

ÖZET

SPEŞİFİK OLARAK DLL4 VE VEGF'YE BAĞLANAN YENİ ÇİFT-HEDEFLİ PROTEİN VE BUNUN KULLANIMI

5

Mevcut buluş, şunları içeren bir yeni çift-hedefli protein ile ilgilidir: spesifik olarak delta-benzeri ligand 4'e (DLL4) bağlanan bir yeni protein ve spesifik olarak vasküler endotelial hücre büyüme faktörüne (VEGF) bağlanan bir antikor.

İSTEMLER

1. Bir çift-hedefli protein olup, şunları içermektedir: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün amino asit sekanslarında amino asit kalıntıları 58^{inci} ila 65^{inci} amino asit sekanslarını ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit sekanslarını içeren DLL4'ün bir konformasyonel eptiopunu tanımlayan, spesifik olarak DLL4'e bağlanan bir protein; ve spesifik olarak VEGF'ye (vasküler endotelial büyüme faktörü) bağlanan bir antikor, burada DLL4'e spesifik olarak bağlanan protein aşağıdakileri içermektedir:
SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8 ile temsil edilen bir ağır-zincirli amino asit sekansı ve
SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9 ile temsil edilen bir hafif-zincirli amino asit sekansı.
2. İstem 1'e göre çift-hedefli protein olup, burada VEGF'ye spesifik olarak bağlanan antikor aşağıdakileri içermektedir:
SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip ağır zincir CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip ağır zincir CDR2, ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 12 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip ağır zincir CDR3 içeren bir ağır zincir değişken bölge, ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip hafif zincir CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip hafif zincir CDR2, ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 15 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip hafif zincir CDR3 içeren bir hafif zincir değişken bölge.
3. Çift-hedefli proteinin, DLL4'e spesifik olarak bağlanan proteinin ve VEGF'ye spesifik olarak bağlanan IgG (immünoglobülin G)-tipi antikorun bir bağ ile birbirine bağlandığı bir form olduğu, İstem 1'e göre çift-hedefli protein.
4. Bağın, bir peptidil bağ veya bir peptidil olmayan bağ olduğu, tercihen peptit bağının, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 18 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip olduğu, İstem 3'e göre çift-hedefli protein.
5. İstem 1'e göre çift-hedefli protein olup, burada VEGF'ye spesifik olarak bağlanan antikor, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 16 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip bir ağır zincir değişken bölge ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 17 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip bir hafif zincir değişken

bölge içermektedir.

- 5
6. VEGF'ye spesifik olarak bağlanan antikorun Bevacizumab olduğu, İstem 1'e göre çift-hedefli protein.
7. Çift-hedefli proteinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip bir ağır zincir ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 20 ile temsil edilen bir amino asit sekansına sahip bir hafif zincir içerdiği, İstem 1'e göre çift-hedefli protein.
- 10
8. Spesifik olarak DLL4'e bağlanan proteinin, tam-uzunlukta antikorlar, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG veya scFv(Tek-zincirli değişken fragment) formunda olduğu, İstem 1'e göre çift-hedefli protein.
- 15
9. İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre çift-hedefli proteini kodlayan bir polinükleotit.
10. İstem 9'a göre polinükleotit içeren bir ifade vektörü.
11. İstem 10'a göre ifade vektörünün dahil edildiği bir dönüştürücü.
- 20
12. DLL4'e spesifik olarak bağlanan bir protein ve VEGF'ye (vasküler endotelial büyüme faktörü) spesifik olarak bağlanan bir protein içeren bir çift-hedefli proteinin üretilmesine yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem, şu adımları içermektedir: (a) bir çift-hedefli proteinin üretilmesi için İstem 11'e göre dönüştürücünün kültürlenmesi; ve (b) adım (a)'da üretilen çift-hedefli proteinin geri kazanılması.
- 25
13. İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre çift-hedefli proteini içeren bir bileşim.
14. İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre çift-hedefli proteini içeren, kanserin tedavi edilmesi için bir yöntemde kullanıma yönelik bir farmasötik bileşim.
- 30
15. Kanser; esofajal kanser, mide kanseri, kalın bağırsak kanseri, rektal kanser, oral kanser, farinks kanseri, larinks kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, meme kanseri, uterin servikal kanser, endometrial kanser, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, testis kanseri, mesane kanseri, renal kanser, karaciğer kanseri, pankreas kanseri, kemik kanseri, bağ doku kanseri, deri kanseri, beyin kanseri, tiroid kanseri, lösemi, Hodgkin hastalığı, lenfoma
- 35

ve çoklu miyeloid kan kanserinden oluşan gruptan seçildiği, İstem 14'e göre kullanıma yönelik farmasötik bileşim.

- 5 **16.** İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre çift-hedefli proteini içeren, kanserin teşhis edilmesi için bir yöntemde kullanıma yönelik bir bileşim.

TARİFNAME

SPEŞİFİK OLARAK DLL4 VE VEGF'YE BAĞLANAN YENİ ÇİFT-HEDEFLİ PROTEİN VE BUNUN KULLANIMI

5

TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, şunları içeren bir yeni çift-hedefli protein ile ilgilidir: spesifik olarak delta-benzeri ligand 4'e (DLL4) bağlanan bir protein ve spesifik olarak vasküler endotelial hücre büyüme faktörüne (VEGF) bağlanan bir antikor.

ÖNCEKİ TEKNİK

Notch sinyalizasyonun, vertebral ve invertebral hayvanlarda yüksek derecede evrimsel olarak tüketildiği ve gelişimin başlangıç aşamasında hücrelerin kaderini belirlemede çok önemli bir rolü oynadığı raporlanmıştır. Notch sinyalizasyonu, nöral hücreler, intraoküler hücreler, lenfositler, müküler hücreler, hemositler ve benzerinin farklılaşmasını regüle eden bir önemli yol olarak bilinmektedir ve ayrıca kan damarlarının gelişiminde dahil edilmektedir. Memeliler, dört Notch reseptörüne (Notch 1, 2, 3 ve 4) sahiptir ve Notch reseptörlerinin her biri, bir 300 ila 350 kDa'lık bir büyüklüğe sahip bir protein olarak sentezlenmektedir ve hücre yüzeyinde bir heterodimeri oluşturmak için Golgi'de furin-benzeri konvertaz tarafından S1 alanında yarılmaktadır. Ek olarak dört Notch ligand (dişli-1/2 ve delta-benzeri (DLL) 1/3/4) memelilerde bulunmuştur.

Aktive Notch sinyalizasyon, çeşitli tümör modellerinde tümörjenezini indüklediği bilinmektedir. Aktive Notch NICD, sıçan hematopoietik hücrelerde ifade edildiğinde T-hücre lösemi/lenfoma oluşmuştur ve aktive Notch 1, T-ALL'nin (T-hücre akut lenfoblastik lösemi) yaklaşık %50'sinde bulunmuştur. Ek olarak meme kanseri durumunda Notch 4 reseptörünün, MMTV (fare meme tümör virüsü) ile eklenmiş sıçanlarda (Czech II) ifade edildiği bulunmuştur ve bu sıçanlarda bir meme bezi tümörünün oluşumu raporlanmıştır. Notch reseptörleri ve ligandları ve Notch sinyalizasyon hedefleri, servikal kanseri, akciğer kanseri, pankreas kanseri, yumurtalık kanseri, meme kanseri ve prostat kanseri gibi çeşitli kanserlerde aktiveleştirilmektedir. Notch 1 reseptörünün, meme kanseri hastalarında daha kötü prognoz ile ilişkili ve prostat kanserinin metastazı ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Delta-benzeri ligand 4 (DLL4) (bundan böyle "DLL4" olarak atıfta bulunmaktadır), vasküler endotelial hücrelerde aşırı ifade edilen Notch proteinlerine bağlanan delta-sınıfı ligandlarından

biridir. Anjiyojenezi regüle eden önemli bir faktör olarak bilinmektedir. DLL4, özellikle, vasküler endotelial hücrelerde aşırı ifade edilen Notch 1 veya Notch 4 reseptörüne bağlanmaktadır. DLL4'ün, normal kan damarlarından da ifade edilmesine rağmen kanser kan hücrelerinde yüksek derecede aşırı ifade edildiği bilinmektedir. Anjiyojenez, yeni kan damarlarının önceden var olan kan damarlarından oluşturulduğu mekanizmaya atıfta bulunmaktadır. Özellikle tümörlerde anjiyojenez, kanser dokusunun hipoksi bölgesine oksijen ve besin maddelerini tedarik etmek için VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) gibi anjiyojenik faktörler dolayısıyla neden olmaktadır. Tümörlerde anjiyojenezin, yalnızca tümörün büyümesinde değil, aynı zamanda tümörün metastazında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Tümörlerde DLL4 tarafından Notch sinyalizasyonu bloke edildiğinde anjiyojenez, kolaylıkla kontrol edilememektedir ve dolayısıyla tümörlerin büyümesi inhibe edilebilmektedir. Ek olarak, DLL4 tarafından Notch sinyalizasyonu inhibe edildiğinde otoimmün hastalık, düzenleyici T hücrelerinin (T_{Düz}) sayısının artırılmasıyla tedavi edilebilmektedir (US 2011-0189200 sayılı Patent Yayını). Bu nedenlerden dolayı DLL4, kanserlerin ve otoimmün hastalıkların yeni bir hedefi olmaktadır.

Bu arada anjiyojenezin inhibe edilmesine yönelik bir antikanser antikor ilacı olarak, VEGF'yi hedefleyen Avastin® (Genentech/Roche), 2004 yılında FDA tarafından onaylanmıştır ve bir antikanser terapötik ajan olarak büyük ölçüde başarılı olmuştur. Ancak son klinik model ve prelinik hayvan model çalışmalar, tüm katı tümörlerin VEGF inhibitörlerine yanı vermediğini göstermiştir, ve başlangıç aşamasında VEGF inhibitörleri ile tedavi edilen bazı tümörlerin belirli bir zaman sonra direnç gösterdiğini raporlamıştır. Ek olarak çalışma sonuçları, VEGF inhibitörlerinin uygulanmasının, kanser hücrelerini daha agresif olan ve kolay bir şekilde metastaz olan kanser hücrelerine dönüştürdüğünü gösterdiği raporlamıştır. Bu tür çalışma raporları, Avastin direncinin üstesinden gelen veya Avastin'inkinden daha yüksek verimliliğe sahip olan yeni antikanser hedeflerin araştırmasını ve gelişimini teşvik etmiştir. Bu tür yeni antikanser hedefler arasında DLL4/Notch sinyalizasyon yolunda dahil olan proteinler, ilgi çekici olmaktadır. Günümüze kadar raporlanan çalışma sonuçları, VEGF/VEGFR sinyalizasyon yolu ve DLL4/Notch sinyalizasyon yolu farklı mekanizmalar tarafından anjiyojenezi etkilediğinden dolayı daha güçlü sinerjistik antikanser etkilerin, iki sinyalizasyon yolunun hepsi inhibe edildiğinde elde edilebileceği beklenmektedir.

WO 2014/007513 A1 sayılı Patent Dokümanı, insan delta-benzeri ligand 4 (DLL4) ve Notch reseptörü arasında bir etkileşimi inhibe etmek için insan delta-benzeri ligand 4'e (DLL4) spesifik olarak bağlanan bir monoklonal antikorunu açıklamaktadır.

WO 2010/129304 A2 sayılı Patent Dokümanı, şunları içeren insan vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) spesifik olarak bağlanan bir izole antikorunu açıklamaktadır: (a) NYWMH (SEKANS

KİMLİK NUMARASI:17) içeren bir ağır zincir CDR1, DINPSNGRTSYKEKFKR (SEKANS KİMLİK NUMARASI:18) içeren bir ağır zincir CDR2, ve HYDDKYYPLMDY (SEKANS KİMLİK NUMARASI:19) içeren bir ağır zincir CDR3; ve (b) RASESDNYGISFMK (SEKANS KİMLİK NUMARASI:20) içeren bir hafif zincir CDR1, AASNQGS (SEKANS KİMLİK NUMARASI:21) içeren bir hafif zincir CDR2, ve
5 QQSKEVPWTFGG (SEKANS KİMLİK NUMARASI:22) içeren bir hafif zincir CDR3.

WO 2013/044215 A1 sayılı Patent Dokümanı, şunları içeren insan vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) spesifik olarak bağlanan bir izole antikoru açıklamaktadır: (a) NYWMH (SEKANS KİMLİK NUMARASI:17) içeren bir ağır zincir CDR1, DINPSNGRTSYKEKFKR (SEKANS KİMLİK NUMARASI:18) içeren bir ağır zincir CDR2, ve HYDDKYYPLMDY (SEKANS KİMLİK NUMARASI:19) içeren bir ağır zincir CDR3; ve (b) RASESDNYGISFMK (SEKANS KİMLİK NUMARASI:20) içeren bir hafif zincir CDR1, AASNQGS (SEKANS KİMLİK NUMARASI:21) içeren bir hafif zincir CDR2, ve
10 QQSKEVPWTFGG (SEKANS KİMLİK NUMARASI:22) içeren bir hafif zincir CDR3. Doküman, ayrıca, DLL4'e karşı bispesifik antikorları açıklamaktadır.

15 WO 2011/039370 A1 sayılı Patent Dokümanı, bir DLL4-bağlayıcı bileşen ve bir VEGF-bağlayıcı bileşeni içeren bir bispesifik bağlayıcı molekülü açıklamaktadır.

WO 2012/061374 A2 sayılı Patent Dokümanı, bir polipeptit zinciri içeren bir antijen çiftine
20 bağlanan bir bağlayıcı proteini açıklamaktadır, burada söz konusu polipeptit zincir, VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n içermektedir, burada VD1, bir birinci ağır zincir değişken alanıdır; VD2, bir ikinci ağır zincir değişken alanıdır; C, bir ağır zincir sabit alanıdır; X1, CH1 olmaması şartıyla bir bağlayıcıdır; X2 bir Fc bölgesidir; (X1)n (X1)0 veya (X1)1 olmaktadır; ve (X2)n (X2)0 veya (X2)1 olmaktadır; burada antijen çifti, TNF ve PGE2 veya VEGF ve DLL4 olmaktadır, burada VD1 ve VD2 bağımsız
25 olarak, SEKANS KİMLİK NUMARASI:30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300 veya 302'den bağımsız olarak üç CDR içermektedir.

30 WO 2009/085209 A2 sayılı Patent Dokümanı, bir polipeptit zincir içeren bir bağlayıcı proteini açıklamaktadır, burada söz konusu polipeptit zinciri, VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n içermektedir, burada VD1, bir birinci ana antikor veya bunun antijen bağlayıcı proteinden elde edilen bir birinci ağır zincir değişken alanıdır; VD2, bir ikinci ana antikor veya bunun antijen bağlayıcı bölümden elde edilen bir ikinci ağır zincir değişken alanıdır; C, bir ağır zincir sabit alanıdır; (X1)n, CH1 olmaması
35 şartıyla bir bağlayıcıdır, burada söz konusu (X1)n, ya bulunmaktadır ya da yoktur; ve (X2)n bir Fc bölgesidir, burada söz konusu (X2)n ya bulunmaktadır ya da yoktur, burada bağlayıcı protein, CD-

20 ve CD-19; CD-20 ve CD-80; CD-20 ve CD-22; CD20 ve CD-40; CD3 ve HER-2; CD-3 ve CD-19; EGFR ve HER-2; EGFR ve CD-3; EGFR ve IGF1,2; EGFR ve IGF1R; EGFR ve RON; EGFR ve HGF; EGFR ve c-MET; HER-2 ve IGF1,2; HER-2 ve IGF1R; RON ve HGF; VEGF ve EGFR; VEGF ve HER-2; VEGF ve CD-20; VEGF ve IGF1,2; VEGF ve DLL4; VEGF ve HGF; VEGF ve RON; VEGF ve NRP1; 5 CD-20 ve CD3; DLL4 ve PLGF; VEGF ve PLGF, ErbB3 ve EGFR, HER-2 ve ErbB3, ErbB3 ve HGF; HER-2 ve PLGF, ve HER-2 ve HER-2'den oluşan gruptan seçilen bir antijen çiftini bağlayabilmektedir.

10 WO 2009/085209 A2 sayılı Patent Dokümanı, kanserin tedavi edilmesine yönelik bir yöntemi açıklamaktadır, bu yöntem, bir DLL4 antagonistinin etkili bir miktarının buna gereksinim duyan bir süjeje uygulanmasını içermektedir.

15 WO 2014/071074 A2 sayılı Patent Dokümanı, bir polipeptit zincir içeren bir bağlayıcı proteini açıklamaktadır, burada polipeptit zincir, VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n içermektedir, burada VD1, bir birinci ağır zincir değişken alanıdır; VD2, bir ikinci ağır zincir değişken alanıdır; C, bir ağır zincir sabit alanıdır; X1, CH1 olmaması şartıyla bir bağlayıcıdır; X2 bir Fc bölgesidir; n 0 veya 1'dir; ve burada bağlayıcı protein, DLL4 ve VEGF'yi bağlamaktadır, burada VD1 ve VD2, bağımsız olarak 20 SEKANS KİMLİK NUMARASI:39, 41, 43, 45, 47, 49, 51 veya 53'ten seçilen üç CDR'yi içermektedir, ve burada VD1 ve/veya VD2'den en az biri, SEKANS KİMLİK NUMARASI:39'dan üç CDR içermektedir.

BULUŞUN AÇIKLAMASI

TEKNİK PROBLEM

25 Mevcut buluş sahipleri, DLL4/Notch ve VEGF/VEGFR sinyalizasyon yollarını etkili bir şekilde inhibe etmek için spesifik olarak insan-türevli DLL4 ve VEGF'ye bağlanabilen ve immünojenisite riskini minimuma indirebilen bir çift-hedefli proteini geliştirmeye yönelik kapsamlı çabalar göstermiştir. Nihai olarak mevcut buluş sahipleri, yeni bir çift-hedefli protein olan insan VEGF'sine spesifik 30 olarak bağlanan yeni bir insan monoklonal antikorunu yapmıştır, burada spesifik olarak insan DLL4'e bağlanan yeni bir ScFv (tek-zincirli değişken fragment), IgG-tipi Avastin'e benzer bir proteinin C-terminal bölgesine bağlanmaktadır, ve ayrıca, bu tür bir çift-hedefli proteinin, yalnızca VEGF ve VEGF reseptörü arasındaki etkileşimi değil, aynı zamanda DLL4 ve Notch proteini arasındaki etkileşimi etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve dolayısıyla mükemmel antikanser etkiler 35 sergilediğini bulmuştur, böylelikle mevcut buluşu tamamlamıştır.

Mevcut buluşun yapılandırmaları, istemler 1 ve 12'de açıklanmaktadır.

Tercih edilen yapılandırmalar, bağlı istemler 2 ila 11 ve 13 ila 16'da açıklanmaktadır.

5 **TEKNİK ÇÖZÜM**

Mevcut buluşun bir amacı, şunları içeren bir çift hedefli protein sağlamaktır: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel eptiopunu tanımlayan spesifik olarak DLL4'e bağlanan bir protein; ve spesifik olarak VEGF'ye (vasküler endotelial büyüme faktörü) bağlanan bir antikor.

Mevcut buluşun başka bir amacı, yukarıda açıklanan çift-hedefli proteini kodlayan bir polinükleotit, polinükleotit içeren bir ifade vektörü ve ifade vektörünü içeren bir dönüştürücü sağlamaktır.

Mevcut buluşun yine başka bir amacı, çift-hedefli proteinin üretilmesine yönelik bir yöntem sağlamaktır.

Mevcut buluşun yine başka bir amacı, yukarıda bahsedilen çift-hedefli proteini içeren bir bileşimi sağlamaktır.

Mevcut buluşun yine ilave bir amacı, yukarıda bahsedilen çift-hedefli proteini içeren, kanserin tedavi edilmesine yönelik bir farmasötik bileşim sağlamaktır.

Mevcut buluşun yine ilave bir amacı, yukarıda bahsedilen çift-hedefli proteini içeren, kanserin teşhis edilmesine yönelik bir bileşim sağlamaktır.

Mevcut buluşun yine ilave bir amacı, kanserin tedavi edilmesine yönelik bir yöntemde kullanma yönelik yukarıda bahsedilen çift-hedefli proteinin sağlanmasını sağlamaktır.

Mevcut buluşun başka bir amacı, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel eptiopunu sağlamaktır.

Mevcut buluşun yine başka bir ilave amacı, yukarıda bahsedilen konformasyonel epitopunu tanımlayan, DLL4'e spesifik olarak bağlanan bir monoklonal antikoru sağlamaktır.

Mevcut buluşun başka bir amacı, monoklonal antikoru kodlayan bir polinükleotit, polinükleotit içeren bir ifade vektörü ve ifade vektörünü içeren bir dönüştürücü sağlamaktır.

5 AVANTAJLI ETKİLER

Mevcut buluşa göre çift-hedefli protein, hem VEGF hem de DLL4'e bağlanarak kanseri tedavi edebilmektedir, ve DLL4'e spesifik olarak bağlanan yeni bir proteini içerdiğinden dolayı mükemmel bağlayıcı afinite ve antikanser etkileri sergilemektedir. Dolayısıyla kanser tedavisinin ve teşhisi alanlarında geniş çapta kullanılabilir. 10

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

ŞEKİLLER 1a ve 1b, hem DLL4 hem de VEGF'ye bağlanabilen bir çift-hedefli proteinin yapısını göstermektedir. 15

ŞEKİL 2a, CHO hücrelerinde hem DLL4 hem de VEGF'ye bağlanabilen bir çift-hedefli proteinin ifade edilmesiyle, ifade edilen proteinin saflaştırılması ve SDS-PAGE ile saflaştırılmış proteinin analiz edilmesiyle elde edilen sonuçları göstermektedir.

ŞEKİL 2b, CHO hücrelerinde hem DLL4 hem de VEGF'ye bağlanabilen bir çift-hedefli proteinin ifade edilmesiyle, ifade edilen proteinin saflaştırılması ve SEC-HPLC kromatografisi ile saflaştırılmış proteinin analiz edilmesiyle elde edilen sonuçları göstermektedir. 20

ŞEKİL 3, çift-hedefli proteinin DLL4 ve VEGF'ye bağlanma kabiliyetlerini incelemek için gerçekleştirilen bir enzim ile bağlantılı immünosorban tahlilin (ELISA) sonuçlarını göstermektedir.

ŞEKİL 4a, çift-hedefli protein tarafından hedeflenen bir antijen olan DLL4 için çift-hedefli proteinin denge ayrışma sabitini (KD) ölçmek için gerçekleştirilen bir Biacore tahlilinin sonuçlarını göstermektedir. 25

ŞEKİL 4b, çift-hedefli protein tarafından hedeflenen bir antijen olan VEGF için çift-hedefli proteinin denge ayrışma sabitini (KD) ölçmek için gerçekleştirilen bir Biacore tahlilinin sonuçlarını göstermektedir. 30

ŞEKİL 5, DLL4 ve VEGF'yi nötrleştirmeye yönelik çift-hedefli proteinin kabiliyetlerini ölçmek için gerçekleştirilen bir ELISA'nın sonuçlarını göstermektedir.

ŞEKİL 6, insan DLL4 ve MLCK2 antikorumun, bir çapraz-bağın varlığında veya yokluğunda bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir.

ŞEKİL 7, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen DLL4'ün amino asit sekansının amino asit kalıntıları 58-65'ten [FRVCLKHF]) oluşan bir fragmentin ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 35

22 ile temsil edilen bir fragmentin, bir insan DLL4 C2 alanında bir kesintisiz moleküler yüzeyi oluşturduğu (amino asit kalıntısı 27-174) bir modeli göstermektedir.

ŞEKİL 8, yabani-tip ve DLL4'ün her birinin ekstraselüler alanının bir delesyon fragmentini kodlayan mutant proteinlerinin bağlama afinitelerini incelemek için gerçekleştirilen Western blotlamanın sonuçlarını göstermektedir.

ŞEKİL 9a, VEGF-hedefli antikor Avastin ile tedavi gerçekleştirildiğinde vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonunun, DLL4 varlığına veya yokluğuna bakılmaksızın bir konsantrasyona-bağlı şekilde inhibe edildiğini göstermektedir.

ŞEKİL 9b, yalnızca DLL4'e karşı bir antikor ile tedavi gerçekleştirildiğinde vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonunun, anti-DLL4 antikoronun konsantrasyonuna bağlı bir şekilde yalnızca DLL4'e sahip bir deney grubunda görüldüğünü göstermektedir.

ŞEKİL 9c, çift-hedefli protein ile tedavi gerçekleştirildiğinde DLL4 olmadan bir deney grubunun, Avastin antikoru (siyah çubuklar) ile tedaviye benzer bir proliferasyon inhibitör etki gösterdiğini ve DLL4'e sahip bir deney grubunun, Avastin'e (beyaz çubuklar) kıyasla vasküler proliferasyon inhibitör etkisini gösterdiğini göstermektedir.

ŞEKİL 10, DLL4 ve VEGF'ye bağlanan çift-hedefli proteinin, insan umbilikal damar endotelial hücrelerde (HUVEC'ler) DLL4/Notch VEGF/VEGFR sinyalizasyon yollarının inhibe edilmesine yönelik bir aktivite sergilediğini gösteren, Western blot analizinin sonuçlarını göstermektedir.

ŞEKİL 11, DLL4 ve VEGF'ye bağlanan çift-hedefli proteinin, çıplak farelerde yapılan bir Avastin-dirençli insan SCH gastrik kanser ksenograft modelde Avastin'den daha güçlü bir antikanser etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

ŞEKİL 12, DLL4 ve VEGF'ye bağlanan çift-hedefli proteinin, çıplak farelerde yapılan bir Avastin-dirençli insan A549 akciğer kanser ksenograft modelde Avastin'den daha güçlü bir antikanser etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

BULUŞUN GERÇEKLEŞTİRİLMESİNE YÖNELİK EN İYİ MOD

Bir yönde mevcut buluş, şunları içeren bir çift hedefli protein sağlamaktadır: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel eptiopunu tanımlayan spesifik olarak DLL4'e bağlanan bir protein; ve spesifik olarak VEGF'ye (vasküler endotelial büyüme faktörü) bağlanan bir antikor.

Burada kullanıldığı üzere "çift-hedefli protein" terimi, iki farklı antijene (hedef protein) bağlanabilen bir proteine atıfta bulunmaktadır. Spesifik olarak çift-hedefli protein doğal olarak oluşmamaktadır ve tercihen bir genetik mühendislik yöntemi veya herhangi başka bir yöntem ile

üretilmektedir.

Mevcut buluşun amacı doğrultusunda çift-hedefli protein, hem kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen VEGF'ye hem de endotelial hücrelerde ifade edilen DLL4'e bağlanabilmektedir. Çift-hedefli protein, bir antikor formunda olabilmektedir. Burada kullanıldığı üzere "çift-hedefli protein" terimi, "çift-hedefli antikor", "bispesifik antikor" veya "bispesifik antikor proteini" terimi ile değişimli olarak kullanılabilir. Tercihen mevcut buluşun çift-hedefli proteini, antijenler olarak VEGF ve DLL4'ü hedefleyebilmektedir. Mevcut buluşa göre çift-hedefli proteinin formu, bir çift-hedefli proteini içermektedir, burada spesifik olarak VEGF'ye bağlanan bir IgG-tipi antikor ve spesifik olarak DLL4'e bağlanan bir protein bir bağ ile birbirine bağlanmaktadır, ancak spesifik olarak bununla sınırlı değildir. Mevcut buluşa göre çift-hedefli proteinin yapısı, Şekil 1a'da şematik olarak gösterilmektedir.

Spesifik olarak mevcut buluşun çift-hedefli proteini, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ile temsil edilen bir ağır-zincirli amino asit sekansını ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 20 ile temsil edilen bir hafif-zincirli amino asit sekansını içerebilmektedir.

Burada kullanıldığı üzere "antikor" terimi, belirli bir antijen ile immünolojik olarak reaktif olan bir immünglobülin molekülünü içeren, ve spesifik olarak bir antijeni tanımlayan bir reseptör olarak işlev gören bir protein molekülüne atıfta bulunmaktadır. Bu terim, tüm poliklonal antikorları, monoklonal antikorları, tam-boy antikorları ve antikor fragmentleri içerebilmektedir. Ek olarak terim, kimerik antikorlar (örneğin insanlaştırılmış murin antikorları) ve heterojen antikorlar (örneğin bispesifik antikorlar) gibi genetik mühendislik ile üretilen formları içerebilmektedir. Bir tam-boy antikor, iki tam-boy hafif zincire ve iki tam-boy ağır zincire sahiptir, burada hafif zincirlerin her biri, bir disülfid bağ ile ağır zincire bağlanmaktadır. Tam-boy antikor, IgA, IgD, IgE, IgM ve IgG içerebilmektedir, ve IgG'nin alttıpleri, IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 içermektedir. Ek olarak antikor terimi, çift değerlikli molekülleri, diakorpusları, triakorpusları ve tetra korpusları kapsayabilmektedir. Spesifik olarak, VEGF'ye spesifik olarak bağlanan antikorlar IgG tipi olabilmektedir.

Mevcut buluşta çift-hedefli protein, spesifik olarak VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve bir tam-boy antikora bağlanan bir immünoglobülin G (IgG)-tipi antikorun, spesifik olarak DLL4'e (delta-benzeri ligand 4) bağlanan Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG veya scFv-tip proteinin bir bağ ile birbirine bağlandığı bir form olabilmektedir.

Tipik olarak bir immünoglobülin ve scFv, ağır zincir ve hafif zincirlere sahiptir, ve her bir ağır ve

hafif zincir, bir sabit bölge ve bir değişken bölge barındırmaktadır (bölgeler ayrıca alanlar olarak bilinmektedir). Hafifi ve ağır zincir değişken bölgeler, dört çerçeve bölgesini ve ayrıca "tamamlayıcılık belirleme bölgeleri" olarak adlandırılan üç hiperdeğişken bölgeyi (bundan böyle "CDR'ler" olarak atıfta bulunmaktadır) içermektedir. CDR'ler, öncelikle bir antijenin bir epitopuna 5 bağlanma bakımından sorumludur. Her bir zincirin CDR'sine, tipik olarak N-terminusundan başlayarak sıralı olarak sayılı CDR1, CDR2 ve CDR3 olarak atıfta bulunmaktadır ve ayrıca tipik olarak, belirli CDR'nin konumlandırıldığı zincir ile tanımlanmaktadır.

DLL4'e spesifik olarak bağlanan bir protein ve spesifik olarak VEGF'ye bağlanan bir antikor içeren 10 mevcut buluşun çift-hedefli proteini, insan-türevli DLL4 ve VEGF için güçlü bir afinite göstermektedir, DLL4-ifade eden hücrelerin (örneğin kanser hücreleri veya vasküler endotelial hücreler) Notch 1 veya Notch 4 reseptörüne bağlanmasını etkili bir şekilde inhibe etmektedir, ve ayrıca VEGF reseptörünü ifade eden vasküler endotelial hücrelerin, kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen VEGF tarafından aktive edildiği bir anjiyojenik prosesi inhibe etmektedir. Dolayısıyla, 15 mevcut buluşun çift-hedefli proteini, kanser gibi hastalıkların tedavisinde daha güçlü bir terapötik etki sergileyebilmektedir.

Mevcut buluşa göre çift-hedefli proteinin VEGF-spesifik bağlayıcı antikorunu ve DLL4-spesifik bağlayıcı proteini, bunların spesifik bağlanmasını sürdürebilmektedir ve özellikle eş zamanlı olarak 20 iki hedefi (antijeni) inhibe edebilmektedir. Dolayısıyla antikor ve protein, bir tek hedefe bağlanan veya bunu inhibe eden bir protein veya antikordan daha etkili olabilmektedir ve bunlar, eş zamanlı olarak iki sinyali inhibe edebilmektedir.

Burada kullanıldığı üzere "antikor fragmentler" terimi, antijenlerin bağlanma kabiliyetine sahip 25 fragmentlere atıfta bulunmaktadır ve örneğin Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG ve scFv gibi antikorların antijen-bağlayıcı formlarını içermektedir. Özellikle "antikor fragmentleri" terimi, scFv (tek-zincirli değişken fragment) kapsamaktadır ve özellikle, çift değerlikli molekülleri veya diakorpusları, triakorpusları ve tetrakorpusları kapsayabilmektedir.

Burada kullanıldığı üzere "scFv (tek-zincirli değişken fragment)" terimi, bir tam antijen-tanım ve 30 antijen-bağlanma alanını barındıran ve alanların bir tek polipeptit zincirinde bulunabildiği antikor VH ve VL alanlarını içeren minimum antikor fragmentine atıfta bulunmaktadır.

Burada kullanıldığı üzere "çift hedefli protein" şunları içermektedir: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 35 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel eptiopunu tanımlayan

spesifik olarak DLL4'e bağlanan bir protein; ve spesifik olarak VEGF'ye (vasküler endotelial büyüme faktörü) bağlanan bir antikor, DLL4 ve VEGF'nin dahil edildiği iki sinyalizasyon yolunu eş zamanlı olarak inhibe edebilen herhangi bir çift-hedefli proteini kapsayabilmektedir. Çift-hedefli proteinin VEGF-spesifik bağlayıcı antikor ve DLL4-spesifik bağlayıcı proteini, yukarıda açıklandığı üzere tam-boy antikorların ve antikor fragmentlerin formunda olabilmektedir.

Burada kullanıldığı üzere "SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4 (delta-benzeri ligand 4) proteininin amino asit sekansında 58^{inci} ile 65^{inci} ve 110^{uncu} ile 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel eptopunu tanımlayan spesifik olarak DLL4'e bağlanan bir protein", SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4 (delta benzeri ligand 4) proteininin amino asit sekansında 58^{inci} ile 65^{inci} ve 110^{uncu} ile 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel epitopuna spesifik olarak bağlanan bir proteine atıfta bulunmaktadır. Protein, kanserin büyümesinin inhibe edilmesiyle bir kanser terapötik etkisi sergileyebilen bir protein anlamına gelmektedir. Protein, yüksek afiniteye sahip epitopa bağlanabilmektedir ve DLL4 aktivitesini nötrleştirmek üzere işlev görebilmektedir. Protein, DLL4'ün Notch reseptörüne bağlanmasını bloke edebilmektedir ve DLL4-aracılı sinyalizasyonu inhibe edebilmektedir. SEKANS KİMLİK NUMARALARI: 21 ve 22'yi içeren DLL4'ün bir konformasyonel epitopuna spesifik olarak bağlanan bir protein, spesifik olarak tam-boy antikorlar, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG veya scFv(Tek-zincirli değişken fragment) formunda olabilmektedir.

SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ile 65^{inci} ve 110^{uncu} ile 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel eptopuna spesifik olarak bağlanan protein, DLL4'e spesifik olarak bağlanan protein, şunları içerebilmektedir: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR3 içeren bir ağır-zincirli değişken bölge; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR3 içeren bir hafif-zincirli değişken bölge.

Daha da spesifik olarak ağır zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8 ile temsil edilen bir ağır-zincirli amino asit sekansını içerebilmektedir ve hafif zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9 ile temsil edilen bir hafif-zincirli amino asit sekansını içerebilmektedir. Ancak protein, ayrıca, yukarıda açıklanan CDR sekanslarını içeren ve bir kanser terapötik etkisini sergilemek için spesifik olarak DLL4'e bağlanabilen herhangi bir protein olabilmektedir. Ağır zincir ve hafif zincir, bir bağ ile birbirine bağlanabilmektedir.

Ek olarak mevcut buluşun çift-hedefli proteininin DLL4-spesifik bağlayıcı proteini, spesifik olarak yalnızca insan DLL4'e değil, aynı zamanda fare DLL4'e bağlanabilmektedir, ve DLL4 ve Notch proteini arasındaki etkileşimi inhibe edebilmektedir.

5

Mevcut buluşun bir örneğinde, DLL4 ve VEGF'yi inhibe etmeye yönelik mükemmel bir biyolojik aktiviteye sahip olan, mevcut buluşun çift-hedefli proteininin DLL4-spesifik bağlayıcı antikorunun epitopu tanımlanmıştır. Spesifik olarak mevcut buluşta, antikorun, DLL4'ün amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısından oluşan DLL4'ün kesintisiz moleküler yüzeyine bağlandığı bulunmuştur. Dolayısıyla DLL4'ün amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 22) ve 110^{uncu} ila 115^{inci} (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 23) amino asit kalıntısı, mevcut buluşa göre DLL4-spesifik bağlayıcı antikorun epitopu olabilmektedir. Daha da spesifik olarak SEKANS KİMLİK NUMARALARI: 22 ve 23'ten oluşan DLL4'ün bir moleküler yüzey bölgesi bir konformasyonel epitop olabilmektedir.

15

Burada kullanıldığı üzere "delta-benzeri ligand 4 (DLL4)" terimi, Notch reseptörlerine bağlanan delta-sınıfı ligandlardan birine atıfta bulunmaktadır ve tercihen Notch 1 veya Notch 2'ye bağlanan bir proteine atıfta bulunmaktadır, ancak bununla sınırlı değildir. DLL4, herhangi bir memeli DLL4 olabilmektedir ancak tercihen insan veya fare DLL4 olmaktadır. DLL4'ün, tümör damar yapılarını içeren çeşitli tümör hücrelerinde aşırı ifade edilen ve ksenograft modellerde anormal damar yapılarının sayısının artırılmasıyla kanserin büyümesini kolaylaştırdığı bilinmektedir.

20

Dolayısıyla SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel epitopuna spesifik olarak bağlanan bir protein içeren mevcut buluşun çift-hedefli proteini, etkili bir şekilde DLL4'ün fonksiyonunun inhibe edilmesiyle kanserin tedavi edilmesi için kullanılabilir. DLL4 ile ilgili bilgi, Ulusal Sağlık Enstitülerinin Gen Bankasını içeren bilinen veri tabanlarından elde edilebilmektedir, ve örneğin Gen Bankası Erişim Numarası NM_019074.3 (Gen KİMLİĞİ: 54567 ve NCBI Referans Sekansı: NM_019074.3) olan DLL4'ün bilgisi olabilmektedir. DLL4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21'in amino asit sekansını içerebilmektedir.

30

Burada kullanıldığı üzere "Notch reseptörü" terimi, Notch sinyalizasyonuna aracılık eden bir proteine atıfta bulunmaktadır ve Notch ile değişimli olarak kullanılabilir. Notch reseptörü, Notch sinyalizasyonuna aracılık eden herhangi bir protein olabilmektedir. Tercihen Notch reseptörü, Notch 1 veya Notch 4 olabilmektedir ancak bununla sınırlı değildir.

35

Burada kullanıldığı üzere "insan delta-benzeri ligand 4 (DLL4) ve Notch reseptörü arasındaki etkileşimin inhibe edilmesi" ifadesi, mevcut buluşun DLL4-spesifik bağlayıcı proteininin, DLL4 ve Notch reseptörü arasındaki etkileşimi inhibe etmek için DLL4'e bağlandığı anlamına gelmektedir. Tercihen, bu ifade, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel epitopu için spesifik çift-hedefli proteinin, DLL4 ve Notch 1 veya Notch 4 reseptörü arasındaki etkileşimi inhibe etmek için DLL4'e bağlandığı, ancak bununla sınırlı olmadığı anlamına gelmektedir. Mevcut buluşun çift-hedefli proteini, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel epitopuna spesifik olarak bağlandığında Notch reseptörlerinin, buna DLL4'ün bağlanmasıyla yapısal olarak değiştirilmesini önlemektedir. Dolayısıyla Notch sinyalizasyonu inhibe etmek için Notch proteinlerinin hidrolizini önlemektedir. DLL4, tümörlerde Notch reseptörlerine bağlandığında kan damarlarının büyüklüğünü arttırdığı ve vasküler endotelial hücreler veya kanser hücreleri ve vasküler endotelial hücreler arasındaki Notch sinyalizasyonu arasındaki sinyalizasyonu aktive etmektedir, böylelikle tümörlerin proliferasyonu ve metastazında bir rol almaktadır.

Dolayısıyla tümörlerde DLL4 tarafından Notch sinyalizasyonu inhibe edildiğinde anjiyogenez, kolaylıkla kontrol edilememektedir ve dolayısıyla tümörlerin büyümesi inhibe edilebilmektedir. Ek olarak DLL4 bloke edildiğinde, bir anjiyogenik alanın sonundaki hücrelerde yanal inhibisyon kaybının aşırı filizlenmeye neden olduğu görünmektedir, böylelikle düşük verimliliğe sahip anjiyogenik reaksiyonlarda bir düşüşe neden olmaktadır, ve oksijenin tedarik edilmesine yönelik perfüzyon, tümörlerin etrafındaki hipoksiyi indüklemek üzere azaltılabilmektedir, böylelikle anti-VEGF terapisine direnç gösteren tümörlere karşı bile antitümör etkilere neden olmaktadır.

Bu doğrultuda, DLL4 ve Notch arasındaki etkileşimi etkili bir şekilde inhibe eden DLL4-spesifik bağlayıcı proteini içeren mevcut buluşun çift-hedefli proteini, etkili bir şekilde kanserin tedavisi için kullanılabilir.

Burada kullanıldığı üzere "spesifik olarak VEGF'ye bağlanan antikor" veya "VEGF-spesifik bağlayıcı antikor" ifadesi, tümör hücrelerinde spesifik olarak antijen VEGF'ye bağlanan tüm antikorları kapsamaktadır. Spesifik olarak antikor, VEGF'yi hedefleyen bir terapötik etki olan Bevacizumab(Avastin®) olabilmektedir ancak bununla sınırlı değildir. VEGF'ye spesifik olarak bağlanan bu tür antikorlar, yukarıda açıklandığı üzere tam-boy antikorları veya antikor fragmentleri içerebilmektedir ve IgG antikorlar olabilmektedir, ancak bununla sınırlı değildir. VEGF, anjiyogenezde önemli bir rol oynayan bir ligandır, ve VEGF inhibe edildiğinde hiçbir anjiyogenez

oluşmayacaktır, ve dolayısıyla kanser tedavi edilebilmektedir. US FDA tarafından onaylanan Bevacizumab (Avastin®, Genentech), stabil bir şekilde kullanılabilen bir terapötik antikordur.

5 Spesifik olarak VEGF'ye bağlanan antikör, spesifik olarak şunları içerebilmektedir: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 12 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR3 içeren bir ağır-zincirli değişken bölge; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 15 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR3 içeren bir hafif-zincirli değişken bölge. Daha da spesifik olarak spesifik olarak VEGF'ye bağlanan antikör, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 16 ile temsil edilen bir ağır-zincirli amino asit sekansını ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 17 ile temsil edilen bir hafif-zincirli amino asit sekansını içerebilmektedir. Ancak antikör, ayrıca, yukarıda açıklanan CDR sekanslarını içeren ve bir kanser terapötik etkisini sergilemek için spesifik olarak VEGF'ye bağlanabilen herhangi bir antikör olabilmektedir.

15 Mevcut buluşa göre çift-hedefli proteinin VEGF-spesifik bağlayıcı antikörü, tümör hücrelerinde aşırı ifade edilen VEGF'ye spesifik olarak bağlanabilmektedir, ve dolayısıyla VEGF'yi ifade eden tümör hücrelerinde mevcut buluşun çift-hedefli proteinin, konsantr edebilmektedir. Ayrıca VEGF'ye bağlanarak antikanser aktiviteyi sergileyebilmektedir.

20 Burada kullanıldığı üzere "vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)" terimi, vasküler endotelial hücrelerin büyüme aktivitesini geliştiren ve makrofajlar, düz kas hücreleri ve tümör hücreleri dahil çeşitli türlerde hücreler tarafından salgılanan bir büyüme faktörü türüne atıfta bulunmaktadır. VEGF, fetal anjiyojenezde önemli bir rol oynamaktadır ve ayrıca hızlı büyüme ve metabolizmanın olduğu tümör dokusuna oksijen tedarik etmek için anjiyojenezi indüklemek üzere işlev görmektedir. VEGF proteininin ve bunun reseptörünün dahil edildiği yollar, yetişkinlerde antikanser ajanların hedef sinyalizasyon yolları olarak çalışılmıştır.

30 Ek olarak, çift-hedefli proteinin VEGF-bağlayıcı alanı, insan VEGF ve VEGF reseptörü arasındaki etkileşimin inhibe edilmesi anlamına gelmektedir. Spesifik olarak VEGF için spesifik çift-hedefli proteinin, VEGF ve VEGFR-2 arasındaki etkileşimi inhibe etmek üzere VEGF'ye bağlandığı, ancak bununla sınırlı olmadığı anlamına gelmektedir.

35 Mevcut buluşun amacı doğrultusunda VEGF reseptörü, memeli VEGF'sine bağlanan herhangi bir protein olabilmektedir. Spesifik olarak insan VEGF'sine bağlanan bir protein olabilmektedir.

VEGF ve VEGF reseptörü arasındaki etkileşim, mevcut buluşun VEGF-spesifik çift-hedefli proteini ile inhibe edildiğinde VEGF'nin VEGF reseptörüne bağlanmasıyla VEGF/VEGF sinyalizasyonu inhibe edilecektir. Tümörlerdeki VEGF ve VEGF reseptörü birbirine bağlandığında kanser dokusunun stromal/endotelial hücrelerindeki VEGF/VEGF reseptörünün, kan damarlarının sayısını azaltmak ve tümörlerdeki bir vasküler fonksiyonu zayıflatmak için DLL4/Notch sinyalizasyon yolunun mekanizmasından farklı olarak anjiyojenezi güçlü bir şekilde inhibe etmek üzere aktifleştirilmektedir, böylelikle kanser proliferasyonu ve metastaz inhibe edilmektedir.

Dolayısıyla, DLL4 ve VEGF için spesifik olan mevcut buluşun çift-hedefli proteini, farklı bir mekanizma ile kanser dokusunda anjiyojenezi inhibe etme kabiliyeti göstermektedir, ve dolayısıyla daha iyi antikanser aktiviteye sahip bir terapötik ajan olarak kullanılabilir.

Spesifik olarak çift-hedefli protein, DLL4'e spesifik olarak bağlanan proteinin ve VEGF'ye spesifik olarak bağlanan IgG (İmmünoglobülin G)-tipi antikorun bir bağ ile birbirine bağlandığı bir form olabilir.

Burada kullanıldığı üzere "bağ" terimi, bir hidrojen bağlayıcının kullanımı, elektrostatik etkileşim, van der Waals kuvveti, bir disülfid bağlayıcı, bir tuz köprüsü, hidrofobik etkileşim, bir kovalent bağlayıcı vs. ile iki farklı füzyon partnerini (örneğin biyolojik polimer) birleştirebilen herhangi bir kısma atıfta bulunmaktadır. Spesifik olarak bağ, fizyolojik koşullar veya diğer standart peptid koşulları (örneğin peptitlerin saflaştırılmasına veya depolanmasına yönelik koşullar) altında en az bir disülfid bağlayıcıda çökelebilen en az bir sistein kalıntısına sahip olabilir. Füzyon partnerlerinin birleştirilmesine ek olarak bağ, bir aralıklayıcı olarak işlev görebilmektedir ve füzyon partnerleri arasında bir aralık sağlamaktadır veya konjugat için esneklik veya sertlik sağlaması için bir menteşe olarak işlev görebilmektedir. Bağ, bir peptidil bağ veya bir peptidil olmayan bağ olabilir. Bir peptid bağlayıcı veya bir disülfid bağlayıcı aracılığıyla füzyon partnerleri arasındaki doğrudan bağlantı, bağın rolü kapsamındadır.

Mevcut buluşta bağ, tercihen, DLL4-spesifik bağlayıcı proteini VEGF-spesifik bağlayıcı antikora birleştirebilen bir polipeptid olabilir ancak spesifik olarak bununla sınırlı değildir. Daha da tercihen bağ, VEGF-spesifik bağlayıcı antikorun Fc bölgesinin C-terminusunu DLL4-spesifik bağlayıcı proteinine birleştirebilen bir peptidil bağ olabilir. Daha da tercihen bağ, bir GGGGS motifinin tekrarlarından oluşan bir amino asit sekansını içeren bir peptidil bağ olabilir. GGGGS motifi, 1 ila 10 kere tekrarlanabilir. En fazla tercihen bağ, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 18'in bir amino asit sekansını veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 19'un bir polinükleotid sekansı ile kodlanan bir amino asit sekansını içerebilir.

Bağ peptit (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 18) GGGGSGGGGSGGGGS

Bağ polinükleotit (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 19): GGTGGAGGTGGCAGCGGTGGTGG
CGGCAGTCCCGGTGGCGGCTCC

5

Burada kullanıldığı üzere "peptit olmayan bağ" terimi, herhangi bir peptidil olmayan kovalent bağlayıcı ile birbirine birleştirilebilen en az iki tekrar biriminden oluşan bir biyouyumlu bağa atıfta bulunmaktadır.

10 Mevcut buluşta kullanılan peptit olmayan bağın örnekleri, polietilen glikol (PEG) homopolimerleri, polipropilen glikol homopolimerleri, etilen glikol-propilen glikol kopolimerleri, polioksietillenmiş polioli, polivinil alkoller, polisakkaritler, dekstran, polivinil etil eter, biyobozunur polimerler, lipit polimerler, kitinler, hiyalüronik asit ve bunun kombinasyonlarını içermektedir. Tercihen peptidil olmayan bağ, bir polietilen glikol homopolimeridir. Teknikte hâlihazırda bilinen ve teknik seviyede
15 kolaylıkla hazırlanabilen türevler, mevcut buluşun kapsamı dahilindedir. Daha da tercihe peptidil olmayan bağ, 1 ila 5 kDa arasında bir molekül ağırlığına sahip bir polietilen glikol homopolimeridir. En fazla tercihen, VEGF-spesifik bağlayıcı antikoru DLL4-spesifik bağlayıcı proteine birleştirebilen, 3.4 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip olan ve her iki ucunda aldehit grupları barındıran bir bağ olabilmektedir. Özellikle her iki uçtaki aldehit fonksiyonel gruplar, spesifik olmayan reaksiyonların
20 minimum hale getirilmesinde etkilidir.

Bağ aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak birleştirilen bölgeler, Fc fragmentleri, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv ve benzerini içermektedir ancak spesifik olarak bunlar ile sınırlı değildir. Çift-hedefli protein, şunlar olabilmektedir: DLL4-spesifik bağlayıcı proteinin tamamının veya bir parçasının,
25 VEGF-spesifik bağlayıcı antikorun tamamına veya bir parçasına bağlandığı bir form; veya DLL4-spesifik bağlayıcı proteinin tamamının veya bir parçasının, bir peptidil bağ aracılığıyla VEGF-spesifik bağlayıcı antikorun tamamına veya bir parçasına bağlandığı bir form; veya bunların bir kombinasyonu, ancak çift-hedefli protein bunlar ile sınırlı değildir.

30 Ek olarak Çift-hedefli protein, şunlar olabilmektedir: DLL4-spesifik bağlayıcı proteinin tamamının veya bir parçasının, VEGF-spesifik bağlayıcı antikorun bir ağır zincirinin tamamına veya bir parçasına bağlandığı bir form; veya DLL4-spesifik bağlayıcı proteinin tamamının veya bir parçasının, bir peptidil bağ aracılığıyla VEGF-spesifik bağlayıcı antikorun bir hafif zincirinin tamamına veya bir parçasına bağlandığı bir form; veya bunların bir kombinasyonu.

35

Mevcut buluşun bir örneğinde, spesifik olarak DLL4 ve VEGF'ye bağlanan çift-hedefli protein

Avastin-DLL4 BsAb, polinükleotidi kodlayan, polinükleotidi bir vektöre ekleyen, vektörü hayvan hücrelerine dahil eden ve bir Avastin-DLL4-bağlayıcı çift-hedefli proteinini hücrelerden izole eden bir çift-hedefli proteini hazırlamak için bir bağ tarafından IgG-tipi Avastin'in ağır-zincirli bölgesinin C-terminusunun, bir scFv-tipi DLL4-bağlayıcı proteinine birleştirilmesiyle yapılmıştır. Çift-hedefli protein molekülü, bir Avastin IgG antikorunun, bir bağ tarafından bir DLL4-bağlayıcı scFv'ye birleştirildiği bir yapıya sahiptir (ŞEKİL 1). Hayvan hücrelerinde ifade edilen Avastin-DLL4-bağlayıcı çift-hedefli protein izole edilmiştir ve bunun ifadesi ve saflığı ölçülmüştür (ŞEKİLLER 2a ve 2b). Ek olarak Avastin-DLL4-bağlayıcı çift-hedefli proteinin spesifik olarak VEGF ve DLL4 hedeflerine bağlandığı bulunmuştur (ŞEKİL 3). Ek olarak antijenlerin her biri için çift-hedefli proteinin bağlayıcı afinitesinin, bir kontrol antikorunkine benzer olduğu gösterilmiştir. Spesifik olarak çift-hedefli protein, insan DLL4 için 30 nM'lik bir KD değeri ve insan VEGF için 0.126 nM'lik bir KD değeri göstermiştir (Tablolar 2 ve 3). Ayrıca, bağlayıcı vasküler endotelial hücre DLL4 ve insan Notch 1 reseptörünün her biri ve VEGF'nin VEGF reseptörüne bağlanması dolayısıyla neden olunan sinyalizasyon yolunun, çift-hedefli protein ile tedavi vasıtasıyla etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir (ŞEKİL 10). Bu tür sonuçlar, DLL4 ve VEGF için spesifik olan mevcut buluşun çift-hedefli proteininin, DLL4'ün Notch reseptörüne bağlanmasını ve VEGF'nin VEGF reseptörüne bağlanmasını etkili bir şekilde bloke edebildiğini, böylelikle bir antikanser etki sağladığını önermektedir. Avastin-dirençli insan SCH gastrik kanserinde ve A549 akciğer kanseri ksenograft modellerinde çift-hedefli proteinin antikanser etkisi bulunmuştur (ŞEKİLLER 11 ve 12).

Başka bir yönde mevcut buluş, yukarıda açıklanan çift-hedefli proteini kodlayan bir polinükleotit, polinükleotit içeren bir ifade vektörü ve ifade vektörünü içeren bir dönüştürücü sağlamaktadır.

Mevcut buluşa göre çift-hedefli proteini kodlayan bir polinükleotit içeren bir ifade vektörü spesifik olarak kısıtlanmamaktadır ancak memeli hücreler (örneğin insan, maymun, tavşan, sıçan, hamster veya fare hücreleri), bitki hücreleri, maya hücreleri, böcek hücreleri ve bakteriyel hücreler (örneğin *E.coli*) dahil ökaryotik veya prokaryotik hücrelerde polinükleotidi kopyalayabilen ve/veya ifade edebilen bir vektör olabilmektedir. Tercihen, en az bir seçici işaretçi içeren ve polinükleotidin bir konak hücrede ifade edilebilmesi için uygun bir promotöre işlevsel olarak bağlanan bir vektör olabilmektedir. Daha da tercihen vektör, bir faj, plazmit, kozmit, mini-kromozom, virüs veya retrovirüs vektörüne eklenen polinükleotidi içerebilmektedir.

Çift-hedefli proteini kodlayan polinükleotidi içeren ifade vektörü, ya çift-hedefli proteinin ağır zincir veya hafif zincirini kodlayan her bir polinükleotidi içeren bir ifade vektörü ya da çift-hedefli proteinin ağır zincir ve hafif zincirini kodlayan tüm polinükleotitleri içeren bir ifade vektörü olabilmektedir.

Mevcut buluşun ifade vektörünün, dönüştürücüleri oluşturmak için dahil edildiği hücreler, *E. coli*, *Streptomyces* ve *Salmonella typhimurium* gibi bakteriyel hücreleri; maya hücrelerini; *Pichia pastoris* gibi mantar hücrelerini; Drosophila veya Spodoptera Sf9 hücreleri gibi böcek hücreleri; Çin hamster yumurtalık (CHO) hücreleri, SP2/0 (fare miyelom), insan lenfoblastoid, COS, NSO (fare miyelom), 293T, Bowes melanoma hücreleri, HT-1080, BHK (bebek hamster böbrek hücreleri), HEK (insan embriyonik böbrek hücreleri), PERC.6 (insan retinal hücreler), benzerini; ve bitki hücrelerini kapsamaktadır. Mevcut buluşun bir örneğin CHO-S hücreleri konak hücreler olarak kullanılmıştır.

10 Burada kullanıldığı üzere "ekleme" terimi, çift-hedefli proteini bir konak hücrelerine kodlayan polinükleotit içeren vektörün iletimine atıfta bulunmaktadır. Bu ekleme, kalsiyum fosfat-DNA birlikte çökmesi, DEAE-dekstran-aracılı transfeksiyon, polibren-aracılı transfeksiyon, elektroporasyon, mikroenjeksiyon, lipozom-aracılı transfeksiyon, lipozom füzyonu, lipofeksiyon ve protoplast füzyon dahil teknikte bilinen çeşitli yöntemler ile gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca transfeksiyon, viral partiküller kullanılarak enfeksiyon vasıtasıyla bir hücreye istenilen bir malzemenin iletilmesi anlamına gelmektedir. Ek olarak vektör, gen bombardımanı ile bir konak hücrelerine eklenebilmektedir. Mevcut buluşta ekleme, transfeksiyon ile değişimli olarak kullanılabilir.

20 Yine başka bir yönde mevcut buluş, çift-hedefli proteinin üretilmesine yönelik bir yöntem sağlamaktadır.

Çift-hedefli proteinin üretilmesine yönelik yöntem, tercihen, DLL4'e spesifik olarak bağlanan bir protein ve VEGF'ye (vasküler endotelial büyüme faktörü) spesifik olarak bağlanan bir antikor içeren bir çift-hedefli proteinin üretilmesine yönelik bir yöntem olabilmektedir, bu yöntem, şu adımları içermektedir: (a) bir çift-hedefli proteini üretmek için dönüştürücünün kültürlenmesi; ve (b) adım (a)'da üretilen çift-hedefli proteinin geri kazanılması.

30 Daha da tercihen çift-hedefli proteinin üretilmesine yönelik yöntem şu adımları içeren bir yöntem olabilmektedir: (a) spesifik olarak VEGF'ye bağlanan bir antikor kodlayan bir polinükleotidin ve spesifik olarak DLL4'e bağlanan ve şunları içeren bir proteini kodlayan bir polinükleotidin hazırlanması: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR3 içeren bir ağır-zincirli değişken bölge; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR2

ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR3 içeren bir hafif-zincirli değişken bölge; (b) adım (a)'da hazırlanan VEGF-spesifik bağlayıcı antikoru kodlayan polinükleotidin Fc-bölgesini kodlayan polinükleotidin 3' ucunun, bir bağ ile DLL4-spesifik bağlayıcı proteini kodlayan polinükleotidin 5' ucuna birleştirilmesi; (c) bir ifade vektörünü hazırlamak için adım (b)'nin çift-hedefli protein-kodlayan polinükleotidin klonlanması; (d) bir dönüştürücünün elde edilmesi için bir konak hücreye adım (c)'nin ifade vektörünün eklenmesi ve dönüştürücünün kültürlenmesi; ve (e) çift-hedefli proteinin adım (d)'nin dönüştürücünden geri kazanılması.

Ek olarak çift-hedefli proteinin üretilmesine yönelik yöntem şu adımları içeren bir yöntem olabilmektedir: (a) spesifik olarak VEGF'ye bağlanan bir antikoru kodlayan bir polinükleotidin ve spesifik olarak DLL4'e bağlanan ve şunları içeren bir proteini kodlayan bir polinükleotidin hazırlanması: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR3 içeren bir ağır-zincirli değişken bölge; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR3 içeren bir hafif-zincirli değişken bölge; (b) bir ifade vektörünü hazırlamak için adım (a)'nın polinükleotidinin klonlanması; (c) bir dönüştürücünün elde edilmesi için bir konak hücreye adım (b)'nin ifade vektörünün eklenmesi ve dönüştürücünün kültürlenmesi; ve (d) adım (c)'nin dönüştürücünden VEGF-spesifik bağlayıcı antikorun ve DLL4-spesifik bağlayıcı proteinin geri kazanılması ve bir bağ vasıtasıyla VEGF-spesifik bağlayıcı antikorun Fc bölgesinin C-terminusunun, DLL4-spesifik bağlayıcı proteinin N-terminusuna birleştirilmesi.

Mevcut buluşun çift-hedefli proteini, bilinen bir rekombinasyon tekniği veya biyokimyasal yöntem ile üretilebilmektedir, ve antikor, uygun bir konak hücreye eklenebilmektedir ve dönüştürücünün kültür ortamından geri kazanılabilmektedir.

Spesifik olarak çift-hedefli protein, bilinen bir izolasyon yöntemi ile izole edilebilmektedir. Örneğin çift-hedefli protein, uygun bir şekilde, protein, A-Sefaroz, hidrokspapatit kromatografisi, jel elektroforezi, diyaliz veya afinite kromatografisi gibi geleneksel bir saflaştırma prosedürü ile kültür ortamından izole edilebilmektedir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Yine başka bir yönde mevcut buluş, çift-hedefli proteini içeren bir bileşim sağlamaktadır.

Bir ilave yönde mevcut buluş, çift-hedefli proteini içeren, kanserin tedavi edilmesine yönelik bir farmasötik bileşim sağlamaktadır.

Çift-hedefli protein, DLL4 ve VEGF'nin Notch veya VEGF reseptörüne bağlanmasını inhibe etmek için hem DLL4 hem de VEGF'ye bağlanabilmektedir, böylelikle kanserin büyümesi inhibe edilebilmektedir. DLL4/Notch reseptörü ve VEGF/VEGF reseptörü yukarıda açıklandığı gibidir.

5 Spesifik olarak DLL4 ve VEGF'ye bağlanan çift-hedefli proteini içeren mevcut buluşun bileşimi, *in vivo* uygulandığında kanserin gelişimi, proliferasyonu ve metastazını inhibe edebilmektedir, veya kanserin ilerlemesini önleyebilmektedir, böylelikle kanser tedavi edilebilmektedir.

Burada kullanıldığı üzere "kansere" terimi, kısıtlama olmaksızın kanserin tüm türlerini kapsamaktadır, ancak kanserin örnekleri, esofajel kanser, mide kanseri, kalın bağırsak kanseri, 10 rektal kanser, oral kanser, farinks kanseri, larinks kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, meme kanseri, uterin servikal kanser, endometrial kanser, yumurtalık kanser, prostat kanseri, testis kanseri, mesane kanseri, renal kanser, karaciğer kanseri, pankreas kanseri, kemik kanseri, bağ doku kanseri, deri kanseri, beyin kanseri, tiroid kanser, lösemi, Hodgkin hastalığı, lenfoma ve 15 çoklu miyeloid kan kanserini içerebilmektedir. Burada kullanıldığı üzere "tedavi" terimi, bileşimin uygulanması ile kanserin semptomlarını faydalı bir şekilde restore eden veya değiştiren tüm hareketlere atıfta bulunmaktadır.

Ek olarak mevcut buluşun farmasötik bileşimi, ayrıca farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı 20 içerebilmektedir.

Burada kullanıldığı üzere "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı" terimi, bir organizmayı irrite etmeden bir uygulanmış bileşiğin biyolojik aktivitesini ve özelliklerini bozmayan bir taşıyıcı veya seyrelticiye atıfta bulunmaktadır. Bir sıvı çözelti olarak formüle edilen bir bileşimde farmasötik 25 olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı olarak bir steril veya biyouyumlu taşıyıcı kullanılmaktadır. Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı, fizyolojik tuzlu su, steril su, Ringer çözeltisi, tamponlu tuzlu su, albümin enjeksiyon çözeltisi, dekstroz çözeltisi, maltodekstrin çözeltisi, gliserol, etanol veya iki veya daha fazlasının bir karışımı olabilmektedir. Ek olarak mevcut buluşun bileşimi, gerekli görüldüğü takdirde, antioksidanları, tamponları ve bakteriyostatik ajanları kapsayan diğer 30 geleneksel katkıları içerebilmektedir. Ayrıca mevcut buluşun bileşimi, seyrelticiler, dağıtıcılar, sürfaktanlar, bağlayıcılar veya yağlayıcılar yardımıyla sulu çözeltiler, süspansiyonlar veya emülsiyonlar gibi enjekte edilebilir formlar olarak formüle edilebilmektedir. Ek olarak mevcut buluşa göre bileşim, haplar, kapsüller, granüller veya tabletler formunda formüle edilebilmektedir.

35 Mevcut buluşun farmasötik bileşimi, bir oral veya parenteral formülasyon gibi çeşitli şekillerde formüle edilebilmektedir. Genellikle dolgular, genleştiriciler, bağlayıcılar, ıslatma ajanları,

dağıtıcılar ve sürfaktanlar vs. gibi seyrelticilerin veya ekspiyanlar formülasyonlar için kullanılmaktadır. Mevcut buluşa göre bileşiği içeren bir farmasötik bileşim, genellikle kullanılan, dolgular, genleştiriciler, bağlayıcılar, ıslatma ajanları, dağıtıcılar ve sürfaktanlar vs. gibi seyrelticiler veya ekspiyanlar kullanılarak formüle edilmektedir. Oral uygulama için Katı Formülasyonlar, tabletleri, hapları, tozları, granülleri, kapsülleri vs. içermektedir. Bu tür Formülasyonlar, nişasta, kalsiyum karbonat, sakkaroz, laktoz, jelatin vs. gibi en az bir ekspiyan ile mevcut buluşun bileşiğinin karıştırılmasıyla hazırlanmaktadır. Basit ekspiyanlara ek olarak magnezyum stearat, talk vs. gibi yağlayıcılar eklenebilmektedir. Süspansiyonlar, dahili çözeltiler, emülsiyonlar, şuruplar vs. gibi oral uygulamama için Sıvı Formülasyonlar, örneğin su ve sıvı parafin gibi basit seyrelticileri, ayrıca örneğin ıslatma ajanları, tatlandırıcılar, aromatikler, koruyucular vs. gibi çeşitli ekspiyanları içerebilmektedir. Parenteral uygulama için formülasyonlar, sterilize sulu çözeltiler, sulu olmayan çözücüler, süspansiyonlar, emülsiyonlar, liyofilize ajanlar, süperzivatuarlar vs. içermektedir. Sulu olmayan çözücüler ve süspansiyonlar, propilen glikol, polietilen glikol, zeytinyağı gibi sebze yağları veya enjekte edilebilir esterler, örneğin etiloleat kullanılarak hazırlanabilmektedir. Süperzivatuarlar için bir baz olarak Witepsol, Macrogol, Tween 61, kakao yağı, laurin yağı, gliserojelatin vs. kullanılabilir.

Farmasötik bileşim, tabletler, haplar, tozlar, granüller, kapsüller, süspansiyonlar, dahili çözeltiler, emülsiyonlar, şurup, sterilize sulu çözeltiler, sulu olmayan çözücüler, liyofilize ajanlar ve süperzivatuarlardan seçilen herhangi bir formülasyona sahip olabilmektedir.

Mevcut buluşun farmasötik bileşimi, ayrıca farmasötik olarak etkili bir miktarda uygulanmaktadır.

Burada kullanıldığı üzere "farmasötik olarak etkili miktar" terimi, herhangi bir tıbbi tedaviye uygulanabilir makul bir fayda/risk oranında hastalıkları tedavi etmek için yeterli bir miktara atıfta bulunmaktadır. Bileşimin etkili dozaj seviyesi, süjenin türü, hastalık şiddeti, süjenin yaşı ve cinsiyeti, hastalığın türü, ilacın aktivitesi, ilaca duyarlılık, uygulama süresi, uygulama yolu, salgılama hızı, tedavi süresi, bileşim ile kombinasyon halinde kullanılan ilaçları içeren faktörler veya tıbbi alanda bilinen diğer faktörlere göre belirlenebilmektedir. Mevcut buluşun farmasötik bileşimi, tek tek veya terapötik ajanlar ile kombinasyon halinde uygulanabilmektedir, ve sıralı olarak veya geleneksel terapötik ajanlar ile eş zamanlı olarak uygulanabilmektedir. Bileşim, bir tek veya çoklu dozaj formunda uygulanabilmektedir. Yukarıda açıklanan faktörlerin hepsi göz önüne alındığında, yan etkilere neden olmadan maksimum etki sergileyebilecek minimum miktarda bileşimin uygulanması önemlidir, ve bu miktar, teknikte uzman bir kişi tarafından kolay bir şekilde belirlenebilmektedir.

Mevcut buluşun bir örneğinde, mevcut buluşun çift-hedefli proteininin, hem VEGF hem de DLL4'e bağlanabilmektedir (ŞEKİLLER 3, 4a ve 4b), DLL4'ü nötrleştirebilmektedir (ŞEKİL 5), ve Avastin-dirençli insan SCH gastrik kanserinde ve A549 akciğer kanseri ksenograft modellerinde bir antikanser etki sergilemiştir (ŞEKİLLER 11 ve 12), çift-hedefli proteinin, kanserin tedavi edilmesi için bileşimde bir aktif içerik olarak kullanılabilir. 5

Yine başka bir yönde mevcut buluş, kanserin tedavi edilmesine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik bir çift-hedefli protein sağlamaktadır. Çift-hedefli protein ve farmasötik olarak etkili miktar, yukarıda açıklandığı gibidir.

10 Kanser tedavisine yönelik bir yöntemde çift-hedefli proteinin kullanımı, bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ile birlikte çift-hedefli proteinin, kansere sahip olunan veya kanser olduğu şüphelenilen bir süjeye uygulanmasını içerebilmektedir. Burada farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ve kanser, yukarıda açıklandığı gibidir. Süjenin örnekleri, sığır, domuzlar, koyun, 15 tavuk, köpekler ve insanlar gibi memelileri içermektedir. Süje, kanserin, mevcut buluşun bileşiminin uygulanması ile tedavi edileceği herhangi bir süje olabilmektedir.

Bu durumda bileşim, sıvı, toz aerosol, kapsül, enterik-kaplı tablet ve süperzituvarlar formunda uygulanabilmektedir. Mevcut buluşun bileşimi, intraparatoneal olarak, intravenöz olarak, 20 intramüsküler olarak, subkütanöz olarak, transdermal olarak, oral olarak, topikal olarak, intranasal olarak, intrapulmoner olarak veya interrektal olarak uygulanabilmektedir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Ancak peptit, oral olarak uygulandığında sindirildiği için oral uygulama için bileşimde aktif içerik, midede bozunmanın korunması için kaplanması veya formüle edilmesi gerekmektedir. Ek olarak farmasötik bileşim, aktif içeriğin hedef hücrelere iletilmesi herhangi bir cihaz ile 25 uygulanabilmektedir.

Bir ilave yönde mevcut buluş, çift-hedefli proteini içeren, kanserin teşhis edilmesine yönelik bir farmasötik bileşim sağlamaktadır.

30 Çift-hedefli protein ve kanser, yukarıda açıklandığı gibidir.

Burada kullanıldığı üzere "teşhis etme" terimi, bir patolojik durumun mevcudiyetinin veya özelliğinin tespit edilmesi anlamına gelmektedir. Mevcut buluşun amacı doğrultusunda "teşhis etme" terimi, kanserin başlangıcının tespit edilmesi anlamına gelmektedir.

35 Mevcut buluşa göre kanserin teşhis edilmesine yönelik bileşim aşağıdaki gibi kullanılabilir.

Kanser olduğu şüphelenebilen bir süjeden izole edilen bir numunede VEGF ve DLL4 proteinin seviyesi, çift-hedefli protein kullanılarak ölçülmektedir, ve ölçülen VEGF ve DLL4 seviyesinin normal bir kontrol numunesinden yüksek olması durumunda süjenin kanser olduğu belirlenmektedir.

5

Bu amaçla, protein miktarının ölçülmesine yönelik analiz yöntemleri, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla immüno-blotlama (Western blotlama), ELISA (Enzim ile Bağlantılı İmmünoabsorban Tahlil), radyoimmünotahlil (RIA), radyoimmünodiffüzyon, Ouchterlony immünodiffüzyon, roket immünoelektroforez, immünohistoboyama immünopresipitasyon tahlili, kompleman fiksasyon tahlili, FACS ve protein çip analizi içermektedir. Normal bir kontrol numunesinde ve kanser olduğu şüphelenilen numunede VEGF veya DLL4 protein seviyeleri, analiz yöntemleri vasıtasıyla birbiri ile karşılaştırılabilmektedir ve dolayısıyla kanser olduğu şüphelenilen bir hastanın kanserinin başlangıcı gerçek olarak teşhis edilebilmektedir.

10

15 Mevcut buluşa göre kanserine teşhis edilmesine yönelik bileşim, ayrıca, çift-hedefli proteine ek olarak, protein seviyesinin ölçülmesine yönelik yöntemi gerçekleştirmek için gerekli olan teknikte bilinenleri içerebilmektedir.

Yine ilave bir yönde mevcut buluş, şu adımları içeren, kanserin teşhis edilmesine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik bir çift-hedefli protein sağlamaktadır: (a) çift-hedefli protein kullanılarak kanser olduğu düşünülen bir süjeden izole edilen bir numunede VEGF veya DLL4 seviyesinin ölçülmesi; ve (b) adım (a)'da ölçülen VEGF ve DLL4 seviyesinin normal bir kontrol numunesinden yüksek olması durumunda süjenin kanser olduğu belirlenmesi.

20

25 Burada çift-hedefli protein, kanser, süje, teşhis etme ve protein seviyesinin ölçülmesine yönelik yöntem (adım) yukarıda açıklandığı gibidir.

Burada kullanıldığı üzere "numune" terimi, bir kanser hastasına VEGF veya DLL4 ifade seviyesinde bir fark bulunduğu, tam kan serumu, plazma, salya, ürin, flegm, lenf, serebrospinal akışkan ve intersitiyal akışkanı içerdiği anlaşılmaktadır.

30

Başka bir yöntem mevcut buluş, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21 ile temsil edilen bir DLL4'ün (delta-benzeri ligand 4) amino asit sekansında 58^{inci} ila 65^{inci} ve 110^{uncu} ila 115^{inci} amino asit kalıntısını içeren DLL4'ün bir konformasyonel eptiopunu sağlamaktadır.

35

Mevcut buluşun bir örneğinde, çapraz bağlı olan SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21'in DLL4'ünde

amino asit kalıntıları, bir çapraz bağlama reaksiyonu ve kütle spektrometrisi ile belirlenmiştir. ŞEKİL 7’de gösterildiği üzere iki fragmentin, 58^{inci} ila 65^{inci} [FRVCLKHF] amino asit kalıntılarında oluşan bir amino asit sekansı ve 110^{uncu} ila 115^{inci} (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 23) amino asit kalıntılarında oluşan bir amino asit sekansının kesintisiz bir moleküler yüzeyi oluşturduğu, böylelikle DLL4’ün epitopunu oluşturduğu bulunmuştur.

Yine başka bir yönde mevcut buluş, konformasyonel epitopu tanımlayan, DLL4’e spesifik olarak bağlanan bir monoklonal antikoru sağlamaktadır.

Spesifik olarak monoklonal antikor, şunları içerebilmektedir: SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR3 içeren bir ağır-zincirli değişken bölge; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR3 içeren bir hafif-zincirli değişken bölge. Daha da spesifik olarak ağır zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8 ile temsil edilen bir ağır-zincirli değişken bölge amino asit sekansını içerebilmektedir ve hafif zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9 ile temsil edilen bir hafif-zincirli değişken bölge amino asit sekansını içerebilmektedir.

Başka bir yönde mevcut buluş, yukarıda açıklanan monoklonal antikoru kodlayan bir polinükleotit, polinükleotit içeren bir ifade vektörü ve ifade vektörünü içeren bir dönüştürücü sağlamaktadır.

Burada mevcut buluşa ait DLL4, monoklonal antikor, vektör, dönüştürücü vs. yukarıda açıklandığı gibidir.

Yine başka bir yönde mevcut buluş, kanser olduğu şüphelenilen bir süjeye çift-hedefli proteinin uygulanmasına dair bir adımı içeren kanserin tedavi edilmesine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik bir çift-hedefli protein sağlamaktadır.

Süje, kanserin önlenmesine veya tedavisine gereksinim duyan bir süjedir, ve kanserin veya buna benzer semptomların tedavisine gereksinin duyan insanlar, sığır, atlar, koyun, domuzlar, keçiler, develer, antiloplar, köpekler ve kediler dahil memelilerden seçilebilmektedir.

Burada kullanıldığı üzere “uygulama” terimi, herhangi bir uygun yöntem ile mevcut buluşun farmasötik bileşiminin bir hastaya dahil edilmesi anlamına gelmektedir. Mevcut buluşun farmasötik bileşimi, istenilen bir dokuya ulaşabildiği sürece çeşitli oral veya parenteral yollar ile

uygulanabilmektedir.

5 Mevcut buluşta açıklandığı üzere kanser tedavisinin bir yönteminde kullanıma yönelik çift-hedefli protein, bir terapötik olarak etkili miktarda çift-hedefli proteini içeren farmasötik bileşimin veya çift-hedefli proteinin uygulanmasını içermektedir. Bileşimin toplam uygun günlük dozunun, katı tıbbi karar kapsamında tedavi eden bir hekim veya veteriner tarafından belirlenebildiği teknikte uzman kişiler için aşikar olmaktadır. Ek olarak bileşim, bunun etkili miktarının istenilen aralığı dahilinde bir kere veya birkaç kere uygulanabilmektedir. Mevcut buluşun amacı doğrultusunda, Ancak, herhangi bir belirli hasta için spesifik terapötik olarak etkili miktar, gerçekleştirilecek yanıtın 10 türü ve derecesi, diğer ajanların bununla kullanılıp kullanılmamasına göre spesifik bileşimler, hastanın yaşı, vücut ağırlığı, sağlık durumu, cinsiyet ve diyet, uygulama süresi ve yolu, bileşimin salgılanma hızı, tedavi süresi ve bileşim ile kombinasyon halinde veya eş zamanlı kullanılan diğer ilaçlar, ve tıbbi alanda iyi bilinen diğer benzer faktörler dahil çeşitli faktörlere bağlı olacaktır.

15 **ÖRNEKLER**

Bundan böyle mevcut buluş, örneklere atıfta bulunularak daha ayrıntılı açıklanacaktır. Bu örneklerin, yalnızca gösterici amaçlar doğrultusunda olduğu ve mevcut buluşun kapsamını sınırlandırmayı amaçlamadığı teknikte orta derecede uzman bir kişi için aşikar olacaktır. Dolayısıyla 20 mevcut buluşun büyük ölçüde kapsamı ekli istemler ile belirlenecektir.

Örnek 1: Anti-DLL4/VEGF Çift-Hedefli Proteinin Preparasyonu

Örnek 1-1: DLL4 Antijeninin Preparasyonu

25 İnsan DLL4'ün ekstraselüler alanı olarak R&D Sisteminden satın alınan insan DLL4 proteini (Kat: 1506-D4/CF) kullanılmıştır. DLL4 antijen proteini, DLL4'ün amino asit sekansının amino asit sekansları 27 ila 524'ü (Erişim No. Q9NR61) içermektedir. Proteinin C-terminusu, bir 10-His etiketine sahiptir.

30 DLL4'ün ekstraselüler alanının bir spesifik bölgesine karşılık gelen bir antijen hazırlanmıştır. Bu spesifik bölge, amino asit kalıntıları 27 ila 251'i içermektedir. Bu bölge, Notch 1 reseptörüne bağlandığı bilinen "DSL (delta/Serrate)/gecikme-2" olarak adlandırılan bir motifi barındırmaktadır. Fc proteini ile birleştirilen DLL4'ün ekstraselüler alanın bir delesyon fragmentini 35 (amino asit kalıntıları 27 ila 251) kodlayan bir polinükleotidin yukarı akımı bir CMV promotörünü içeren bir memeli ifade vektör plazmidi, standart bir rekombinant DNA tekniği kullanılarak

hazırlanmıştır. Fc proteini ile birleştirilen insan DLL4'ünün bir kimerası olan DLL4'ün delesyon fragmentini kodlayan bir ilave yapı, genel bir rekombinant DNA tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan yapılar, geçici olarak, Fc proteini ile birleştirilen insan DLL4'ün amino asit sekansının amino asit kalıntıları 27 ila 251'i içeren rekombinant füzyon proteinlerini ifade etmesi için HEK 293E hücrelerine transfekte edilmiştir. Antijen proteinini geri kazanmak için koşullandırma ortamı, her 72 saatte bir toplanmıştır ve bu proses dört kere yinelenmiştir. Antijen proteini, protein A afinite kromatografisi ile koşullandırma ortamından saflaştırılmıştır.

Örnek 1-2: Kütüphane Fajının Preparasyonu

37°C'de 2-3 saat boyunca ($OD_{600}=0.5-0.7$), hücreler yardımcı faj ile enfekte edildikten ve 30°C'de 16 saat boyunca 2X YT CMK ortamında (2X YT CM, 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamisin (Sigma, K1876), 1 mM IPTG (ELPISBIO, IPTG025)) kültürlendikten sonra, farklılığa sahip 2.7×10^{10} insan scFv (tek-zincirli değişken fragment) kütüphane hücreleri, 17 g 2X YT CM [Trypton (CONDA, 1612.00), 10 g maya ekstraktı (CONDA, 1702.00), 5 g NaCl (Sigma, S7653-5 kg), 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kloramfenikol (Sigma, C0857)], %2 glikoz (Sigma, G5400) ve 5 mM MgCl_2 (Sigma, M2393) barındıran bir ortamda (3 l) kültürlenmiştir. Kültürlenmiş hücreler, santrifüjlenmiştir (4500 dds (dakikada devir sayısı), 15 dk, 4°C), ve süpernatant, %4 PEG (Fluka, 81253) 6000 ve %3 NaCl (Sigma, S7653) eklenmiştir ve burada çözünmüştür, ve sonrasında 1 saat boyunca buzda inkübe edilmiştir. Sonrasında çözelti santrifüjlenmiştir (8000 dds, 20 dk, 4°C), ve pelletler, PBS'ye eklenmiştir ve burada çözünmüştür ve sonrasında santrifüjlenmiştir (12000 dds, 10 dk, 4°C). Kütüphane fajını içeren süpernatant, taze bir tüpe yerleştirilmiştir ve 4°C'de depolanmıştır.

Örnek 1-3: Faj Gösterimi ile Gezdirme

İnsan DLL4'üne bağlanan bir anti-DLL4'ü taramak için insan DLL4 antijeninin gezdirilmesi 3 sefer için gerçekleştirilmiştir.

Rekombinant insan DLL4'ünün (R&D System) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bir çözeltisi, bir immünotüpe eklenmiştir, ve protein, 4°C'de gece boyunca immünotüpün yüzeyinin üzerine adsorbe edilmiştir ve sonrasında %1 bovin serum albümin çözeltisi, DLL4 ile adsorbe edilmemiş yüzeyi korumak için immünotüpe eklenmiştir. İmmünotüp boşaltıldıktan sonra %1 bovin serum albüminde dağılan 10^{12} CFU antikor fajı, antijene bağlanmak için buraya eklenmiştir. Spesifik olarak bağlı olmayan faj, PBS-T (fosfat tamponlu tuzlu su - %0.05 Tween 20) ile yıkanarak çıkarılmıştır, ve sonrasında kalan antijen-spesifik faj antikorunu, 100 mM trietilamin çözeltisi kullanılarak geri kazanılmıştır.

5 Geri kazanılan faz, 37 °C'de 1 saat boyunca 1M tris tamponu (pH 7.4) ile nötrleştirilmiştir ve *E. coli* ER2537'ye enfekte edilmiştir, ve enfekte *E. coli* hücreleri, karbenisilin-barındıran LB (Luria-Bertani) agar ortamında plakalanmıştır ve 37°C'de gece boyunca kültürlenmiştir, kültürlenmiş *E. coli* hücreleri, 4 mL SB (süperbrot)-karbenisilin ortamında süspansiyon halinde tutulmuştur ve %15 gliserol buraya eklenmiştir. Süspansiyonun bir bölümü, -80°C'de depolanmıştır ve 50µl kalan, 37°C'de %2 glikoz barındıran SB-karbenisilin ortamında kültürlenmiştir.

10 Kültür ortamının absorbansı 600 nm'de (OD₆₀₀) 0.6'ya ulaştığında kültür ortamı, santrifüjleme ile çıkarılmıştır ve kalan malzeme, 20 mL SB-karbenisilin ortamından yeniden süspansiyon halinde tutulmuştur ve 10¹² PFU VCSM13 yardımcı faj, yavaşça karıştırma ile 37°C'de inkübasyondan sonrasında buraya eklenmiştir. Sonraki günde kültür ortamı, santrifüjleme ile toplanmıştır ve santrifüjleme sonrasında 30 dakika boyunca 4°C'de %4 polietilen glikol 8000 (PEG8000) ve %3 sodyum klorürde (NaCl) çökeltilmiştir. Süpernatant çıkarılmıştır ve çökeltilebilir faj 1 mL PBS'de 15 süspansiyon halinde tutulmuştur. Yukarıda açıklanan gezdirme prosesi, bir kütüphane olarak süspansiyon halinde tutulmuş faj kullanılarak yinelenmiştir, böylelikle antijen-spesifik klonlar güçlendirilmiştir/yoğunlaştırılmıştır.

20 İnsan DLL4 proteininin Notch-1-bağlayıcını alanına bağlanan bir antikoru taramak için insan DLL4 proteininin ve insan DLL4'ünün spesifik bir bölgesine karşılık gelen bir delesyon fragmentinin (amino asit kalıntıları 27 ila 251) çapraz-gezdirme defalarca gerçekleştirilmiştir. Sonrasında hücreler, *E.coli*'nin periplazmasında scFv-tip proteinin ifadesinin IPTG eklenerek indüklenmesinden sonra, 400 µl SB-karbenisilin ortamında sonrasında inoküle edilmiş ve inkübe edilmiş tek kolonileri elde etmek için bir antikor genini barındıran LB-karbenisilin agar ortamında 25 plakalanmıştır ve kültürlenmiştir. *E.coli* hücreleri, TES çözeltisinden (Tris, EDTA, sakkaroz) süspansiyon halinde tutulmuştur ve 1 saat boyunca 4°C'de beklemeye bırakılmıştır. Sonrasında, bir ELISA tekniği ile rekombinant insan DLL4 antijeni ve scFv arasındaki bağlanmayı incelemek üzere kullanılmış, periplazmayı ekstrakte etmek üzere santrifüjlenmiştir.

30 Bağlı scFv, bir yabancu peroksidaz (HRP)-anti-HA antikor ve bir tetrametilbenzidin (TMB) substratı kullanılarak tespit edilmiştir. Tespit edilen antijen-spesifik antikor klonları sekanslanmıştır. Taranan scFv'nin sekanslama sonuçları, aşağıdaki Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1

	Amino Asit Sekansları	CDR1	CDR2	CDR3
V _H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSDYAMSWVRQA PGKCLEWVSWIYSGSGNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARAD WPFDYWGQGLTVVSS (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8)	GFTFSY AMS (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 12)	WIYSGSG NKYYAD SVKG (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3)	ADWPF Y (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4)
V _L	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCTGSSNIGSNDVTWYQQL PGTAPKLLIYADSKRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCGTWDYSLAYV FGCGTKLTVL (SEKANS KİMLİK NUMARASI:9)	TGSSNIG SNDVT (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5)	ADSKRPS (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6)	GTWDYS LSAYV (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7)

Yukarıdaki sekansa sahip anti-DLL4 antikorunu, "MLCK-2" olarak adlandırılmıştır.

Örnek 1-4: DLL4 ve VEGF'yi Hedefleyen Çift-Hedefli Antikoru (Bispesifik Antikor) Preparasyonu

5

Örnek 1-3'te hazırlanan insan DLL4-bağlayıcı scFv-tipi antikor, bir bağ kullanılarak bir Avastin IgG tipi antikora birleştirilmiştir, böylelikle ayrıca insan VEGF'sine bağlanabilen bir çift-hedefli protein ifade vektörü hazırlanmıştır (ŞEKİL 1b).

10

Hazırlanan çift-hedefli protein, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ile temsil edilen bir ağır-zincirli amino asit sekansını (VEGF-DLL4 BsAb ağır zincir) ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 20 ile temsil edilen bir hafif-zincirli amino asit sekansına sahiptir. Ağır zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 ile temsil edilen ağır-zincirli CDR3 içeren bir ağır-zincirli

15

değişken bölge; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ile temsil edilen hafif-zincirli CDR3 içeren bir hafif-zincirli değişken bölge içermektedir.

20

Çift-hedefli protein ifade vektörü kullanılarak CHO hücrelerinde bir antikor üretmek için ilgili gen, intraselüler gen iletim verimliliğinin artırılması için bir polimer kullanılarak hayvan hücrelerine transfekte edilmiştir ve hücreler, toplam 1ℓ'lik hacme şişe başı bir 200 ml'lik hacimde bir 500-ml Erlenmeyer kabında (Corning Costar) kültürlenmiştir. Ultra-düşük-IgG fetal bovin serumunu (Invitrogen Corp.) barındıran RPMI ortamının (Invitrogen Corp.) ve CHO hücre ortamının bir 1ℓ karışımı, 4 gün boyunca bir inkübatörde (Sanyo) inkübe edilmiştir, böylelikle

25

bir rekombinant protein üretilmiştir. Hücre kültür ortamı, rekombinant protein barındıran süpernatanı süspansiyon halinde tutulmuş hücrelerden ayırmak için toplanmıştır ve santrifüjlenmiştir, ve süpernatant, bir 0.22-µm vakum filtresinin (Millipore) içinden bir kere filtrelenmiştir.

30

Antikor saflaştırma için Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikor, birinci olarak, rekombinant protein-A Sefaroz kolonu (Hitrap MabSelect Sure, 5 mL, GE healthcare) kullanılarak kültürden saflaştırılmıştır. Spesifik olarak filtrelenmiş kültür ortamı, rekombinant protein-A Sefaroz kolonunda yüklenmiştir. Kolon, bir 20-kat hacimde 50 mM Tris-Cl (pH7.5), 100 mM NaCl tamponu ile yıkanmıştır, ve katışkıları çıkarmak için bir 10 kat hacimde 50 mM Na-sitrat

35

tamponu (pH5.0) ile yıkanmıştır. Antikor, 5 mM Na-sitrat 10 mM NaCl tamponu (pH3.4) ile

ayrıştırılmıştır ve 1M Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ile nötrleştirilmiştir.

İkinci saflaştırma için Avastin-DLL4 BsAb çift hedefli antikorunun bir agregasyonu, HiLoad TM 26/60 Superdex 200 Prep derecesi GL (GE Healthcare) kullanılarak çıkarılmıştır. Kolon, bir 2-
5 kat hacimde 50 mM Na-fosfat tamponu (pH6.0), 20 mM L-Arg ile dengelenmiştir ve sonrasında saflaştırılmış Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikor, bunu büyüklüğe göre ayırmak için kolonun içinden geçmesi sağlanmıştır.

Kolonlar kullanılarak saflaştırılan fraksiyonlar, SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (ŞEKİL 2), ve
10 pozitif fraksiyonlar, bir Amicon Ultra (30,000 MWCO, Millipore) konsantratörü kullanılarak santrifüjleme ile konsantre edilmiştir. Aynı konsantratör kullanılarak fosfat tamponu ile tampon değişimi ve konsantrasyon gerçekleştirilmiştir. Nihai olarak antikor, 0.22 μm 'lik bir gözenek büyüklüğüne sahip bir şırınga filtresinin içinden steril olarak filtrelenmiştir, ve bunun absorbansı (A_{280}) antikor konsantrasyonunu belirlemek üzere ölçülmüştür.

15

Örnek 2: ELISA ile DLL4 ve VEGF için Çift-Hedefli Proteinin Bağlayıcı Afinitelerinin Analizi

DLL4 ve VEGF için çift-hedefli proteinin bağlayıcı afinitelerinin analizi, bir ELISA-temelli çözelti rekabet tahlili kullanılarak değerlendirilmiştir. Spesifik olarak bir 96-kuyucuklu plaka (Nunc-Immuno Plate, NUNC, Rochester, NY), 4 °C'de gece boyunca kuyucuk başına 100 μl miktarında 50 ng/ mL hVEGF (R&D Systems, kat: 293-VE) ve 200 ng/ mL rhDLL4 (R&D Systems, kat: 1506-D4/CF) ile kaplanmıştır, ve spesifik olmayan bağlayıcı alanlar, 2 saat boyunca BSA (bovin serum albümin) ile bloke edilmiştir. 96-kuyucuklu mikrotitre plakasında antikor, 128 nM ve 64 nM'den
25 1/5-kat seyreltilmiştir ve seyreltiklerin her birinin 100 μl 'si hDLL4 ve hVEGF proteinleri ile kaplı plakanın her bir kuyucuğuna eklenmiştir. Sonrasında plaka, 2 saat boyunca inkübe edilmiştir ve %0.05 tween 20-barındıran PBS ile beş kere yıkanmıştır. Plakaya-bağlı antikoru tespit etmek için bir HRP-konjuge anti-Fab antikoru (Pierce, kat: 31414)) bir 1:40,000 oranında seyreltilmiştir, yıkanmış 96-kuyucuklu mikrotitre plakasına aktarılmıştır ve sonrasında 1 saat
30 boyunca 37 °C'de reaksiyona girmesi sağlanmıştır. Reaksiyon sonrasında bir kolorimetrik substrat (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin; Sigma-Aldrich) kullanılarak renk gelişimi gerçekleştirilmiştir. Enzimatik reaksiyon, 0.5 mol/ ℓ sülfürik asit kullanılarak durdurulmuştur. 450 nm'de absorbans, SpectraMax 190 (moleküler cihaz) kullanılarak ölçülmüştür.

35 ŞEKİL 3'te görülebileceği üzere mevcut buluşun çift-hedefli proteininin spesifik olarak bunun

hedeflerine (VEGF ve DLL4) bağlandığı gösterilmiştir.

Örnek 3: DLL4 ve VEGF için DLL4/VEGF Çift-Hedefli Proteinin Denge Ayrışma Sabitinin (KD) Tahlili

5

Örnek 1’de saflaştırılan çift-hedefli protein (bispesifik antikor), "Avastin-DLL4 BsAb" olarak adlandırılmıştır ve antijenler için saflaştırılmış antikorun afinitesi aşağıdaki gibi analiz edilmiştir. DLL4 ve VEGF için Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikorunun bağlanma afinitelerindeki farklılığı incelemek için bir BIACORE tahlili gerçekleştirilmiştir.

10

Spesifik olarak Biacore T200, SPR analizinde kullanılmıştır ve bir çalışan tampon olarak HBS-EP (10 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, %0.15 sürfaktan P20) kullanılmıştır. Yüzey preparasyonu, bir sihirbaz programının bir yüzey preparasyon hedef immobilizasyon aleti kullanılarak yapılmıştır (koşul: 25°C, 5 µl/dk). Ligandlar (hVEGF ve hDLL4), 10 mM sodyum asetat tamponunda (pH 4.5) 5 µg/ml ve 4 µg/ml’lik nihai konsantrasyonlara seyreltilmiştir ve sonrasında her bir test grubu için bir hedef immobilizasyon seviyesi ile CM5 çipinin yüzeyine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon prosesinde iki akış hücresi, bir küme olarak dahil edilmiştir, burada birinci ve üçüncü akış hücreleri bir boşluk olarak ayarlanmıştır, ikinci akış hücresi, bunun yüzeyine immobilize edilen hVEGF’ye sahiptir ve dördüncü akış hücresi mevcut örnekte hDLL4 olarak ayarlanmıştır. Birinci ve üçüncü akış hücreleri, spesifik olmayan bağlayıcılar ve tampon etkileri yüzünden deney değişkenli bakımından hesaba katmak için bir referans olarak hareket etmiş ve analizde çıkarılan RU değerleri (Fc2-Fc1 ve Fc4-Fc3) deney sonuçları olarak kullanılmıştır. hVEGF ve hDLL4’e bağlanan Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikor, çalışan bir tamponda 100 nM’lik bir nihai molar konsantrasyonuna seyreltilmiştir, seri olarak 1/2 kere seyreltilmiştir ve 5 seyreltinin her biri analiz edilmiştir. Analiz edilecek numune, minimumda 100 kereden daha fazla seyreltilmesi için yeterli olan, yüksek saflığa ve yüksek konsantrasyona sahip olacak şekilde hazırlanmıştır, böylelikle tampon etkisi minimuma indirilmiştir. Tüm analiz, bir sihirbaz programı kullanılarak yapılmıştır, her bir numune için tarama iki kere yapılmıştır ve bir rejenerasyon adımı, her bir analiz adımının arasına eklenmiştir, böylelikle deneyin standardı sabit kalmaktadır.

30

Deney sonuçları, Biaevaluation yazılı versiyon 4.0 ile analiz edilmiştir. Bu sefer RU değerlerini (Fc2-Fc1 ve Fc4-Fc3) belirlemek için taban hattı sifıra ayarlanmıştır, bir tampon enjeksiyon parçasında (analit, 0 nM) ölçülen değer, bir tam sensörgramdan çıkarılmıştır. Sonrasında ortaya çıkan RU değeri, bir bağlanma afinitesini belirlemek için bir Bivalent bağlama modeli ile analiz

35

edilmiştir. Analiz edilecek faktörler k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}) ve K_D (M) içermektedir. Spesifik olmak gerekirse k_a , bir bağlanma afinitesi (tanıma) gösteren bir ilişkilendirme sabitidir ve k_d stabiliteyi gösteren bir ayrışma sabitidir.

- 5 Tablo 2, hVEGF için çift-hedefli proteinin bağlanma afinitesinin analiz sonuçlarını göstermektedir, ve Tablo 3, hDLL4 için çift-hedefli proteinin bağlanma afinitesinin analiz sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 2

Antikor	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	K_D
Avastin-DLL4 BsAb	1.34E04	1.68E-06	1.26E-10

Tablo 3

Antikor	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	K_D
Avastin-DLL4 BsAb	1.94E04	5.87E-04	3.02E-08

10

Tablolar 2 ve 3'te yukarıda görülebildiği üzere denge ayrışma sabiti $K_D(M)$, k_d 'nin k_a 'ya bölünmesiyle (k_d/k_a) hesaplanmıştır. hVEGF için bağlanma afinitesinin analiz sonuçları, K_D değerinin, Avastin IgG'nin denge ayrışma sabitine benzer olan yaklaşık 0.126 nM olduğunu göstermiştir (ŞEKİL 4a ve Tablo 2), ve hDLL4 için bağlanma afinitesinin analiz sonuçları, K_D değerinin, yaklaşık 30 nM olduğunu göstermiştir (ŞEKİL 4b ve Tablo 3). Bu, mevcut buluşa ait çift-hedefli proteinin bağlanma afinitesinin, yüksek seviyede interferans olmadan her bir antijen için gerçekleştirildiğini göstermektedir.

15

Örnek 4: Anti-DLL4/VEGF Çift-Hedefli Proteinin Nötrleşme Etkisinin Tahlihi

20

Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikorunun nötrleşme etkisi analizi, bir ELISA-temelli çözelti rekabet tahlili kullanılarak değerlendirilmiştir. Spesifik olarak bir 96-kuyucuklu plakanın (Nunc-Immuno Plate, NUNC, Rochester, NY) her biri, 100 $\mu\ell$ of 500 ng/m ℓ hNotch-1-hFc protein (R&D Systems) (PBS seyreltilmiş) ile gece boyunca 4 °C'de kaplanmıştır, ve sonrasında spesifik olmayan bağlayıcı alanları bloke etmek için 2 saat boyunca BSA ile tedavi edilmiştir.

25

96-kuyucuklu mikrotitre plakasında Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikorunun (saflaştırılmış protein), 0 nM ila 140 nM aralığında olan bir antikor konsantrasyonunda antijen proteininin (insan DLL4-His, 600 ng/m ℓ) seri seyreltileri ile önceden karıştırılmıştır. Antijen/antikor karışımı 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir ve sonrasında serbest antikoru ölçmek için DLL4 reseptörü

30

hNotch-1 protein (50 ng/kuyucuk) ile önceden kaplanmış bir mikrotitre plakasına aktarılmıştır. Sonrasında plaka, 2 saat boyunca inkübe edilmiştir ve %0.05 tween 20-barındıran PBS ile beş kere yıkanmıştır. Plakaya bağlı DLL4 antijenini tespit etmek için bir HRP-konjuge His anti-fare Ig poliklonal antikor reaktifi (Roche applied science) bir 1:8000 oranında seyreltilmiştir, 5 yıkanmış mikrotitre plaka seyreltilmiş antikor reaktifi ile işlenmiştir ve sonrasında 1 saat boyunca 37 °C'de reaksiyona girmesi sağlanmıştır. Sonrasında bir kolorimetrik substrat (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin; Sigma-Aldrich Co.) kullanılarak renk gelişimi gerçekleştirilmiştir ve enzimatik reaksiyon, 0.5 mol/l sülfürik asit kullanılarak durdurulmuştur. 450 nm'de absorbans ölçülmüştür ve ölçüm sonuçları, ŞEKİL 5'te gösterilmektedir. Plaka-ile kaplı Notch 1-hFc proteinine (IC₅₀) bağlı insan DLL4-His'inde bir %50 oranında düşüşü gerçekleştirmek için 10 gerekli antikor miktarı aşağıdaki Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4

Klon	IC ₅₀ (nM)
VEGF-DLL4 BsAb	1.12

Yukarıdaki Tablo 4'te görülebileceği üzere mevcut buluşun çift-hedefli proteini, DLL4 için 1.12 15 nM'lik bir düşük IC₅₀ değeri göstermiştir, böylelikle bunun, yalnızca anti-DLLT antikorununkine karşılaştırılabilir DLL4 inhibitör aktivitesine sahip olduğunu önermektedir.

Örnek 5: Çapraz-Bağlama Reaksiyonu ve Kütle Spektrometrisi ile Epitop Eşleştirme

20 Birden fazla kesintili sekanstan oluşan ancak bir tek moleküler yüzeyi konformasyonel olarak oluşan bir konformasyonel epitopu tanımlamak için çapraz-bağlama reaksiyonları ve kütle spektrometrisi ile çapraz-bağlama reaksiyonlarının konumlarının belirlenmesine dair teknik kullanılmıştır.

Örnek 5-1: Çapraz-Bağlı Kompleksin Oluşumu

Örnek 1-3'ün antijen proteini insan delta-benzeri ligand 4 (insan DLL4, hDLL4, R&D Systems) ve MLCK2'si, 2:1 molar oranında birbiri ile karıştırılmıştır, ve sonrasında bir K200 çapraz-bağ (CovalX AG) 0.2 mg/ml'lik bir nihai konsantrasyonda buraya eklenmiştir. Karışım, bir antijen- 30 antikor kompleksini oluşturmak için 3 saat boyunca oda sıcaklığında reaksiyona girmesi sağlanmıştır ve sonrasında reaksiyon ürününün molekül ağırlığı, bir Ultraflex II MALDI ToF spektrometresi (Bruker Daltonics) kullanılarak analiz edilmiştir. ŞEKİL 6'da gösterildiği üzere

5 Çapraz-bağ kullanıldığında insan DLL4 ve MLCK2 antikoruna arasındaki 1:1 ve 2:1 kompleksleri, hiçbir çapraz-bağin kullanılmadığı bir kontrol deneyinden farklı olarak oluşturulmuştur. Ancak insan DLL4 veya MLCK2 antikorunun yalnızca çapraz-bağ ile reaksiyona girmesi sağlandığında herhangi bir multimer veya kompleks tespit edilmemiştir, böylelikle insan DLL4/MLCK2 antikor kompleksinin oluşumunun, DLL4 ve MLCK2 arasında spesifik bir reaksiyondan kaynaklandığı önerilmektedir.

Örnek 5-2: Proteaz ile Fragmentlerin Oluşumu

10 Çapraz bağlı peptit fragmentlerini tanımlamak için d0-DSS (disüksinimidil substrat) ve d12-DSS, 1:1 oranında birbiri ile karıştırılmıştır ve 2 mg/ml çözelti oluşturmak için DMF’de çözünmüştür. Çözelti, 0.2 mg/ml’lik bir nihai konsantrasyona 2:1 DLL4 ve MLCK2 karışımına eklenmiştir ve 3 saat boyunca oda sıcaklığında bir çapraz-bağlama reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Reaksiyon ürünü, etkili bozunma için DTT (ditiyotritol) ve iyodoasetamid kullanılarak indirgeme ve
15 alkilasyon ile modifiye edilmiştir ve tripsin, α -kimotripsin veya ASP-N proteaz gibi bir proteaz kullanılarak fragmentli olmuştur. Üretilen fragmentler, bir Ultimate 3000 nano-sıvı kromatografi sistemi (Dionex) ve bir LTQ Orbitrap XL kütle spektrometresi (Thermo) ile analiz edilmiştir, ve elde edilen kütle spektrometri verisi, çapraz-bağlı peptit çiftlerini tespit etmek için Xquest (versiyon 2.0) yazılımı ve Stavrox (versiyon 2.1) yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak
20 aşağıda Tablo 5’te gösterildiği üzere hDLL4 ve MLCK2 arasında çapraz bağlanma ile oluşturulan peptit çiftleri tespit edilebilmektedir.

Bir apraz-bağlama reaksiyonunun oluştuğu insan DLL4 üzerindeki konumlar, insan DLL4’ün amino asit sekansının 59, 63, 64 ve 110 amino asit kalıntıları olmuştur. 58^{inci} ila 65^{inci}
25 [FRVCLKHF] amino asit kalıntılarında (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 22) oluşan bir amino asit sekansı ve 110^{uncu} ila 115^{inci} [TWPGETF] amino asit kalıntılarında (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 23) oluşan bir amino asit sekansı olan iki fragment, ŞEKİL 7’de gösterildiği üzere bir insan DLL4 C2 alan (27-174) üzerinde bir kesintisiz moleküler yüzeyi oluşturmaktadır. Dolayısıyla sekanslar, MLCK2 antikoruna için insan DLL4’ün epitopu olduğu belirlenebilmektedir.

Tablo 5

Sekans	Protein 1	Protein 2	Sek. Protein 1	Sek. Protein 2	Kimlik-Puan	nAA1	nAA2	Xquest üzerindeki kimlik	Stavrox üzerindeki kimlik
ADSVKGRF-TWPGTF-a3-b1	MLCK2HC	hDLL4	60-67	110-115	13.62	62	110	evet	evet
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a12-b2	MLCK2LC	hDLL4	50-62	58-65	11.59	62	59	evet	evet
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a3-b7	MLCK2LC	hDLL4	50-62	58-65	9.47	53	64	evet	evet
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a3-b2	MLCK2LC	hDLL4	50-62	58-65	6.33	53	59	evet	evet
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a3-b6	MLCK2LC	hDLL4	50-62	58-65	6.15	53	63	evet	evet
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a4-b2	MLCK2LC	hDLL4	50-62	58-65	5.04	54	59	evet	evet
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a12-b7	MLCK2LC	hDLL4	50-62	58-65	3.87	62	64	evet	evet

Örnek 6: Western blotlama ile Epitop Eşlemenin İncelenmesi

İnsan DLL4'ünün bir alanin ikame mutant paneli, aşağıdaki gibi hazırlanmıştır, burada insan DLL4'ün ekstraselüler protein bölgesinin amino asit sekansında konumlar 64 (histidin), 65 (fenilalanin) ve 69'daki (valin) amino asit kalıntılarının her biri, alanin ile ikame edilmiştir. Alanin ifade mutantları için bir ifade vektörü olarak, Örnek 1-1'de açıklandığı üzere DLL4'ün ekstraselüler alanının spesifik bölgesine karşılık gelen antijenin preparasyonunda kullanılan vektör kullanılmıştır. Spesifik olarak vektör, insan DLL4'ünün spesifik bölgesinin amino asit sekansının amino asit kalıntıları 27 ila 251'e karşılık gelen bir gen içermektedir, ve bu bölge, Notch 1 reseptörüne bağlandığı bilinen "DSL (delta/Serrate)/gecikme-2" olarak adlandırılan bir motifi barındırmaktadır.

Fc proteini ile birleştirilen DLL4'ün ekstraselüler alanın bir delesyon fragmentini (amino asit kalıntıları 27 ila 251) kodlayan bir polinükleotidin yukarı akımı bir CMV promotörünü içeren bir memeli ifade plazmidi, standart bir rekombinant DNA tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Alanin ile vektördeki amino asit kalıntıları 64, 65 ve 69'un her birini ikame etmek için bir rekombinant DNA tekniği (QuikChange Site-Directed Mutagenesis, Agilent) kullanılmıştır ve mutantlar, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) kullanılarak HEK293E hayvan hücrelerine transfekte edilmiştir ve ifade ortamı geri kazanıldıktan sonra 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bir kontrol olarak yabancı-tip DLL4'ün ekstraselüler alanının bir delesyon fragmentini (amino asit kalıntıları 27 ila 251) kodlayan bir protein kullanılmıştır.

4 gün boyunca inkübe edilen mutant ifade ortamı, süspansiyon halinde tutulmuş malzemenin çıkarılması için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında 1000 dds'de santrifüjlenmiştir, ve sonrasında bir 0.45-µm şırınga vasıtasıyla filtrelenmiştir. Western blotlama analizi için mutant ifade ortamında proteinin seviyesi, mutantın bir birörnek miktarı SDS jeli üzerine yüklenecek şekilde Octet® sistemi (ForteBio) kullanılarak niceliklendirilmiştir. Sonrasında her bir mutant ifade ortamının 20 µl'si, iki Novex %4-12 Bis/Tris jellerinin her birinde yüklenmiştir ve 50 dakika boyunca 140 V'de MOPS tamponu kullanılarak jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Bir kontrol olarak yabancı-tip DLL4'ün ekstraselüler alanının bir delesyon fragmentini (amino asit kalıntıları 27 ila 251) kodlayan bir protein kullanılmıştır. Elektroforezin tamamlanmasından sonra protein bandı, bir poliviniliden diflorür membranına aktarılmıştır. Toplamda iki proses gerçekleştirilmiştir. Bir proste mutant ve yabancı-tip proteinlerinin birörnek miktarlarının, DLL4'ün ekstraselüler alanının delesyon fragmenti (amino asit kalıntıları 27 ila 251) SDS jeline yüklendiğinde yüklenip yüklenmediğini incelemek için bir HRP-konjuge anti-insan Fc antikoru

(1:10000) (Pierce Kat: 31413), aktarılan membrana bağlanmıştır, ve sonrasında membran, PBS-T ile üç kere yıkanmıştır. Diğer yöntemde MLCK2 antikorunun afinitelerinin mutantlara bağlanmasını incelemek için MLCK2 antikorunu (1 µg/mL) öncelikle aktarılan membrana bağlanmıştır, membran, PBS-T ile üç kere yıkanmıştır, ve sonrasında bir HRP-konjuge anti-
5 insan Fab antikorunu (1:10000) membrana bağlanmıştır, bundan sonra PBS-T ile üç kere yıkanmıştır. Sonrasında Amersham ECL Western blotlama tespit reaktifi (GE Healthcare), membrana uygulanmıştır ve sinyal, ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

10 ŞEKİL 8'de gösterildiği üzere Western blotlama analizinin sonuçları, yabancı-tip ve DLL4'ün ekstraselüler alanının delesyon fragmentini (amino asit kalıntıları 27 ila 251) kodlayan mutan proteinlerin bir birörnek miktarda yüklendiğini göstermiştir. Ek olarak mutantlar için MLCK2 antikorunun bağlama afiniteleri incelendiğinde konum 64'te amino asit mutanı için MLCK2'nin bağlayıcı afinitesinin kaybolduğu ve konum 65'te amino asit için MLCK2 antikorunun bağlayıcı
15 afinitesinin önemli ölçüde azaltıldığı görülebilmektedir. Ek olarak konum 69'da amino asit mutantının, MLCK2 antikorunun bağlama afinitesini etkilemediği gösterilmiştir.

Örnek 7: İnsan Umbilikal Ven Endotelial Hücrelerin (HUVEC'ler) Proliferasyonu üzerinde DLL4/VEGF Çift-Hedefli Antikoru Etkisinin Analizi

20 DLL4 ve VEGF'ye bağlanan çift-hedefli antikoru, insan umbilikal ven endotelial hücreler (HUVEC'ler) üzerindeki etkisini analiz etmek için Lonza'dan satın alınan insan umbilikal ven endotelial hücreler (HUVEC'ler) deneyde kullanılmıştır.

25 HUVEC'lerin kültürü için T-kabı (Nunc), 4-6 saat boyunca bir oda sıcaklığından %1 jelatin (Sigma) barındıran PBS tamponu (Gibco) ile kaplanmıştır ve sonrasında PBS ile yıkanmıştır. EBM-2 barındıran EGM-2 Tek Kuot (Lonza), bir kültür ortamı olarak kullanılmıştır, bir hücre kültürünün yoğunluğu, %80'nin altında sürdürülmüştür ve hücreler bir %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de kültürlenmiştir. Geçiş 6 öncesinde hücreler bu deney için kullanılmıştır. Bir HUVEC
30 proliferasyon tahlili aşağıdaki şekilde yapılmıştır. Birinci olarak bir hDLL4-kaplı plakayı hazırlamak için, deney gerçekleştirilmeden bir gün önce rhDLL4 (R&D Systems), bir 96-kuyucuklu plakada (BD) 1 mg/ml'lik bir nihai konsantrasyona bir karbonat tamponunda seyreltilmiştir, ve 100 ml seyreltilmiş rhDLL4 her bir kuyucuğa inoküle edilmiştir ve plaka, gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Ek olarak HUVEC'ler, serum etkisini en aza indirmek için 24
35 saat boyunca %0.1 FBS ile takviye edilen EBM-2 minimal ortamında kültürlenmiştir. Deneyin

birinci gününde rhDLL4-kaplı plakanın her bir kuyucuğu, PBS ile iki kere yıkanmıştır, ve her bir test grubu için hVEGF'nin (50 ng/mL) her biri ve antikorlar (Avastin: 20 mg/mL; yalnızca anti-DLL4 antikor: 20 mg/mL; Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikor: 26 mg/mL), EBM-2 minimal ortam ile seyreltilmiştir, ve sonrasında üçlü olarak her bir kuyucuğa eklenmiştir, sonrasında 20 dakika boyunca bir oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 24 saat boyunca dayanan HUVEC'ler, tek hücrelere ayrıştırılmıştır ve EBM-2 minimal ortam ile 4×10^3 hücre/kuyucuğa seyreltilmiştir. Seyreltilmiş hücreler, antikor ile tedavi edilen kuyucuğa inoküle edilmiştir ve 96 saat boyunca 37°C'de bir %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Hücre proliferasyonu tamamlandıktan sonra 10 µl hücre sayma kiti-8 (CCK-8, Dojino), her bir kuyucuğa eklenmiştir ve plaka, 5 saat boyunca 37°C'de bir %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. SpectraMax 190 (Molecular Devices) kullanılarak 450 nm'deki numunenin absorpsiyonu ölçülmüştür ve hücre proliferasyonunun seviyeleri, farklı test grupları ile karşılaştırılmıştır.

ŞEKİL 9'un tüm şekillerinde (PBS-ile tedavi görmüş grup) gösterildiği üzere DLL4/Notch sinyalizasyonu aktive edildiğinde vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonu, yaklaşık %30 oranında inhibe edilecektir, öte yandan vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonu VEGF tarafından aktive edilmektedir. Yukarıda açıklandığı üzere *in vivo* mekanizmalarda VEGF antikorunun, böylelikle tümörlerin büyümesini ve metastazını inhibe etmek için tümörlerin anjiyogenezini inhibe ettiği, oysa DLL4 antikorunun, böylelikle tümörlerin büyümesini inhibe etmek için tümörlerde anormal kan damarlarının (inaktif kan damarları) aşırı üretimini indüklediği bilinmektedir. ŞEKİL 9'un sonuçlarının, *in vitro* VEGF ve DLL4'ün farklı anjiyogenik mekanizmalarını yansıttığı söylenebilmektedir.

ŞEKİL 9a'da görülebildiği üzere vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonunda önemli bir rol oynayan VEGF ve bunun reseptörü, ve VEGFR sinyalizasyon yolu, VEGF-hedefli antikor (Avastin) ile tedavi edilmektedir, vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonu, DLL4'ün varlığına veya yokluğuna bakılmaksızın bir konsantrasyona bağlı şekilde inhibe edilmiştir. Ancak yalnızca DLL4-hedefli antikor ile tedavi dolayısıyla elde edilen sonuçları gösteren ŞEKİL 9b'de gösterildiği üzere, hiçbir DLL4'ün bulunmadığı deney grubunda antikor konsantrasyonu, endotelial hücrelerin proliferasyonu üzerinde önemli etkiye sahip olmamıştır, ve DLL4'ün bulunduğu deney grubunda vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonu, DLL4-hedefli antikorun konsantrasyonuna bağlı bir şekilde yeniden oluşmuştur. Çift-hedefli protein ile tedavinin gerçekleştirildiği durumlarda, DLL4'ün bulunmadığı deney grubunda çift-etkili protein, Avastin antikoruna ile tedavininkine (ŞEKİL 9c; kalın çubuklar) benzer bir proliferasyon inhibitör etkisi göstermiştir, ancak DLL4'ün bulunduğu deney grubunda çift-hedefli proteinin

proliferasyon inhibitör etkisi azaltılmıştır (ŞEKİLLER 9a ve 9c; beyaz çubuklar).

DLL4-hedefli antikor ile tedavi edilen grubun, yalnızca VEGF-hedefli antikor ile tedavi edilen ile karşılaştırılabilir bir proliferasyon inhibitör etkisi göstermediği durumlarda mevcut buluşun çift-hedefli antikorunun, VEGF ve DLL4 sinyalizasyon yollarını etkili bir şekilde inhibe ettiği görülebilmektedir.

Örnek 8: DLL4/Notch ve VEGF/VEGFR Sinyalizasyon Yolları üzerinde DLL4/VEGF Çift-Hedefli Antikorun İnhibitör Aktivitelerinin Analizi

10

DLL4 ve VEGF'ye bağlanan çift-hedefli antikorun, DLL4/Notch ve VEGF/VEGFR sinyalizasyon yolları üzerindeki inhibitör aktivitelerini incelemek için HUVEC'ler, Örnek 4'te kullanılan ile aynı yöntemle kullanılmıştır. Spesifik olarak, deneyin gerçekleştirilmesinden bir gün önce bir rekombinant insan DLL4 (rhDLL4, R&D Systems), karbonat tamponu ile 1 mg/ml'lik bir nihai konsantrasyona seyreltilmiştir ve sonrasında 1 ml/kuyucuk seyreltilmiş rhDLL4, bir 6-kuyucuklu plakaya (BD) eklenmiştir ve gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Bu rhDLL4 ile tedavi edilmeyen bir kontrol grubu için 1 ml/kuyucuk karbonat tamponu, yalnızca plakaya eklenmiştir ve gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Sonraki gün, DLL4-ile kaplı plaka, bir 4°C dondurucudan alınmıştır ve PBS ile bir kere yıkanmıştır, ve 1 ml EGM-2 ortamı plakanın her bir kuyucuğuna eklenmiştir. Sonrasında antikorların (Avastin: 20 mg/mL; DBZ: 0.08 mM; yalnızca DLL4-hedefli antikor: 20 mg/mL; yalnızca Oncomed DLL4-hedefli antikor: 20 mg/mL; Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikor: 26 mg/mL) her biri her bir kuyucuğa eklenmiştir. Her bir kuyucuktaki nihai hacim 2 ml olmuştur ve eklenen antikorun hacmi, ortam hacminin iki katı olmuştur. Plaka, 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Antikor tedavisi sırasında geçişler #2 ila #5'te HUVEC'leri barındıran 75T plaka, plakadan çıkarılmıştır ve sonrasında hücreler, tek hücreler olarak ayrıştırılmıştır. Santrifüjleme vasıtasıyla HUVEC'ler yıkanmıştır ve taze bir EGM-2 ortamında yeniden süspansiyon halinde tutulmuştur. Hücreler sayıldıktan sonra hücreler, 5×10^5 hücre/ml'ye seyreltilmiştir ve 1ml hücreler, her bir kuyucuğa inoküle edilmiştir ve bir gün boyunca 37 °C'de %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Bir gün boyunca HUVEC'ler kültürlendikten sonra ortam, her bir kuyucuktan çıkarılmıştır ve hücreler PBS ile bir kere yıkanmıştır ve %0.2 FBS barındıran 2 ml EBM-2 minimal ortamı ile tedavi edilmiştir. Ayrıca önceki gün tedavi edilmiş antikorların (Avastin: 20 mg/mL; DBZ: 0.08 mM; yalnızca DLL4-hedefli antikor: 20 mg/mL; yalnızca Oncomed DLL4-hedefli antikor: 20 mg/mL; Avastin-DLL4 BsAb çift-hedefli antikor: 26 mg/mL) aynı konsantrasyonun her biri ile her bir kuyucuk tedavi edilmiştir ve hücreler, bir gün boyunca 37 °C'de %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

35

Sonrasında her bir antikor ile tedavi edilmiş HUVEC'leri barındıran her bir kuyucuk, 100 ng/ml hVEGF (R&D Systems) ile tedavi edilmiştir ve 5 dakika boyunca 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Sonrasında plaka alınmıştır ve ortam hızlı bir şekilde çıkarılmıştır. Hücreler bir kere PBS ile yıkanmıştır, ve 150 µl bir hücre lizis tamponu (%1 NP-40, 20mM Tris, 137mM NaCl, %10 Gliserol, 2mM EDTA, 1mM Sodyum ortovanabat, 1x Proteaz & fosfataz inhibitör kokteyli) her bir kuyucuğa eklenmiştir ve plaka, lizis tamponunu yaymak için çalkalanmıştır.

Hemen sonrasında plaka buzun üzerine koyulmuştur ve HUVEC'ler, bir sıyrıcı kullanılarak her bir kuyucuktan toplanmıştır ve bir 1.5 ml tüpe koyulmuştur ve buz üzerinde durması sağlanmıştır. Her 5 dakikada bir hücreleri barındıran 1.5 ml tüp buzdan alınmıştır, üç kere vortekslenmiştir ve hücre lizisi için tekrar buz üzerine koyulmuştur. Sonrasında numune, 10 dakika boyunca 4°C'de ve 14000 dds'de santrifüjlenmiştir ve izole süpernatant, taze bir tüpe aktarılmıştır ve tartılmıştır. SDS-PAGE analizi için süpernatant, 5x SDS numune tamponuna eklenmiştir ve 10 dakika boyunca 100°C'de kaynatılmıştır, sonrasında SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Bu sırada hazırlanan protein numuneleri, %4 ila %12 bis-TRIS jeli vasıtasıyla işlenmiştir, ve büyüklüklerine göre ayrılmıştır ve ayrılan proteinler, aşağıdaki antikorlar ile Western blotlanmıştır (ŞEKİL 10). NICD (Hücre sinyalizasyonu), PERK (Hücre sinyalizasyonu), ERK (Hücre sinyalizasyonu), VEGFR2 (Hücre sinyalizasyonu), P-VEGFR2 (Hücre sinyalizasyonu) ve Aktin (Santa Cruz).

ŞEKİL 10'da gösterildiği üzere mevcut buluşun çift-hedefli antikorunu, yalnızca DLL4-hedefli antikor ve yalnızca VEGF-hedefli antikor ile gerçekleştirilenlere benzer seviyelere kadar DLL4/Notch ve VEGF/VEGFR sinyalizasyon yollarını inhibe edebilmektedir.

Örnek 9: Avastin-Dirençli İnsan SCH Gastrik Kanseri Ksenograft Modelinde Çift-Hedefli Antikorum Antikanser Aktivitesinin Analizi

Literatürde raporlandığı üzere insan SCH insan gastrik kanseri hücreleri Avastin'e karşı dirençlidir. Dolayısıyla, çift-hedefli antikorum etkisi ile ilgili bir deney, SCH hücrelerine sahip bir çıplak fare ksenograft modelinde gerçekleştirilmiştir.

Spesifik olarak Avastin-dirençli SCH gastrik kanser hücreler, dişi çıplak farelere inoküle edilmiştir, ve tümör büyüklüğü ortalama bir 200 mm³'e ulaştığında antikorların her biri, mevcut buluşun çift-hedefli antikorumun *in vivo* antikanser aktivitesini onaylamak için haftada bir kere farelere uygulanmıştır (ŞEKİL 11). Çıplak fare ksenograft modelinde bu *in vivo* deneyde, insan

DLL4 epitopuna (DSL alanı) eşit fare DLL4 epitopuna (DSL alanı) bağlanan çift-hedefli proteinin yerine geçen bispesifik antikor Avastin-fare DLL4, çift-etkili antikorun mükemmel antikanser etkisini göstermek için insan DLL4'ü hedefleyen Avastin-DLL4 çift-hedefli antikorun yerine uygulanmıştır.

5

ŞEKİL 11'de gösterildiği üzere *in vivo* deneyin sonuçları, mevcut buluşun çift-hedefli proteininin, Avastin-dirençli gastrik kanser hücrelerine karşı önemli ölçüde arttırılmış bir antikanser etkisine sahip olduğunu göstermiştir.

10 **Örnek 10: Avastin-Dirençli İnsan A549 Akciğer Kanseri Ksenogreft Modelinde Çift-Hedefli Antikorun Antikanser Aktivitesinin Analizi**

A549 hücreleri, sonrasında 3 ay boyunca Avastin (2.5 mg/kg/hafta) ile tedavi edilen çıplak farelere inoküle edilmiştir, böylelikle Avastin ile tedavi sonrasında bile bunun büyüklüğünü azaltmadan tümörün büyüdüğü Avastin-dirençli A549 kanser hücreleri elde edilmiştir. Tümör ayrılmıştır ve sonrasında Avastin-dirençli A549 hücreleri, çift-hedefli antikorun etkisini analiz etmek için *ex vivo* inkübe edilmiştir.

Spesifik olarak Avastin-dirençli A549 akciğer kanser hücreler, dişi çıplak farelere inoküle edilmiştir, ve tümör büyüklüğü ortalama bir 200 mm³'e ulaştığında antikorların her biri, mevcut buluşun çift-hedefli antikorunun *in vivo* antikanser aktivitesini onaylamak için haftada iki kere farelere uygulanmıştır (ŞEKİL 12). Avastin-dirençli A549 hücrelerini kullanan bu *in vivo* deneyde, insan DLL4 epitopuna eşit fare DLL4 epitopuna bağlanan çift-hedefli proteinin yerine geçen bispesifik antikor Avastin-fare DLL4, çift-etkili antikorun mükemmel antikanser etkisini göstermek için insan DLL4'ü hedefleyen Avastin-DLL4 çift-hedefli antikorun yerine uygulanmıştır.

ŞEKİL 12'de gösterildiği üzere *in vivo* deneyin sonuçları, mevcut buluşun çift-hedefli proteininin, Avastin-dirençli akciğer kanser hücrelerine karşı önemli ölçüde arttırılmış bir antikanser etkisine sahip olduğunu göstermiştir.

30

<110> HANWHA CHEMICAL CORPORATION

<120> Spesifik olarak D114 ve VEGF'ye bağlanan yeni çift-hedefli protein ve bunun kullanımı

<130> OPA14097-PCT

<150> KR 10-2013-0080523

5 <151> 2013-07-09

<160> 23

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 713

10 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Avastin-anti-Dll4 BsAb VH

<400> 1

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

Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
	210					215					220				
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
225					230					235					240
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Tyr	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			260					265					270		
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
		275					280					285			
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
	290					295					300				
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
305					310					315					320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				325					330					335	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
			340					345					350		
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	His	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
		355					360					365			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370					375					380				
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390					395					400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
				405					410					415	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
			420					425					430		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
		435					440					445			
Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	450					455					460				
Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr
465					470					475					480
Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile
				485					490					495	
Gly	Ser	Asn	Asp	Val	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro
			500					505					510		
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
		515					520					525			
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser
	530					535					540				

Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp
 545 550 560
 Tyr Ser Leu Ser Ala Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val
 565 570 575
 Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 595 600 605
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 610 615 620
 Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 625 630 635 640
 Cys Leu Glu Trp Val Ser Trp Ile Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Lys Tyr
 645 650 655
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 660 665 670
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 675 680 685
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asp Trp Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 690 695 700
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 705 710

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

5 <220>
 <223> anti-DLL4 VH CDR1
 <400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Ser
 1 5 10

10 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

<220>
 <223> anti-DLL4 VH CDR2

15 <400> 3

Trp Ile Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

5 <220>
<223> anti-DLL4 VH CDR3

<400> 4

Ala Asp Trp Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 5
10 <211> 13
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> anti-DLL4 VL CDR1

15 <400> 5

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

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Yapay Sekans

<220>
<223> anti-DLL4 VL CDR2

<400> 6

Ala Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

25 <210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
30 <223> anti-DLL4 VL CDR3

<400> 7

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

<210> 8
<211> 116
35 <212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>

<223> anti-DLL4 VH

<400> 8

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

<210> 9

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> anti-DLL4 VL

10 <400> 9

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

<210> 10

<211> 10
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
5 <223> anti-VEGF VH CDR 1

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 11
<211> 17
10 <212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> anti-VEGF VH CDR 2

<400> 11

15

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15
Arg

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Yapay Sekans

<220>
<223> anti-VEGF VH CDR 3

<400> 12

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His
1 5

25 <210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
30 <223> anti-VEGF VL CDR 1

<400> 13

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 14
<211> 7
35 <212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> anti-VEGF VL CDR2

<400> 14

20 Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 15
5 <211> 9
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> anti-VEGF VL CDR3

10 <400> 15

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 16
<211> 452
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

15 <220>
<223> anti-VEGF VH

<400> 16

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Tyr Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg His Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 17
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> anti-VEGF VL

<400> 17

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

- 5 <210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> peptit bađı

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 19
<211> 45
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

5 <220>
<223> peptit bađı

<400> 19
ggtggaggtg gcagcgggtg tggcggcagt cccggtggcg gctcc 45

10 <210> 20
<211> 214
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> Avastin-anti-DII4 BsAb VL

15 <400> 20

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

<210> 21

<211> 685

<212> PRT

<213> Homo sapien

5 <220>

<221> PEPTIT

<222> (1)..(685)

<223> insan DLL4

<400> 21

Met 1	Ala	Ala	Ala	Ser 5	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly 10	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	15
Val	Ala	Leu	Trp 20	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala 25	Gly	Ser	Gly	Val	Phe 30	Gln	Leu	
Gln	Leu	Gln 35	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu 40	Arg	Gly	Val	Leu	Ala 45	Ser	Gly	Arg	
Pro	Cys 50	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg 55	Thr	Phe	Phe	Arg	Val 60	Cys	Leu	Lys	His	
Phe 65	Gln	Ala	Val	Val	Ser 70	Pro	Gly	Pro	Cys	Thr 75	Phe	Gly	Thr	Val	Ser 80	
Thr	Pro	Val	Leu	Gly 85	Thr	Asn	Ser	Phe	Ala 90	Val	Arg	Asp	Asp	Ser 95	Ser	
Gly	Gly	Gly 100	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln 105	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Thr 110	Trp	Pro	
Gly	Thr	Phe 115	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu 120	Ala	Trp	His	Ala	Pro 125	Gly	Asp	Asp	
Leu 130	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro 135	Pro	Asp	Ala	Leu	Ile 140	Ser	Lys	Ile	Ala	
Ile 145	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala 150	Val	Gly	Gln	Asn	Trp 155	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln 160	
Thr	Ser	Thr	Leu	Thr 165	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser 170	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys 175	Ser	
Asp	Asn	Tyr	Tyr 180	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser 185	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys 190	Arg	Asn	
Asp	His	Phe 195	Gly	His	Tyr	Val	Cys 200	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn 205	Leu	Ser	Cys	
Leu	Pro 210	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu 215	Tyr	Cys	Gln	Gln	Pro 220	Ile	Cys	Leu	Ser	
Gly 225	Cys	His	Glu	Gln	Asn 230	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys 235	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu	240
Cys	Arg	Pro	Gly	Trp 245	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys 250	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro 255	His	
Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys	

		595						600									605
Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg		
	610					615					620						
Gly	Thr	Met	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	His	Ser	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu		
625					630					635					640		
Lys	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Pro	Glu	Cys	Arg	Ile	Ser		
				645					650					655			
Ala	Ile	Cys	Ser	Pro	Arg	Asp	Ser	Met	Tyr	Gln	Ser	Val	Cys	Leu	Ile		
			660					665					670				
Ser	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Val	Ile	Ala	Thr	Glu	Val					
		675					680					685					

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

5 <220>
 <223> hDLL4 epitop1

<400> 22

Phe Arg Val Cys Leu Lys His Phe
 1 5

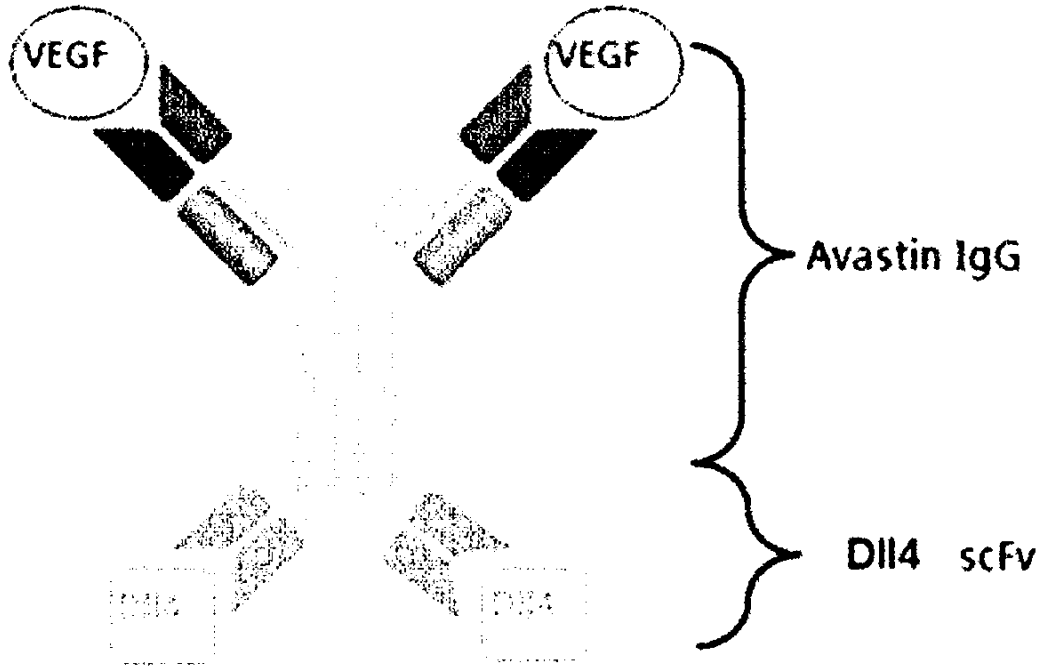
10 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

<220>
 <223> hDLL4 epitop 2

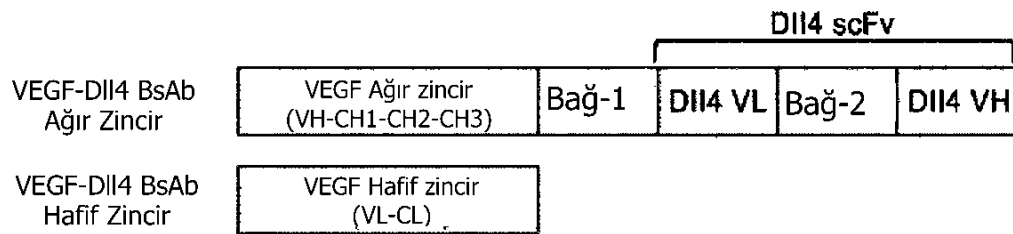
15 <400> 23

Thr Trp Pro Gly Thr Phe
 1 5

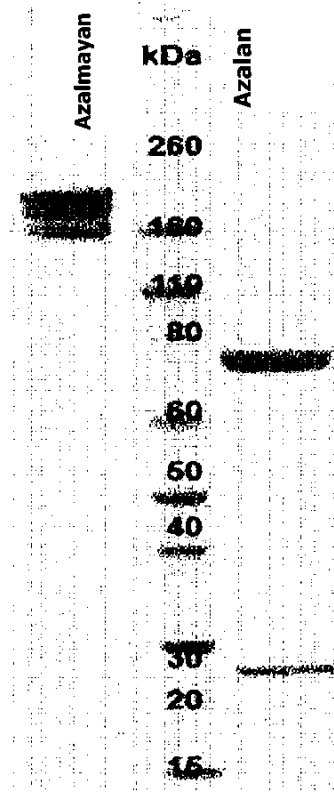
Şekil 1a



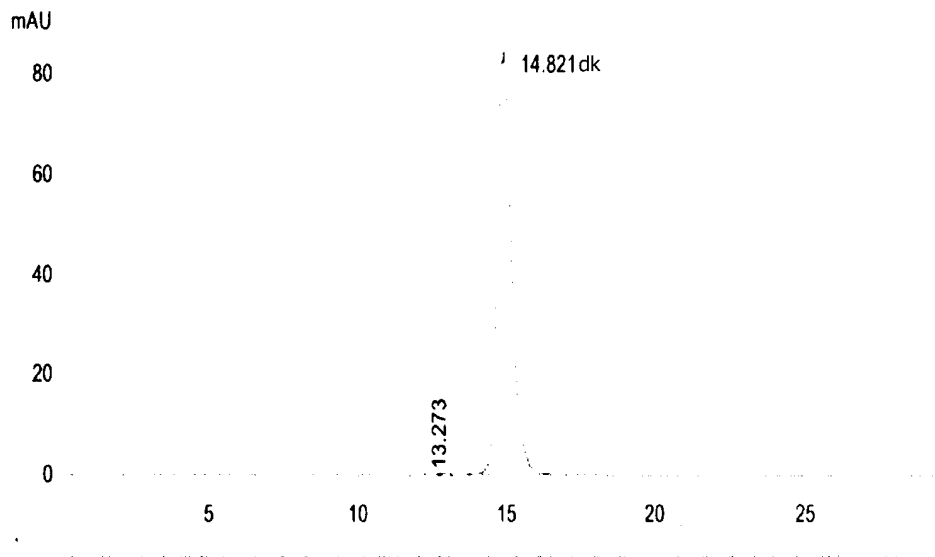
Şekil 1b



Şekil 2a

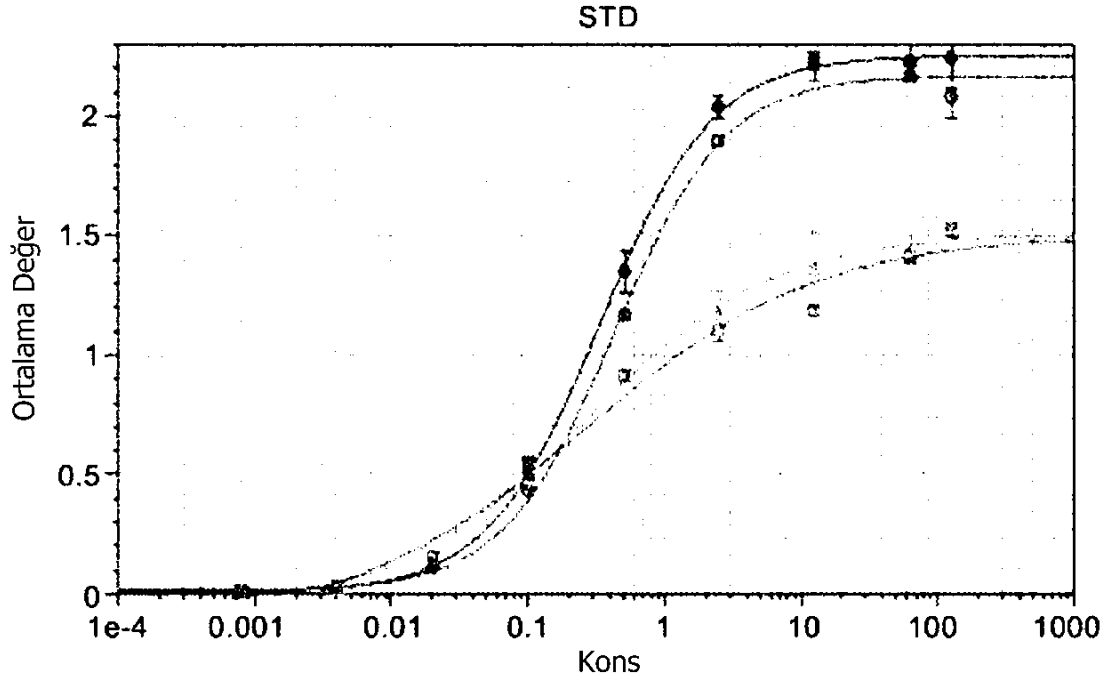


3/13



Şekil 2b

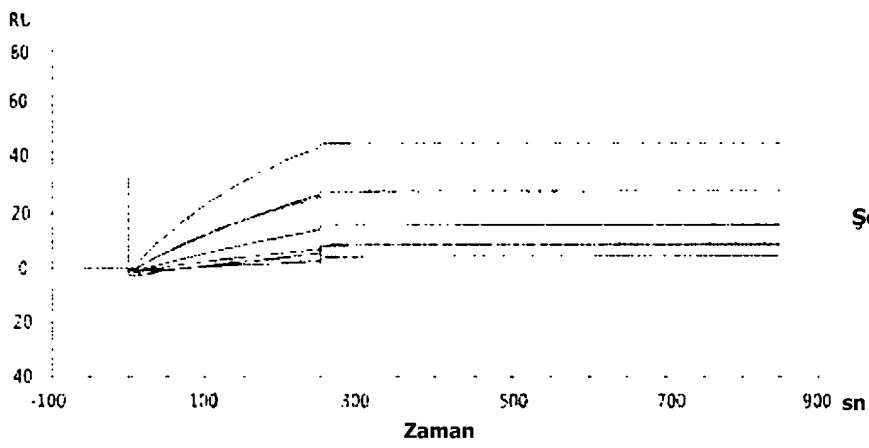
Şekil 3



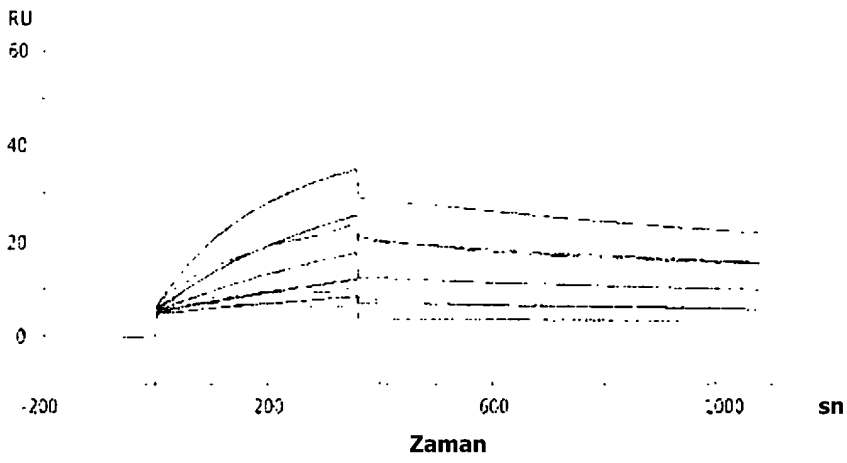
$$4-P F_2 y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

	A	B	C	D	R ²
● STD (VEGF-Geçici Kons'a karşı Ortalama Değer)	0.00268	1.05	0.337	2.26	1
○ Plan#1 (VEGF-(GS havuzu) hücre hattı: Konsantrasyon...)	0.0144	1.07	0.43	2.17	0.997
□ Plan#2 (DLL4-Geçici Konsantrasyona Karşı Ortalama...)	-0.126	0.506	0.264	1.51	0.987
△ Plan#3 (DLL4-(GS havuzu) hücre hattı: Konsantrasyona karşı...)	-0.0656	0.623	0.261	1.51	0.997

Kıvrım Seçeneği - Sabit Ağırlık Değeri



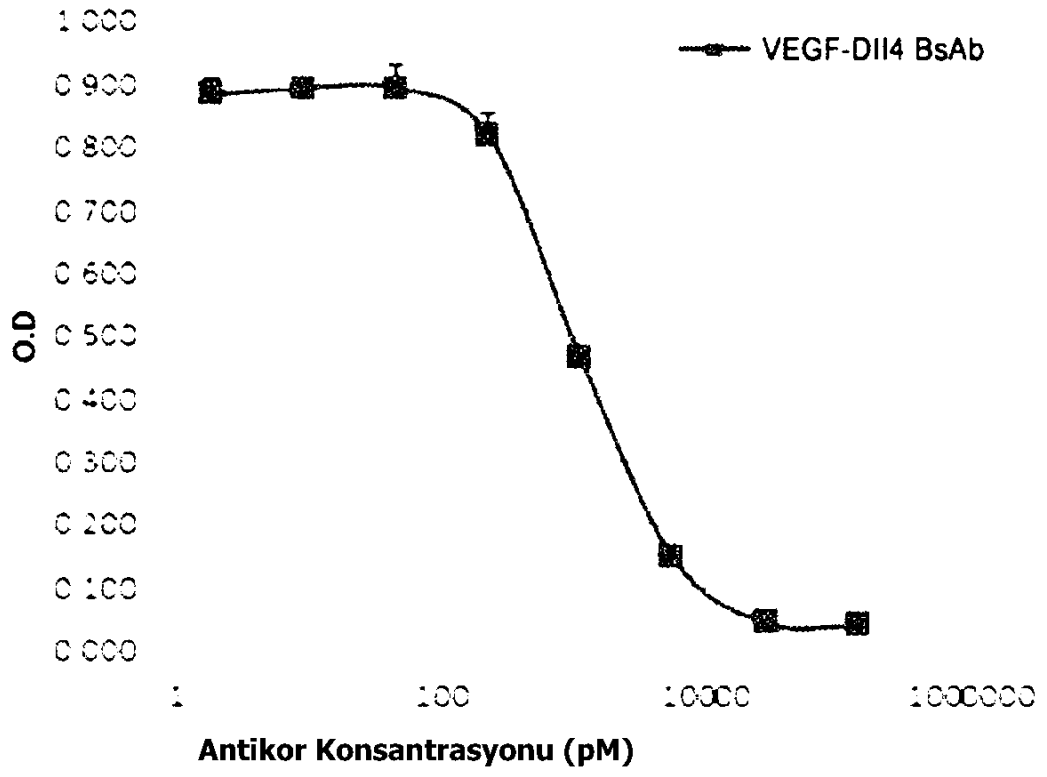
Şekil 4a

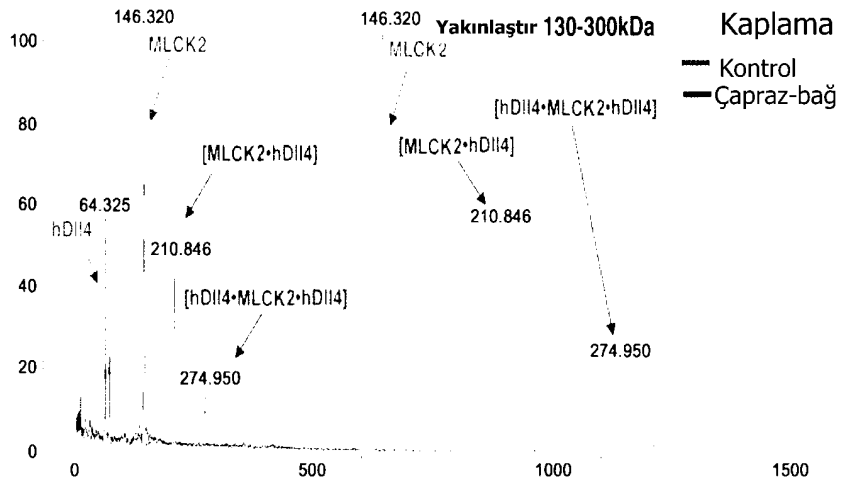


Şekil 4b

Şekil 5

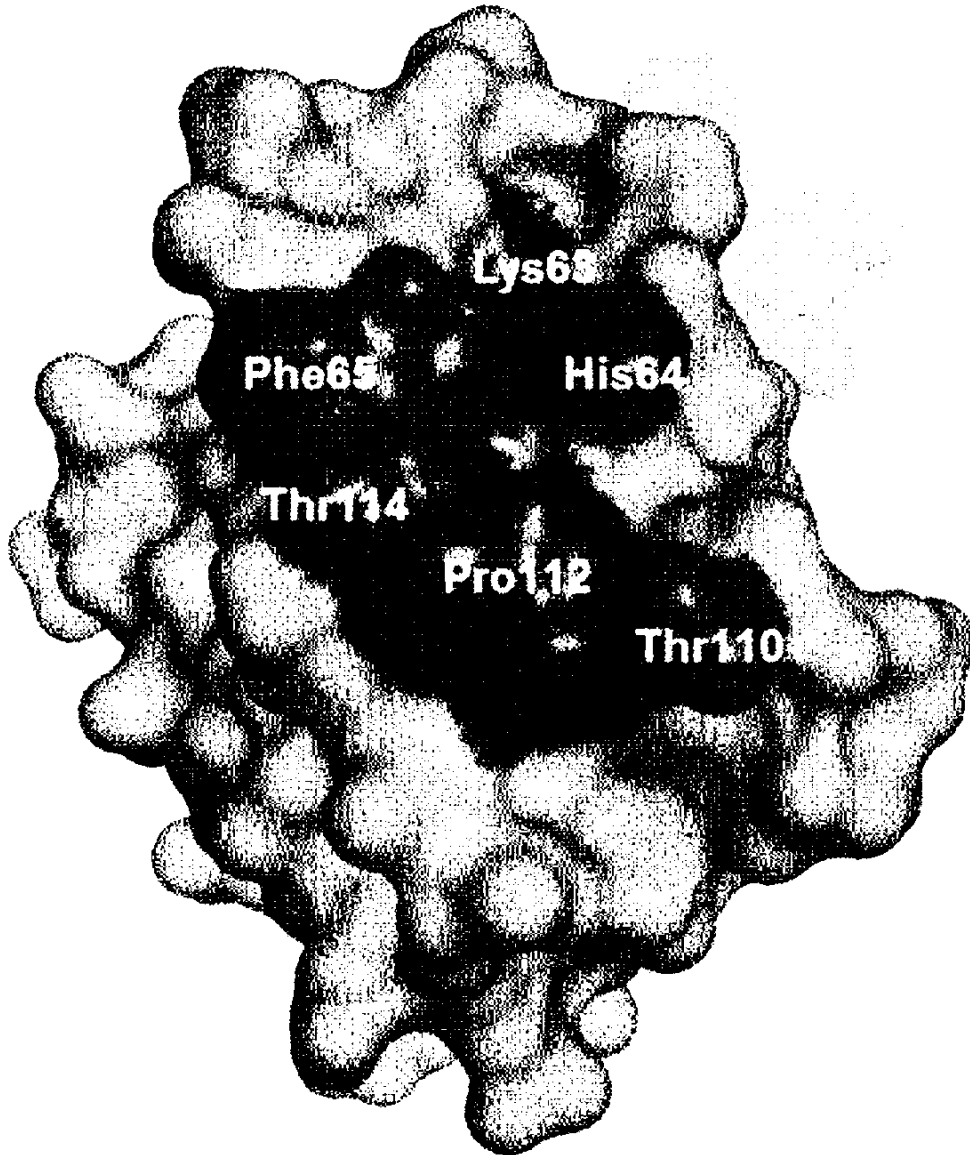
İnsan Dll4/İnsan notch nötrleştirme tahlili



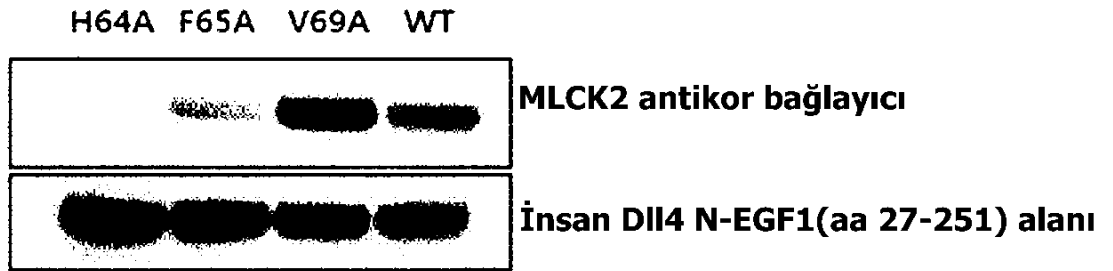


Şekil 6

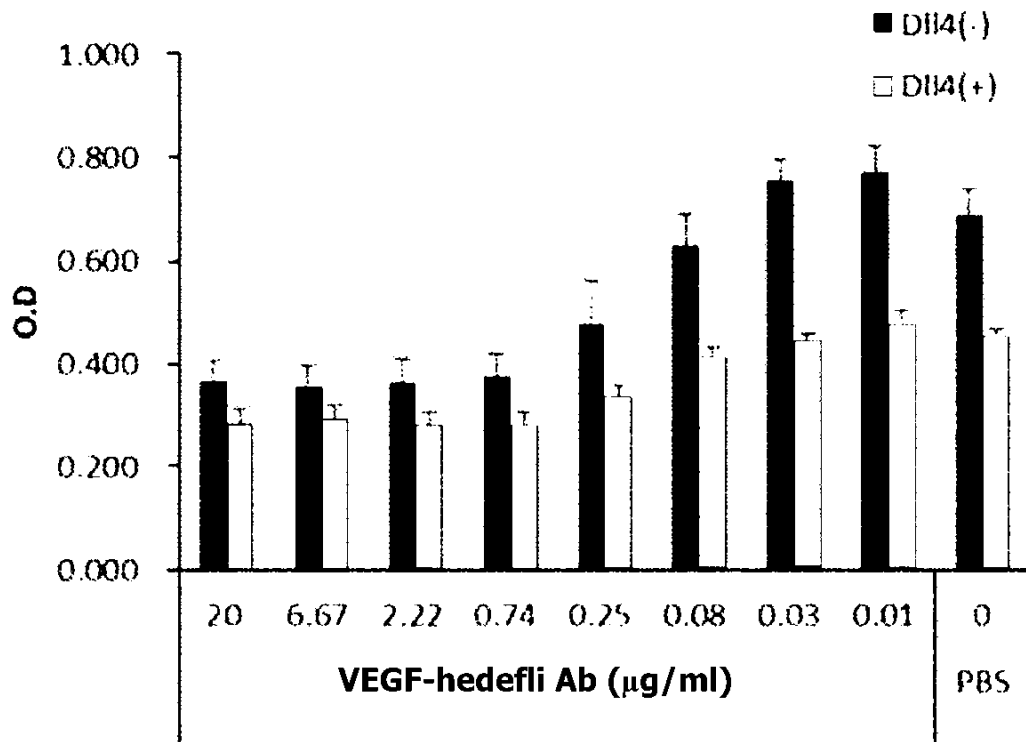
Şekil 7



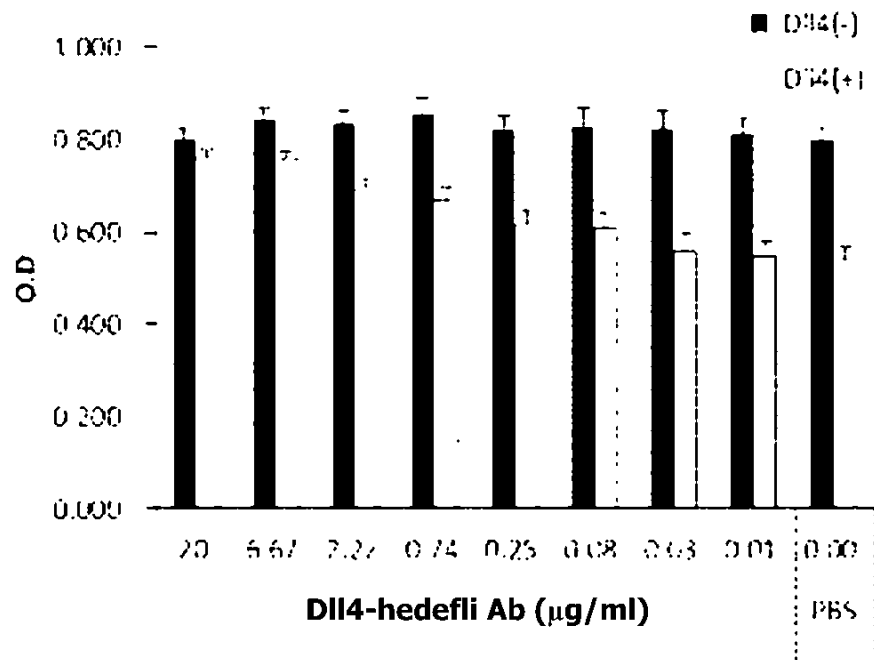
Şekil 8



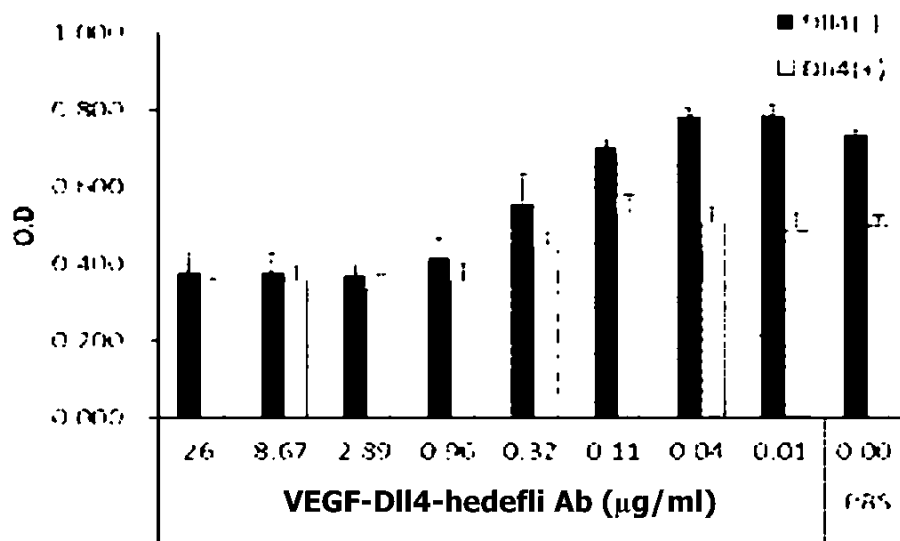
Şekil 9a



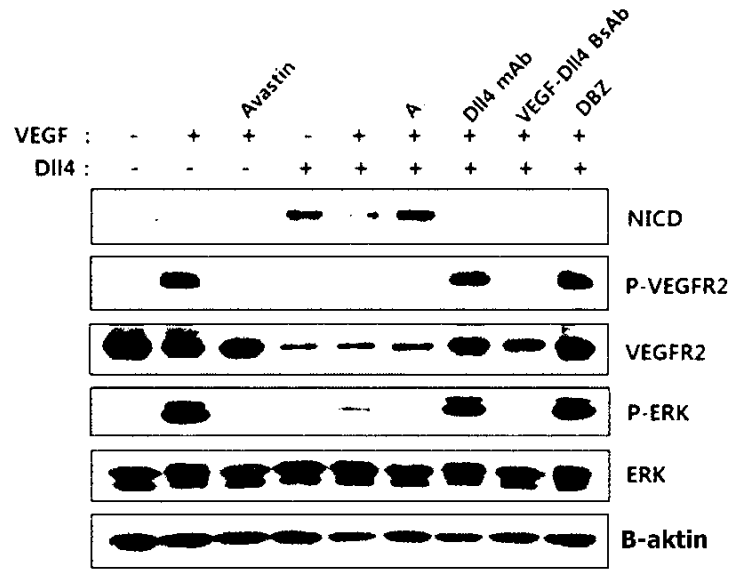
Şekil 9b



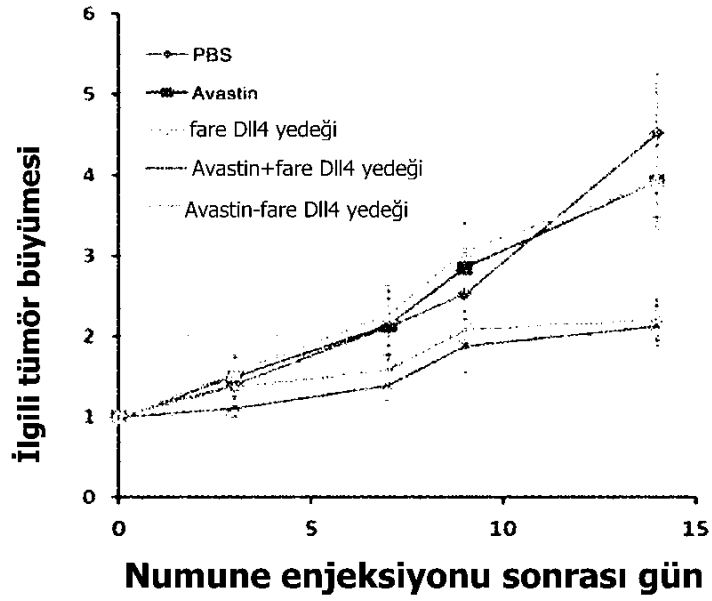
Şekil 9c



Şekil 10



Şekil 11



Şekil 12

