{\circ}\text{C}$ 'deki bir su banyosu içinde 1 saat boyunca
- 20 inkübe edilmiştir. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0190 mL; her bir antikör molekülü için 13,8 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

Safılaştırma: Yukarıdaki çözeltili söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltilinin 35,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak safılaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür E kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

Antikor konsantrasyonu: 2,08 mg/mL, antikor verimi: 18,7 mg (%94) ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı (n): 6,1.

### [Örnek 11: hTINA1-H1L1 ADC (3) üretimi]

[Formü 27]



15

### Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (3)

Antikörün indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözeltili (5,0 mL) bir 15 mL'lik

20

kaba toplanmıştır, karıştırarak bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 mL) ile doldurulmuştur ve akabinde 37°C'de 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Buna karıştırarak bir sulu 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0745 mL; her bir antikör molekülü için 2,3 eş-değer) eklenmesinden ve  
5 akabinde çözeltinin  $7,0 \pm 0,1$  olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikör içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ 37°C'de 1 saat boyunca karıştırma ile indirgenmiştir.

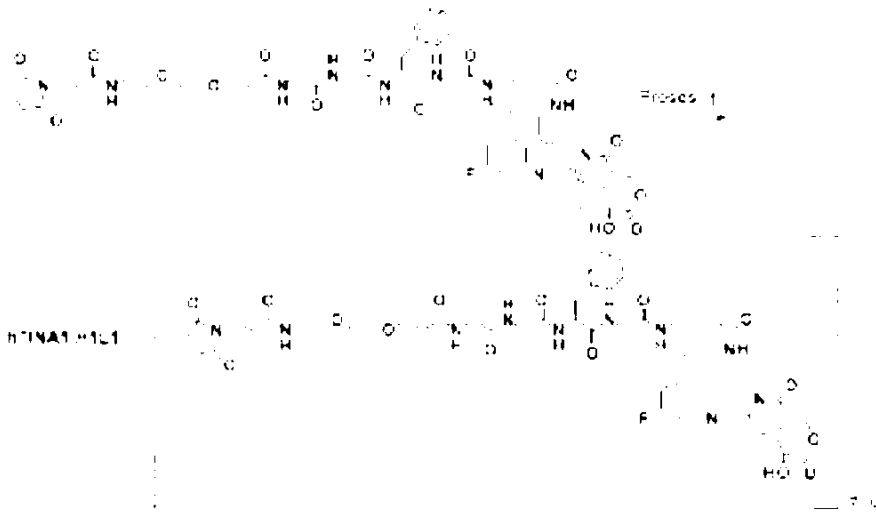
Antikör ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti 15°C'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, buna Örnek 9'un Proses 5'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,162 mL; her bir antikör molekülü için 5,0 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için 15°C'deki bir su banyosu içinde 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0418 mL; her bir  
15 antikör molekülü için 12,9 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

Saflaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikör-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin 21,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D  
20 kullanılarak saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedürler E ve F kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (ölçülen ortalama değer) ve  $E_{D,370} = 18982$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

25 Antikör konsantrasyonu: 2,19 mg/mL, antikör verimi: 46,0 mg (%92), her bir antikör molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı: 3,6 ve her bir antikör molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür F ile ölçülen ortalama sayısı: 3,6.

30 **[Örnek 12: hTINA1-H1L1 ADC (4) üretimi]**

[Formül 28]



#### Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (4)

- 5 Antikorum indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen htINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (5,0 mL) bir 15 mL'lik kaba toplanmıştır, karıştırarak bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai
- 10 Tesque, Inc.; 0,0813 mL) ile doldurulmuştur ve akabinde 37°C'de 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Buna karıştırarak bir sulu 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,162 mL; her bir antikor molekülü için 5,0 eş-değer) eklenmesinden ve akabinde çözeltinin 7,0 ± 0,1 olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikor içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ 37°C'de 1 saat boyunca karıştırma ile indirgenmiştir.

15

- Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti 15°C'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, buna Örnek 9'un Proses 5'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,389 mL; her bir antikor molekülü için 12,0 eş-değer) kademeli olarak damla damla eklenmiştir ve
- 20 ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için 15°C'lik bir su banyosu içinde 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0418 mL; her bir antikor molekülü için 12,9 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

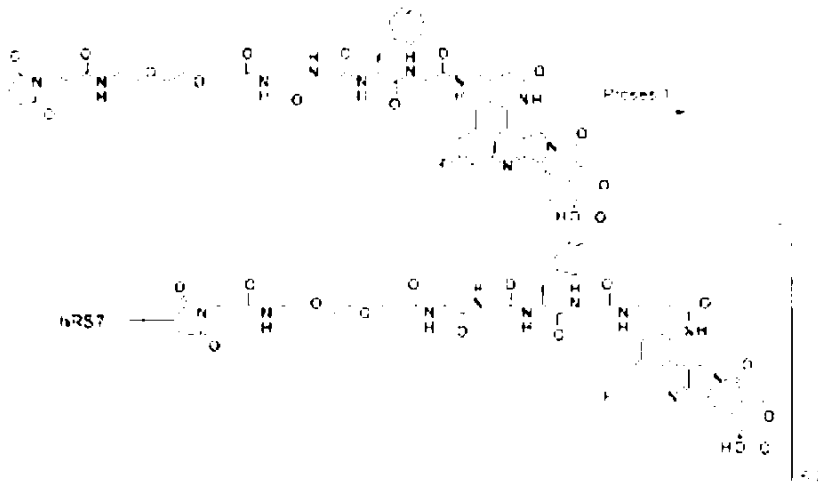
Safılaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin 21,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak safılaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedürler E ve F kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

Antikor konsantrasyonu: 2,19 mg/mL, antikor verimi: 46,0 mg (%92), her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı: 7,0 ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür F ile ölçülen ortalama sayısı: 7,0.

### [Referans Örnek 13: hRS7 ADC (5) üretimi]

15

(Formül 10)



### Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (5)

20 Antikorum indirgenmesi: Referans Örnek 1'de üretilen hRS7, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,56 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (2,0 mL) bir 4 mL'lik tüpe toplanmıştır ve bir sulu 10 mM TCEP çözeltisi (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)  
25 (0,0690 mL; her bir antikor molekülü için 5,0 eş-değer) ve bir sulu 1 M dipotasyum

hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 mL) ile doldurulmuştur. Çözeltinin  $7,4 \pm 0,1$  olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikor içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca inkübe etme ile indirgenmiştir.

- 5 Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti  $15^{\circ}\text{C}$ 'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, buna Örnek 9'un Proses 5'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,127; her bir antikor molekülü için 9,2 eş-değer) eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için  $15^{\circ}\text{C}$ 'deki bir su banyosu içinde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonra, bir
- 10 sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0190 mL; her bir antikor molekülü için 13,8 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

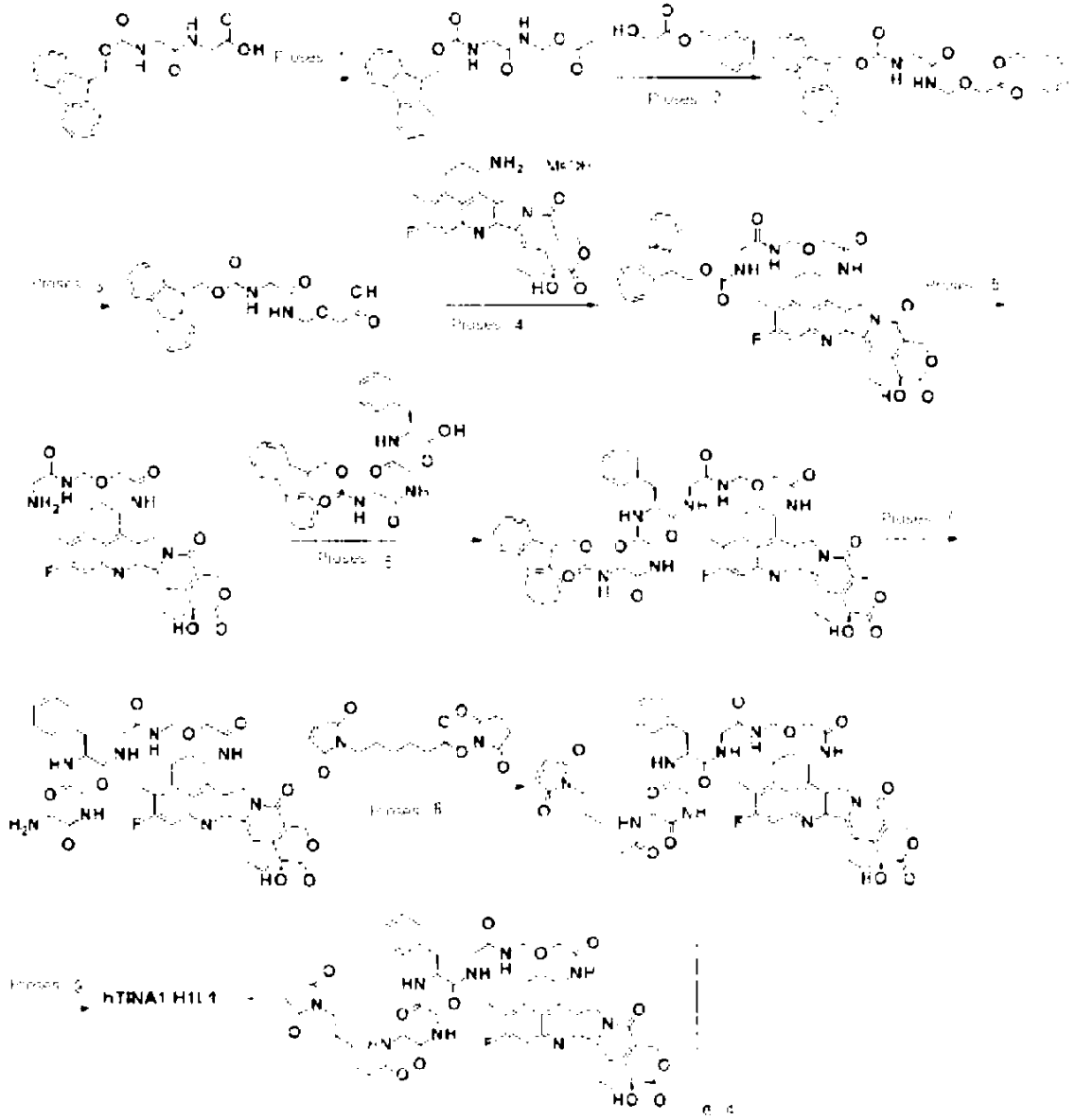
- Saflaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin
- 15 9,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür E kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

20

Antikor konsantrasyonu: 2,04 mg/mL, antikor verimi: 18,4 mg (%92) ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı (n): 6,2.

- 25 **[Örnek 14: hTINA1-H1L1 ADC (6) üretimi]**

[Formül 30]



### Proses 1: ({N-[(9H-Floren-9-iletoksi)karbonil]glisil}amino)metil asetat

5

N-9-florenilmetoksikarbonilglisilglisin (4,33 g, 12,2 mmol), tetrahidrofuran (120 ml) ve tolüen (40,0 ml) içeren bir karışıma, piridin (1,16 ml, 14,7 mmol) ve kurşun tetraasetat (6,84 g, 14,7 mmol) eklenmiştir ve geri-akım altında 5 saat boyunca ısıtılmıştır. Reaksiyon çözeltisi oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, çözünmeyen maddeler Celite yoluyla filtrasyon ile uzaklaştırılmıştır ve azaltılmış basınç altında konsantre edilmiştir. Elde edilen rezidüler etil asetat içinde çözündürülmüştür ve su ve doymuş tuzlu su ile yıkanmıştır ve akabinde organik katman anhidroz magnezyum sülfat üzerinde

10

kurutulmuştur. Çözücü azaltılmış basınç altında çıkarıldıktan sonra, elde edilen rezidüler söz konusu bileşiği bir renksiz katı madde (3,00 g, %67) olarak elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [hekzan : etil asetat = (hacim/hacim) 9 : 1 - etil asetat] ile saflaştırılmıştır.

- 5 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.07 (3H, s), 3.90 (2H, d, J=5.1 Hz), 4.23 (1H, t, J=7.0 Hz), 4.46 (2H, d, J=6.6 Hz), 5.26 (2H, d, J=7.0 Hz), 5.32 (1H, brs), 6.96 (1H, brs), 7.32 (2H, t, J=7.3 Hz), 7.41 (2H, t, J=7.3 Hz), 7.59 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.77 (2H, d, J=7.3 Hz).

### Proses 2: Benzil [({N-[(9H-Floren-9-ilmetoksi)karbonil]glisil}amino)metoksi]asetat

10

Yukarıda Proses 1'de elde edilen bileşiğin (3,68 g, 10,0 mmol) ve benzil glikolatın (4,99 g, 30,0 mmol) bir tetrahidrofüran (40,0 mL) çözeltisine, potasyum ter-bütoksit (2,24 g, 20,0 mmol) 0°C'de eklenmiştir ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon çözeltisi 0°C'de etil asetat ve su ile doldurulmuştur ve etil asetat ve kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen organik katman sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve filtreden geçirilmiştir. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır. Elde edilen rezidüler dioksan (40,0 mL) ve su (10,0 mL) içinde çözündürülmüştür, sodyum hidrojen karbonat (1,01 g, 12,0 mmol) ve 9-florenilmetil kloroformat (2,59 g, 10,0 mmol) ile doldurulmuştur ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon çözeltisi su ile doldurulmuştur ve etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen organik katman sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur ve filtreden geçirilmiştir. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve elde edilen rezidüler söz konusu bileşiği renksiz yağlı madde (1,88 g, %40) olarak elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [hekzan : etil asetat = (hacim/hacim) 100 : 0 - 0 : 100] ile saflaştırılmıştır.

25

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.84 (2H, d, J=5.5 Hz), 4.24 (3H, t, J=6.5 Hz), 4.49 (2H, d, J=6.7 Hz), 4.88 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.15-5.27 (1H, m), 5.19 (2H, s), 6.74 (1H, brs), 7.31-7.39 (7H, m), 7.43 (2H, t, J=7.4 Hz), 7.61 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.79 (2H, d, J=7.4 Hz).

30

### Proses 3: [({N-[(9H-Floren-9-ilmetoksi)karbonil]glisil}amino)metoksi]asetik asit

Yukarıda Proses 2'de elde edilen bileşik (1,88 g, 3,96 mmol) etanol (40,0 mL) ve etil asetat (20,0 ml) içinde çözündürülmüştür. Paladyum karbon katalizörü (376 mg) eklendikten sonra, bu oda sıcaklığında hidrojen atmosferi altında 2 saat boyunca

35

kariştirilmiştir. Çözünmeyen maddeler Celite yoluyla filtrasyon ile uzaklaştırılmıştır ve çözücü söz konusu bileşiği bir renksiz katı madde (1,52 g, kantitatif) olarak elde etmek için azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 3.62 (2H, d, J=6.3 Hz), 3.97 (2H, s), 4.18-4.32 (3H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 7.29-7.46 (4H, m), 7.58 (1H, t, J=5.9 Hz), 7.72 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.90 (2H, d, J=7.4 Hz), 8.71 (1H, t, J=6.5 Hz).

**Proses 4: 9H-Floren-9-ilmetil(2-[[2-[[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino}-2-oksoetoksi)metil]amino}-2-oksoetil)karbamat**

Buz ile soğutma altında, ekzatekan mesilatın (0,283 g, 0,533 mmol), N-hidroksisüksinimidin (61,4 mg, 0,533 mmol) ve yukarıda Proses 3'te elde edilen bileşiğin (0,205 g, 0,533 mmol) bir N,N-dimetilformamid (10,0 mL) çözeltisine, N,N-diizopropiletilamin (92,9 µL, 0,533 mmol) ve N,N'-disikloheksilkarbodiimid (0,143 g, 0,693 mmol) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 3 gün boyunca kariştirilmiştir. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve elde edilen rezidüler söz konusu bileşiği bir solgun kahverengi renkte katı madde (0,352 g, %82) olarak elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [kloroform - kloroformun bölüntülenmiş organik katmanı : metanol : su = (hacim/hacim/hacim) 7 : 3 : 1] ile saflaştırılmıştır.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.81 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.73-1.87 (2H, m), 2.06-2.20 (2H, m), 2.34 (3H, s), 3.01-3.23 (2H, m), 3.58 (2H, d, J=6.7 Hz), 3.98 (2H, s), 4.13-4.25 (3H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.09-5.22 (2H, m), 5.32-5.42 (2H, m), 5.50-5.59 (1H, m), 6.49 (1H, s), 7.24-7.30 (3H, m), 7.36 (2H, t, J=7.4 Hz), 7.53 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.66 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.75 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.84 (2H, d, J=7.4 Hz), 8.47 (1H, d, J=8.6 Hz), 8.77 (1H, t, J=6.7 Hz).

MS (ESI) m/z: 802 (M+H)<sup>+</sup>.

**Proses 5: N-[[2-[[(1S,9S)-9-Etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino}-2-oksoetoksi)metil]glisinamid**

Yukarıda Proses 4'te elde edilen bileşiğin (0,881 g, 1,10 mmol) bir N,N-dimetilformamid (11,0 mL) çözeltisine, piperidin (1,1 mL) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca

karıştırılmıştır. Çözücü söz konusu bileşiği içeren bir karışım elde etmek için azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır. Karışım ilave saflaştırma olmadan sonraki reaksiyon için kullanılmıştır.

5 **Proses 6: N-[(9H-Floren-9-iletoksi)karbonil]glisilglisil-L-fenilalanin-N-[(2-  
 {[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-  
 1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino}-2-  
 oksoetoksi)metil]glisinamid**

10 Buz ile soğutma altında, yukarıda Proses 5'te elde edilen karışımın (0,439 mmol), N-  
 hidroksisüksinimidin (0,101 g, 0,878 mmol) ve N-[(9H-Floren-9-  
 iletoksi)karbonil]glisilglisil-L-fenilalaninin bir N,N-dimetilformamid (50,0 mL)  
 çözeltilisine (2002-60351 Numaralı Yayınlanmış Japon Patenti; 0,440 g, 0,878 mmol),  
 N,N'-disikloheksilkarbodiimid (0,181 g, 0,878 mmol) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 4  
 15 gün boyunca karıştırılmıştır. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve elde  
 edilen rezidüler söz konusu bileşiği bir solgun turuncu renkte katı madde (0,269 g,  
 %58) olarak elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [kloroform - kloroform :  
 metanol = (hacim/hacim) 9 : 1] ile saflaştırılmıştır.  
 MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)<sup>+</sup>.

20

**Proses 7: Glisilglisil-L-fenilalanin-N-[(2-  
 {[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-  
 10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-  
 benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino}-2-  
 oksoetoksi)metil]glisinamid**

25

Yukarıda Proses 6'da elde edilen bileşiğin (0,269 g, 0,253 mmol) bir N,N-  
 dimetilformamid (4,00 mL) çözeltilisine, piperidin (0,251 mL, 2,53 mmol) eklenmiştir ve  
 oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Çözücü söz konusu bileşiği içeren bir  
 karışım elde etmek için azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır. Karışım ilave  
 30 saflaştırma olmadan sonraki reaksiyon için kullanılmıştır.

**Proses 8: N-[6-(2,5-Diokso-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hekzanoil]glisilglisil-L-  
 fenilalanin-N-[(2-  
 {[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-  
 2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-  
 35 b]kuinolin-1-il]amino}-2-oksoetoksi)metil]glisinamid**

Yukarıda Proses 7'de elde edilen bileşiğin (0,253 mmol) bir N,N-dimetilformamid (10,0 mL) çözeltilisine, N-süksinimidil 6-maleimid hekzanoat (0,156 g, 0,506 mmol) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 3 gün boyunca karıştırılmıştır. Çözücü azaltılmış basınç altında uzaklaştırılmıştır ve elde edilen rezidüler söz konusu bileşiği bir solgun sarı renkte katı madde (0,100 g, %38) olarak elde etmek için silika jel kolon kromatografisi [kloroform - kloroform : metanol = (hacim/hacim) 9 : 1] ile saflaştırılmıştır.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.83 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.09-1.21 (2H, m), 1.33-1.47 (4H, m), 1.75-1.90 (2H, m), 2.00-2.23 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.69-2.81 (1H, m), 2.94-3.03 (1H, m), 3.06-3.22 (2H, m), 3.23-3.74 (8H, m), 3.98 (2H, s), 4.39-4.50 (1H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.17 (2H, s), 5.39 (2H, s), 5.53-5.61 (1H, m), 6.50 (1H, s), 6.96 (2H, s), 7.11-7.24 (5H, m), 7.28 (1H, s), 7.75 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.97 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.03 (1H, t, J=5.9 Hz), 8.09 (1H, d, J=7.8 Hz), 8.27 (1H, t, J=6.5 Hz), 8.48 (1H, d, J=9.0 Hz), 8.60 (1H, t, J=6.5 Hz).

MS (ESI) m/z: 1034 (M+H)<sup>+</sup>.

15

#### **Proses 9: Antikor-ilaç konjugatı (6)**

Antikorum indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (10,0 mL) bir 50 mL'lik tüpe toplanmıştır ve bir sulu 10 mM TCEP çözeltisi (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; her bir antikor molekülü için 4,6 eş-değer) ve bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL) ile doldurulmuştur. Çözeltinin 7,4 ± 0,1 olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikor içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ 37°C'de 1 saat boyunca inkübe etme ile indirgenmiştir.

Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti normal sıcaklığındaki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, buna bir dimetil sülfoksit (0,567) eklenmiştir. Bunu takiben, yukarıda Proses 8'de elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,635 mL; her bir antikor molekülü için 9,2 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için oda sıcaklığında 40 dakika boyunca bir tüp rotatör kullanılarak karıştırılmıştır. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,127 mL; her bir antikor

30

molekölü için 18,4 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

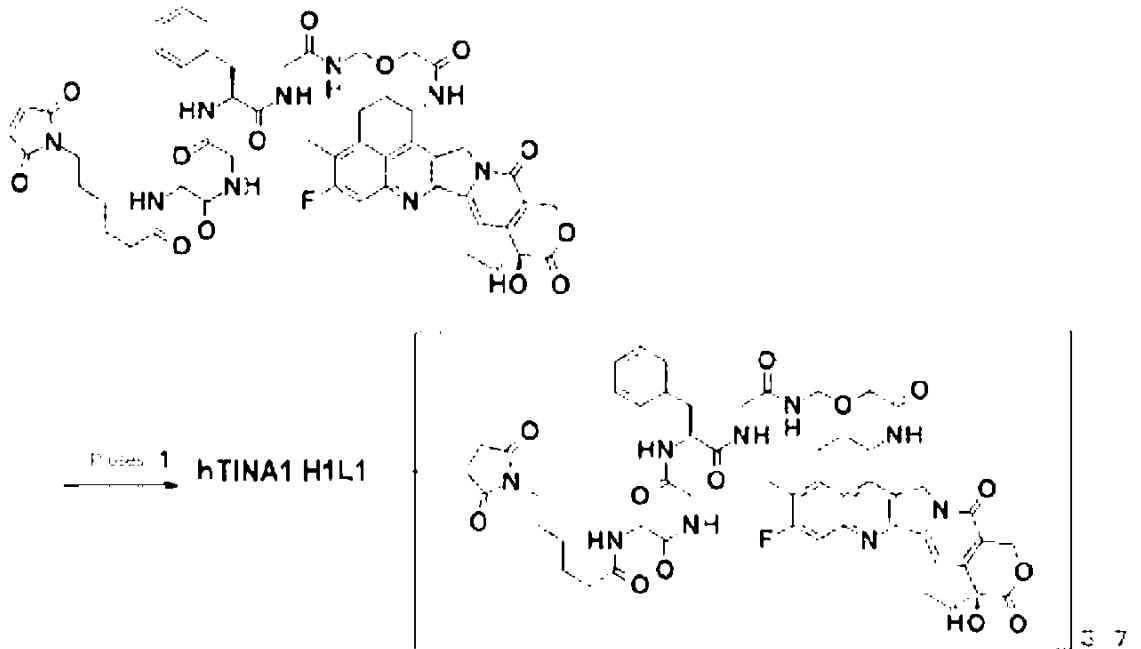
5 Saflaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin 35,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür E kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

10

Antikor konsantrasyonu: 2,70 mg/mL, antikor verimi: 94,5 mg (%95) ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı (n): 6,4.

15 **[Örnek 15: hTINA1-H1L1 ADC (7) üretimi]**

[Formül 31]



20

**Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (7)**

Antikoron indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (2,0 mL) bir 4 mL'lik tüpe  
5 toplanmıştır ve bir sulu 10 mM TCEP çözeltisi (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; her bir antikor molekülü için 5,0 eş-değer) ve bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 mL) ile doldurulmuştur. Çözeltinin 7,0 ± 0,1 olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikor içindeki mentеше parçasındaki disülfid bağ 37°C'de 1 saat boyunca inkübe etme ile indirgenmiştir.

10

Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti 15°C'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, buna Örnek 14'ün Proses 8'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,127; her bir antikor molekülü için 9,2 eş-değer) eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için 15°C'deki bir su banyosu içinde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonra, bir  
15 sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0190 mL; her bir antikor molekülü için 13,8 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

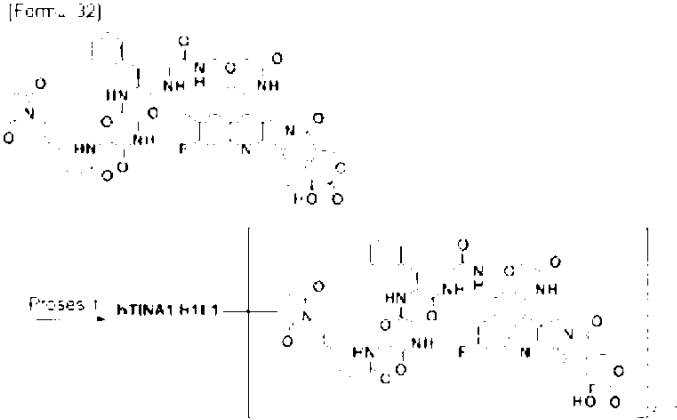
20

Saflaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin 9,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak saflandırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür E kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik  
25 değerler elde edilmiştir.

Antikor konsantrasyonu: 2,04 mg/mL, antikor verimi: 18,4 mg (%92) ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı (n): 5,7.

30

**[Örnek 16: hTINA1-H1L1 ADC (8) üretimi]**



### Proses1: Antikor-ilaç konjugatı (8)

- 5 Antikörün indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikör konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (30,0 mL) bir 100 mL'lik kaba toplanmıştır, karıştırarak bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai
- 10 Tesque, Inc.; 0,4875 mL) ile doldurulmuştur ve akabinde 37°C'de 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Buna karıştırarak bir sulu 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,9721 mL; her bir antikör molekülü için 5,0 eş-değer) eklenmesinden ve akabinde çözeltinin  $7,0 \pm 0,1$  olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikör içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ 37°C'de 1 saat boyunca karıştırma ile
- 15 indirgenmiştir.

Antikör ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti 15°C'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, buna Örnek 14'ün Proses 8'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (2,33 mL; her

20 bir antikör molekülü için 12,0 eş-değer) kademeli olarak damla damla eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için 15°C'lik bir su banyosu içinde 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,251 mL; her bir antikör molekülü için 12,9 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika

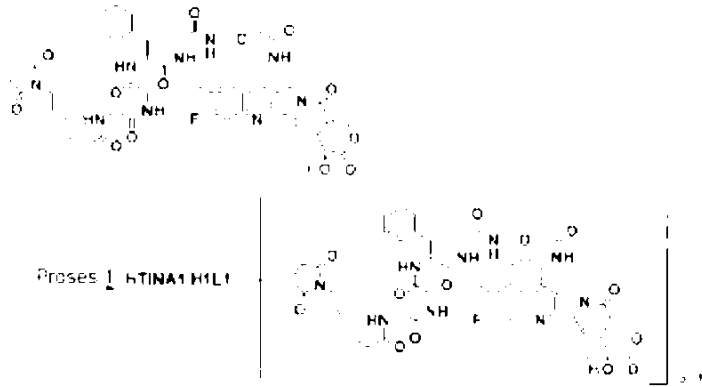
25 boyunca karıştırılmıştır.

Safılaştırma: Yukarıdaki çözeltili söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltilinin 98,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak safılaştırmaya tabi tutulmuştur. Akabinde, çözeltili söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltilinin 17,5 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür A'ya göre konsantre edilmiştir.

Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedürler E ve F kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir. Antikor konsantrasyonu: 14.6 mg/mL, antikor verimi: 256 mg (85%), her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı: 6,7 ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür F ile ölçülen ortalama sayısı: 7,0.

#### 15 [Örnek 17: hTINA1-H1L1 ADC (9) üretimi]

[Formül 22]



#### Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (9)

20

Antikörün indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözeltili (5,0 mL) bir 15 mL'lik kaba toplanmıştır, karıştırarak bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltilisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 mL) ile doldurulmuştur ve akabinde 37°C'de 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Buna karıştırarak bir sulu 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co.,

25

Ltd.) (0,0778 mL; her bir antikor molekülü için 2,4 eş-değer) eklenmesinden ve akabinde çözeltinin  $7,0 \pm 0,1$  olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikor içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca karıştırma ile indirgenmiştir.

5

Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti  $15^{\circ}\text{C}$ 'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, buna Örnek 14'ün Proses 8'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,162 mL; her bir antikor molekülü için 5,0 eş-değer) kademeli olarak damla damla eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için  $15^{\circ}\text{C}$ 'lik bir su banyosu içinde 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0418 mL; her bir antikor molekülü için 12,9 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

15

Saflaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin 21,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedürler E ve F kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

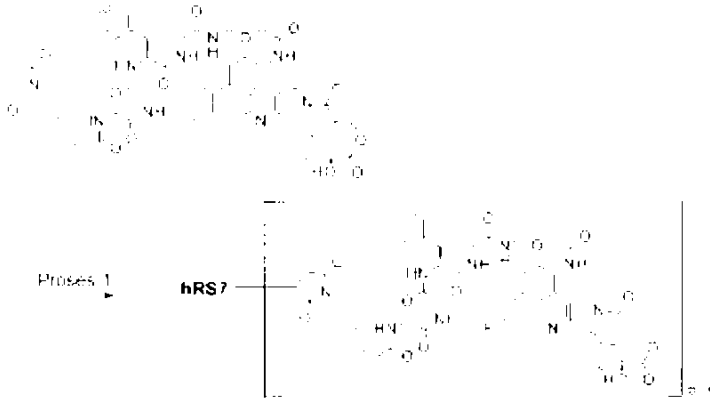
20

Antikor konsantrasyonu: 2,26 mg/mL, antikor verimi: 47,5 mg (%95), her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı: 3,5 ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür F ile ölçülen ortalama sayısı: 3,6.

25

**[Referans Örnek 18: hRS7 ADC (10) üretimi]**

[Formül 54]



### Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (10)

5 Antikörün indirgenmesi: Referans Örnek 1'de üretilen hRS7, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,56 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikör konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (2,0 mL) bir 4 mL'lik tüpe toplanmıştır ve bir sulu 10 mM TCEP çözeltisi (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)

10 (0,0690 mL; her bir antikör molekülü için 5,0 eş-değer) ve bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 mL) ile doldurulmuştur. Çözeltinin  $7,0 \pm 0,1$  olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikör içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca inkübe etme ile indirgenmiştir.

15 Antikör ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti  $15^{\circ}\text{C}$ 'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, buna Örnek 14'ün Proses 8'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,1269; her bir antikör molekülü için 9,2 eş-değer) eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için  $15^{\circ}\text{C}$ 'deki bir su banyosu içinde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonra, bir

20 sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0190 mL; her bir antikör molekülü için 13,8 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

Saflaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikör-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin

25 9,0 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür E kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (ölçülen ortalama

değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır, aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

Antikor konsantrasyonu: 2,07 mg/mL, antikor verimi: 18,6 mg (%93) ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı (n): 5,6.

### [Örnek 19: hTINA1-H1L1 ADC (11) üretimi]

10 [Formül 35]



15 **Proses 1: ter-Bütül [2-(2-(((1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-dioksa-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il)amino)-2-oksoetoksi)etil]karbamat**

Ekzatekan mesilat (3,10 g, 5,47 mol), söz konusu bileşiği bir solgun sarı renkte katı madde (2,56 g, %73) olarak elde etmek için 4-(ter-Bütoksikarbonilamino)bütanoik asit yerine {2-[(ter-Bütoksikarbonil)amino]etoksi}asetik asit (J. Med. Chem., 1992, Vol. 35, p. 2928; 1,55 g, 6,01 mmol) kullanılarak Örnek 1'in Proses 1'i ile aynı şekilde reaksiyona sokulmuştur.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.87 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.26 (9H, s), 1.81-1.91 (2H, m), 2.13-2.22 (2H, m), 2.40 (3H, s), 3.08-3.26 (4H, m), 3.43-3.53 (2H, m), 4.00 (1H, d, J = 15.1 Hz), 4.05 (1H, d, J = 15.1 Hz), 5.14 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.22 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.40 (1H, d, J = 16.6 Hz), 5.44 (1H, d, J = 16.6 Hz), 5.59-5.66 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.86 (1H, t, J = 5.4 Hz), 7.31 (1H, s), 7.79 (1H, d, J = 10.9 Hz), 8.49 (1H, d, J = 9.1 Hz).

MS (APCI) m/z: 637 (M+H)<sup>+</sup>.

**Proses 2: 2-(2-Aminoetoksi)-N-[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-dioekso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1i]asetamid trifloroasetat**

Yukarıda Proses 1'de elde edilen bileşik (1,50 g, 2,36 mol), söz konusu bileşiği bir solgun sarı renkte katı madde (1,50 g, kantitatif) olarak Örnek 1'in Proses 2'si ile aynı şekilde reaksiyona sokulmuştur.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.87 (3H, t, J = 7.5 Hz), 1.81-1.92 (2H, m), 2.15-2.23 (2H, m), 2.41 (3H, s), 3.05 (2H, t, J = 5.1 Hz), 3.15-3.23 (2H, m), 3.71 (2H, t, J = 5.1 Hz), 4.10 (2H, s), 5.19 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.24 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.43 (2H, s), 5.58-5.66 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.33 (1H, s), 7.73-7.84 (4H, m), 8.55 (1H, d, J = 9.1 Hz).

MS (APCI) m/z: 537 (M+H)<sup>+</sup>.

**Process 3: N-(ter-Bütoksikarbonil)glisilglisil-L-fenilalanin-N-[2-(2-[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-dioekso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino)-2-oksoetoksi]etil]glisinamid**

Yukarıda Proses 2'de elde edilen bileşik (554 mg, 0,85 mmol), söz konusu bileşiği (775 mg, %95) elde etmek için Örnek 1'in Proses 3'ü ile aynı şekilde reaksiyona sokulmuştur.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.85 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.36 (9H, s), 1.78-1.89 (2H, m), 2.13-2.22 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.71 (1H, dd, J = 13.4, 9.8 Hz), 2.95 (1H, dd, J = 13.4, 4.3 Hz), 3.09-3.23 (1H, m), 3.23-3.32 (2H, m), 3.40-3.62 (8H, m), 3.73 (1H, dd, J = 16.5, 5.5 Hz), 4.03 (2H, s), 4.39-4.47 (1H, m), 5.17 (1H, d, J = 18.9 Hz), 5.25 (1H, d, J = 18.9 Hz), 5.41 (1H, d, J = 16.8 Hz), 5.45 (1H, d, J = 16.8 Hz), 5.57-5.64 (1H, m), 6.54 (1H, s), 6.99 (1H, t, J = 5.8 Hz), 7.13-7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.76-7.82 (2H, m), 7.90 (1H, t, J = 5.2 Hz), 8.13 (1H, d, J = 7.9 Hz), 8.27 (1H, t, J = 5.8 Hz), 8.49 (1H, d, J = 8.5 Hz).

MS (APCI) m/z: 955 (M+H)<sup>+</sup>.

10

**Proses 4: Glisilglisil-L-fenilalanin-N-[2-(2-[[[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino)-2-oksoetoksi)etil]glisinamid trifloroasetat**

15

Yukarıda Proses 3'te elde edilen bileşik (630 mg, 0,659 mmol), söz konusu bileşiği (588 mg, %92) elde etmek için Örnek 1'in Proses 4'ü ile aynı şekilde reaksiyona sokulmuştur.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.86 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.79-1.90 (2H, m), 2.13-2.22 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.71 (1H, dd, J = 13.4, 10.1 Hz), 2.99 (1H, dd, J = 13.4, 4.3 Hz), 3.09-3.23 (1H, m), 3.24-3.32 (3H, m), 3.41-3.71 (7H, m), 3.86 (1H, dd, J = 16.8, 5.8 Hz), 4.04 (2H, s), 4.52 (1H, td, J = 9.0, 4.1 Hz), 5.17 (1H, d, J = 18.9 Hz), 5.25 (1H, d, J = 18.9 Hz), 5.41 (1H, d, J = 16.5 Hz), 5.45 (1H, d, J = 16.5 Hz), 5.56-5.65 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.13-7.26 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.80 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.87-8.01 (4H, m), 8.29-8.36 (2H, m), 8.46-8.55 (2H, m).

25

MS (APCI) m/z: 855 (M+H)<sup>+</sup>.

**Proses 5: N-[6-(2,5-Diokso-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hekzanoil]glisilglisil-L-fenilalanin-N-[2-(2-[[[(1S,9S)-9-etil-5-floro-9-hidroksi-4-metil-10,13-diokso-2,3,9,10,13,15-hekzahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]kuinolin-1-il]amino)-2-oksoetoksi)etil]glisinamid**

30

Yukarıda Proses 4'te elde edilen bileşik (240 mg, 0,247 mmol), söz konusu bileşiği (162 mg, %62) elde etmek için, diizopropiletilamin yerine trietilamin (31,4 µL, 0,22 mmol) ve N-süksinimidil 3-(2-(2-(3-maleinimidpropanamid)etoksi)etoksi)propanoat

35

yerine N-süksinimidil 6-maleimid hekzanoat (95,3 mg, 0,31 mmol) kullanılarak Örnek 1'in Proses 5'i ile aynı şekilde reaksiyona sokulmuştur.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.86 (3H, t, J = 7.6 Hz), 1.13-1.22 (2H, m), 1.40-1.51 (4H, m), 1.78-1.90 (2H, m), 2.09 (2H, t, J = 7.6 Hz), 2.14-2.21 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.74 (1H, dd, J = 13.6, 9.7 Hz), 2.96 (1H, dd, J = 13.6, 4.5 Hz), 3.08-3.24 (1H, m), 3.24-3.30 (1H, m), 3.33-3.40 (4H, m), 3.47-3.68 (7H, m), 3.72 (1H, dd, J = 16.6, 5.7 Hz), 4.03 (2H, s), 4.42 (1H, td, J = 8.6, 4.2 Hz), 5.17 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.25 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.40 (1H, d, J = 17.2 Hz), 5.44 (1H, d, J = 17.2 Hz), 5.57-5.64 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.13-7.25 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.74-7.81 (2H, m), 7.99 (1H, t, J = 5.7 Hz), 8.03-8.11 (2H, m), 8.22 (1H, t, J = 5.7 Hz), 8.47 (1H, d, J = 9.1 Hz).  
MS (APCI) m/z: 1048 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Proses 6: Antikor-ilaç konjugatı (11)

15 Antikorum indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (3,0 mL) bir 15 mL'lik kaba toplanmıştır, karıştırarak bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0488 mL) ile doldurulmuştur ve akabinde 37°C'de 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Buna karıştırarak bir sulu 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0972 mL; her bir antikor molekülü için 5,0 eş-değer) eklenmesinden ve akabinde çözeltinin 7,0 ± 0,1 olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikor içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ 37°C'de 1 saat boyunca karıştırma ile indirgenmiştir.

Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti 15°C'deki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, buna Örnek 11'in Proses 8'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (2,3333 mL; her bir antikor molekülü için 12,0 eş-değer) kademeli olarak damla damla eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için 15°C'lik bir su banyosu içinde 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0251 mL; her bir antikor molekülü için 12,9 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

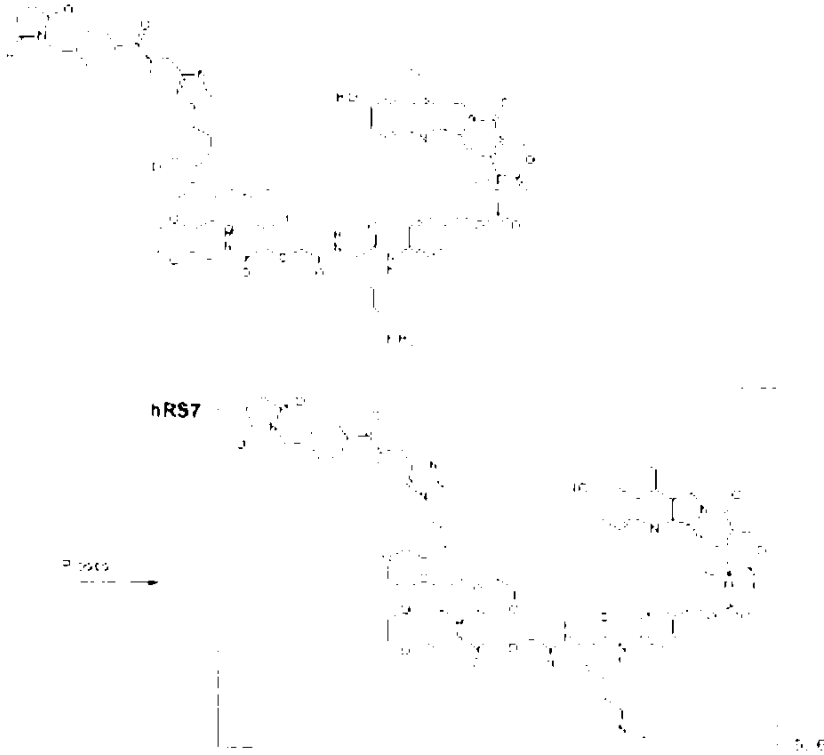
Safılaştırma: Yukarıdaki çözelti söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltinin 14 mL'sini elde etmek için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür D kullanılarak safılaştırmaya tabi tutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedürler E ve F kullanılarak ( $\epsilon_{D,280} = 5193$  (ölçülen ortalama değer) ve  $\epsilon_{D,370} = 20347$  (ölçülen ortalama değer) kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

Antikor konsantrasyonu: 1,93 mg/mL, antikor verimi: 27,0 mg (%90), her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı: 7,1 ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür F ile ölçülen ortalama sayısı: 7,0.

#### [Referans Örnek 2: hRS7-CL2A-SN38 (12) üretimi]

15

[Formül 36]



20 **Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (12)**

Antikoron indirgenmesi: Referans Örnek 1'de üretilen hRS7, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (10,0 mL) bir 50 mL'lik tüpe toplanmıştır ve bir sulu 10 mM TCEP çözeltisi (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; her bir antikor molekülü için 4,6 eş-değer) ve bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL) ile doldurulmuştur. Çözeltinin  $7,4 \pm 0,1$  olan pH'a sahip olduğu konfirme edildikten sonra, antikor içindeki mentеше parçasındaki disülfid bağ 37°C'de 1 saat boyunca inkübe etme ile indirgenmiştir.

10

Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti normal sıcaklığındaki bir su banyosu içinde 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, buna bir dimetil sülfoksit (0,567 mL) eklenmiştir. Bunu takiben, 2011/0293513 Numaralı ABD Patent Yayını'na göre sentezlenmiş CL2A-SN38'in 10 mM'ını içeren bir dimetil sülfoksit çözeltisi (0,635 mL; her bir antikor molekülü için 9,2 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için oda sıcaklığında 40 dakika boyunca bir tüp rotatör kullanılarak karıştırılmıştır. Sonra, bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,127 mL; her bir antikor molekülü için 18,4 eş-değer) buna eklenmiştir ve ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca karıştırılmıştır.

20

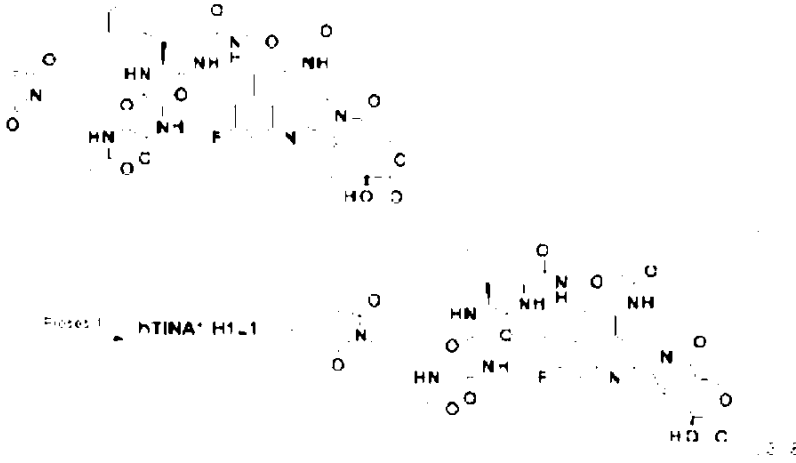
Saflaştırma: Yukarıdaki reaksiyon çözeltisi Üretim yönteminin Ortak prosedürü D'de tarif edilen jel filtrasyonuna ve saflaştırmaya tekrarlı bir şekilde iki kere tabi tutulmuştur ve bunu takiben benzer bir şekilde polisorbitat 80 (%0,01) içeren 25 mM trehaloz çözeltisi kullanılarak NAP-25 kolonu ile jel filtrasyonu saflaştırmasına tabi tutulmuştur. Akabinde, elde edilen eluat (35 mL) dondurarak-kurutulmuştur. Fizikokimyasal karakterizasyon: Dondurarak kurutulmadan önce eluat için Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür E kullanılarak, aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

25

30 Antikor konsantrasyonu: 2,78 mg/mL, antikor verimi: 97,3 mg (%97) ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin ortalama sayısı (n): 5,6.

#### [Örnek 20: hTINA1-H1L1 ADC (13) üretimi]

Resim 37



### Proses 1: Antikor-ilaç konjugatı (13)

- 5 Antikorum indirgenmesi: Örnek 7'de üretilen hTINA1-H1L1, Üretim yöntemi 1'de tarif edilen Ortak prosedür B (280 nm'de absorpsiyon kat sayısı olarak 1,54 kullanılmıştır) ve Ortak prosedür C kullanılarak PBS6,0/EDTA ile 10 mg/mL'lik antikor konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti (100 mL) bir 250 mL'lik polikarbonat Erlenmeyer flask içine yerleştirilmiştir, bir manyetik karıştırıcı kullanılarak
- 10 karıştırılarak oda sıcaklığında bir sulu 1 M dipotasyum hidrojen fosfat (1,4 mL) çözeltisi ile doldurulmuştur ve akabinde bir sulu 10 mM TCEP (1,62 mL; her bir antikor molekülü için 2,5 eş-değer) ile doldurulmuştur. Çözeltinin  $7,0 \pm 0,1$  olan pH'a sahip oluşu konfirme edildikten sonra, karıştırma durdurulmuştur ve antikor içindeki menteşe parçasındaki disülfid bağ  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat boyunca inkübe etme ile indirgenmiştir.

15

- Antikor ve ilaç bağlayıcı arasında konjugasyon: Yukarıdaki çözelti  $15^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra, DMSO (3,24 mL) buna karıştırılarak kademeli olarak damla damla eklenmiştir. Bunu takiben, buna Örnek 14'ün Proses 8'inde elde edilen bileşiğin 10 mM'ını içeren bir DMSO çözeltisi (1,76 mL; her bir antikor molekülü için 5,0 eş-değer)
- 20 kademeli olarak damla damla eklenmiştir. Bu çözelti antikor bağlayıcıyı antikora konjuge etmek için  $15^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonra, karıştırarak buna bir sulu 100 mM NAC çözeltisi (0,324 mL; her bir antikor molekülü için 5,0 eş-değer) eklenmiştir ve reaksiyona sokulmamış ilaç bağlayıcının reaksiyonunu durdurmak için oda sıcaklığında bir başka 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

25

Safılaştırma: %20'lik sulu asetik asit çözeltilisi (yaklaşık 0,52 mL) ve ABS (100 mL), çözeltilinin pH'ını  $5,5 \pm 0,1$ 'e ayarlamak için karıştırarak yukarıdaki çözeltiye kademeli olarak eklenmiştir. Bu çözelti, beyaz türbiditeyi uzaklaştırmak ve bir filtratın yaklaşık 200 mL'sini elde etmek için mikro-filtrasyona (0,45  $\mu$ m, PVDF membran) tabi tutulmuştur. Bu filtrat, bir ultrafiltrasyon membranından (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 30 KDa), bir tüp pompasından (Cole-Parmer International, MasterFlex Pompa modeli 77521-40, Pompa başı modeli 7518-00) ve bir tüpten (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16) oluşan bir ultrafiltrasyon aparatı kullanılarak ultrafiltrasyon saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Spesifik olarak, ABS reaksiyon çözeltilisine saflaştırma için bir tampon çözeltisi olarak damla damla eklenirken (toplamda 1600 mL), ultrafiltrasyon saflaştırma konjuge edilmemiş ilaç bağlayıcılarını ve diğer düşük-moleküler-ağırlıklı reaktifleri uzaklaştırmak aynı zamanda tampon çözeltilisini ABS ile değiştirmek ve çözeltiyi ilaveten konsantre etmek için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen saflaştırılmış çözelti, söz konusu antikor-ilaç konjugatını içeren bir çözeltilinin 88 mL'sini elde etmek için mikrofiltrasyona (0,22  $\mu$ m, PVDF membran) tabi tutulmuştur.

Fizikokimyasal karakterizasyon: Ortak prosedür E ve Ortak prosedür F kullanılarak, ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  ve  $\epsilon_{D,370} = 20217$  kullanılmıştır), aşağıdaki karakteristik değerler elde edilmiştir.

Antikor konsantrasyonu: 9,96 mg/mL, antikor verimi: 876 mg (%88), her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür E ile ölçülen ortalama sayısı: 3,8 ve her bir antikor molekülü için konjuge edilmiş ilaç moleküllerinin (n) Ortak prosedür F ile ölçülen ortalama sayısı: 3,8.

### **[Örnek 21: ADC'nin anti-tümör etkisinin değerlendirilmesi]**

#### **21-a) ADC - (1)'in anti-tümör etkisi**

30

Fare: 5- ila 6-haftalık dişi BALB/c-nu/nu fareleri (Charles River Laboratories Japan, Inc.) deneyde kullanılmadan önce SPF koşulları altında 4 ila 7 gün boyunca ortama alıştırmıştır. Fareler sterilize edilmiş katı besin (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) ile beslenmiştir ve farelere (5 ila 15 ppm sodyum hipoklorit çözeltilisinin eklenmesi ile hazırlanmış) sterilize edilmiş musluk suyu verilmiştir.

35

Analiz ve hesaplama ifadesi: Tüm çalışmalarda, tümörün majör eksen ve minör eksenini bir elektronik dijital çap ölçer (CD-15C, Mitutoyo Corp.) kullanılarak haftada iki kere ölçülmüştür ve tümör hacmi (mm<sup>3</sup>) hesaplanmıştır. Hesaplama ifadesi aşağıda gösterildiği şekildedir.

$$\text{Tümör hacmi (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{Majör eksen (mm)} \times [\text{Minör eksen (mm)}]^2$$

Antikor-ilaç konjugatlarının tümü fizyolojik salin (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) ile seyreltilmiştir ve her bir farenin kuyruğuna intravenöz uygulama için 10 mL/kg olan bir hacimde kullanılmıştır. Bir insan kolorektal kanser hücresi hattı COLO205 ATCC'den satın alınmıştır ve fizyolojik salin içinde süspansiyon edilmiştir. Süspansiyonun 2 x 10<sup>6</sup> hücresi her bir dişi BALB/c-nu/nu faresinin sağ abdomenine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 7'de rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (1), (6) veya (12) Günler 7'de, 14'te ve 21'de her bir farenin kuyruğuna 10 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Konjuge edilmemiş hTINA1-H1L1 antikorunun ve hRS7 antikorunun her biri yukarıdaki ile aynı yol yoluyla 25 mg/kg olan bir dozda bir negatif kontrol olarak uygulanmıştır. Antikor-ilaç konjugatının (1) veya (6) uygulanması, antikor-ilaç konjugatının (12) uygulanmasına kıyasla tümör hacmini göze çarpan bir şekilde küçültmüştür ve antikor-ilaç konjugatlarının her ikisi de bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 13). Şekilde, apsis günlerin sayısını gösterir ve ordinat tümör hacmini gösterir.

#### **21-b) ADC - (2)'nin anti-tümör etkisi**

ATCC'den satın alınmış olan bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı Bx-PC3 her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine nakledilmiştir ve bir solid tümör grefti olarak ilaveten geçirilmiştir. Bu tümör grefti her bir dişi BALB/c-nu/nu faresinin sağ abdomenine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 16'da rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (1), (6) veya (12) Günler 16'da, 23'te ve 30'da her bir farenin kuyruğuna 10 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Konjuge edilmemiş hTINA1-H1L1 antikorunun ve hRS7 antikorunun her biri yukarıdaki ile aynı yol yoluyla 25 mg/kg olan bir dozda bir negatif kontrol olarak uygulanmıştır. Antikor-ilaç konjugatının (1) veya (6) uygulanması, antikor-ilaç konjugatının (12) uygulanmasına

kıyasla tümör hacmini göze çarpan bir şekilde küçültmüştür ve antikor-ilaç konjugatlarının her ikisi de bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 14).

#### **21-c) ADC - (3)'ün anti-tümör etkisi**

5

ATCC'den satın alınmış olan bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı Capan-1 her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine nakledilmiştir ve bir solid tümör grefti olarak ilaveten geçirilmiştir. Bu tümör grefti her bir dişi BALB/c-nu/nu faresinin sağ abdominine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 8'de rastgele gruplandırılmıştır.

10 Antikor-ilaç konjugatı (1), (6) veya (12) Günler 18'de, 25'te ve 32'de her bir farenin kuyruğuna 10 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Konjuge edilmemiş hTINA1-H1L1 antikorunun ve hRS7 antikorunun her biri yukarıdaki ile aynı yol yoluyla 25 mg/kg olan bir dozda bir negatif kontrol olarak uygulanmıştır. Antikor-ilaç konjugatının (1) veya (6) uygulanması, antikor-ilaç konjugatının (12) uygulanmasına

15 kıyasla tümör hacmini göze çarpan bir şekilde küçültmüştür ve antikor-ilaç konjugatlarının her ikisi de bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 15).

#### **21-d) ADC - (4)'ün anti-tümör etkisi**

20 COLO205 Örnek 21-a)'daki ile aynı şekilde her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 11'de rastgele gruplandırılmıştır. 10 mg/kg olan bir dozda antikor-ilaç konjugatı (2) veya (5) ve 3 mg/kg olan bir dozda antikor-ilaç konjugatı (7) veya (10), sırasıyla, her bir farenin kuyruğuna Günler 11'de, 18'de ve 25'te intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (2), (5), (7) ve

25 (10) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 16).

#### **21-e) ADC - (5)'in anti-tümör etkisi**

30 Bx-PC3 Örnek 21-b)'deki ile aynı şekilde her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 25'te rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (2), (5), (7) veya (10) her bir farenin kuyruğuna Günler 25'te ve 32'de 3 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (2), (5), (7) ve (10) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 17).

35 **21-f) ADC - (6)'nın anti-tümör etkisi**

COLO205 Örnek 21-a)'daki ile aynı şekilde her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 9'da rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (3), (4), (8) veya (9) her bir farenin kuyruğuna Günler 9'da ve 16'da 10 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (3), (4), (8) ve (9) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 18).

#### **21-g) ADC - (7)'nin anti-tümör etkisi**

Bx-PC3 Örnek 21-b)'deki ile aynı şekilde her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 21'de rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (3), (4), (8) veya (9) her bir farenin kuyruğuna Günler 21'de ve 28'de 3 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (3), (4), (8) ve (9) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 19).

#### **21-h) ADC - (8)'in anti-tümör etkisi**

ATCC'den satın alınmış olan bir insan ovaryan kanser hücresi hattı NIH:OVCAR-3'ün  $8 \times 10^6$  hücresi Matrigel (Becton, Dickinson and Company) içinde süspansiyon edilmiştir ve her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 25'te rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (3), (4), (8) veya (9) her bir farenin kuyruğuna Gün 25'te 3 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (3), (4), (8) ve (9) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 20).

#### **21-i) ADC - (9)'un anti-tümör etkisi**

ATCC'den satın alınmış olan bir insan gastrik kanser hücresi hattı NCI-N87'nin  $1 \times 10^7$  hücresi fizyolojik salin içinde süspansiyon edilmiştir ve her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 6'da rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (3), (4), (8) veya (9) her bir farenin kuyruğuna Gün 6'da 3 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (3), (4), (8) ve (9) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 21).

### 21-j) ADC - (10)'un anti-tümör etkisi

ATCC'den satın alınmış olan bir insan akciğer kanseri hücre hattı NCI-H292'nin  $5 \times 10^6$  hücresi fizyolojik salin içinde süspansiyon edilmiştir ve her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 9'da rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (3), (4), (8) veya (9) her bir farenin kuyruğuna Gün 9'da 3 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (3), (4), (8) ve (9) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 22).

### 10 21-k) ADC - (11)'in anti-tümör etkisi

ATCC'den satın alınmış olan bir insan boğaz kanseri hücre hattı FaDu'nun  $3 \times 10^6$  hücresi fizyolojik salin içinde süspansiyon edilmiştir ve her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 11'de rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (3), (4), (8) veya (9) her bir farenin kuyruğuna Gün 11'de 3 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (3), (4), (8) ve (9) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 23).

### 20 21-l) ADC - (12)'nin anti-tümör etkisi

ATCC'den satın alınmış olan bir insan pankreatik adenokarsinom hücre hattı CFPAC-1'in  $4 \times 10^6$  hücresi fizyolojik salin içinde süspansiyon edilmiştir ve her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 14'te rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (3), (4), (8) veya (9) her bir farenin kuyruğuna Gün 14'te 3 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (3), (4), (8) ve (9) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 24).

### 30 21-m) ADC - (13)'ün anti-tümör etkisi

CFPAC-1 Örnek 21-1)'deki ile aynı şekilde her bir dişi BALB/c-nu/nu faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 14'te rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (8) veya (13) her bir farenin kuyruğuna Gün 14'te 1 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç konjugatlarının (8) veya (13) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 25).

### 21-n) ADC - (14)'ün anti-tümör etkisi

ATCC'den satın alınmış olan bir insan pankreatik adenokarsinom hücresi hattı HPAC'ın  
 5 3 x 10<sup>6</sup> hücresi fizyolojik salin içinde süspansiyon edilmiştir ve her bir dişi BALB/c-nu/nu  
 faresine subkütan olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 12'de rastgele  
 gruplandırılmıştır. Antikor-ilaç konjugatı (8) veya (13) her bir farenin kuyruğuna Gün  
 12'de 3 mg/kg olan bir dozda intravenöz olarak uygulanmıştır. Uygulanan antikor-ilaç  
 10 konjugatlarının (8) veya (13) tümü bir tümör büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil  
 26).

### 21-o) ADC - (15)'in anti-tümör etkisi

Japan Health Sciences Foundation'dan elde edilmiş olan insan özofajiyal kanser  
 15 dokuları her bir NOG faresine (Central Institute for Experimental Animals) subkütan  
 olarak nakledilmiştir ve bunların büyümesine izin verilmiştir. Elde edilen tümör grefti her  
 bir dişi NOD-scid faresine (Charles River Laboratories Japan, Inc.) ilaveten subkütan  
 olarak nakledilmiştir (Gün 0) ve fareler Gün 27'de rastgele gruplandırılmıştır. Antikor-  
 ilaç konjugatı (8) veya (13) her bir farenin kuyruğuna Gün 27'de 3 mg/kg olan bir dozda  
 20 intravenöz olarak uygulanmıştır. Antikor-ilaç konjugatlarının (8) ve (13) tümü bir tümör  
 büyümesi inhibitör etki uygulamıştır (Şekil 27).

### [Örnek 22: ADC'nin hücre büyümesi inhibitör etkisinin değerlendirilmesi]

25 TROP2 antijen-pozitif hücre hatları olarak BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCA3, CFPAC-  
 1, FaDu, bir insan akciğer adenokarsinomu hücre hattı Calu-3 (ATCC), ve bir insan  
 overyan kanser hücresi hattı CaOV3 (ATCC) ve TROP2 antijen-negatif hücre hatları  
 olarak bir insan akciğer kanseri hücre hattı Calu-6 (ATCC) ve bir insan kütanöz  
 melanom hücre hattı A375 (ATCC) her bir ADC'nin hücre büyümesi inhibitör etkisinin  
 30 değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Her biri 2,2 x 10<sup>6</sup> hücre/mL'ye sahip olacak şekilde,  
 BxPC3 ve NCI-H292, %10 fetal bovin serumu (Moregate Biotech) içeren RPMI1640  
 Medium (Gibco) ile hazırlanmıştır, NIH:OVCA3, %20 fetal bovin serumu ve 0,01  
 mg/mL insülin (Invitrogen Corp.) içeren RPMI1640 Medium ile hazırlanmıştır, CFPAC-  
 1, %10 fetal bovin serumu içeren Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco) ile  
 35 hazırlanmıştır, FaDu, Calu-3 ve Calu-6, %10 fetal bovin serumu içeren Eagle's

Minimum Essential Medium (ATCC) ile hazırlanmıştır ve CaOV3 ve A375, %10 fetal bovin serumu içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) ile hazırlanmıştır. Her bir hücre süspansiyonu hücre kültürü için bir 96-kuyucuklu mikro-plakaya 90 µL/kuyucuk'ta ekilmiştir. RPMI1640 Medium ile 100 nM'a, 20 nM'a, 4 nM'a, 0,8 nM'a, 0,16 nM'a, 0,032 nM'a veya 0,0064 nM'a seyreltilmiş olan antikor-ilaç konjugatı (4) veya (8) veya karşılaştırma için RPMI1640 Medium 10 µL/kuyucuk'ta buna eklenmiştir ve hücreler %5 CO<sub>2</sub> altında 37°C'de 6 gün boyunca kültürlenmiştir. Kültürden sonra, mikro-plaka inkübatöre alınmıştır ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca beklemeye bırakılmıştır. Kültür çözeltilisine bir eşit miktarda CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) doldurulmuştur ve bu bir plaka karıştırıcı kullanılarak 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Hücre lizisinden sonra, lüminesans yoğunluğu bir plaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür.

6 gün boyunca kültürden sonra hücre büyümesi inhibisyonunun oranı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre büyüme inhibisyonunun oranı (\%)} = a / b \times 100$$

a: 6 gün boyunca kültürden sonra örnek-takviye edilmiş kuyucuklardan elde edilen ortalama değer - kültürün başlangıcında örnek-takviye edilmemiş kuyucuklardan elde edilen ortalama değer

b: 6 gün boyunca kültürden sonra vasat-takviye edilmiş kuyucuklardan elde edilen ortalama değer - kültürün başlangıcında vasat-takviye edilmemiş kuyucuklardan elde edilen ortalama değer

25

GI<sub>50</sub> değeri aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\ln \left( \frac{d - c}{a - c} \right) = \ln \left( \frac{1 - (1 - 10^{-GI_{50}/c})^b}{1 - 10^{-GI_{50}/d}} \right)$$

30

c: Örnek konsantrasyonu c

d: Örnek konsantrasyonu d

e: Örnek konsantrasyonu c'de hücre büyümesi inhibisyonunun oranı

f: Örnek konsantrasyonu d'de hücre büyümesi inhibisyonunun oranı

Konsantrasyonlar c ve d, hücre büyümesi inhibisyonunun %50'lik oranını geçen c>d ilişkisini belirler.

Antikor-ilaç konjugatları (4) ve (8), TROP2 antijen-pozitif hücre hatları BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCA3, CFPAC-1, FaDu, Calu-3 ve CaOV3 üzerinde  $GI_{50} < 1$  (nM) olan bir hücre büyümesi inhibitör etki göstermiştir. Diğer taraftan, bu antikor-ilaç konjugatları TROP2 antijen-negatif hücre hatları Calu-6 ve A375 üzerinde herhangi bir hücre büyümesi inhibitör etki ( $> 100$  (nM)) göstermemiştir.

#### 10 **Dizi Listesinin Serbest Metni**

SEQ ID NO: 1: TINA1 antikorunun bir ağır zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA'nın nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 2: TINA1 antikorunun ağır zincir değişken bölgesinin amino asit dizisi

15 SEQ ID NO: 3: TINA1 antikorunun bir hafif zincir değişken bölgesini şifreleyen cDNA'nın nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 4: TINA1 antikorunun hafif zincir değişken bölgesinin amino asit dizisi

20 SEQ ID NO: 5: Bir insan  $\kappa$  zinciri salgılama sinyalini ve bir insan  $\kappa$  zinciri sabit bölgesini şifreleyen nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 6: Bir insan ağır zincir salgılama sinyalini ve bir insan IgG1 sabit bölgesini şifreleyen nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 7: cTINA1 antikorunun bir ağır zincirinin nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 8: cTINA1 antikorunun ağır zincirinin amino asit dizisi

25 SEQ ID NO: 9: cTINA1 antikorunun bir hafif zincirinin nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 10: cTINA1 antikorunun hafif zincirinin amino asit dizisi

SEQ ID NO: 11: hTINA1-H1'in nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 12: hTINA1-H1'in amino asit dizisi

SEQ ID NO: 13: hTINA1-H2'nin nükleotid dizisi

30 SEQ ID NO: 14: hTINA1-H2'nin amino asit dizisi

SEQ ID NO: 15: hTINA1-H3'ün nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 16: hTINA1-H3'ün amino asit dizisi

SEQ ID NO: 17: hTINA1-L1'in nükleotid dizisi

SEQ ID NO: 18: hTINA1-L1'in amino asit dizisi

35 SEQ ID NO: 19: hTINA1-L2'nin nükleotid dizisi

- SEQ ID NO: 20: hTINA1-L2'nin amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 21: hTINA1-L3'ün nükleotid dizisi  
 SEQ ID NO: 22: hTINA1-L3'ün amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 23: TINA1 antikorunun CDRH1'inin amino asit dizisi  
 5 SEQ ID NO: 24: TINA1 antikorunun CDRH2'sinin amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 25: TINA1 antikorunun CDRH3'ünün amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 26: TINA1 antikorunun CDRL1'inin amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 27: TINA1 antikorunun CDRL2'sinin amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 28: TINA1 antikorunun CDRL3'ünün amino asit dizisi  
 10 SEQ ID NO: 29: hRS7 antikorunun bir ağır zincirinin amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 30: hRS7 antikorunun ağır zincirinin amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 31: hRS7 antikorunun bir hafif zincirinin nükleotid dizisi  
 SEQ ID NO: 32: hRS7 antikorunun hafif zincirinin amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 33: mG2aVR2 primeri  
 15 SEQ ID NO: 34: mKVR2 primeri  
 SEQ ID NO: 35: 3.3-F1 primeri  
 SEQ ID NO: 36: 3.3-R1 primeri  
 SEQ ID NO: 37: TINA1H-F primeri  
 SEQ ID NO: 38: TINA1H-R primeri  
 20 SEQ ID NO: 39: TINA1L-F primeri  
 SEQ ID NO: 40: TINA1L-R primeri  
 SEQ ID NO: 41: EG-Inf-F primeri  
 SEQ ID NO: 42: EG1-Inf-R primeri  
 SEQ ID NO: 43: CM-LKF primeri  
 25 SEQ ID NO: 44: KCL-Inf-R primeri  
 SEQ ID NO: 45: AspGlyGlyPhe amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 46: GluGlyGlyPhe amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 47: GlyGlyPheGly amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 48: SerGlyGlyPhe amino asit dizisi  
 30 SEQ ID NO: 49: LysGlyGlyPhe amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 50: AspGlyGlyPheGly amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 51: GlyGlyPheGlyGly amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 52: AspAspGlyGlyPheGly amino asit dizisi  
 SEQ ID NO: 53: LysAspGlyGlyPheGly amino asit dizisi  
 35 SEQ ID NO: 54: GlyGlyPheGlyGlyGlyPhe amino asit dizisi

## Dizi Listesi

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited  
 <120> ANTI-TROP2 ANTIKOR-İLAÇ KONJUGATI  
 5 <130> PD20-9007WO  
 <150> JP2013-267548  
 <151> 2013-12-25  
 <160> 44  
 <170> PatentIn versiyonu 3.5  
 10 <210> 1  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 1  
 cagatccagt tggtagcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaggatc 60  
 tcttgcgaagg ctctctgggta taccctcaca actgctggaa tgcagtgqgt gcaaaaagatg 120  
 ccaggcaaaqg gtttgaagtg gattgqcttg ataacacccc acctctgqgt gccaaaatat 180  
 gcagaagaact tcaagggagc gtttgccttc tctttggaaa cctctgcaag cactgcatat 240  
 ttacagataa gcaacctcaa aaatgagqac acgactacgt atctctctgc caatccqqq 300  
 ttccggtagta gctactggta ctctgatgtc tgggggcagc ggaccggcgt caacctctcc 360  
 15 tca 363  
 <210> 2  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 20 <400> 2  
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala  
 20 25 30  
 Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 3

<211> 327

5

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

```

gacattgtga tgaccagtc tcacaaatcc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      60
atcaactgca aggcagctca ggatgtgagt actgtgttag cctggtatca aacgaatca      120
ggacaatctc ctaaaactgt gatttactcg gcatccacc gctaacctgg agtccctgat      180
cgttccactg gcagtgcatc tgggacggct ttcacttcca ccatcagcag tgtgcaggct      240
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gttcgggtct      300
gggaccaagc tggagctgaa accggct                                     327
    
```

<210> 4

10

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala

100 105

<210> 5

<211> 449

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gectcggac	tctagagcca	ccatggtgct	gcagaccacg	gtgttcatct	ccctgctgct	60
gtqgatctcc	gacqqtacg	gcgatctcgt	gatgattaaa	cgtacqqtgg	cccccctcc	120
cgtgttcate	tccccccct	ccgacgagca	gctgaagtc	ggcacgct	ccgtgggtg	180
cctgctgat	aactctacc	ccagagagcc	caaggtgac	tggaggtgg	acaacgct	240
gcagtccggg	aactcccag	agagcgtgac	cgagcaggac	agaaaggaca	gnaectacag	300
cctgagcagc	accctgacc	tgagcaagc	cgactcggc	agcacaag	tgtccgctg	360
cgaggtgac	accagggcc	tgagctccc	dgtcacaag	agctcaaca	ggggggagt	420
ttacggccc	gtttaaccg	ggcggcta				449

<210> 6

10 <211> 1132

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

```

gectccggac tctagagcca ccctgaaaca cctgtggttc ttctctctgc tgggtggcagc      60
tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagg ctcccacaag      120
ggcccaggcg tcttccccct ggcaccctcc tccaaagaca cctctggcgg caccgcgcgc      180
ctgggctgcc tggfcaagga ctacttcccc gaaccngtga ccgtgagctg gaactcagga      240
gcccagacca gggcgctgca caccctcccc gctgtctctg agtccctcagg actctactcc      300
ctcagcagcg tggtgaccct gccctccagg agcttgggca cccagacctc catctgcacc      360
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaaggtg gacaagagag ttgagoccaa atcttctgac      420
aaaaactaca catgcccccc ctgcccagca cctgaactcc tggggggacc ctcaqtcttc      480
ctcttccccd caaaacccaa ggcacccttc atgatctccc gaccctctga ggtcacatgc      540
gtggfggfgg acgtgagcca cgaagacctf gaggtcaagt tcaantggta cgtggagggc      600
gtggaggtgc ataatgcusa gscasagccc cgggaggggc agtaccscag cactgaccgg      660
gtggtcagcg tctcaccctt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      720
aaggtctaca aaaaagccct cccagccccd atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc      780
cagcccgcgg aaccacaggt gtaccacctg cccccctccc gggagggat gaccsaqaac      840
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaagg tctctatccc gggacatcgc cgtggaggtg      900
gagagcaatg gcccgcgcga gaaccaactac aagaccaccc ctccctgctt ggaactccgc      960

ggctctctct tctctacag caagctcacd gtggcaaga gacggtggca gcagggcaac      1020
gtcttctcac gctccgtgat gcctgagget ctgcacaacc actaaccca gaagagcttc      1080
tccctgtctc ccggcaaatg agatctcggg ccngttcaaa cggggggagg ta      1132

```

5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1410

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Yapay Dizi

&lt;220&gt;

10

&lt;223&gt; kimerik mürin-insan TINA1 antikörünün ağır zincirinin nükleotid dizisi

&lt;400&gt; 7

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
atccagttgg tgcagttctg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caggatctcc      120
tgcacggctt ctgggtatcc cttcccaact gctggaatgc agtgggtgca aasgatgcca      180
ggaaaaggctt tgaagtgat tggctggata aacacccact ctggagtccc aaaaatagca      240
gaagaactta agggaggggt tgccttctct ttggaaacct ctgcaagcac tgcataattha      300
cagataagca acctcaaaa tggaggacag actacgtatt tctgtgagag atcggggttc      360
ggtactagct actggtactt ccatgtctgq ggcacagga ccgaggtccc cgtcaqctca      420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaaagag caectctggc      480
ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaacccgt gaccgtgagc      540
tggaaactca gcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccctgtctct gcagctctca      600
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgcctccca gcagcttggg caccacagcc      660
taeatctgca aagtgaaaca caagccagc aacacaaagg tggacaagag agtllgagcc      720
aaatcttctg acaaaactca cacatgccc cctgcccag caactgaact cctgggggga      780
cctcagctct tctcttccc cccaaaacc aagcacacc tcatgatctc ccggaccct      840
gaggtcacat gctgggtggt ggaactgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
taqtlggagc gqtlggaggt gcataatgcc aagacaaaag cccgggagga gcagtaaac      960
agcacgtacc ggtggtcag cgtctcacc gctctgccc aggactggt gaatggcaag      1020
gagtaacaagt gcaaggtctc caacaagcc cteccagccc ccataagaaa aaccatctcc      1080
aaagcaaaag gcaagcccg ggaaccacag gtrtaaccc tgcacccatc cggggaggg      1140
atqaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaaq gcttctatcc caqccactc      1200
gccttggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaaat acaagaccac cctccctgtg      1260
ctggaactcc aggctctctt cttctctctac agcaagctca cngtggacaa gagcaggtgg      1320
cagcagggca agtcttctc atgctcctgt atgcatgagg ctctgacaaa ccactacacc      1380

cagaagagcc tctcctgtc tcccggcaaa      1410

```

5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 470

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Yapay Dizi

&lt;220&gt;

10

&lt;223&gt; kimerik mürin-insan TINA1 antikörünün ağır zincirinin amino asit dizisi

&lt;400&gt; 8

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 9

<211> 702

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5

<220>

<223> kimerik mürin-insan TINA1 antikorunun hafif zincirinin nükleotid dizisi

<400> 9

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctcgg cgcgtaaggc      60
gacatgctga tgaccagtc tcacaaatc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      120
atcactctga aggcagtcx ggatgctggt actgctgtag ccaggctatca acagaaccca      180
ggacaatctc ctaaaactgt gatttactcg gcctctacc gctacaactgg agtccctgat      240
cgttccactg gcagtggtac tgggacggct ttcactttca ccataagcag tgtgcaggct      300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gttcgtgct      360
gggaccaagc tggagctgaa acgggctgtg gcgcacct ccgtgttcat ctccccccc      420
tcgacagagc agctgagtc cggccaccgc tcctgtgtgt gctgtgtgaa taactctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaaagccc tgcagtcagg gaactccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcactaca gctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaaq ccgactacga gaagcacaag gtgtacgctt gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gacttccaa cggggggagt gt                                702

```

<210> 10

10

<211> 234

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> kimerik mürin-insan TINA1 antikorunun hafif zincirinin amino asit dizisi

15

<400> 10

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1             5             10             15

```

```

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
 20             25             30

```

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp  
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
115 120 125

Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 11

<211> 1410

5 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hümanize TINA1 antikoruna, tip H1'in ağır zincirinin nükleotid dizisi

<400> 11

10

atgaaacacc tgtggttctt cctctctctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag

60

gtgcagctgg tgcagttctgg cgcgcgaagtg aagaaaaccag gcgcacagcgt gaaggtgtcc 120  
 tgcdaaggcca ggggttaca ctttaccacc gccgggatgc agtgggtgag ccaggctact 180  
 ggcacggguc tggatggat ggggtggatc aacacccaca ggggggtguc caatataccc 240  
 gaqgacttca aqqccagat qaccatcagc gccgaccca qcacctccac agctactctg 300  
 cagctgagca gctgaagtc ccaggacacc gccgtgact actgggcag aagggcttc 360  
 ggcagcagct actggtact cgaagtgtgg ggcacggca cctctgtgac cgtcagctca 420  
 cctccacca aqqcccaag cgtctccc ctgccacct cctcccaag cacctctgc 480  
 ggcacagccg cctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaacctg gacctgagc 540  
 tggactcag ggcctgac caggggggtg caaccttcc ccgtgtctt gcagtctca 600  
 ggaactact cctcagcag cgtggtacc gtccctcca qcagcttgg cacccaqcc 660  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaaag tggacaagag agttgagccc 720  
 aatcttctg acaaaactca caatgcca cctggccag caactgaact cctgggggga 780  
 cctcagctt tctcttccc cccaaaacc aaggacccc tcatgatct ccggaccct 840  
 gaqtcacat cctggtggt ggaactgag caccaagcc ctgaggtca gttcaactg 900  
 tacgtggagc gctggaggt gcataatgc aagacaaagc ccggggagga gcagtacac 960  
 agcagttacc ggggggtag cgtctcacc gtcctgcacc aggaactggt gaalggcaag 1020  
 gactacagc qcaagcttc caacaaagc ctcccagccc cctcagaga aaccatctc 1080  
 aaagccaaag gccagcccc ggaaccacag gtgtacccc tgcaccacc ccgggaggg 1140  
 atgacaaaga accaggtcag cctgaactgc ctggtcaaa gctctctatc cagggacac 1200  
 gccgtggat gggagagca tggccagccc gagaacaact caagaccac cctccctg 1260  
 ctgactccg accgtctct ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa ggcaggtgg 1320  
 cagcagggca actctctcc atgctcngtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacac 1380  
 cagaagagcc tctcctgtc tcccggaaa 1410

<210> 12

<211> 470

5

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hümanize TINA1 antikoru, tip H1'in ağır zincirinin amino asit dizisi

<400> 12

10

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

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

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 13

<211> 1410

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> hümanize TINA1 antikoruna, tip H2'nin ağır zincirinin nükleotid dizisi

&lt;400&gt; 13

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
gtgcagctgg tgcagttctg ccgcgaagtg aagaaacacg ggcgcagcgt gaaggtgttc      120
tgcacggcca ggcgtacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgag ccaggtctct      180
ggacagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccacac gggcgtgccc caaatacgcc      240
gaggacttca agggcagagt gaccatcaga ctggacaca ggaactccac cgcctacttg      300
cagctgagca gctggaagtc cggagacacc gccgtgtact actgggcccg aagcggcttc      360
ggcagcagct actggtaact cgacgtgtgg gccacggcca cctcgtgac cgtcagctca      420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaacct cctccaaagag caactctggc      480
ggcacagccc ccttgggtct cctggttaag gactacttcc ccgaacccgt gacctgagc      540
tggaaactag gccccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtctt gcagctctca      600
ggactctact cctccagcag cgttggtagc gtgccttcca ggaacttggg caaccagacc      660
tacctctgca actgtaatca caagcccagc aacacaaagg tggacaagag agttgagccc      720
aaattctgtg acaaaactca cacatgccca cctgcccag caactgaact cctgggggga      780
cctccagttc tctcttccc cccaaaaacc aaggaaacc tcatgatctc cgggacctct      840
gaggtccact gcttgggtgt ggacgtgagc cagaaagacc ctgaggtcaa gttcaacttg      900
tacctggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac      960
agcaagtacc ggttggtagc cgtctcacc cgtctgacc aggaactggc gaatggcaag     1020
gagtaacaat gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccattgagaa aacctctctc     1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacacc tgcctccatc ccgggagggag     1140
atgacaaaga accaggtcag cctgaactgc ctggtcaaaag gctctctatc cagcagatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacact caagaccac ccttcccgtg     1260
ctggaactcc acggtctctt ctctcttcc agcaagctca ccgtggaca gagcaggtgg     1320
cagcagggca acgtcttctc atgctcngtg atgatgagg ctctgcacaa ccactacacc     1380
cagaagagcc tctcctgtc tcccggcaaa     1410

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 470

5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Yapay Dizi

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hümanize TINA1 antikoru, tip H2'nin ağır zincirinin amino asit dizisi

&lt;400&gt; 14

10

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15

```

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 15

<211> 1410

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> hümanize TINA1 antikoru, tip H3'ün ağır zincirinin nükleotid dizisi

<400> 15

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
atccagctgg tgcagttctg ccgggaagtg aagaaacccg gggagagcgt gaaggtgtcc      120
tgcgaaggcc gggctacac ctttccacc gccggcatgc agtgggtgca gcagatgctt      180
ggcaagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccaca gggggtgccc caataccgc      240
gaggacttca agggcagagt gaccttcaga ctggaaaca gaactccac cgcctaccg      300
cagctgagca gctggaagtc cgggacacc gccgtgtact actgggccc agcggcttc      360
ggcagcagct actggtaact cgacgtgtgg ggcagggca cctcgtgac cgtcagctca      420
gcctccaca agggcccaag cgtcttccc ctggaaact cctccaaag caactctgg      480
ggcaagccc cctgggctg cctggtcaag gactacttc ccgaaccct gacctgagc      540
tggaaactag gccccctgac cagcggcgtg cacaccttc ccgtgtctt gcagctctca      600
ggactctact cctccagcag cgtgggtgac gtgcctcca gacgttggg caaccagac      660
tacctctgca actgtaatca caagcccagc aaccccaag tggacaagc agttgagcc      720
aaatctgtg acaaaactca cacatgccca cctgcccag caactgaact cctgggggga      780
cctccagctc tctcttccc cccaaaaacc aaggaaacc tcatgatctc cgggaccct      840
gaggtccat gctggtgtgt ggaactgagc caagaagcc ctgaggtca gttcaacttg      900
tactgtgacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac      960
agcaagtacc ggggtgtcag cgtctcacc gtcttgacc aggantgggt gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caaccaagcc ctcccagccc ccattgagca accctctctc     1080
aaagccaaag gccagcccc ggaaccacag gtgtacacc tgcaccacc cccgggagga     1140
atgaccaaga accaggtcag cctgaactgc ctggtcaaa gctctctacc cagcagacc     1200
gccgtgggtt gggagagca tggccagccc gagaaccact caagccccc ccttcccgtg     1260
ctggaactcc acgctctct cttctctacc agcaagctca ccgtggaca gagcaggtgg     1320
cagcagggca acgtctctc atgctcngtg atgatgagg ctctgcacaa ccactacac     1380
cagaagagcc tctcctgtc tcccggcaaa     1410

```

<210> 16

<211> 470

5

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hümanize TINA1 antikoru, tip H3'ün ağır zincirinin amino asit dizisi

<400> 16

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15

```

10

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 35 39

Pro Gly Glu Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Gln Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Gln Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp



&lt;400&gt; 17

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccg agcgtacggc      60
gacatccaga tgaaccagag ccttaguagc ctgagggccn ggtggggga cagagtgaac      120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagcct      180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgccccagc      240
agattttctg gcagcggccc cggcaacgac ttcacccctga caatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcc ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctllgcccag      360
ggcaccaaag tggaaatcaa gcttacggtg gccgccccct ccgtgttcat ctccccccc      420
tcgcacqagc auctgaagc ccgucacccc tccgtgctgt gctctgtgaa taactctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtcagg gaactcccag      540
gagagcctga ccgagccagg ccgcaaggac agcacctaca gctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaaag ccgactaaga gaagcacaag gtgtacgccc gagaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccac gacttccac aggggggagt gt                                702

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 234

5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Yapay Dizi

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hümanize TINA1 antikoru, tip L1'in hafif zincirinin amino asit dizisi

&lt;400&gt; 18

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
:           5           10           15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          20           25           30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          35           40           45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          50           55           60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
65           70           75           80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
          85           90           95

Ser Leu Gln Pro Gln Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr

```

10

	100		105		110	
Ile Thr Pro	Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys	Leu Glu Ile Lys Arg				
	115		120		125	
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln						
	130		135		140	
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr						
	145		150		155	160
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser						
		165		170		175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr						
		180		185		190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys						
		195		200		205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro						
	210		215		220	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
	225		230			

<210> 19

<211> 702

5

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hümanize TINA1 antikoru, tip L2'nin hafif zincirinin nükleotid dizisi

<400> 19

atggtgctgc agaccacagt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg agcgtacggc	60
gacatcgtga tgaaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gqgtgggcga cagagtgacc	120
atcactgca aggcacgcca ggaagctctc scagccgtgg ctctgtatca gaagaagct	180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacacccg cgtgccacgc	240
agattttctg gcaagcgctc cggcacccgc ttacccctga caatcagcag cctgcagccc	300
gaggacttcc cctgttacta ctgccagcag cadctatca cccccctgac ctttgcccag	360
ggcaccacagc tggaaatcaa gctaacggtg gccgcccct cngtgttcat ctcccccac	420
tccagcagac agctgaagtc cggcacccgc tccgtggtgt gctgctgaa taactctac	480
cccagagagc ccaagctgca ctggaaggtg gacaacgcc tccagtcagg gaactccag	540

10

gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcaactaca gctcagcag caccctgacc 600

ctgagcaaaag ccgactanga gaagcacaag gtgtangcct gngaggtgac ccaccagggc 660

ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt 702

<210> 20

<211> 234

5

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hümanize TINA1 antikoru, tip L2'nin hafif zincirinin amino asit dizisi

<400> 20

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser  
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

10

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180

185

190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 702

5

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Yapay Dizi

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hümanize TINA1 antikoru, tip L3'ün hafif zincirinin nükleotid dizisi

&lt;400&gt; 21

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg agcgtacggc      60
gacatcgtga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcga cctgctggca cagagtgacc      120
atcatatgca aggcacgca ggagctgccc acagcctggg cctggctatca gcagaagccc      180
ggcaagcagc ccaagctgct galctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgccccagc      240
agattctctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc      300
gggacttctg cctgtctact ctgccagcag cactacatca ccccccctgc ctttgcccag      360
ggcaccagc tggaatcaa gctacggtg gccgcacct cctgtgtcat ctccccccc      420
tcgcagcagc agctgagtc cggcccccgc tcctgtgtgt gctgtgtgaa taactctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgcgc tgcagtcagg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcaccatca gctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaaq ccgactacga gaagcacaag gtgtacgccc gggaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccac gacttcaac agggggaggt gt                                702

```

10

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 234

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Yapay Dizi

15

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hümanize TINA1 antikoru, tip L3'ün hafif zincirinin amino asit dizisi

&lt;400&gt; 22

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro  
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Gln Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 23  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 23  
 Thr Ala Gly Met Gln  
 1 5

<210> 24  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 5 <400> 24  
 Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 25  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 10 <213> Mus musculus  
 <400> 25  
 Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 26  
 <211> 11  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 26  
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
 1 5 10  
 <210> 27  
 20 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 27  
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5  
 25 <210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 28  
 Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr  
 1 5  
 30 <210> 29  
 <211> 1410

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 29

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
gtgcagctgc agcagagcgg cagcagctcg aagaagcctg gggcagcgtt caaggtgttc      120
tgaagggcca gggcctaac cttcaccacc tacggcatga actgggtgaa gcaggcccca      180
ggccaggggc tgaagtggat gggtctggatc aacacctaca ccggggagcc cacctacacc      240
gaagacttca agggccgggt ngccttcagg ctggacacca ggtgagcacc ggcctacctg      300
cagatcagca gcctgaaggc ccagcatacc gcctgctact tctggcccag aggcgcttc      360
ggcagcagct actggtactt ccagctgtgg ggcagggcca gctggtgac cgtgagctca      420
gcttcaccca agggcccaag ngcttccccc ctggcaccct cctcccaagag caactctggc      480
ggcacagccg cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctt gaccctgagc      540
tggaaactag ggcctctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtctt gcagctctca      600
ggactctact ccttcagcag cgtggtgacc gtgccttcca gtagcttggg cacccagacc      660
tacctctgca ccgtgaatca ccagcccagc aacacccaag tggacaagag agttgagccc      720
aaattctgtg acaaaactca cacatgcaca cctgcccag caactgaact cctgggggga      780
ccctcagctc tctcttccc cccaaaaacc aaggaacccc tcatgacttc ccggaccct      840
gaggtcaccat ggtggttgtt ggaagtgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gttcaacttg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgc aagacaaagc cccgggagga gcagtcaca      960
agcagctacc ggtgggtcag cgtctcacc gtcctgcacc aggaactggt gaalggcaag     1020
gagtcacaagt gcaaggtctc caccacaagc ctcccagccc ccattggaaa aacctctctc     1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacacc tgcacctc ccgggagggg     1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaaq gcttctatcc cagcagactc     1200
ggcgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac cctccctgtg     1260
ctggaactccg acggtctctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc     1380
cagaagagcc tctcctgtc tcccggcaaa

```

5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 470

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 30

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15  
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60  
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125  
 Val Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 31

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens



Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 143

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 33

<211> 30

5 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> primer mG2aVR2'nin nükleotid dizisi

<400> 33

10 agagttccag gtcaagggtca ctggctcagg 30

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

15 <220>

<223> primer mKVR2'nin nükleotid dizisi

<400> 34

agtccaactg ttcaggacgc cattttgtog 30

<210> 35

20 <211> 30

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

- <220>  
 <223> primer 3.3-F1'in nükleotid dizisi  
 <400> 35  
 tataccgtcg acctctagct agagcttggc 30  
 5 <210> 36  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Yapay Dizi  
 <220>  
 10 <223> primer 3.3-R1'in nükleotid dizisi  
 <400> 36  
 gctatggcag ggctgccgc cccgacgttg 30  
 <210> 37  
 <211> 47  
 15 <212> DNA  
 <213> Yapay Dizi  
 <220>  
 <223> primer TINA1H-F'nin nükleotid dizisi  
 <400> 37  
 20 ccagatgggt gctgagccag atccagttgg tgcagtctgg acctgag 47  
 <210> 38  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Yapay Dizi  
 25 <220>  
 <223> primer TINA1H-R'in nükleotid dizisi  
 <400> 38  
 ctgggtggag gctgagctga cggtgaccgc ggtccctgcg cccagac 48  
 <210> 39  
 30 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Yapay Dizi  
 <220>  
 <223> primer TINA1L-F'nin nükleotid dizisi

<400> 39  
 atctccggcg cgtacggcga cattgtgatg acccagtctc acaaattc 48  
 <210> 40  
 <211> 45  
 5 <212> DNA  
 <213> Yapay Dizi  
 <220>  
 <223> primer TINA1L-R'nin nükleotid dizisi  
 <400> 40  
 10 ggagggggcg gccacagccc gtttcagctc cagcttggtc ccagc 45  
 <210> 41  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Yapay Dizi  
 15 <220>  
 <223> primer EG-Inf-F'nin nükleotid dizisi  
 <400> 41  
 agctcccaga tgggtgctga gc 22  
 <210> 42  
 20 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Yapay Dizi  
 <220>  
 <223> primer EG1-Inf-R'nin nükleotid dizisi  
 25 <400> 42  
 gggcccttg tggaggctga gc 22  
 <210> 43  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 30 <213> Yapay Dizi  
 <220>  
 <223> primer CM-LKF'nin nükleotid dizisi  
 <400> 43  
 ctgtgatct ccggcgcgta cggc 24

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5

<220>

<223> primer KCL-Inf-R'nin nükleotid dizisi

<400> 44

ggagggggcg gccaccgtac g 21

## ŞEKİL 1

### SEQ ID NO: 7: cTINA1 antikoru ağır zincirinin nükleotid dizisi

atgaaatgacatgaggggttcttccctctctggtcgttgggaacctcccaaatgggtcctgggctgaagtccaa  
 ttgggtggaactctggacctcagctgaaagaacctggagagacautcaaatctctctgcaagcctctct  
 gggtatagctttcacaactgctgggaatccagtggggtgcacaaagatgcaaggcaaggctttgcaagtgg  
 atctgggtggatcaacacccactctggagtgcccaaatatggagaagacttcaagcggcaggtttgctc  
 tctctcttggcaacctctgcaagcaactgcattattcaaatcaagcaactcacaatgcaqgcaag  
 actaagtattctctgtagagctgggggttcggtagtagctactggtaacttccatgctctggggcgca  
 gggaacggcgtcagctcactcagcctccaccaaggcccaaggctctcccccctggcaacctcc  
 tccaaagacacctctggggcgcaagcggccctgggctgacctggctcaaggcaactctcccaagaccc  
 gtgacggtgagctggcaactcagggcgccctgaccagcggcgtgcaacacctccacggctgctctgcaq  
 tctctcaaacctctactcctccacacctgctgacgctgctctccagcagcttgggcaacccagcct  
 tcaatctgcacgctgaatcacaagcccagcaaacaccaaagctggacaacagacttgaagcccaaatct  
 tctgcaacaaactcaactatgcccaacctgcccagcaactgaactctggggggcaactcagctctcc  
 ctctcccccacaaaaccaaagcaacctcagctctcccaagcctctcaactcaatggcgtggctg  
 gtggacttgaagccaggaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggagggcgtggaggtgca  
 catgcaagcaaacacccaggaaggaagactcaacacagcaatcaaggtgctcaagcctctcaact  
 gtaactgcaacaggaactggtgcaatgcaaggaagctacaagtgcaagctctcccaacagcctccca  
 gcaactatggagaacactctcaaacgcaacaggaagcaacaggaacacaggtctgcaaacctctg  
 ccccaactccggggaggaatgaccaagcaacaggtcagcctcagctcctctgctcaagccttctat  
 ccaagcaactcagcctggagtgccagcaacatgcccaccccagcaaacactcaagcaacacccct  
 cccctgctgaactcagagcggctctctctcctctctcaagcaagctcaagctggcaagcaagcaggtgq  
 cacaagcacaagctctctctactctcctctgctcaatgagcctctcccaacacactcaacccagaag  
 agcctctccctgtctccagcaaa

Sinyal dizisi (1-57), değişken bölge (58-420), sabit bölge (421-1410)

### SEQ ID NO: 8: cTINA1 antikoru ağır zincirinin amino asit dizisi

MKELWFFLLI VAAF RFWLSQIQLVJSSDE LKKPGETVRI SCKASGYTFTTAGM QWVQ KMPGKGLKWI GWIN T  
 HECVPKYALDFKGF PAFNLE PSASTAYLQI SLENEDTTLYFCARSGF GGSYWYFDVWCAGI AVIVSSASTK  
 QESVPEIAPSSKPTREGTAALGGLVKEVYFPEPVTVSNBGA L TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSRVVTVPSSSL  
 GTQPYITCNVNHKPE NTKVDRKVEPKSCDKTHTCPPEFAPELGGPSVLEFTEPKKDTLMI GRTPEVTCVYVD  
 VSHEDPSVKE N WYVIGV E VHNAKTKPFEEQJNSTYRVVGVVGVLEIQLVWNEKEYKGRVENKAI PAPEKTL S  
 KAKGQPRFIQVYCSFDGSEPMFKNQVSLTCLVKGFIYSDI AVRWESMGPFPNNYKTTPEVLSNGSFFLYSK  
 LTVLDRSSWQGLNVFSCSVMHSEALHNEYTQRELSLSLPSK

Sinyal dizisi (1-19), değişken bölge (20-140), sabit bölge (141-470)

## ŞEKİL 2

### SEQ ID NO: 9: cTINA1 antikorü hafif zincirinin nükleotid dizisi

at ggt gct qdagaacaaaggt gtt caat ttc cct gct ggt gtt ggt tct caagcaat qtaacgggagatatt  
 mt qat qaccccaat ct caaaaat tcaat gtt ccccaat caat laqcaagcaacgggt ca qcaat caccct gtaag  
 gttcagt caaggat gtt gagt aact gct g' aact tgggt at caa caaaa aacaggcaaat ct. ctcaaat g  
 ct qat t taat ccccaat cct aacccct acaact ggaagt cccct gat cct caact ggcagt gcaat ct qca  
 acgggt t tcaact t caaccat cagcaat q' qcaagct caaacct ggcagt t taat taact gtaaaa  
 caat taat taact cccct caagt t cggat gct gggacaaagct ggaact caaaaagcaat ct qcccaac  
 cct cagtt gtt caat t tcccccct ccccaat ggcacat caat caat caaggcaacngct cct ggt gttgc  
 ct gct gaataaact t ct aac caagagaggg caagg t gcaat ggaaggt gga caaacccct qcaat ct  
 gggcaat caaagcaaacct caaagcaaacaggcaaac caaagcaaac caact caaagct ggcacacacac  
 ct gaccct caagcaaacagcct caaagcaaac caaagct gcaagct ggcagat gca caaacagggt  
 mt caact ccccccgt ca caaagagat t caa caagcggggagt g'

Sinyal dizisi (1-60), değişken bölge (61-387), sabit bölge (388-702)

### SEQ ID NO: 10: cTINA1 antikorü hafif zincirinin amino asit dizisi

MVIGQQVFLSLLLWTSQAYGDTVMQSHKEMTTSVQDFVSLLEKADQJVDCTAVAWYQQRFGQSPKILLYGAQ  
 YRYTQVE DREFDSSGGTAEFTYLSAVQALDGLAVYYQQQHYTTPETFGASTKLRLEKRAVAALISVLEIPFESJQQ  
 LKSDIASVQLLNHYFFFAKVAQKMDNALQSSNSQESVTEQQAEDSTYSLSNLTLSKADYSKHKVYAGRW  
 THQGLSSPVDFSENFCEQ

Sinyal dizisi (1-20), değişken bölge (21-129), sabit bölge (130-234)

## ŞEKİL 3

### SEQ ID NO: 11: hTINA1-H1'in nükleotid dizisi

atgaaagaactgtggcttcttccctccctgctggatggagctccacagatgggtgctgaagcaggtggaactggtg  
 cagctctggcctcgaactgaaggaacccagcgcgcaagctggaaggtgtctctgcaaggccacccgctacaccttt  
 ccacacggcgcggatgaagtcggatcccccagctctctcgcacaggtctcctggaatgcaatgggctgcaatgacgccc  
 ccacaggggcttgcacaaaacagcccaagcctctccagggcagagctgacccctccagcccccgaaccccccctcc  
 acagctacactgcaagctgacagccctgaactccgaagcaaacacagccctctaacctccgcgcacaaagccgcttc  
 ggcagccctactggtactctgcaagtgtgggcacagggcaacctctcgaagctcgaactcagccctccacccag  
 ggcacaaaggtcttccacctggcaacctctcccaagagccctctggccggcaccgcccctgggctgcaatg  
 ctcaagcactacttcccccgaacctctgacgtgagctcgaactcaggccgctcagccagggcctcagcaact  
 tctccacctgtctcggctctccaggaactctactccctcagcagctgggtgacgtgcccctccagcaacttgc  
 cccacccagactaacctctcgaagctgaaatccacaaacccagcaacacacacaggttggcaaacacacttgaaccc  
 caactttatgcaaaaactccacactgcccacctcgcacagccctgcaactcctcccccagccctccactcttcc  
 ctcttcccccaaaaaccccaaggcacacctccatgactccccgaacctcaggttccactgctggtggtgac  
 gtagccacgcaagacctcaggttcaagttcaactggctcagctggaactctctggaggtgcaatgacgcaagaca  
 caagccctgggagggagccctacacacagcaactcaccagctgggtcagctctctccactcctgcccacagccctgc  
 ctcaatgacacagcaactacacagctgcaagctctcccaaaaagccctcccaagccacctccgcaaaaacctctcc  
 caagcccaagggcaacctccagcaacacagctctacacccctcgcacccctcccccagcaagcaatgcccagaac  
 caagctccacctcgaactcctcctccacagctctctatccacagcaactccacctccagctgggagagcaatggcc  
 cacccccagcaacacacacagcaacctccagctgctggactcccaagctctctctctctccacagcaag  
 ctccacctggcaacagcaactcctccagcaagcccaagctctctctcctgctccctgacgcaatcagctctccac  
 aacacactccacccagcaagcagctctccctgctctccagcaaaa

Sinyal dizisi (1-57), değişken bölge (58-420), sabit bölge (421-1410)

### SEQ ID NO: 12: hTINA1-H1'in amino asit dizisi

MKHLWPEEILVAAPENVLGGVQLVQGGALVERPQASVKKVSCKADCYTEPTACMDKWRQAFSGGLEWNGWINT  
 HSPVFKYAEDEFGRVLIISADYSTEIAYLQILSGGLESDTAVVYCARSCDFSSNYWYFDVKSQGTIVTVSRAATK  
 QPSVFEIAPSSKNISSCTAALGKLVKDYFPEPVTVSNNSCALISGVITFPAVLQSSGLYLSGGVTVPSERI  
 DILTYIENVNKKPNTKVDKRVVEFKSDKLIHTCPKCPAPELGGHCVGLLEPEPKOTLMSSTPEVTCVVVD  
 VSRFDPEVKENWYVGGVEVHNAKTRIEBQYNSIYR/VSSVLTVLEQDWINGLKLYKCKVSNKALPAPTEKTS  
 KAKGQRFEPQVYELPESKESMTKQVSLDCLVRCFYPGDTAVSWFQNGQPIINNYKTFEVLSSDGSFEIYSK  
 LTVNKPENQGGVYSSSVMREALENHYLKSLGSLPFX

Sinyal dizisi (1-19), değişken bölge (20-140), sabit bölge (141-470)



## ŞEKİL 5

### SEQ ID NO: 15: hTINA1-H3'ün nükleotid dizisi

atgaaacaaatctatggttctcttcctccctgctggatggcagctaccagctggggctgctcagctcagatccagctggctg  
 caatctctcccccgaagctdaaaaaacccccgcagacccctcaaacctctcctcgcaccccacagcctccacccctt  
 acmnmcccgcgcctgcagctccgctgcaagcagctggctggcagggctcccaatgcctcggcctcagatcaaaccc  
 caacagccctgcccacactaggccaggactccacgggcaggctgacctccagcctggucacccacacccctcc  
 accccctcactggagctcagcagcttgaactccgaggaaccccccctctactactccgacaaaagccctctc  
 ggcgcagctcactggctacttcgacgctggggcaggggacccctcctgacccctccacctccacccctccacccag  
 ggcaaaaagctctcccccctgcacccctccctcccaagaggaactctccaggaacacccagccctggcctgcctg  
 gtcacagcctacttcccccaacccctgacccctcagctcgaactcagcagccctgacccagccctgcacaccc  
 tcccccctgctccctggagctctcagcactctactccctcagcagcctggctgacccctgcctccagcagcttc  
 ggcaacagacctacactctcgaactcctcaacaccccagcaaccccaggctggcaaacagccttgaacccc  
 aactctctgtagcaaaaactccacaaagccaaacctgcacagccctgcaactctggagggaccctccagctctcc  
 ctctctcccccacaaaccccagcaacccctcactgactcccccacccctcaggtccacatgcccctggctgcaac  
 gtcagcccccagacacccctcagctccactctcactggctacgtgacggcctggaggtgcactactgcacagaca  
 aacccctggggagggagctacacacagcagctccggcctgctcagcctcctccaccctccctcccccagcactgc  
 ctgcaatcgcacagcctccacagctcccaactctccacacaaagccctccagcaccacatccagcaaaaacacctctcc  
 aaaaacaaagccctcccccgggaaccccaggtgcacacccctgcacacaccccggagagcagatgcacacagac  
 cagctccagctgcctcctgcctgcctgcacagctctctccacacagcaacatcccccctggagtcggagagggagcaatggc  
 cacccccacacacacaccccccacacccctcccccctggcccccagccctccctctctccctctccagcaac  
 ctccacccctccagcaagcagccagctggctggcaacacagcccaagctctctccacagctccctggagcctgcagctctgcac  
 aacacacacacacacacagccctctccctctctcccccacaa

Sinyal dizisi (1-57), değişken bölge (58-420), sabit bölge (421-1410)

### SEQ ID NO: 16: hTINA1-H3'ün amino asit dizisi

MKH WFF LLLVAAAPRWVL QDLVQSCAEVKEKPLSLVKVSCFASGGYFTTASKQVQGMKQST FAWWVNF  
 HSGVPKYAE DFRGVVFSI DPSTSCAYLQLSLKSEDTAVYYCARSGFSSNYWYFDVWGGCTLVTVSSACTK  
 QPSVFTLAPSKKNTSCSTAAALQQLVKDYFPLPVTVSWNRQALYGVVITFPAVLQSSGLYSLSRVVTVPSSSL  
 GTQTY LSNVNHKPN KVKRVEPKSCDKTFTSPCPAPELLGGPVELFPPKFKDTEMLISRTSEVTCVVVD  
 VSHRDPFVFNWVQGVVFNAAKTKPRERQYNGSTYRVVSVLT VLIHQWLNKFKYKVKVNRKALFAFIEKTLK  
 KARGQFRPQVYSLQFNSHEEMTENQVSLTDFVKGDFYPSDTAVFNKSNQGFENNYKTFQVLDKQGSDFLYSK  
 LTVKSRWQGSNVFSQSYVMSALRNHYTQENLSLSPSK

Sinyal dizisi (1-19), değişken bölge (20-140), sabit bölge (141-470)







## ŞEKİL 9

**SEQ ID NO: 23: TINA1 antikorunun CDRH1'inin amino asit dizisi**

TAGMQ

**SEQ ID NO: 24: TINA1 antikorunun CDRH2'sinin amino asit dizisi**

WINTHSGVPKYAEDFKG

**SEQ ID NO: 25: TINA1 antikorunun CDRH3'ünün amino asit dizisi**

SGFGSSYWYFDV

**SEQ ID NO: 26: TINA1 antikorunun CDRL1'inin amino asit dizisi**

KASQDVSTAVA

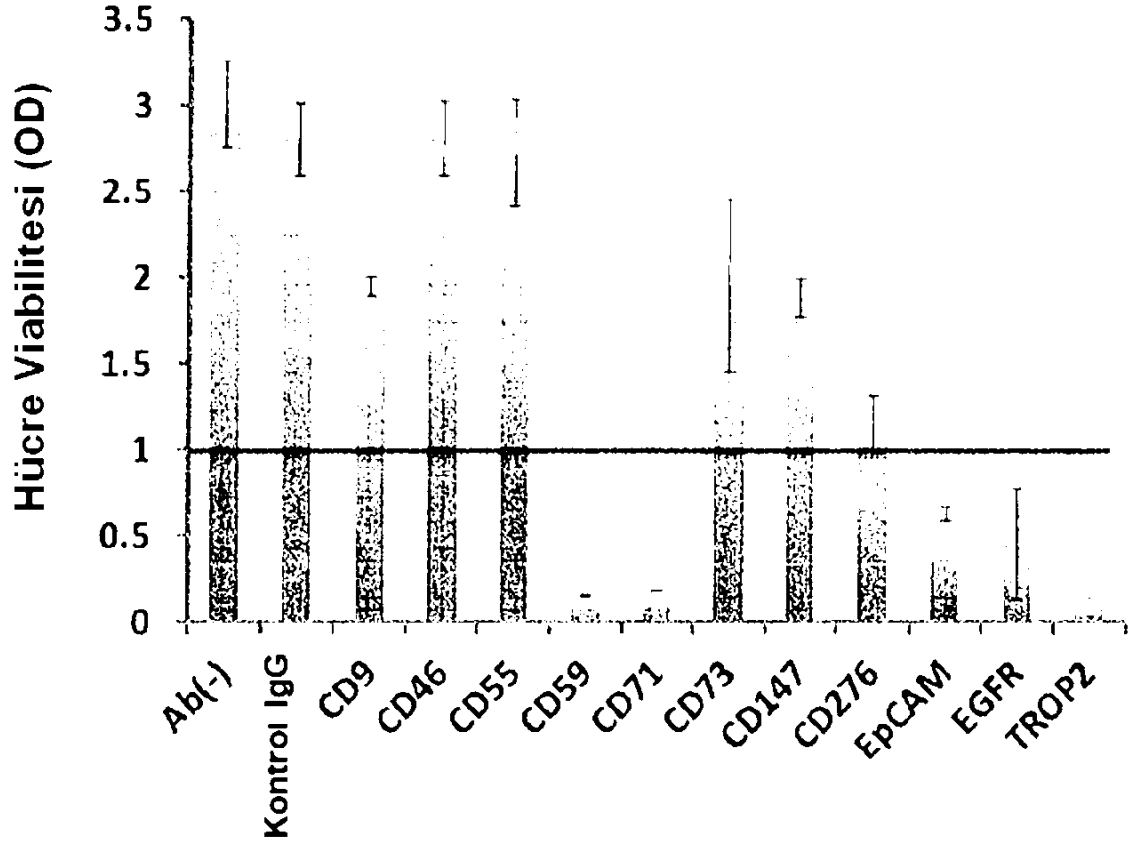
**SEQ ID NO: 27: TINA1 antikorunun CDRL2'sinin amino asit dizisi**

SASYRYT

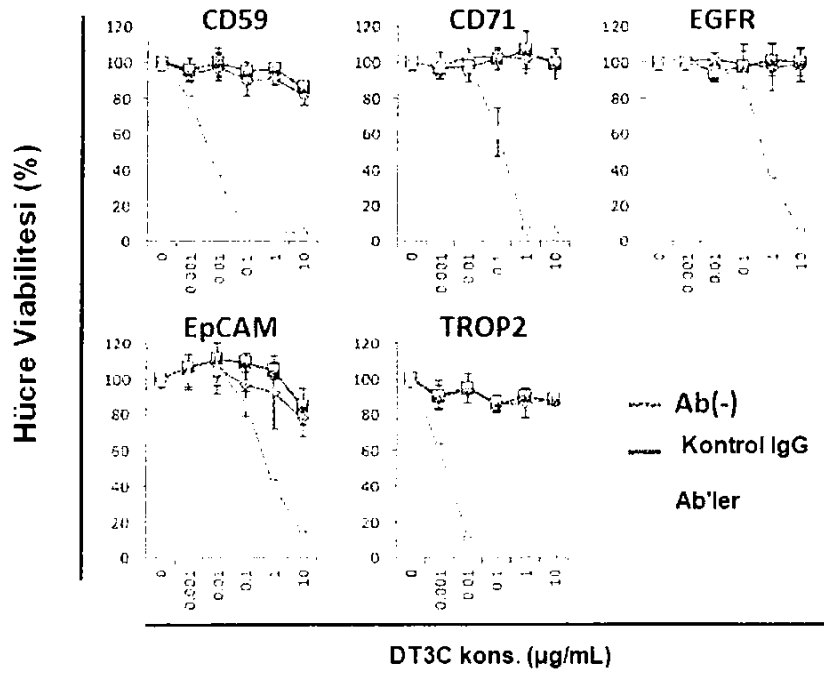
**SEQ ID NO: 28: TINA1 antikorunun CDRL3'ünün amino asit dizisi**

QQHYITPLT

ŞEKİL 10

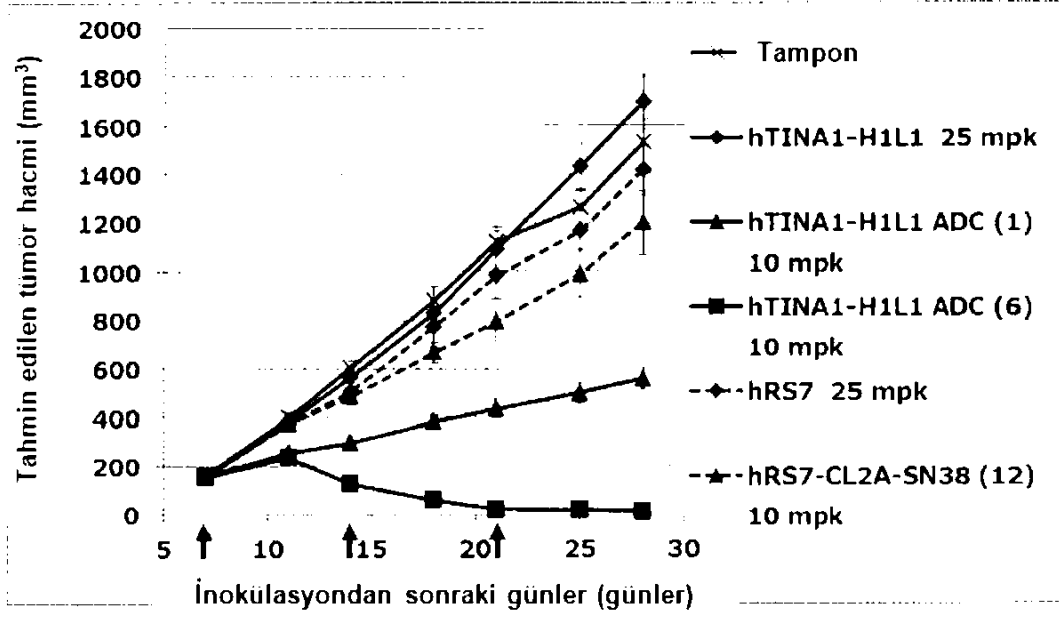


ŞEKİL 11

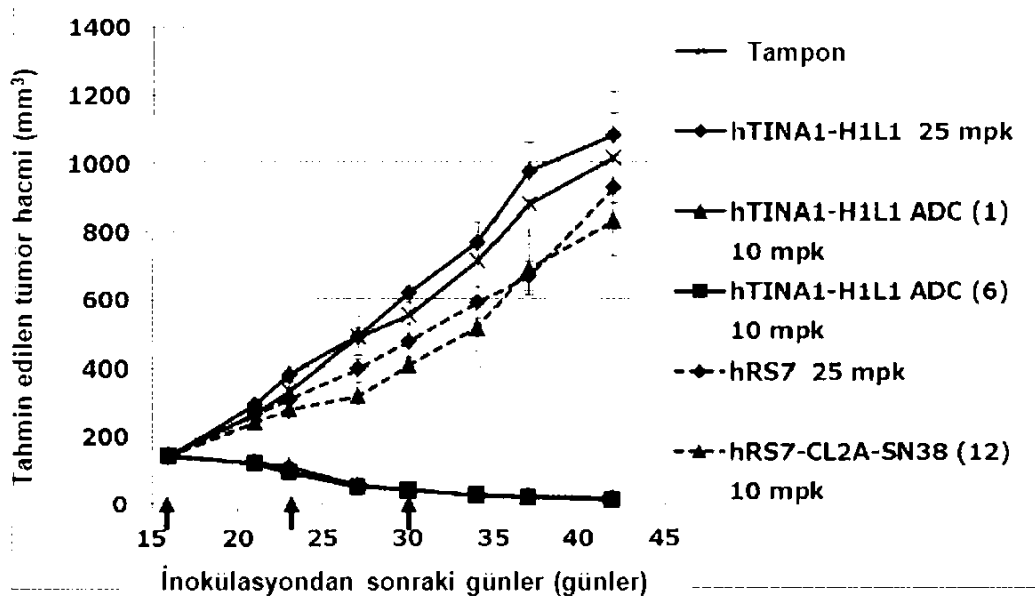




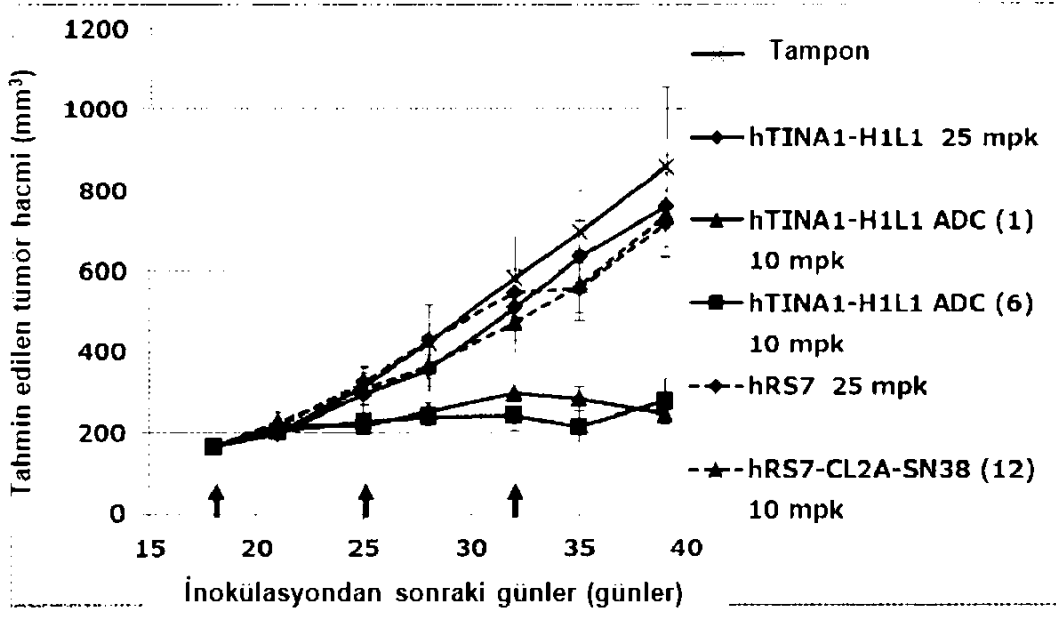
ŞEKİL 13



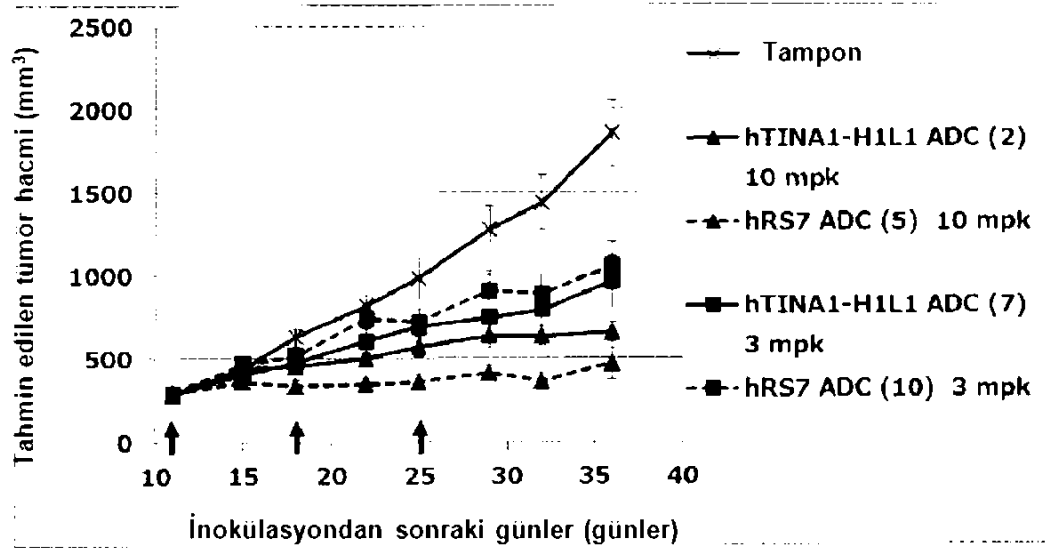
ŞEKİL 14



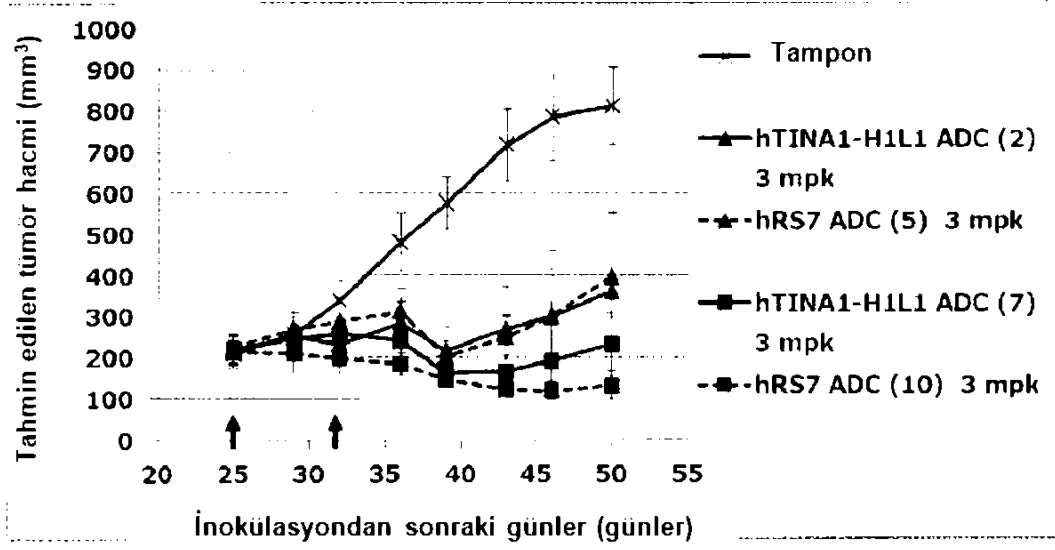
ŞEKİL 15



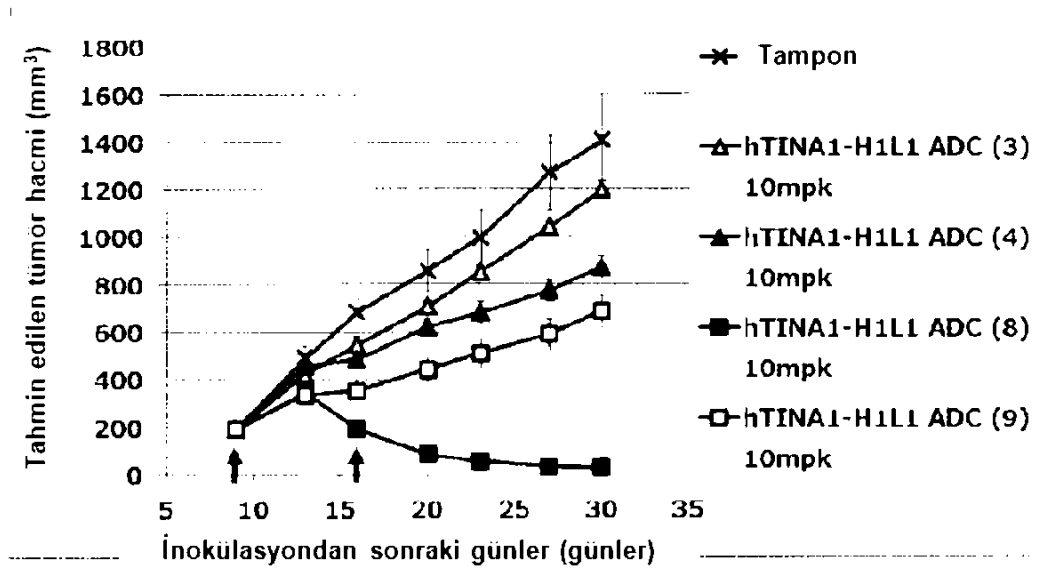
ŞEKİL 16



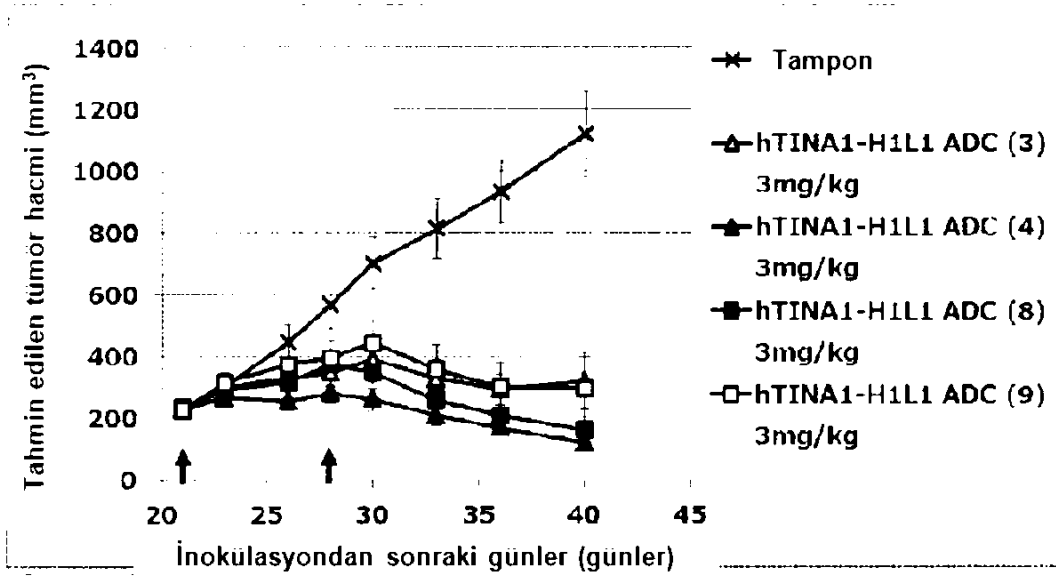
ŞEKİL 17



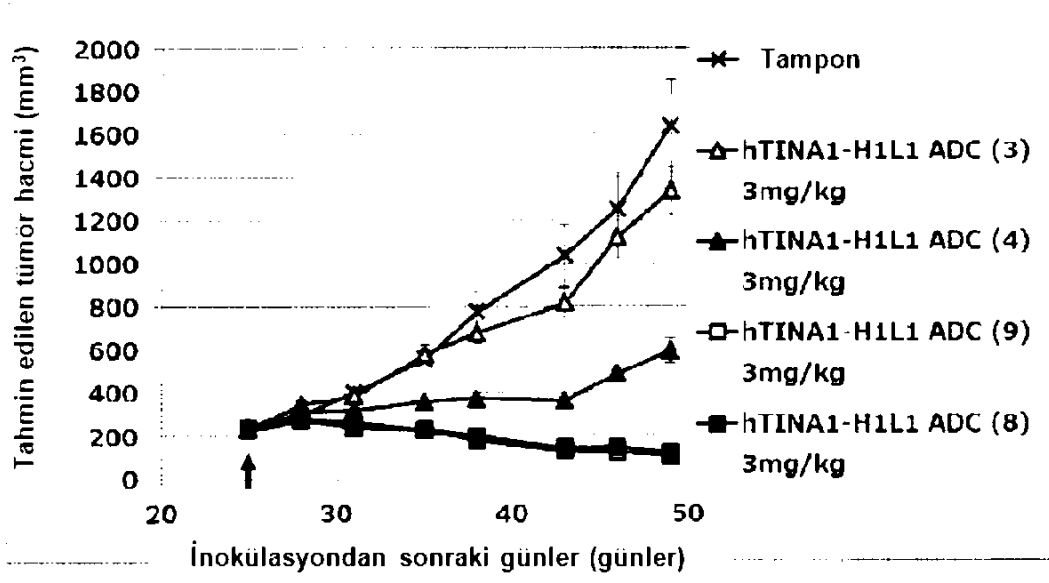
ŞEKİL 18



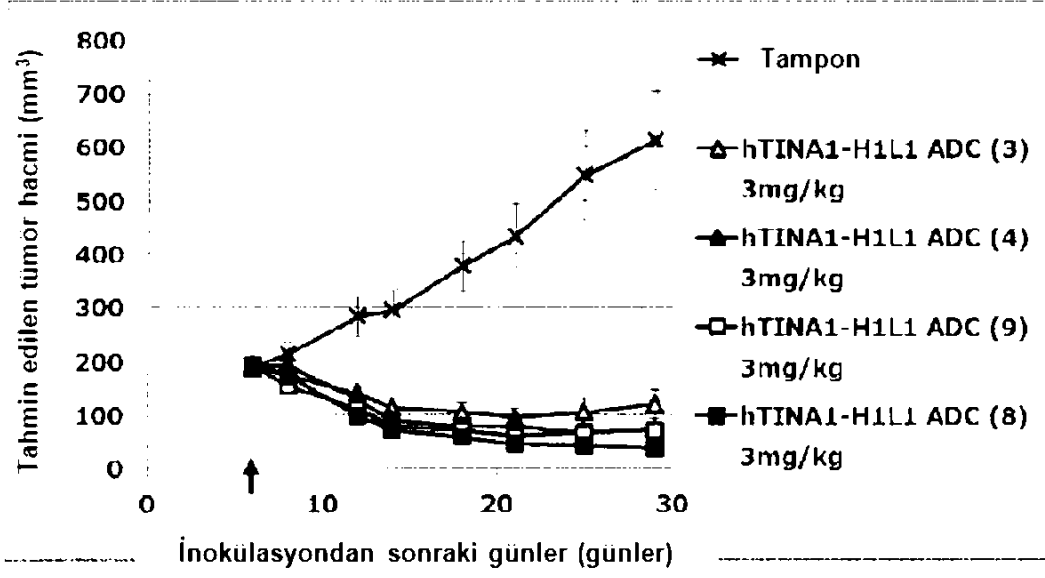
## ŞEKİL 19



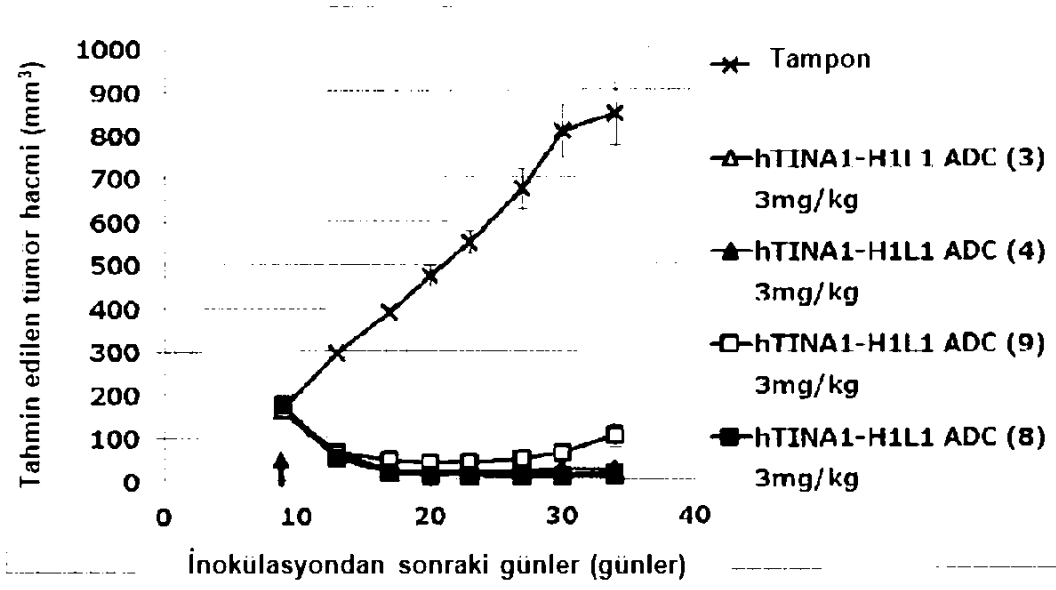
ŞEKİL 20



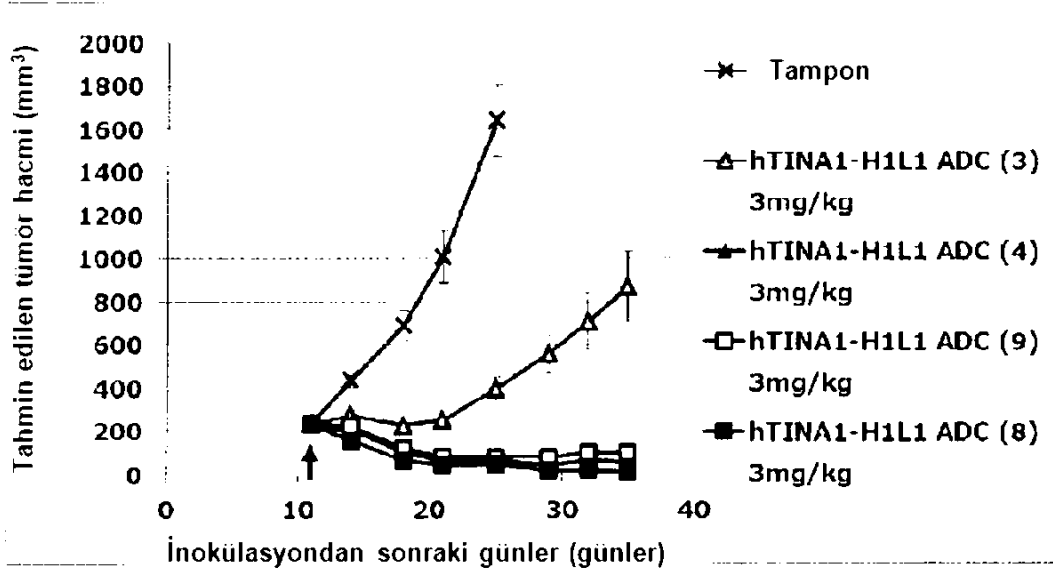
ŞEKİL 21



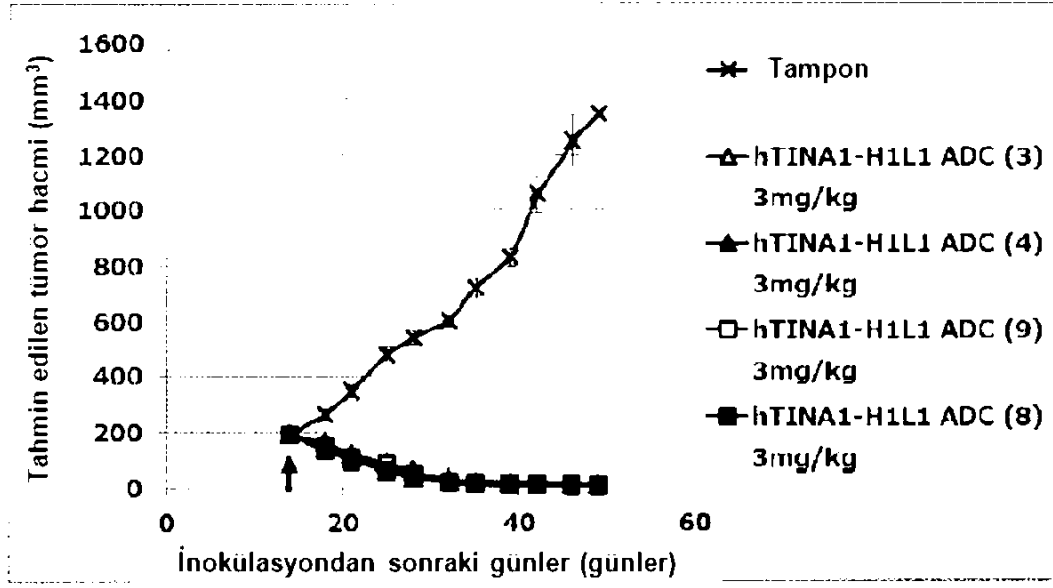
## ŞEKİL 22



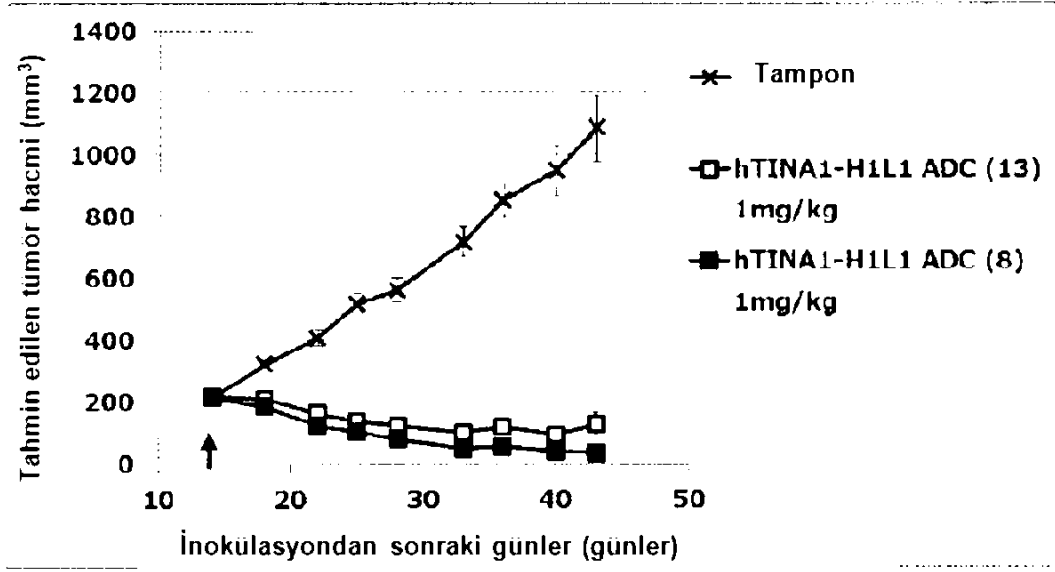
ŞEKİL 23



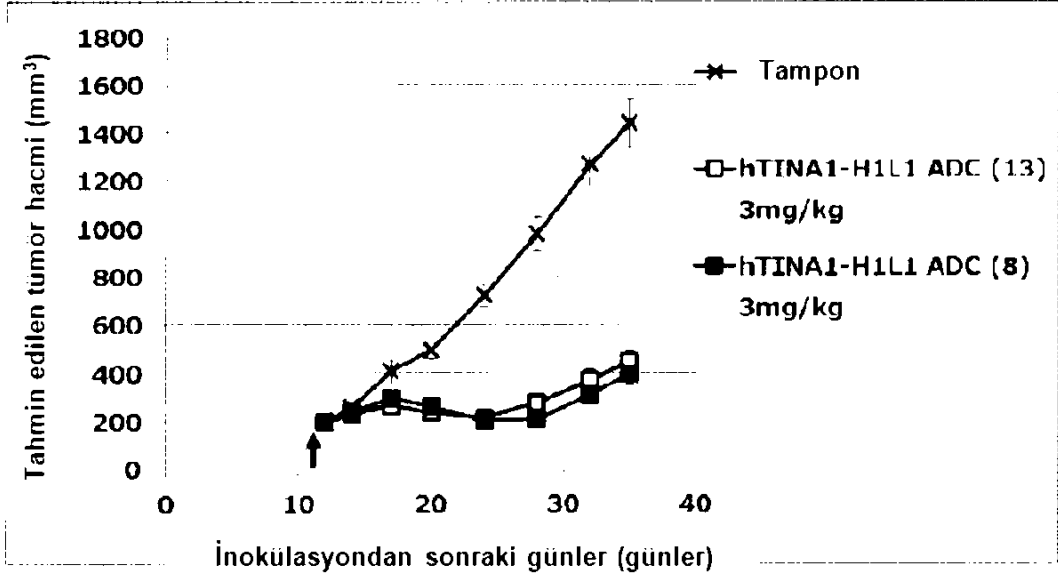
## ŞEKİL 24



ŞEKİL 25



## ŞEKİL26



ŞEKİL 27

