

ÖZET

OPGL'YE KARŞI ANTİKORLAR

- 5 Osteoprotegerin ligandı (OPGL) ile etkileşime geçen antikorlar açılanmaktadır. Farmasötik olarak etkili bir antikor miktarını, OPGL'ye uygulanmasıyla osteopenik rahatsızlıkların tedavi edilmesine yönelik yöntemler açılanmaktadır. OPGL'ye karşı antikorlar kullanarak bir numunede OPGL miktarını tespit edilmesine yönelik yöntemler açılanmaktadır.

İSTEMLER

1. Bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren bir antikor olup,

- 5 a) burada ağır zincir, bir OPGL'ye özgüllük kazandırmak için yeterli değişken bölge sekansına sahip olan bir tam uzunlukta ağır zincirden ve bunun polipeptit fragmanlarından seçilmektedir, ve ağır zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansına en az %90 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansı içeren bir birinci değişken bölgeyi içermektedir ve
- 10 b) burada hafif zincir, bir OPGL'ye özgüllük kazandırmak için yeterli değişken bölge sekansına sahip olan bir tam uzunlukta hafif zincirden ve bunun polipeptit fragmanlarından seçilmektedir ve hafif zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansına en az %90 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansı içeren bir ikinci değişken bölgeyi içermektedir,
- 15

20 burada antikor, bir osteoprotegerin liganda (OPGL) bağlanmaktadır ve OPGL'nin, bir osteoklast farklılaşımına ve aktivasyon reseptörüne (ODAR) bağlanmasını inhibe etmektedir ve burada bir antikor fazlalığı bir *in vitro* rekabetçi bağlama deneylerinde ölçüldüğü gibi bağlanma oranını en az %20 azaltmaktadır

25 2. Birinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansına en az %95 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansı içerdigi ve ikinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansına en az %95 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansı içerdigi istem 1'e göre antikor.

30 3. Birinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansına en az %99 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansı içerdigi ve ikinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansına en az %99 özdeşliğe sahip olan bir amino asit sekansı içerdigi istem 1 veya istem 2'e göre antikor.

4. İstem 1 ila 3 arasından herhangi birine göre antikor,

a) burada ağı zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'ün üç CDR'sini içermektedir, ve

b) burada hafif zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'ün üç CDR'sini içermektedir.

- 5 **5.** Ağı zincirin ve hafif zincirin, tek zincirli bir antikoru oluşturduğu istem 1 ile 4'ten herhangi birine göre antikor.
- 6.** Tek zincirli bir Fv antikoru olan istem 5'e göre antikor.
- 10 **7.** Bir Fab antikoru, bir Fab' antikoru veya bir F(ab')₂ antikoru olan istem 1 ile 4'ten herhangi birine göre antikor.
- 8.** Tamamen insan olan istem 1 ile 4'ten herhangi birine göre antikor.
- 15 **9.** Bir konak hücreden eksprese edilen istem 1 ile 8'den herhangi birine göre antikor.
- 10.** Konak hücrenin, bir memeli konak hücre olduğu istem 9'a göre antikor.
- 11.** Memeli konak hücrenin, bir Çin hamster yumurtalı hücresinden, bir HeLa hücresinden, bir bebek hamster böbrek hücresinden, bir maymun böbreği hücresinden ve bir insan hepatohücrel karsinom hücresinden seçildiği istem 10'a göre antikor.
- 20 **12.** Konak hücrenin, bir birinci polinükleotidi ve bir ikinci polinükleotidi içerdiği, birinci polinükleotidin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansı içeren bir ağı zinciri kodladığı ve ikinci polinükleotidin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansı içeren bir hafif zinciri kodladığı istem 9 ile 11 arasından herhangi birine göre antikor.
- 25 **13.** Birinci polinükleotidin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'nin amino asit sekansı içeren bir ağı zinciri kodladığı ve ikinci polinükleotidin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'ün amino asit sekansı içeren bir hafif zinciri kodladığı istem 12'ye göre antikor.
- 30 **14.** İstemler 1 ile 13 arasından herhangi birine göre bir antikoru içeren bir farmasötik bileşim.
- 35 **15.** Kemik kaybının tedavisi için istemler 1 ile 13 arasından herhangi birine göre

antikor veya istem 14'e göre farmasötik bileşim.

16. Kemik kaybı, osteoporoz, Paget hastalığı, osteomyelit, hiperkalsemi, osteopeni, osteonekroz, bir inflamatuvar koşul, bir otoimmün koşul, romatoid artrit ve kanser arasından seçilen en az bir koşul ile ilişkili olduğu istem 15'e göre kullanıma yönelik antikor veya kullanıma yönelik farmasötik bileşim.

17. Kemik kaybı tedavi edilmesine yönelik bir ilaç üretilmesi için istemler 1 ila 13 arasından herhangi birine göre antikor veya istem 14'e göre farmasötik bileşim kullanımı

18. Kemik kaybı, osteoporoz, Paget hastalığı, osteomyelit, hiperkalsemi, osteopeni, osteonekroz, bir inflamatuvar koşul, bir otoimmün koşul, romatoid artrit ve kanser arasından seçilen en az bir koşul ile ilişkili olduğu istem 17'ye göre kullanıma yönelik antikor veya kullanıma yönelik farmasötik bileşim.

19. Kanser ile ilişkili kemik kaybı tedavi edilmesi için en az bir radyasyon tedavisi ve kemoterapi ile uygulamaya yönelik olarak bir ilaç üretilmesi için istemler 1 ila 13 arasından herhangi birine göre antikor veya istem 14'e göre farmasötik bileşim kullanımı

20. En az bir radyasyon tedavisi ve kemoterapi ile uygulama vasıtasıyla kanser ile ilişkili kemik kaybı tedavi edilmesinde kullanıma yönelik istemler 1 ila 13 arasından herhangi birine göre antikor veya istem 14'e göre farmasötik bileşim kullanımı

21. Kanser, meme, prostat, tiroit, böbrek, akciğer, özofagus, rektal, mesane, servikal, yumurtalık, karaciğer, gastrointestinal, multipl miyelom, lenfoma ve Hodgkin Hastalığı arasından seçildiği istem 19'a göre kullanımı.

22. Kanser, meme, prostat, tiroit, böbrek, akciğer, özofagus, rektal, mesane, servikal, yumurtalık, karaciğer, gastrointestinal, multipl miyelom, lenfoma ve Hodgkin Hastalığı arasından seçildiği istem 20'ye göre kullanıma yönelik antikor veya kullanıma yönelik farmasötik bileşim.

23. Kemoterapinin, bir antrasiklin, taksol, tamoksifen, doksorubisin, 5-florourasil ve bir lüteinizan hormon salgılatıcı hormon (LHRH) antagonistinden seçilen en az bir madde ile tedaviyi içerdiği istem 19'a göre kullanımı.

24. Kemoterapinin, bir antrasiklin, taksol, tamoksifen, doksorubisin, 5-florourasil ve bir lüteinizan hormon salgılatıcı hormon (LHRH) antagonistinden seçilen en az bir madde ile tedaviyi içerdiği istem 20'ye göre kullanılır.

5

25. İstemler 1 ila 4 ve 8'den herhangi birine göre antikor olup, burada söz konusu antikor aşağıdakileri içermektedir

- 10
- i) SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'ün amino asit sekansını içeren bir insan IgG2 ağır zincir ve
 - ii) SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'ün amino asit sekansını içeren bir insan kappa hafif zincir.

15 **26.** Bir birinci polinükloetidi ve bir ikinci polinükloetidi içeren bir memeli konak hücreden eksprese edilen, birinci polinükleotidin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'ün amino asit sekansını içeren bir insan IgG2 ağır zinciri kodladığı ve ikinci polinükleotidin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'ün amino asit sekansını içeren bir insan kappa hafif zincirini kodladığı istem 25'e göre antikor.

20 **27.** Bir birinci polinükloetidi ve bir ikinci polinükloetidi içeren bir memeli konak hücreden eksprese edilen, birinci polinükleotidin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'nin amino asit sekansını içeren bir değişken bölgeyi ve sabit bölgeyi içeren bir ağır zinciri kodladığı ve ikinci polinükleotidin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'ün amino asit sekansını içeren değişken bölgeyi ve sabit bölgeyi içeren bir hafif zinciri kodladığı istem 25'e göre antikor.

25

TARİFNAME

OPGL'YE KARŞI ANTİKORLAR

5 TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, osteoprotegerin ligandı (OPGL) bağlayan antikorlarla ilgilidir. Osteoporoz, artrit, kemik hastalığı kaybı, Paget hastalığı ve osteopeni gibi kemik hatalarının tedavisine yönelik bileşimler ve yöntemler de açıklanmaktadır

10

ÖNCEKİ TEKNİK

Kemik dokusu, vücuda destek sağlamaktadır ve mineral (kalsiyum ve fosfor), bir kolajen ve kolajen olmayan protein matrisi ve hücreleri içermektedir. Canlı kemik dokusu, birikme olarak adlandırılan kemik oluşumu ve erime olarak adlandırılan kemik yıkımı arasında dinamik bir denge sergilemektedir. Kemik, osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlarda bulunan üç hücre türü, bu dengede yer almaktadır. Osteoblastlar, kemik doku oluşumunu arttırırken, osteoklastlar, rezorpsiyon ile ilişkilendirilmektedir. Kemik matrisinin ve mineralin rezorpsiyonu ve çözünmesi, kemik oluşumuna kıyasla hızlı ve etkili bir süreçtir ve kemikten büyük miktarda mineral salabilmektedir. Osteoklastlar, iskelet dokusunun normal yeniden modellenmesinin ve hormonlarla indüklenen rezorpsiyonun regülasyonunda yer almaktadır. Örneğin rezorpsiyon, hücre dışı sıvılarda kalsiyum iyonun azalan konsantrasyonlarına yanıt olarak paratiroid hormonun salgılanması ile uyartılmaktadır. Buna karşın, rezorpsiyonun inhibisyonu, bir kalsitonin işlevidir. Ek olarak, D vitamininin metabolitleri, paratiroid hormona ve kalsitonine karşı kemik tepkisini değiştirmektedir.

25

Rekombinant çözülebilir OPGL'nin ('sODF' olarak adlandırılmaktadır) bir konsantrasyondan bağlanması şeklinde kemik rezorpsiyonunu temin ettiği deneylerden, Tsukii ve meslektaşları OPGL'nin ('ODF' olarak adlandırılmaktadır), kemik mikroçevresinde kemik rezorpsiyonunda kritik bir rol oynaması ile sonuçlanmıştır. Deneyler, OPGL aktivitesinin, osteoprotegerin ('OPG'; 'OCIF' olarak adlandırılmaktadır) veya bir poliklonal anti-ODF antikoruna ile inhibe edilebildiğini ve OCIF ve poliklonal anti-ODF antikorunun, herhangi bir 1α , 25-dihidroksivitamin D₃, paratiroid hormonu veya prostaglandin E₂ ile indüklenen kemik rezorpsiyonunu bloke edilebildiğini göstermiştir (Tsukii, K., ve ark., (1998) Biochem. Biophys. Res. Comm., 246 : 337-341).

35

Nagai ve meslektaşları, ana malignan dokuların, şiddetli humoral hiperkalsemiye yol açtığı skuamöz hücreli karsinom hücre dizisinden OPGL'nin ('sODF/TRANSE' olarak adlandırılmaktadır) bir salgılanması, C-terminal formunu kodlayan bir yeni cDNA'yı izole etmiştir. Bu kanser hücreleri ile koşullandırılan ortam, insan ODF/TRANSE'ın hücre dışı alanına özgü tavşan poliklonal antikora reaksiyona giren proteini içermiştir ve bu koşullandırılan ortamda kültürlendiğinde, HL60 hücreleri (insan promiyeloblastik lösemi hücreleri), osteokast benzeri hücrelere farklılaşmıştır. Bu farklılaşma, tavşan poliklonal antikoru ile inhibe edilmiştir, bu da sODF/TRANSE'ın, malignitenin humoral hiperkalsemisinde gelişmiş kemik rezorpsiyonda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. (Nagai, M. ve ark., (2000) Biochem. Biophys. Res. Comm., 269 : 532-536).

Sitokinlerin TNF ailesinin bir elemanı olan osteoprotegerin ligand (OPGL), NF- κ B'nin reseptör aktivatörüne (RANK, aynı zamanda osteoklast farklılaşma ve aktivasyon reseptörü veya ODAR olarak adlandırılmaktadır) bağlanması vasıtasıyla osteoklastların oluşumunu arttırmaktadır. Öte yandan, osteoprotegerin (OPG), OPGL'yi ayırarak ve OPGL'nin ODAR ile birleşimini önleyerek osteoklastların oluşumunu inhibe etmektedir. Bu sebepten ötürü, ODAR ile birleşik OPGL miktarı kemik birikimi ve rezorpsiyonu arasındaki denge ile ilişkilidir.

İskeletin olgunlaşmasından sonra, iskelette bulunan kemik miktarı kemik oluşumunu ve kemik rezorpsiyonunun dengesini (veya dengesizliğini) yansıtmaktadır. Zirve kemik kütlesi, kırkıncı yıldan önce iskelet olgunlaşmasından sonra oluşmaktadır. Kırkıncı ve ellinci yıl arasında, denge değişmektedir ve kemik rezorpsiyonu baskın gelmektedir. İlerleyen yıllarda kemik kütlesindeki kaçınılmaz azalma, kadınlarda, erkeklerden daha önce başlamaktadır ve bazı kadınlarda (prensipten önce olarak Açık tenli ve Asya neslinden gelenler) menapozdan sonra belirgin bir şekilde hız kazanmaktadır.

Osteopeni, genellikle kemik kütlesinde, normal seviyelerin altında herhangi bir azalma ile ilişkili bir koşuldur. Bu tarz bir koşul, kemik sentezi oranında bir azalmadan veya kemik yıkım oranında bir artıştan veya her ikisinden kaynaklanabilmektedir. Yaygın bir osteopeni formu, postmenopozal ve senil osteoporoz olarak da adlandırılan birincil osteoporozdur. Bu osteoporoz formu, yaşla ilişkili evrensel kemik kaybının bir sonucudur ve genellikle kemik oluşumunun normal bir oranıyla kemik rezorpsiyonunda artışı bir sonucudur. Amerika Birleşik Devletleri'nde birçok beyaz kadın, semptomatik osteoporoz geliştirmektedir. 45 yaşında ve daha yaşlı kadınlarda osteoporoz ve kalça, femoral, boyun ve intertrokanterik kırılma vakaları arasında doğrudan bir ilişki mevcuttur. Yaşlı erkekler, 50 ve 70 yaşları arasında

semptomatik osteoporoz geliştirebilmektedir. Osteoporoz, belirli durumlarda, artan OPGL seviyelerinden veya aktivitesinden sonuçlanabilmektedir. Bu sebepten ötürü, osteoklastogenezde OPGL aktivitesini regüle edebilen moleküllere sahip olmak faydalı olacaktır.

5

Postmenopozal ve senil osteoporoza katkıda bulunabilen bir kaç faktör tanımlanmıştır. Yaşlanma ile beraber gelen hormon seviyelerinde değişimi ve kalsiyumun ve diğer minerallerin azalması bağırsak emilimine atfedilen yetersiz kalsiyum tüketimini içermektedir. Belirli tedaviler, süreci geciktirmek amacıyla hormon tedavisini veya diyet takviyelerini içermiştir. Son zamanlarda, bifosfonatlar ve seçici östrojen reseptörü modifiye edicileri (SERM'ler) gibi anti-rezorptif maddeleri, azaltılan kemik kütleinin önlenmesi ve tedavisi için ortaya çıkmıştır. Bu sebepten ötürü, belirli osteopenik rahatsızlıkların tedavisinde OPGL aktivitesini regüle edebilen moleküllerle bu tedavilerin birleştirilmesi için kullanılabilmektedir.

15

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Buluş, istemlere göre tanımlanmaktadır.

20

Burada tarif edilen ve/veya iddia edilen belirli yapılandırmalar, bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren bir antikorı sağlamaktadır burada ağır zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'de belirlenen bir amino asit sekansı veya bunların bir fragmanı içermektedir ve hafif zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunların bir fragmanı içermektedir.

25

Burada tarif edilen ve/veya iddia edilen belirli yapılandırmalar, bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren bir antikorı sağlamaktadır burada ağır zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir değişken bölgeyi içermektedir ve burada hafif zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir değişken bölgeyi içermektedir.

30

Burada tarif edilen ve/veya iddia edilen belirli yapılandırmalar, bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren bir antikorı sağlamaktadır burada ağır zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'de belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içermektedir.

35

Burada tarif edilen ve/veya iddia edilen belirli yapılandırmalar, bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren bir antikoru sağlamaktadır burada ağır zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir değişken bölgeyi içermektedir.

5

Burada tarif edilen ve/veya iddia edilen belirli yapılandırmalar, bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren bir antikoru sağlamaktadır burada hafif zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içermektedir.

10 Burada tarif edilen ve/veya iddia edilen belirli yapılandırmalar, bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren bir antikoru sağlamaktadır burada hafif zincir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir değişken bölgeyi içermektedir.

15 Belirli yapılandırmalarda, buluş, bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren bir antikoru sağlamaktadır (a) burada ağır zincir, bir birinci değişken bölgeyi içermektedir ve burada birinci değişken bölgeyi, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansı en az %90 benzerliğe sahip olan bir sekansı içermektedir ve (b) burada hafif zincir, bir ikinci değişken bölgeyi içermektedir ve burada ikinci değişken bölge, SEKANS KİMLİK NUMARASI:

20 14'te belirlenen amino asit sekansı en az %90 benzerliğe sahip olan bir sekansı içermektedir ve (c) antikor, bir osteoprotegerin liganda (OPGL) bağlanmaktadır Bu tarz belirli yapılandırmalarda, antikor, OPGL'ye bağlanmaktadır ve bir osteoklast farklılaşma ve aktivasyon reseptöre (ODAR) OPGL'nin bağlanması inhibe etmektedir, burada bir antikor fazlalığı bir *in vitro* rekabetçi bağlanma deneyinde ölçüldüğü gibi bağlantıyı en az %20 ile
25 azaltmaktadır

Bu tarz belirli yapılandırmalarda, birinci değişken bölge, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansı en az %95 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içermektedir ve ikinci değişken bölge, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansı en
30 az %95 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içermektedir.

Bu tarz belirli yapılandırmalarda, birinci değişken bölge, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansı en az %99 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içermektedir ve ikinci değişken bölge, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansı en
35 az %99 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içermektedir.

Buluşun belirli yapılarındakiler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'de belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir ağı zinciri sağlamaktadır. Buluşun belirli yapılarındakiler, bir değişken bölgeyi ve bir sabit bölgeyi içeren bir ağı zinciri sağlamaktadır, burada değişken bölge, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içermektedir.

Buluşun belirli yapılarındakiler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'de belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir hafif zinciri sağlamaktadır. Buluşun belirli yapılarındakiler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir hafif zinciri sağlamaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, tek zincirli antikorlar sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, tek zincirli Fv antikorlar sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, Fab antikorlar sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, Fab' antikorlar sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, (Fab')₂ antikorlar sağlanmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, burada tarif edilen ve/veya talep edilen bir antikor içeren farmasötik bir bileşim sağlanmaktadır. Belirli yapılarında, burada tarif edilen ve/veya talep edilen OPGL'ye karşı burada tarif edilen ve/veya talep edilen bir antikor içeren bir farmasötik bileşim sağlanmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, bir farmasötik bileşim, OPGL'ye karşı bir antikor ve bir kemik morfojenik faktöründen, dönüştürücü büyüme faktörü-β'dan (TGF-β), bir interlekin-1 (IL-1) inhibitöründen, IL-1ra Kineret™'den, bir TNFα inhibitöründen, bir çözülebilir TNFα reseptöründen, Enbrel™, bir anti-TNFα antikorundan, Remicade™, D2E7 antikorundan, bir paratiroid hormonundan, bir paratiroid hormonunun bir analogundan, bir paratiroid hormonu ile ilişkili proteinden, bir paratiroid hormonu ile ilişkili bir proteinin bir analogundan, bir prostaglandinden, bir bifosfonattan, bir alendronattan, florürden, kalsiyumdan, bir steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçtan (NSAID), bir COX-2 inhibitöründen Celebrex™, Vioxx™; bir immünoşüpresandan, metotreksattan, leflumidden, bir serin proteaz inhibitöründen, bir salgılayan lökosit proteaz inhibitöründen (SLPI), bir IL-6 inhibitöründen, IL-6'ya karşı bir antikordan, bir IL-8 inhibitöründen, IL-8'e karşı bir antikordan, bir IL-18 inhibitöründen, bir IL-18 bağlayıcı proteinden, bir IL-18 antikorundan, bir İnterlekin-1 dönüştürücü enzim (IC) modülatöründen, bir fibroblast büyüme faktöründen

(FGF), bir FGF modölatöründen, bir PAF antagonistinden, bir keratinosit büyüme faktöründen (KGF), bir KGF ile ilişkili bir molekülden, bir KGF modölatöründen; bir matris metaloproteinaz (MMP) modölatöründen, bir nitrik oksit sintaz (NOS) modölatöründen, glukokortikoid reseptörünün bir modölatöründen, glutamat reseptörünün bir modölatöründen, bir lipopolisakkarit (LPS) seviyelerinin bir modölatöründen, bir nöradrenalinden, bir nöradrenalin mimetikinden ve bir nöroadrenalin modölatöründen seçilen en az bir terapötik maddeyi içermektedir.

10 Buluşun belirli yönlerinde, bir osteopenik rahatsızlığın tedavisine yönelik olan, bir antikorun farmasötik olarak etkili bir miktarın uygulanmasını içeren bir yöntem sağlanmaktadır.
Buluşun belirli yönlerinde, bir osteopenik rahatsızlığın tedavisine yönelik olan, bir farmasötik bileşimin uygulanmasını içeren bir yöntem sağlanmaktadır

15 Buluşun belirli yönlerinde, bir hastada kemik kaybına eşlik eden bir inflamatuvar koşulun tedavisine yönelik olan, bir farmasötik bileşimin uygulanmasını içeren bir yöntem sağlanmaktadır

20 Buluşun belirli yönlerinde, bir hastada kemik kaybına eşlik eden bir otoimmün koşulun tedavisine yönelik olan, bir farmasötik bileşimin uygulanmasını içeren bir yöntem sağlanmaktadır

Buluşun belirli yönlerinde, bir hastada romatoid artrit tedavisine yönelik olan, buluşun bir farmasötik bileşiminin uygulanmasını içeren bir yöntem sağlanmaktadır

25 Buluşun belirli yönlerinde, bir biyolojik numunede OPGL seviyesinin tespit edilmesine yönelik olan, bir antikorla numunenin temasa geçirilmesini içeren bir yöntem sağlanmaktadır

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

30 Şekil 1, α OPGL-1 antikor ağı zincirini (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1) kodlayan bir cDNA sekansını göstermektedir. Şekil 2, α OPGL-1 antikor ağı zincirinin (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2) amino asit sekansını göstermektedir. Şekil 3, α OPGL-1 antikor hafif zincirini (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3) kodlayan bir cDNA sekansını göstermektedir. Şekil 4, α OPGL-1 antikor hafif zincirinin (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4) amino asit

sekansını göstermektedir. Şekil 5, α OPGL-1 kappa hafif zincir ekspresyon plazmidinin (α OPGL-1-Kappa/pDSRa19) bir şematik diyagramını göstermektedir.

Şekil 6, α OPGL-1 IgG2 ağır zincir ekspresyon plazmidinin (α OPGL-1-IgG2/pDSRa19) bir şematik diyagramını göstermektedir.

5 Şekil 7, OPGL-kaplı EIA plakalarla α OPGL-1'in doza bağımlı bağlantısını göstermektedir. Şekil 8, membrana bağlı OPGL'ye α OPGL-1'in spesifik bağlantısını göstermektedir. Şekil 9, çözülebilir OPGL ile OPGL-kaplı EIA plakalarla bağlanan α OPGL-1'in inhibisyonunu göstermektedir. Şekil 10, OPGL-kaplı EIA plakalarla α OPGL-1'in spesifik bağlantısını göstermektedir. Şekil 11, α OPGL-1 ile osteoklast oluşumunun doza bağımlı inhibisyonunu göstermektedir, Şekil 12, α OPGL-1 ile ODAR'a OPGL bağlantısının doza bağımlı inhibisyonunu göstermektedir.

Şekil 13, Sinomolgus Maymunlara α OPGL-1'in tek bir dozunun uygulanmasından sonra ortalama serum konsantrasyon süresi profillerini göstermektedir.

15 Şekil 14, Sinomolgus Maymunlara α OPGL-1'in tek bir dozunun uygulanmasından sonra serum N-Tx konsantrasyonunda ortalama yüzde değişimini göstermektedir.

Şekil 15, Sinomolgus Maymunlara α OPGL-1'in tek bir dozunun uygulanmasından sonra ürün N-Tx konsantrasyonunda ortalama yüzde değişimini göstermektedir.

20 Şekil 16, Sinomolgus Maymunlara α OPGL-1'in tek bir dozunun uygulanmasından sonra antikor pozitif ve negatif serum-konsantrasyon süre profillerini göstermektedir.

Şekil 17, α OPGL-1 antikor ağır zincirli değişken bölgesinin (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13) amino asit sekansını göstermektedir. Şekil 18, α OPGL-1 antikor hafif zincirli değişken bölgesinin (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14) amino asit sekansını göstermektedir. Şekil 19, α OPGL-1'in üretimine yönelik bir hücre kültürü sürecini göstermektedir.

25 Şekil 20, Sinomolgus Maymunlara α OPGL-1'in tek bir dozunun uygulanmasından sonra ürün serum kalsiyumun yüzde değişimini göstermektedir.

Şekil 21, Sinomolgus Maymunlara α OPGL-1'in tek bir dozunun uygulanmasından sonra ortalama serum Alkalın Fosfataz yüzde değişimini göstermektedir.

30 AYRINTILI AÇIKLAMA

Burada kullanılan bölüm başlıkları sadece düzenleyici amaçlar için teşkil etmektedir ve tarif edilen ana konuyu kapsayıcı olarak oluşturulmayacaktır.

35 Tanımlar

Standart teknikler, rekombinant DNA, oligonükleotid sentezi ve doku kültürü ve transformasyonu (ör. elektroporasyon, lipofeksiyon) için kullanılabilmektedir. Enzimatik reaksiyonlar ve saflaştırma teknikleri, teknikte ortak bir şekilde tamamlanmış veya burada tarif edildiği üzere imalatçıların tarifnamelerine göre uygulanabilmektedir. Teknikler ve prosedürler genellikle teknikte bilinen geleneksel yöntemlere göre ve mevcut tarifname boyunca alınmış yapıları ve açıklanan çeşitli genel ve daha spesifik referanslarda açıklandığı gibi uygulanabilmektedir. Bkz. örn. Sambrook ve ark. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Spesifik tanımlar sağlanmadıkça, analitik kimya, sentetik organik kimya ve tıbbi ve farmasötik kimya ile bağlantılı olarak kullanılan numaralandırma ve laboratuvar prosedürleri ve teknikleri, teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından iyi bilinenler ve teknikte yaygın olarak kullanılanlardır. Kimyasal sentezler, kimyasal analizler, farmasötik preparasyon, formülasyon ve iletim ve hastaların tedavisi için standart teknikler kullanılabilmektedir.

- 15 Mevcut buluşla uyumlu bir şekilde kullanıldığı üzere, aşağıdaki terimler, aksi belirtilmedikçe, aşağıdaki anlamlara gelecek şekilde anlaşılacaktır

Burada kullanıldığı üzere, "izole polinükleotid" terimi, "izole polinükleotidin" kaynağı yardımıyla (1) "izole polinükleotidinin" doğada bulunduğu bir polinükleotidin tümü veya bir bölümü ile ilişkilendirilmeyen, (2) doğada bağlanmayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlanan veya (3) daha geniş bir sekansın bir bölümü olarak doğada oluşmayan genomik, cDNA veya sentetik kaynağı veya bunların bazı kombinasyonları anlamına gelecektir.

Burada ifade edilen "izole protein" terimi, cDNA, rekombinant RNA veya sentetik kaynak veya bunların belirli bir kombinasyonu ile kodlanan, (1) normalde bulunacak olan en azından bazı proteinleri içermeyen, (2) esasen, örneğin aynı türde aynı kaynaktan gelen diğer proteini içermeyen, (3) farklı bir türden gelen bir hücre ile eksprese edilen veya (4) doğada olmayan bir protein anlamına gelmektedir.

30 "Polipeptit" terimi burada natif proteinleri veya natif sekansın bir veya birden fazla amino asidin delesyonuna, eklentisine ve/veya ikamesine sahip olan sekansları ifade edecek şekilde jenerik bir terim olarak kullanılmaktadır. "Polipeptit" terimi aynı zamanda, α OPGL-1'i (aşağıda açıklandığı üzere, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4) veya α OPGL-1'in bir veya birden fazla amino asidinin delesyonuna, eklentisine ve/veya ikamesine 35 sahip olan sekansları kapsamaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli

yapılanmalar, Şekil 2 (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2) ile temsil edilen insan ağı zincirli immünoglobulin molekülü ve Şekil 4 (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4) ile temsil edilen insan hafif zincirli immünoglobulin molekülü veya bunların fragmanları veya analogları içermektedir.

5

Burada bir nesneye uygulandığı gibi kullanılan "doğal yollarla oluşan" terimi, bir nesnenin, doğada bulunabildiği gerçeğini ifade etmektedir. Örneğin, doğadaki bir kaynaktan izole edilebilen ve laboratuvarı veya başka bir yerde bir kişi tarafından kasıtlı olarak değiştirilmemiş olan bir organizmada (virüsleri içermektedir) mevcut olan bir polipeptit veya polinükleotid sekansları doğal yollarla oluşmaktadır

10

Burada kullanılan "işlevsel olarak bağlı" terimi, amaçlanan şekilde bunların işlev göstermelerine izin verilen bir ilişkide olan bileşenleri ifade etmektedir. Örneğin, bir kodlama sekansına "işlevsel olarak bağlı" bir kontrol sekansı kodlama sekansının ekspresyonuna, kontrol sekansları ile uyumlu olan koşullar altında ulaşıldığı şekilde bağlanmaktadır

15

Burada kullanılan "kontrol sekansı" terimi, bağlandıkları kodlama sekanslarının ekspresyonunu ve işlenmesini etkileyebilen polinükleotid sekansları ifade etmektedir. Bu tarz kontrol sekansları yapıları konak organizmaya bağlı olarak farklı gösterebilmektedir.

20

Prokaryotların kontrol sekansları promoteri, ribozomal bağlantı bölgesini ve transkripsiyon sonlandırma sekansları içerebilmektedir; ökaryotların kontrol sekansları promoteri ve transkripsiyon sonlandırma sekansları içerebilmektedir; "kontrol sekansları" öncü sekansları ve/veya füzyon ortak sekansları içerebilmektedir.

25

Burada ifade edilen "polinükleotid" terimi, en az 10 baz uzunluğunda olan nükleotidlerin bir polimerik formu anlamına gelmektedir. Bazlar, ribonükleotidler veya deoksiribonükleotidler olabilmektedir veya her iki türde nükleotidin modifiye edilmiş bir formu olabilmektedir. Terim, DNA'nın tek ve çift sarmallı formları içermektedir.

30

Burada ifade edilen "oligonükleotid terimi", doğal yollarla oluşan ve doğal yollarla oluşan ve doğal yollarla oluşmayan oligonükleotid bağlantıları ile birlikte bağlanan modifiye edilmiş nükleotidler içermektedir. Oligonükleotidler, genellikle 200 baz veya daha az bir uzunluğu içeren bir polinükleotid alt kümesidir. Buluşun belirli yönlerinde, oligonükleotidler, 10 ila 60 baz uzunluğundadır ve oligonükleotidler, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, veya 20 ila 40 baz uzunluğundadır. Oligonükleotidler, örneğin bir gen mutantının yapısında kullanılmak için tek

35

sarmal veya çift sarmal olabilmektedir. Burada tarif edilen oligonükleotidler, yolcu veya rehber oligonükleotidleri olabilmektedir.

5 "Doğal yollarla oluşan nükleotidler" terimi, deoksiribonükleotidleri ve ribonükleotidleri içermektedir. Burada ifade edilen "modifiye edilmiş nükleotidler" terimi, modifiye edilmiş veya ikame edilmiş şeker grupları ve benzerine sahip nükleotidleri içermektedir. "Oligonükleotid bağlantıları" terimi, fosforotioat, fosforoditioat, fosforoselenoat, fosforodiselenoat, fosforoanilotiyoat, fosfoiladadat, fosforoamdat ve benzerleri gibi oligonükleotidlerin bağlantılarını içermektedir. Bkz. örn. LaPlanche ve ark. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec ve ark. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein ve ark. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon ve ark. Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon ve ark. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec ve ark. ABD Pat. No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Bir oligonükleotid, tespiti yönelik bir işareti içerebilmektedir.

İlişkili polipeptitlerin özdeşliği ve benzerliği hali hazırda bilinen yöntemlerle hesaplanabilmektedir. Bu yöntemler, kısıtlı olmayacak şekilde Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); ve Carillo ve ark., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) referanslarında açıklananları içermektedir.

Özdeşliğin belirlenmesi için tercih edilen yöntemler, test edilen iki sekans arasındaki en büyük eşleşmenin sağlanması için tasarlanmaktadır. Özdeşliğin belirlenmesine yönelik yöntemler, kamusal olarak mevcut bilgisayar programlarında açıklanmaktadır. İki sekans arasındaki özdeşliğin belirlenmesi için tercih edilen bilgisayar programları yöntemleri, kısıtlı olmayacak şekilde GAP (Devereux ve ark., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN ve FASTA (Altschul ve ark., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)) dahil GCG program paketini içermektedir. BLASTX programı Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezinden (NCBI) ve diğer kaynaklardan (BLAST Manual, Altschul ve ark. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul ve ark., *supra* (1990))

kamusal olarak elde edilebilmektedir. İyi bilinen Smith Waterman algoritması aynı zamanda özdeşliği belirlemek için kullanılabilmektedir.

İki amino asit sekansının hizalanmasıya yönelik belirli hizalama şemaları iki sekansın sadece küçük bir bölgesinin eşleştirilmesi ile sonuçlanabilmektedir ve bu küçük hizalanma bölgesi, iki tam uzunluğa sahip sekans arasında önemli bir fark olmamasına rağmen, oldukça yüksek bir sekans benzerliğine sahip olabilmektedir. Dolayısıyla, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, seçilen hizalama yöntemi (GAP programı) hedef polipeptidinin en az 50 bitişik amino asidini kapsayan bir hizalama ile sonuçlanacaktır

Örneğin, bilgisayar algoritması (GAP) (Genetics Computer Group, Wisconsin Üniversitesi, Madison, WI) kullanılarak, sekans yüzdesi özdeşliğinin belirleneceği iki polipeptit, ilgili amino asitlerin optimal eşleşmesi (algoritma ile belirlendiği üzere, "eşleşmiş açığı") için hizalanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bir boşluk açma cezası (3X ortalama köşegen olarak hesaplanmaktadır) "ortalama köşegen", kullanılan kıyaslama matrisinin köşegeninin ortalamasıdır "köşegen", özel kıyaslama matrisi ile eşleşen her bir mükemmel amino aside atanan skor veya sayı ve bir boşluk uzatma cezası (genellikle boşluk açma cezasının 1/10 katı) ve aynı zamanda PAM 250 veya BLOSUM 62 gibi bir kıyaslama matrisi, algoritma ile bağlantı olarak kullanılmaktadır. Belirli yapılandırmalarda, burada tarif edilen ve/veya talep edilen standart bir kıyaslama matrisi (bkz. PAM 250 kıyaslama matrisine yönelik Dayhoff ve ark., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3)(1978); BLOSUM 62 kıyaslama matrisine yönelik Henikoff ve ark., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 (1992)), algoritma vasıtasıyla da kullanılmaktadır

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bir polipeptit sekans kıyaslamasına yönelik parametreler, aşağıdakileri içermektedir:

Algoritma: Needleman ve ark., J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970); Kıyaslama matrisi: Henikoff ve ark., *supra* (1992) referansından BLOSUM 62; Boşluk Cezası: 12 Boşluk Uzunluğu Cezası: 4 Benzerlik Eşiği: 0

GAP programı yukarıdaki parametrelerle kullanılabilmektedir. Belirli yapılandırmalarda, yukarıda bahsi geçen parametreler, GAP algoritması kullanılarak polipeptit kıyaslamalarına (bitiş boşlukları için herhangi bir ceza olmadan) yönelik varsayılan parametrelerdir.

Burada kullanılan üzere, yirmi geleneksel amino asit ve bunların kısıtlı kullanımı takip etmektedir. Bkz. Immunology--A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Yirmi geleneksel amino asidin stereo izomerleri (ör. D-amino asitleri), α -, α -ikame edilmemiş amino asitler, N-alkil amino asitler, laktik asit gibi doğal olmayan amino asitler ve diğer geleneksel olmayan amino asitler de burada tarif edilen ve/veya talep edilen polipeptitlerin uygun bileşenleri olabilmektedir. Geleneksel olmayan amino asitlerin örnekleri, aşağıdakileri içermektedir: 4-hidroksiprolin, γ -karboksiglütamat, ϵ -N, N, N-trimetillizin, ϵ -N-asetillisin, O-fosfoserin, N-asetilserin, N-formilmetiyonin, 3-metilhistidin, 5-hidroksilisin, α -N-metilarginin ve diğer benzer amino asitler ve imino asitler (örn. 4-hidroksiprolin). Burada kullanılan polipeptit notasyonunda, standart kullanımla ve düzeneyle uyumlu bir şekilde sol yön, amino terminal yönüdür ve sağ yön, karboksil-terminal yönüdür.

Benzer bir şekilde, aksi belirtilmedikçe, tek sarmal polinükleotid sekansları sol ucu, 5'-uçtur; çift sarmal polinükleotid sekansları sol tarafta bulunan yönü, 5' yönü olarak ifade edilmektedir. Yeni RNA transkriptlerinin 5' ile 3' eklentisinin doğrultusu, transkripsiyon yönü olarak ifade edilmektedir; RNA ile aynı sekansa sahip olan ve RNA transkriptinin 5' ile 5' ucu olan DNA sarmal üzerinde bulunan sekans bölgeleri, "yukarı yönde sekanslar" olarak ifade edilmektedir; RNA ile aynı sekansa sahip olan ve RNA transkriptinin 3' ile 3' ucu olan DNA sarmal üzerinde bulunan sekans bölgeleri, "aşağı yönde sekanslar" olarak ifade edilmektedir.

Koruyucu amino asit ikameleri, tipik olarak biyolojik sistemlerde sentezle vasıtasıyla olmasından ziyade kimyasal peptit sentezi vasıtasıyla dahil edilen doğal yollarla oluşmayan amino asit kalıntıları kapsayabilmektedir. Bunlar, peptidomimetikleri ve amino asit parçalarını diğer tersine çevrilmiş veya sırası değiştirilmiş formları içermektedir. Doğal yollarla oluşan kalıntılar, yaygın yan zincir özelliklerine bağlı olarak sınıflara bölünebilmektedir:

- 1)hidrofobik: nörlösün, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2)nötr hidrofilik: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;
- 3)asidik: Asp, Glu;
- 4)bazik: His, Lys, Arg;
- 5)zincir yönlendirmesini etkileyen kalıntılar: Gly, Pro; and
- 6)aromatik: Trp, Tyr, Phe.

Örneğin, tutucu olmayan ikameler, bir diğer sözcük olan bir elemanın bu sözcüklerden bir tanesinin bir elemanı dönüşümünü içerebilmektedir. Bu tarz ikame edilmiş kelimeler, insan olmayan antikorlarla homolog olan insan antikoruun bölgelerine veya molekülün homolog olmayan bölgelerine dahil edilebilmektedir.

5

Bu tarz değişikliklerin yapılarında, amino asitlerin hidropatik endeksi göz önünde bulundurulabilmektedir. Her bir amino aside, hidrofobisite ve yük özelliklerinin temelindeki bir hidropatik endeks atanmıştır. Bunlar: İzolösin (+4.5); Valin (+4.2); Lösin (+3.8); Fenilalanin (+2.8); Sistein/Sistin (+2.5); Metiyonin (+1.9); Alanin (+1.8); Glisin (-0.4); Treonin (-0.7); Serin (-0.8); Triptofan (-0.9); Tirozin (-1.3); Prolin (-1.6); Histidin (-3.2); Glutamat (-3.5); Glutamin (-3.5); Aspartat (-3.5); Asparajin (-3.5); Lisin (-3.9) ve Arjinindir (-4.5).

10

Bir proteinde interaktif biyolojik işleve danışılmasında hidropatik amino asit endeksinin önemli genellikle teknikte anlaşılacaktır. Kyte ve ark., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Belirli amino asitlerin, benzer bir hidropatik endekse veya skora sahip olan diğer amino asitler için ikame edilebildiği ve hala, benzer bir biyolojik aktiviteyi tutabildiği bilinmektedir. Hidropatik endeksin esasında değişikliklerin oluşturulmasında, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, hidropatik endekslerin 62 içerisinde olduğu amino asitlerin ikamesi dahil edilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, 61 içerisinde bulunanlar dahil edilmektedir ve burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, 60.5 içerisinde bulunanlar dahil edilmektedir.

15

20

Bunun yanı sıra, benzer amino asitlerin ikamesinin, özellikle biyolojik olarak işlevsel proteinin veya bu şekilde oluşturulan peptidin, mevcut durumda olduğu gibi immünolojik yapılandırmalarda kullanımı için amaçlandırılmış hidrofobisite emeline etkili bir şekilde oluşturulabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bitişik amino asitlerinin hidrofobisitesi ile kapsandığı gibi bir proteinin en büyük lokal ortalama hidrofobisitesi, immunojenisite ve antigenisite ile, bir başka ifadeyle proteinin bir biyolojik özelliği ile ilgilidir.

30

Aşağıdaki hidrofobisite değerleri, bu amino asit kelimelerine atanmıştır: arjinin (+3.0); lisin (+3.0); aspartat (+3.0 $\pm$ 1); glutamat (+3.0 $\pm$ 1); serin (+0.3); asparajin (+0.2); glutamin (+0.2); glisin (0); prolin (-0.4); treonin (-0.5 $\pm$ 1); alanin (-0.5); histidin (-0.5); sistein (-1.0); metiyonin (-1.3); valin (-1.5); lösin (-1.8); izolösin (-1.8); tirozin (-2.3); fenilalanin (-2.5); ve triptofan (-3.4). Benzer hidrofobisite değerlerinin esasında değişikliklerin oluşturulmasında,

35

burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, hidrofilisite değerlerinin ± 2 içerisinde olduğu amino asitlerin ikamesi dahil edilmektedir, burada tarif edilen ve/veya talep edilen diğer yapılandırılmalarda, ± 1 içerisinde olanlar dahil edilmektedir ve burada tarif edilen ve/veya talep edilen diğer yapılandırılmalarda, ± 0.5 içerisinde olanlar dahil edilmektedir. Bir kişi, hidrofilisite temelinde birincil amino asit sekanslarından epitopları tanımlayabilmektedir. Bu bölgeler ayrıca "epitopik çekirdek bölgeler" olarak da ifade edilmektedir.

Örnek teşkil eden koruyucu amino asit ikameleri, Tablo 1'de belirlenmektedir.

Tablo 1: Amino Asit İkameleri

Orijinal Kalınlar	Örnek Teşkil Eden İkameler	Tercih Edilen İkameler
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norlösin	Leu
Leu	Norlösin, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino-butirik Asit, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norlösin	Leu

Teknikte tecrübe sahibi bir kişi, burada iyi bilinen teknikler kullanılarak belirlendiği gibi polipeptidin uygun varyantları belirleyebilecektir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, teknikte tecrübe sahibi kişi, aktivite için önemli olduğuna inanmayan bölgelerin hedef haline getirilmesi ile aktivite yok edilmeden değiştirilebilen molekülün uygun alanları belirleyebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir kişi, benzer polipeptitlerin arasında korunan moleküllerin

kalıntılarını ve bölümlerini belirleyebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, biyolojik aktivite veya yapı için önemli olabilen alanlar bile, biyolojik aktiviteyi yok etmeksizin veya polipeptit yapıyı olumsuz olarak etkilemeksizin koruyucu amino asit ikamelerine tabi olabilmektedir.

5

Ek olarak, teknikte tecrübe sahibi bir kişi, aktivite veya yapı için önemli olan benzer polipeptitlerde bulunan kalıntıları belirleyen yapı fonksiyon çalışmalarını inceleyebilmektedir. Bu tarz bir kıyaslamayı içinde, bir kişi, benzer proteinlerde aktivite veya yapı açısından önemli olan amino asit kalıntılarına tekabül eden bir proteinde amino asit kalıntılarının önemini tahmin edebilmektedir. Teknikte tecrübe sahibi kişi, bu tarz tahmin edilen önemli amino asit kalıntılarını kimyasal olarak benzer amino asit kalıntıları tercih edebilmektedir.

10

Teknikte tecrübe sahibi bir kişi, benzer polipeptitlerde bulunan yapıyla ilgili üç boyutlu yapı ve amino asit sekansını analiz edebilmektedir. Bu tarz bilgilerin içinde, teknikte tecrübe sahibi bir kişi, üç boyutlu yapıya göre bir antikorun amino asit kalıntılarının hizalanmasını tahmin edebilmektedir. Teknikte tecrübe sahibi kişi, bu tarz kalıntıları diğer moleküllerle önemli etkileşimlerin içerisine dahil edilebildikleri için, proteinin yüzeyinde tahmin edilecek olan amino asit kalıntılarına radikal değişikliklerin oluşturulmamasını seçebilmektedir. Dahası, teknikte tecrübe sahibi kişi, her bir istenilen amino asit kalıntısında tek bir amino asit ikamesini içeren test varyantlarını oluşturabilmektedir. Varyantlar, teknikte tecrübe sahibi kişilerce bilinen aktivite deneyleri kullanılarak görüntülenebilmektedir. Bu tarz varyantlar, uygun varyantlar hakkında olan bilgilerin bir araya getirilmesi için kullanılabilmektedir. Örneğin, birisinin, belirli bir amino asit kalıntısında yapılan bir değişimin, yok edilmiş, arzu edilmeyecek şekilde azaltılmış uygun olmayan aktivite ile sonuçlanmasında halinde, bu tarz bir değişimi kapsayan varyantlar önlenebilmektedir. Bir başka ifadeyle, bu tarz rutin deneylerden bir araya getirilen bilgilerin esasında, teknikte tecrübe sahibi kişi hali hazırda diğer ikamelerin tek başlarına veya diğer mutasyonlarla kombinasyon halinde engellenmesi gerektiği amino asitleri belirleyebilmektedir.

15

20

25

30

35

Belirli sayıda bilimsel yayınlar, ikincil yapıyı tahminine adanmıştır. Bkz. Moulton J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou ve ark., Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou ve ark., Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chou ve ark., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou ve ark., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 and Chou ve ark., Biophys. J., 26:367-384 (1979). Dahası, günümüzde ikincil yapıyı tahmin edilmesine yardımcı olması için bilgisayar programları temin edilebilmektedir. İkincil yapıyı tahmin

edilmesine dair bir yöntem, homoloji modellemesine dayanmaktadır. Örneğin, %30'dan daha büyük bir sekans özdeşliğine veya %40'dan daha büyük bir benzerliğe sahip olan iki polipeptit veya protein, benzer yapısal topolojilere sahiptir. Protein yapısal veri tabanında (PDB) son zamanlarda olan büyümesi, polipeptit veya protein yapıları içerisinde potansiyel kat sayıları dahil olmak üzere, ikincil yapıları geliştirmiş tahmin edilebilirliğini sağlamıştır. Bkz. Holm ve ark., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). Sunulan bir polipeptitte veya proteinde kat sayıları bir kriter olarak mevcut olması ve önemli sayıda yapılar çözüldüğünde, yapısal öngörünün çarpıcı olarak daha doğru hale geleceği önerilmiştir (Brenner ve ark., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)).

10

İkincil yapıları öngörülmesine dair ek yöntemler, "bağlantı" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl ve ark., Structure, 4(1):15-19 (1996)), "profile analysis" (Bowie ve ark., Science, 253:164-170 (1991); Gribskov ve ark., Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov ve ark., Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358 (1987)) ve "evrimsel bağlantı" (bkz. Holm, supra (1999) ve Brenner, supra (1997)) içermektedir.

15

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, antikor varyantları glikosilasyon alanları sayıları ve/veya türünün, ana bir polipeptitin amino asit sekansları ile kıyasla değiştirildiği glikosilasyon varyantları içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, protein varyantları natif proteinden daha fazla veya daha az sayıda N-bağlı glikosilasyon alanları içermektedir. Bir N-bağlı glikosilasyon bölgesi, aşağıdaki sekansla karakterize edilmektedir: Asn-X-Ser veya Asn-X-Thr, burada X olarak tasarlanan amino asit kalıntıları prolin haricinde herhangi bir amino asit kalıntısı olabilmektedir. Bu sekansın oluşturulmasına yönelik amino asit kalıntıları ikamesi, bir N-bağlı karbonhidrat zincirinin eklentisi için potansiyel yeni bir bölgesini sağlamaktadır. Alternatif olarak, bu sekansı elimine eden ikameler, N-bağlı karbonhidrat zincirinin var olması ortadan kaldıracaktır. Bunun yanı sıra, bir veya birden fazla N-bağlı glikosilasyon alanları (tipik olarak doğal yollarla oluşanlar) elimine edildiği ve bir veya birden fazla yeni N-bağlı alan oluşturulduğu N-bağlı karbonhidrat zincirlerinin tekrardan bir düzenlenmesi sağlanmaktadır. Ek tercih edilen antikor varyantları bir veya birden fazla sistein kalıntısı, ana amino asit kalıntısı ile kıyasla bir diğer amino asitten (ör. serin) silindiği veya bir diğer amino asit için ikame edildiği sistein varyantları içermektedir. Antikorlar, çözülme inelüzyon korları izolasyonundan sonrasında olduğu gibi, biyolojik olarak aktif bir uygunluğa tekrardan katlanmak durumunda olduğunda, sistein varyantları kullanılabilmektedir. Sistein varyantları genellikle natif proteinden daha az sistein kalıntısı sahiptir ve genellikle

30

35

eşleşmemiş sisteinlerden ortaya çıkan etkileşimleri minimize etmesi için eşit bir sayıda sahiptir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalara göre, amino asit ikameleri:

- 5 (1) proteolize olan duyarlılığı azaltan, (2) oksidasyona olan duyarlılığı azaltan, (3) protein komplekslerinin oluşturulması için bağlayıcı affiniteyi değiştiren, (4) bağlayıcı affiniteleri değiştiren ve/veya (4) bu tarz polipeptitlerde diğer fizyokimyasal veya işlevsel özellikleri sunan veya değiştiren ikamelerdir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalara göre, tek veya çok sayıda amino asit ikamesi (burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, koruyucu amino asit ikameleri), doğal yollarla oluşan sekansta (burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, moleküller arasında temasları oluşturan alanların dışında bulunan polipeptit bölümünde) oluşturulabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen bir koruyucu amino asit ikamesi terimi, tipik olarak ana sekansta yapısal özelliklerini büyük ölçüde değiştirmemelidir (ör. bir yedek amino asidin, 15 ana sekansta oluşan bir sarmal koparmaya veya ana sekansta karakterize edilen ikincil yapıları diğer türlerini bozmaya meyilli olmalıdır). Teknikte bilinen polipeptit ikincil ve üçüncül yapıları örnekleri, Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); ve Thornton ve ark. Nature 20 354:105 (1991) referansında tarif edilmektedir.

Burada kullanılan "polipeptit fragman", bir amino terminal ve/veya karboksi terminal delesyona sahip olan bir polipeptidi ifade etmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, fragmanlar, en az 5 ila 467 amino asit uzunluğundadır burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, fragmanların, en az 5, 6, 8, 10, 14, 20, 25 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 veya 450 amino asit uzunluğundadır

Peptit analoglar genellikle şablon peptidinkilere analog olan özelliklere sahip peptit olmayan ilaçlar olarak farmasötik endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu peptit olmayan bileşik türleri, 30 "peptit mimetikleri" veya "peptidomimetikler" olarak terimlendirilmektedir. Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); ve Evans ve ark. J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Bu tarz bileşikler genellikle bilgisayarla işlenmiş moleküler modelleme yardımıyla geliştirilmektedir. Yapısal olarak terapötik olarak kullanılan peptitlere benzer olan peptit mimetikleri, benzer bir terapötik veya profilaktik etkinin üretilmesi için 35 kullanılabilmektedir. Genellikle peptidomimetikler, insan antikoru gibi bir paradigma

polipeptidine (ör. biyo kimyasal bir özelliğe veya farmakolojik aktiviteye sahip olan bir polipeptit) yapısal olarak benzerdir, fakat teknikte iyi bilinen yöntemler ile $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-$ (cis ve trans), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ ve $-CH_2SO-$ 'dan oluşan gruptan seçilen bir bağlantı ile tercihe bağlı olarak değiştirilen bir veya birden fazla peptit bağlantısına sahiptir. Aynı türde bir D amino asit (ör. L-lizin yerine D-lizin) ile bir konsensüs sekansı bir veya birden fazla amino asidinin sistematik ikamesi, daha stabil proteinlerin üretilmesi için burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda kullanılabilmektedir. Ek olarak, bir konsensüs sekansı veya büyük ölçüde benzer konsensüs sekans varyantı içeren sınırlı peptitler, örneğin peptidi siklize eden intramoleküler disülfid köprülerini oluşturabilen dahili sistein kalıntıları ekleyerek, teknikte (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)) bilinen yöntemler ile üretilmektedir.

"Antikor" veya "antikor peptitleri", bir bozulmamış antikor veya bunun, bağlantıya özgü bozulmamış antikorla mücadele eden bir bağlantı fragmanı ifade etmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bağlantı fragmanları rekombinant DNA teknikleri ile üretilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bağlantı fragmanları bozulmamış antikorların enzimatik veya kimyasal bölünme ile üretilmektedir. Bağlantı fragmanları kesilemeyecek şekilde Fab, Fab', F(ab')₂, Fv ve tek zincirli antikorları içermektedir.

"Ağ zincir" terimi, bir OPGL'ye özgüllük kazandırmak için yeterli değişken bölge sekansına sahip herhangi bir polipeptidi içermektedir. "Hafif zincir" terimi, bir OPGL'ye özgüllük kazandırmak için yeterli değişken bölge sekansına sahip herhangi bir polipeptidi içermektedir. Tam uzunlukta ağ zincir, değişken bir bölge alanı (V_H) ve üç sabit bölge alanı (C_H1 , C_H2 ve C_H3) içermektedir. V_H alanı polipeptidin amino terminaldedir ve C_H3 alanları karboksit terminaldedir. Burada kullanılan "Ağ zincir" terimi, tam uzunlukta bir ağ zinciri ve bunun fragmanları kapsamaktadır. Tam uzunlukta bir hafif zinciri, bir değişken bölge alanı (V_L) ve bir sabit bölge alanı (C_L) içermektedir. Ağ zincire benzer olarak, hafif zincirin değişken bölge alanı polipeptidin amino terminalindedir. Burada kullanılan "hafif zincir" terimi, tam uzunlukta bir hafif zinciri ve bunun fragmanları kapsamaktadır. Bir Fab fragmanı bir hafif zincirden ve C_H1 'den ve bir ağ zincirin değişken bölgelerinden oluşmaktadır. Bir Fab molekülünün ağ zinciri, bir diğer ağ zincirli molekül ile bir disülfid bağlanamamaktadır. Bir Fab' fragmanı C_H1 ve C_H2 alanları arasında birden fazla sabit bölgeyi içeren bir hafif zinciri ve bir ağ zinciri içermektedir, bu şekilde bir zincir arasından disülfid bağ, bir F(ab')₂ molekülü oluşturmak için iki ağ zincir arasında oluşturulabilmektedir. Fv bölgesi, ağ ve

hafif zincirlerden değişken bölgeleri içermektedir, fakat sabit bölgelerden yoksundur. Tek zincirli antikolar, ağır ve hafif zincirli değişken bölgelerin, bir antijen bağlayıcı bölgeyi oluşturan tek bir polipeptit zincirini oluşturması için esnek bir bağlayıcı ile bağlandığı Fv molekülüdür. Tek zincirli antikolar, WO 88/01649 ve ABD 4,946,778 ve 5,260,203 Sayılı

5 Patent Dokümanlarında kapsamlı bir şekilde açıklanmaktadır

Bir "multispesifik" veya "multi işlevsel" antikordan başka bir bivalent antikoru, belirli yapılandırmalarda genellikle benzer bağlantı bölgelerinin hepsine sahip olduğu anlaşılmaktadır

10

Bir antikor fazlalığı, karşı reseptöre bağlanan reseptör miktarı (bir *in vitro* rekabetçi bağlama deneyinde ölçüldüğü gibi) yaklaşık %20, %40, %60, %80, %85 veya daha fazla oranla azaltıldığında bir antikor, bir reseptöre bir ligandı yapışması büyük ölçüde inhibe etmektedir.

15

"Epitop" terimi, bir immünoglobuline veya T-hücresi reseptörüne spesifik olarak bağlanabilen herhangi bir polipeptit determinantları içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, epitop determinantları amino asitler, şeker taraf zincirler, fosforil veya sülfonil gruplar gibi moleküllerin kimyasal olarak aktif yüzey grupları içerebilmektedir ve spesifik üç boyutlu yapısal özelliklere ve/veya spesifik yükleme özelliklerine sahip olabilmektedir. Bir epitop, bir antikor ile bağlanan bir antijen bölgesidir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bir antikoru, tercihe bağlı olarak proteinlerin ve/veya makromoleküllerin bir kompleks karşısında hedef antijenini tanıdığı bir antijeni spesifik olarak bağlandığı söylenmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bir antikoru, ayrışma sabiti ≤ 1 mM olduğunda, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, ayrışma sabiti ≤ 100 mM olduğunda ve burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, ayrışma sabiti ≤ 10 nM olduğunda bir antijeni spesifik olarak bağlandığı söylenmektedir.

20

30

Burada kullanılan üzere, "madde" terimi, kimyasal bir bileşiği, kimyasal bileşiklerin bir karşısında biyolojik bir makromolekülü veya biyolojik maddelerden oluşturulan bir ekstraktı belirtmektedir.

Burada kullanılan üzere, "işaret" veya "işaretli" terimleri, işaretlenmiş avidin ile (ör. optik veya kalorimetrik yöntemler ile tespit edilebilen floresan bir işaretleyiciyi veya enzimatik aktiviteyi içeren streptavidin) tespit edilebilen biyotinil parçaları bir polipeptidine radyo

35

işaretli amino asidin dahil edilmesi veya bağlantı sayesinde tespit edilebilir bir işaretleyicisinin dahil edilmesini ifade etmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, işaret veya işaretleyici de terapötik olabilmektedir. İşaretleyici polipeptitlerin ve glikoproteinlerin çeşitli yöntemleri teknikte bilinmektedir ve kullanılabilmektedir. Polipeptitlerin işaretlerinin örnekleri, kesin olmayacak şekilde aşağıdakileri içermektedir: radyoizotoplar veya radyonüklidler (ör. 3 H, 14 C, 15 N, 35 S, 90 Y, 99 Tc, 111 In, 125 I, 131 I), floresan işaretler (ör. FITC, rodamin, lantanid fosforlar) enzimatik işaretler (ör. yaban turbu peroksidaz, β -galaktosidaz, lusiferaz, alkalın fosfataz), kemilüminesan, biyotinil gruplar veya ikincil bir haberci (ör. lösin fermuar çifti sekansları, ikincil antikolar bağlayıcı bölgeleri, metal bağlayıcı alanlar, epitop etiketleri) ile tanımlanan önceden belirlenmiş polipeptit epitopları. Belirli yapılandırılmalarda, işaretler, potansiyel sterik engelin azaltılması için çeşitli uzunluklarda aralayıcı kollar ile bağlanmaktadır.

Burada kullanılan "biyolojik numune" terimi, kesin olmayacak şekilde, bir canlı varlıktan veya önceden canlı bir varlıktan alınan herhangi bir madde miktarını içermektedir. Bu canlı varlıklar, kesin olmayacak şekilde insanlar, fareler, maymunlar, sıçanlar, tavşanlar ve diğer hayvanları içermektedir. Bu maddeler, kan, serum, idrar, hücreler, organlar, dokular, kemik, kemik iliği, lenf düğümleri ve cildi içermektedir.

"Osteopenik rahatsızlık" terimi, kesin olmayacak şekilde osteoporoz, osteopeni, Paget hastalığı, litik kemik metastazlar, periodontitis, romatoid artrit ve immobilizasyona bağlı kemik kaybını içermektedir. Bu kemik rahatsızlıklarına ek olarak, belirli kanserlerin, osteoklast aktivitesini arttırarak meme, prostat ve multipl miyelom gibi kemik rezorpsiyonunu indüklediği bilinmektedir. Bu kanserler, kemikte OPGL'nin aşırı ekspresyonu ile sonuçlanan ve osteoklast sayısına ve aktivitesine yol açan faktörleri ürettiği bilinmektedir.

Burada kullanılan üzere, "farmasötik madde" veya "ilaç", bir hastaya uygun bir şekilde uygulandığında, istenilen bir terapötik etkiyi harekete geçirebilen bir kimyasal bileşiği veya bileşimi ifade etmektedir.

Burada kullanılan üzere, "modülatör" terimi, bir molekül aktivitesini veya işlevini değiştiren bir bileşiktir. Örneğin, bir modülatör, modülatör yokluğunda gözlemlenen aktivite veya işlev büyüklüğüne kıyasla bir molekülün belirli bir aktivitesinin veya işlevinin büyüklüğünde bir artışa veya azalmaya yol açabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir modülatör, bir molekülün en az bir aktivitesinin veya işlevinin

büyükliğini azaltan bir inhibitördür. Bir molekülün belirli örnek teşkil eden aktiviteleri ve işlevleri, kolay olmayacak şekilde bağlantıaffinitesini, enzimatik aktiviteyi ve sinyal iletimini içermektedir. Belirli örnek teşkil eden inhibitörler, kolay olmayacak şekilde proteinler, peptitler, antikorlar, peptit antikorlar, karbonhidratlar veya küçük organik molekülleri içermektedir. Peptikolar, örneğin WO01/83525 Sayılı Patent Dokümanında

Burada kullanılan üzere, "büyük ölçüde saf" terimi, mevcut baskı türlerdir (örn. bir başka ifadeyle, bir molar bazda, bileşimde herhangi bir diğer bireysel türden daha boldur). Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, büyük ölçüde saf bir molekül, nesne türlerinin, mevcut olan tüm makromoleküler türlerin en az %50'sini (molar bir bazda) içerdiği bir bileşimdir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, büyük ölçüde saf olan bir bileşim genellikle bileşimde mevcut olan tüm makromoleküler türlerin yaklaşık %80, %85, %90, %95 veya %99'dan daha fazlasını içerecektir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarında, nesne türleri, bileşimin esasen tek makromoleküler türlerden oluştuğu esas homojenliğe arz edilmektedir (kontaminant türleri, geleneksel tespit yöntemleri sayesinde bileşimde tespit edilememektedir).

Hasta terimi, insan ve hayvan denekleri içermektedir.

Mevcut başvuruda, tekil kullanımı aksi açıkça belirtilmedikçe çoğulu içermektedir. Mevcut başvuruda, aksi belirtilmedikçe "veya" kullanımı "ve/veya" anlamına gelmektedir. Dahası "içeren" terimi ve bunun yanı sıra, "içermektedir" ve "içermiştir" gibi diğer formlar kolay değildir. Aynı zamanda, "eleman" veya "bileşen" gibi terimler, elemanlar ve bir birimi ve elemanları içeren bileşenleri ve aksi açıkça belirtilmedikçe, bir alt birimden daha fazlasını içeren bileşenleri kapsamaktadır

Sitokinlerin tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin bir elemanı olan Osteoprotegerin Ligand (OPGL), osteoklastların oluşumunda yer almaktadır. Artan osteoklast aktivitesi, menopoza sonrası osteoporoz, Paget hastalığı, litik kemik metastaz ve romatoid artrit dahil bir dizi osteopenik rahatsızlıkla ilişkilidir. Bu şekilde, OPGL aktivitesinde olan bir azalma, osteoklast aktivitesinde bir azalmaya yol açabilmektedir ve osteopenik rahatsızlıkların şiddetini azaltabilmektedir. Buluşun belirli yapılarına göre, OPGL'ye yönlendirilen antikorlar, kolay olmayacak şekilde yukarıda bahsi geçenleri içeren osteopenik rahatsızlıkların tedavi edilmesi için kullanılabilmektedir.

Mevcut buluşun belirli yapılarındalarında, insan osteoprotegerin liganda (OPGL) karşı tamamen insan olan bir monoklonal antikor sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarındalar, ağır ve hafif zincirli immünoglobulin molekülleri kodlayan sekanslar ve bu molekülleri içeren amino asit sekansları özellikle değişken bölgelere tekabül eden sekansları içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarındalar, spesifik olarak CDR1 ile CDR3 arasından tamamlayıcı belirleyici bölgelere (CDR'leri) tekabül eden sekansları içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarındalara göre, bu tarz bir immünoglobulin molekülü ve monoklonal antikoru eksprese eden bir hibridom hücre dizisi de sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarındalarda, insan OPGL'ye karşı saflaştırılmış insan monoklonal antikor sağlanmaktadır.

Yapay maya kromozomlarında (YAC'ler) megabaz boyutlu insan lokusları klonlayabilme ve yeniden oluşturabilme ve bunları fare germ hattına dahil edebilme kabiliyeti, oldukça büyük veya kabaca eşleştirilmiş lokusların işlevsel bileşenlerini açığa kavuşturma ve insan hastaları kullanışlı modellerinin üretilmesi yaklaşımını sağlamaktadır. Dahası insan eşdeğerleri ile fare lokusları ikamesine yönelik bu teknolojinin kullanımı gelişimleri, diğer sistemlerle iletişim ve hastalığın indüksiyonunda ve ilerlemesinde dahil olmaları arasında insan gen ürünlerinin ekspresyonuna ve regülasyonuna benzersiz bilgiler sağlayabilmektedir.

Bu tarz bir stratejinin önemli bir pratik uygulaması fare humoral immün sisteminin "insanlaştırılması". İnsan immünoglobulin (Ig) lokuslarında, endojen Ig genlerinin etkisiz hale getirildiği farelere verilmesi, antikorların programlanmış ekspresyonunun altında yatan mekanizmaları ve antikorların tertibatı ve aynı zamanda B hücresi gelişiminde olan rollerini inceleme fırsatı sunmaktadır. Dahası bu tarz bir strateji, tamamen insan monoklonal antikorların (MAb'ler) üretimi için bir kaynak sağlayabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarındalarda, tamamen insan antikorlardan, fare veya fare türevi Mab'lere özgü immünojenik ve alerjik yanlıları minimize etmesi ve bu şekilde, uygulanan antikorların verimliliğini ve güvenliğini arttırması beklenmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılarındalar, tekrar eden antikor uygulamaları içerebilen, osteoporoz, inflamasyon, otoimmünite ve kanser gibi kronik ve nükseden insan hastalıklarının tedavisinde kullanıma yönelik tamamen insan antikorlarıdır.

Bir kişi, bu farelerin, fare antikorları yokluğunda insan antikorları üretmesi beklentisinde insan Ig lokusları büyük fragmanları ile fare antikorı üretiminde eksik fare suşları tasarlayabilmektedir. Büyük insan Ig fragmanları büyük değişken gen çeşitliliğini ve aynı zamanda antikor üretiminin ve ekspresyonunun uygun regülasyonunu koruyabilmektedir.

- 5 Antikor çeşitlendirmesi ve seçimi için fare makinesinden ve insan proteinlere immünolojik toleransı yoksunluğunu kullanarak, bu fare suşları da yeniden üretilmiş insan antikor repertuarı insan antijenleri dahil olmak üzere herhangi bir ilgili antijene karşı yüksek affiniteli antikorları sunabilmektedir. Hibridom teknolojisi kullanılarak, arzu edilen özgülüğü içeren antijene özgü insan MAb'ler üretilebilmekte ve seçilebilmektedir.

10

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bir kişi, insan değişken bölgeleri ile birlikte insan başka türlerden gelen sabit bölgeleri kullanabilmektedir.

Doğal Yollarla Oluşan Antikor Yapısı

15

Doğal yollarla oluşan antikor yapısal birimler tipik olarak bir tetrameri içermektedir. Her bir tetramer tipik olarak polipeptit zincirlerin iki özdeş çiftten oluşmaktadır; her bir çift, tam uzunlukta bir "hafif" (belirli yapılandırmalarda, 25 kDa) ve tam uzunlukta bir "aę" zincire (belirli yapılandırmalarda, yaklaşık 50-70 kDa) sahiptir. Her bir zincirin amino-terminal bölümü, yaklaşık olarak 100 ila 110 değişken bir bölgeye veya antijen tanımlanmasından birincil derecede sorumlu olan daha fazla amino asidi içermektedir. Her bir zincirin karboksi-terminal bölümü, tipik olarak efektör işlevinden sorumlu olabilen bir sabit bölgeyi belirlemektedir. İnsan hafif zincirleri, tipik olarak kappa ve lambda hafif zincirleri olarak sınıflandırılmaktadır. Aę zincirleri, mu, delta, gama, alfa veya epsilon olarak sınıflandırılmakta ve sıklıkla IgM, IgD, IgG, IgA ve IgE olarak antikor izotopunu belirlemektedir. IgG, kısıfı olmayacak şekilde IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 içeren çeşitli alt sınıflara sahiptir. IgM, kısıfı olmayacak şekilde IgM1 ve IgM2'yi içeren alt sınıflara sahiptir. IgA, kısıfı olmayacak şekilde IgA1 ve IgA2'yi içeren alt sınıflara benzer bir şekilde bölünmektedir. Tam uzunlukta hafif ve aę zincirler içerisinde, tipik olarak değişken ve sabit bölgeler, yaklaşık olarak 10 daha fazla amino asidin bir "D" bölgesini içeren aę zincir ile yaklaşık olarak 12 veya daha fazla amino asidin bir "J" bölgesi ile birleştirilmektedir. Bkz. örn. Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) Her bir hafif/aę zincir çiftinin değişken bölgeleri, tipik olarak antijen bağlama bölgesini oluşturmaktadır.

30

Değişken bölgeler tipik olarak, üç hiper değişken bölge ile birleştirilen, aynı zamanda tamamlayıcı belirleyici bölgeler veya CDR'ler olarak adlandırılan nispeten tutulmuş çerçeve bölgelerinin (FR) aynı genel yapıyı sergilemektedir. Her bir çiftin iki zincirinden CDR'ler, bir spesifik epitopa bağlanmaya izin verebilen çerçeve bölgeleri ile hizalanmaktadır. N-terminalinden C terminaline, hafif ve ağır zincirli değişken bölgeler, tipik olarak FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 ve FR4 alanları içermektedir. Her bir alana amino asitlerin atanması tipik olarak İlgili İmmünolojik Proteinlerin Katmanlı Dizilerinin Tanımları ile uyumludur (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), or Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia ve ark. Nature 342:878-883 (1989).

10

Bispesifik veya Çift İşlevli Antikorlar

Bispesifik veya çift işlevli antikor, iki farklı ağır/hafif zincir çiftlerine ve iki farklı bağlayıcı bölgeye sahip olan yapay bir hibrit antikordur. Bispesifik antikorlar, konsensüs olmayacak şekilde hibridomların füzyonu veya Fab' fragmanlarının bağlantı dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle üretilmektedir. Bkz. örn. Songsivilai & Lachmann Clin, Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny ve ark. J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

15

Antikorların Preparasyonu

Spesifik olarak OPGL'ye bağlanan belirli antikorlar, buluş tarafından kapsanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapıları ve/veya özelliklerinde, antikorlar, tam uzunlukta OPGL, OPGL'nin çözülebilir formları veya bunların bir fragmanını içeren immünizasyon ile üretilmektedir. Burada arif edilen ve/veya talep edilen belirli yapıları ve/veya özelliklerinde, buluşun antikorları poliklonal veya monoklonal olabilmektedir ve/veya rekombinant antikorlar olabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapıları ve/veya özelliklerinde, buluşun antikorları örneğin insan antikorları üretebilen transjenik hayvanların immünizasyonu ile hazırlanan insan antikorlarıdır (bkz. örneğin, PCT Yayınlanma WO 93/12227 Sayılı Başvuru).

20

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapıları ve/veya özelliklerinde, α OPGL-1'in hafif ve ağır zincirli değişken bölgelerin tamamlayıcı belirleyici bölgeleri (CDR'ler), aynı veya bir diğer türden çerçeve bölgelerine (FR'ler) aşılabilir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapıları ve/veya özelliklerinde, α OPGL-1'in hafif ve ağır zincirli değişken bölgelerin CDR'leri, konsensüs insan FR'lere aşılabilir. Konsensüs FR'lerin oluşturulması için, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapıları ve/veya özelliklerinde, çeşitli insan ağır zincirli veya hafif

30

35

zincirli amino asit sekanslarıdan FR'ler, bir konsensüs amino asit sekansından elde edilmek için hizalanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, α OPGL-1 ağı zincirin veya hafif zincirin FR'leri, farklı ağı bir zincirden veya hafif bir zincirden FR'lerle değiştirilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, α OPGL-1'in ağı ve hafif zincirlerinin FR'lerinde nadir amino asitler değiştirilmezken, FR amino asitlerin geri kalanı değiştirilmektedir. Nadir amino asitler, genellikle FR'lerde bulunmadıkları konumlarda bulunan spesifik amino asitlerdir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, α OPGL-1'den aşınmış değişken bölgeler, α OPGL-1'in sabit bölgesinden farklı olan bir sabit bölge ile kullanılabilir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, aşınmış bölgeler, tek zincirli bir Fv antikorunun bölümüdür. CDR aşınması örneğin ABD 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089 ve 5,530,101 Sayılı Patent Dokümanında açıklanmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalara göre, burada tarif edilen ve/veya talep edilen antikorlar, eklenen genomu içeren insan antikorunun önemli bir bölümüne sahip olan, endojen, mürin, antikorları üretiminde yetersiz kalan bir transjenik farenin kullanımı vasıtasıyla hazırlanmaktadır. Daha sonrasında, bu fareler, insan immünoglobulin molekülleri ve antikorları üretebilmektedir ve mürin immünoglobulin moleküllerin ve antikorları üretiminde yetersizdir. Bu sonuca ulaşılması için kullanılan teknolojiler, patentlerde, başvurularda ve burada tarifnamede tarif edilen referanslarda tarif edilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir kişi, PCT Yayınlanmış WO 98/24893 Sayılı Başvuruda tarif edilenler gibi yöntemleri kullanabilmektedir. Bkz. Mendez ve ark. Nature Genetics 15:146-156 (1997).

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalara göre, OPGL'ye özgü tamamen insan monoklonal antikorlar, aşağıdaki gibi üretilmektedir. İnsan immünoglobulin genleri içeren transjenik fareler, ilgili antijen ile immünize edilmektedir. Antikorları eksprese eden farelerden lenfatik hücreler (örneğin B-hücreleri) elde edilmektedir. Bu geri kazanılmış hücreler, ölümsüz hibridom hücre dizilerini hazırlamak için bir miyelom hücre dizisi ile kaynaştırılabilir ve bu hibridom hücre dizileri, ilgili antijene özgü antikorları üreten hibridom hücre dizilerini belirlemek için görüntülenmekte ve seçilmektedir. Buluşun belirli yapılandırmalarında, OPGL'ye özgü antikorları üreten bir hibridom hücre dizisinin üretimi sağlanmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, antikorlar, hibridom dizileri (AMG 6.1, AMG 6.4, AMG 6.5, AMG 7.1 ve AMG 7.2) ile üretilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, antikorlar, hibridom dizileri (AMG 6.1, AMG 6.4 ve AMG 6.5) ile üretilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, antikorlar, yaklaşık olarak 0.23 ve 0.29 nM arasında bir ayrışma sabiti (Kd) ile OPGL'ye bağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, antikorlar, 0.23 nM'den daha az bir Kd ile OPGL'ye bağlanmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, antikorlar, IgG2 izotipinden oluşmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, antikorlar, bir insan kappa hafif zinciri ve bir insan IgG2 ağır zinciri içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, antikorlar, memeli hücrelerde ekspresyon için klonlanmıştır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, antikorların değişken bölgeleri, IgG2 izotipi için sabit bölgeden başka bir sabit bölgeye bağlanmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, α OPGL-1'in ağır ve hafif zincirlerine tutucu modifikasyonlar (ve kodlayan nükleotidlere ilgili modifikasyonlar), α OPGL-1'inkilere benzer işlevse ve kimyasal özelliklere sahip olan OPGL'ye antikorlar üretecektir. Buna karşın, α OPGL-1'in işlevsel ve/veya kimyasal özelliklerindeki bu tarz büyük modifikasyonlar, (a) örneğin bir tabaka veya sarmal konformasyon olarak ikame alanındaki moleküler temelin yapısını, (b) hedef alanda molekülün yükünün veya hidrofobisitesinin veya (c) yan zincirin kütesinin sürdürülmesinde etkilerini önemli ölçüde değiştiren ağır ve hafif zincirlerin amino asit sekansındaki ikamelerin oluşturulması sayesinde tamamlanabilmektedir.

Örneğin bir "koruyucu amino asit ikamesi" terimi, ayrıca polaritede ufak bir etkiye sahip olduğu veya herhangi bir etkiye sahip olmadığı şekilde ve bu konumda amino asit kalıntısının yükünde ufak bir etkiye sahip olduğu veya herhangi bir etkiye sahip olmadığı şekilde natif olmayan bir kalıntı ile natif bir amino asit kalıntısının bir ikamesini içerebilmektedir. Dahası, polipeptitte herhangi bir natif kalıntı aynı zamanda alanin tarama mutagenezi için öncesinde açığa çıkması gibi alaninle de ikame edilebilmektedir.

İstenilen amino asit kalıntıları (koruyucu veya koruyucu olmayan), bu tarz ikamelerin arzu edildiği sürede teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından belirlenebilir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, amino asit ikameleri, α OPGL-1'in önemli

kalınlar belirlmek için ve burada tarif edilen OPGL'ye karşı antikoların affinitesini arttırmak veya azaltmak için kullanılabilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, antikolar, hibridom hücre dizilerinden başka hücre dizilerinde eksprese edilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, özel antikolar kodlayan sekanslar, bir uygun memeli konak hücresinin dönüşümü için kullanılabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, dönüşüm, örneğin bir virüste (veya bir viral vektöre) polinükleotidin paketlenmesi ve virüs (veya vektör) ile bir konak hücrenin iletilmesi dahil bir konak hücreye polinükleotidlerin dahil edilmesine yönelik herhangi bir bilinen yöntem vasıtasıyla veya ABD 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 ve 4,959,455 Sayılı Patent Dokümanı ile örneklendirildiği üzere teknikte bilinen transfeksiyon prosedürleri vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, kullanılan dönüşüm prosedürü, dönüştürülecek olan konağa bağlı olabilmektedir. Memeli hücrelere heterolog polinükleotidlerin dahil edilmesine yönelik yöntemler, teknikte iyi bilinmektedir ve kolay olmayacak şekilde, dekstran aracılı transfeksiyon, kalsiyum fosfat çöktürmesi, polibren aracılı transfeksiyon, protoplast füzyonu, elektroporasyon, lipozomlarda polinükleotidlerin enkapsülasyonu ve çekirdeklere DNA mikroenjeksiyonunun doğrudan yönlendirilmesini içermektedir.

Ekspresyona yönelik konaklar olarak mevcut olan memeli hücre dizileri, teknikte iyi bilinmektedir ve kolay olmayacak şekilde, Çin hamster yumurtalıkları (CHO) hücreleri, HeLa hücreleri, bebek hamster böbrek (BHK) hücreleri, maymun böbrek hücreleri (COS), insan hepatoselüler karsinoma hücreleri (ör. Hep G2) ve bir dizi diğer hücre dizilerini içeren Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) mevcut olan ölümsüz hücre dizilerini kolay olmayacak şekilde içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, hücre dizileri, hücre dizilerinin, yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olup olmadığı ve temel OPGL bağlama özellikleri ile antikoları üretip üretemediğinin belirlenmesi vasıtasıyla seçilebilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalara göre antikolar, biyolojik numunelerde OPGL'nin tespit edilmesi için kullanılır. Bu, proteini üreten hücrelerin veya dokuların tanımlanması olarak sağlamaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, OPGL'ye bağlanan ve diğer bağlayıcı bileşiklerle etkileşimi bloke eden antikolar, osteoklast farklılaşması ve kemik rezorpsiyonunun modüle edilmesinde

terapötik kullanıma sahip olabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, OGPL'ye karşı antikörler, ODAR'a bağlanan OPGL'yi bloke edebilmektedir, bu da sinyal iletim kaskadında bir blokla ve NF-kB aracılığıyla transkripsiyon aktivasyon kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Örneğin bir lusiferaz haberci deney kullanılarak NF-kB aracılığıyla transkripsiyon aktivasyonunun ölçülmesine yönelik deneyler, teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından bilinmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, OPGL'ye antikörün terapötik olarak etkili bir miktarının uygulanması içeren, bir kemik rahatsızlığının tedavisinde kullanılması için OPGL'ye karşı bir antikör sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, OPGL'ye antikörün terapötik olarak etkili bir miktarının uygulanması içeren, bir kemik rahatsızlığının tedavisinde kullanılması için OPGL'ye karşı bir antikör ve bir diğer terapötik madde sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, ek terapötik madde, terapötik olarak etkili bir miktarda uygulanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, kemik rahatsızlığına sebep olmayacak şekilde osteopeni ve osteolizi içeren bir net kemik kaybı ile karakterize edilen bir rahatsızlık. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bir kemik rahatsızlığının tedavisinde kullanılması için OPGL'ye karşı burada tarif edilen ve/veya talep edilen bir antikör, kemik rezorpsiyonunun oranını bastırmaktadır. Bu şekilde, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, tedavi, rezorpsiyon oranını, normalin üzerinde olduğu kemik rezorpsiyonunun oranını azaltabilmektedir veya kemik oluşumunun normal seviyelerinin altında olan seviyeleri telafi etmek için kemik rezorpsiyonunu normal seviyelerin altına azaltmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen antikörler, OPG yokluğunda veya mevcudiyetinde OPGL'ye bağlantısı için test edilebilmektedir ve OPGL-aracılığıyla osteoklastogenezi ve/veya kemik rezorpsiyonunu inhibe edebilme kabiliyetleri için incelenebilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalara göre tedavide kullanılması için antikörlerle tedavi edilebilen koşullar, olmayacak şekilde aşağıdakileri içermektedir:

Mayıncı olmayacak şekilde birincil osteoporoz, endokrin osteoporoz (örn. Mayıncı olmayacak şekilde hipertiroidizm, hiperparatiroidizm, Cushing sendromu ve akromegali dahil), kalıtsal ve konjenital osteoporoz formları (örn. Mayıncı olmayacak şekilde osteogenezis imperfecta, homosistinüri, Menkes sendromu, Riley-Day sendromu) ve ekstremitelerin immobilizasyonuna bağlı osteoporozu içeren osteoporoz; yetişkinlerde ve

erişkinlerde Paget kemik hastalığı (osteitis deformans); Osteomyelit, bir başka ifadeyle kemik kaybına yol açan, kemikte enfeksiyöz bir lezyon;

Kullanılmayacak şekilde katı tümörlerden (örn. göğüs, akciğer ve böbrek dahil) ve hematolojik maliniteler (kullanılmayacak şekilde, multipl miyelom, lenfoma ve lösemi dahil), idiyopatik hiperkalsemi ve hipertiroidizm ve renal işlev rahatsızlıkları ile ilişkili hiperkalsemiyi içeren hiperkalsemi.

Kullanılmayacak şekilde cerrahi sonrası osteopeni, steroid uygulama ile indüklenen osteopeni, ince ve kalın bağırsak rahatsızlıkları ile ilişkili osteopeni ve kronik hepatik ve renal hastalıklarla ilişkili osteopeniyi içeren osteopeni;

Kullanılmayacak şekilde travmatik yaralanma ile ilişkili osteonekroz, Gaucher hastalığı ile ilişkili osteonekroz, orak hücre anemisi ile ilişkili osteonekroz, sistemik lupus eritematozus ile ilişkili osteonekroz, romatoid artrit ile ilişkili osteonekroz, periodontal hastalıkla ilişkili osteonekroz, osteolitik metastaz ile ilişkili osteonekroz ve diğer koşullarla ilişkili osteonekrozu içeren osteonekroz, bir başka ifadeyle kemik hücresi ölümü; ve Romatoid artrit ile ilişkili kırılma ve eklem erozyonu kaybı

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikor, tek başına veya kemik rahatsızlıklarının tedavisi için en az bir ek terapötik madde ile kullanıma yöneliktir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikor, bir ek terapötik maddenin terapötik olarak etkili bir miktarla bağlantılı tedavide kullanıma yöneliktir. OPGL'ye karşı bir antikorla uygulanabilen, örnek teşkil eden terapötik maddeleri, kullanılmayacak şekilde BMP-1 ile BMP-12 arasında belirlenen kemik morfojenik faktörleri; dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve TGF- β aile elemanları; kullanılmayacak şekilde, IL-1a ve bunların türevleri ve Kineret™ dahil interlökin-1 (IL-1) inhibitörlerini; çözülebilir TNF α reseptörleri, Enbrel™, anti-TNF α antikorları, Remicade™ ve D2E7 antikorları dahil TNF α inhibitörleri; paratiroid hormon ve bunların analogları; paratiroid ile ilişkili protein ve analoglar; E serisi prostaglandinler; bifosfonatlar (örneğin alendronat ve diğerleri); florür ve kalsiyum gibi kemik geliştirici mineralleri; kullanılmayacak şekilde Celebrex™ ve Vioxx™ gibi COX-2 inhibitörleri dahil steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler); metotreksat veya leflunomid gibi immünosüpresanlar; kullanılmayacak şekilde, salgılayıcı ökosit proteaz inhibitörü (SLPI) dahil serin proteaz inhibitörleri; IL-6 inhibitörleri (kullanılmayacak şekilde IL-6'ya karşı antikorlar dahil), IL-8 inhibitörleri (kullanılmayacak şekilde, IL-8'e karşı antikorlar dahil); IL-18 inhibitörleri (kullanılmayacak şekilde IL-18 bağlama proteini ve IL-18 antikorları dahil); İnterlökin-1 dönüştürücü enzim (ICE) modülatörleri; FGF-1 ile FGF-10 arasında

fibroblast büyüme faktörleri ve FGF modülatörleri; PAF antagonistleri; keratinosit büyüme faktörü (KGF), KGF ile ilişkili moleküller ve KGF modülatörleri; matris metaloproteinaz (MMP) modülatörleri; kısımlayıcı olmayan şekilde indüklenebilir NOS modülatörleri dahil Nitrik oksit sintaz (NOS) modülatörleri; glukokortikoid reseptörün modülatörleri; glutamat reseptörünün modülatörleri; lipopolisakkarit (LPS) seviyelerinin modülatörleri; ve noradrenalin ve modülatörler ve bunların mimetikleri.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikor, çeşitli inflamatuvar koşulların, otoimmün koşulların veya kemik kaybının eşlik ettiği diğer koşulların tedavisi için özel terapötik maddelerle kullanıma yöneliktir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, koşul ve arzu edilen tedavi seviyesi açısından, iki, üç veya bundan fazla maddeler uygulanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bu maddeler, aynı formülasyonda dahil edilerek birlikte sağlanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bu maddeler ve bir antikor, aynı formülasyonda dahil edilerek birlikte sağlanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bu maddeler, bir tedavi kiti dahil edilerek birlikte sağlanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bu maddeler ve bir antikor, bir tedavi kitinde dahil edilerek birlikte sağlanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bu maddeler ayrı şekilde sağlanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir gen tedavisi ile uygulandığında, OPGL'ye karşı protein maddelerini ve/veya bir antikoru kodlayan genler, aynı vektörde dahil edilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı protein maddelerini ve/veya bir antikoru kodlayan genler, aynı promoter bölgenin kontrolü altında olabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı protein maddelerini ve/veya bir antikoru kodlayan genler, ayrı vektörlerde olabilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikor, en az bir interleukin-1 (IL-1) inhibitörle kombinasyon halinde tedaviye yöneliktir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir tedavi, burada tarif edilen ve/veya talep edilen OPGL'ye karşı bir antikoru ve bir IL-1 inhibitörünü ve burada açılan en az bir ek molekülü içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, burada tarif edilen ve/veya talep edilen bir antikor, IL-1 inhibitörleri ve/veya TNF- α inhibitörleri ile bağlantılı olan tedavide kullanıma yöneliktir. Burada tarif edilen ve/veya talep

edilen belirli yapılandırmalarda, burada tarif edilen ve/veya talep edilen OPGL'ye karşı bir antikör, astım, romatoid artrit ve multipl skleroz gibi koşulların tedavisine yönelik IL-1 inhibitörleri ve/veya TNF- α inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanıma yöneliktir.

- 5 İnterlökin-1 (IL-1), bir anti-inflamatuvar sitokindir. Belirli durumlarda, IL-1, bir çok hastalıkta ve tıbbi koşulda bir araçtır. Belirli durumlarda, IL-1, makrofaj/monosit lineajı hücreleri ile üretilmektedir. Belirli durumlarda, IL-1, iki formda üretilmektedir: IL-1 alfa (IL-1 α) ve IL-1 beta (IL-1 β).
- 10 Spontane veya deneysel hastalığın veya tıbbi koşulun, vücut sıvılarında veya dokusunda IL-1'in yüksek seviyeleri ile ilişkili olması halinde ve/veya vücuttan alınan hücrelerin veya dokuların, kültürde yükselmiş IL-1 seviyelerini üretmesi halinde, bir hastalık veya tıbbi koşulun, bir "interlökin-1 aracılı hastalık" olarak düşünülmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bu interlökin-1 aracılı hastalıklar da aşağıdaki ek iki
- 15 koşul ile tanımlanmaktadır (1) hastalıkta veya tıbbi koşulda ilişkili patolojik bulgular, IL-1'in uygulanması veya IL-1'in ekspresyonunun yukarı regülasyonu vasıtasıyla hayvanlarda deneysel olarak taklit edilebilmektedir; ve (2) hastalık veya tıbbi koşulun deneysel hayvan modellerinde indüklenen bir patoloji, IL-1'in eylemini inhibe eden maddelerle tedavi vasıtasıyla inhibe edilebilmekte veya engellenmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep
- 20 edilen belirli yapılandırmalarda, yukarıdaki bir veya birden fazla koşul, bir IL-1 aracılı hastalıkta karşılanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, tüm üç koşul, bir IL-1 aracılı hastalıkta karşılanmaktadır.

- Akut ve kronik interlökin-1 (IL-1) aracılı hastalıklar, karşılanmayacak şekilde aşağıdakileri
- 25 içermektedir: pankreas iltihabı; amiyotrofik lateral skleroz (ALS veya Lou Gehrig hastalığı); Alzheimer hastalığı; AIDS ile indüklenen kaşeksiyi dahil kaşeksi/anoreksi; astım ve diğer akciğer hastalıkları; ateroskleroz; otoimmün vaskülit; kronik yorgunluk sendromu; karşılanmayacak şekilde Klostridyum ile ilişkili diyare dahil Klostridyum ile ilişkili hastalıklar; karşılanmayacak şekilde konjestif kalp yetmezliği, koroner restenoz, miyokardiyal enfarktüs, miyokart disfonksiyonu (örn., sepsis ile ilişkili) ve koroner arter baypas grefti dahil
- 30 koroner koşullar ve endikasyonlar; karşılanmayacak şekilde multipl miyelom lösemi ve miyelojenöz (örn. AML ve CML) dahil karşılanmayacak şekilde lösemiler ve tümör metastazı dahil kanser; diyabet (karşılanmayacak şekilde insüline bağımlı diyabet dahil); endometriyoz; ateş; fibromiyalji; glomerulonefrit; graft versus host hastalığı ve/veya
- 35 transplant reddi; hemohorrajik şok; hiperaleji; inflamatuvar barsak hastalığı; karşılanmayacak

olmayacak şekilde osteoartrit, psoriatik artrit ve romatoid artrit dahil bir eklemin inflamatuvar koşulların kapsamı olmayacak şekilde örneğin, kornea transplantı ile ilişkili olanlar dahil inflamatuvar göz hastalıkları; kapsamı olmayacak şekilde serebral iskemi (kapsamı olmayacak şekilde, travma, epilepsi, hemoraj veya inmenin bir sonucu olarak beyin hasarı dahil, bunların her birisi nörodejenerasyona yol açabilmektedir) dahil iskemi; Kawasaki hastalığı; öğrenme bozukluğu; akciğer hastalıkları (kapsamı olmayacak şekilde, akut respiratuvar distres sendromu veya ARDS dahil); multipl skleroz; miyopati (örn. kapsamı olmayacak şekilde, sepsiste kas proteini metabolizması dahil); nörotoksisite (kapsamı olmayacak şekilde, HIV ile indüklenen bu koşul dahil); osteoporoz; kapsamı olmayacak şekilde kanser ile ilişkili ağrıyı içeren ağrı; Parkinson hastalığı; periodontal hastalık; erken doğum; sedef hastalığı; Reperfüzyon hasarı; septik şok; radyasyon tedavisinden yan etkiler; temporal mandibular eklem hastalığı; uyku bozukluğu; üveit; ve örneğin zorlanma, burkulma, kırılma, hasar, travma, ortopedik cerrahi, enfeksiyon veya diğer hastalık süreçlerinden kaynaklanan bir inflamatuvar koşul.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bir IL-1 inhibitörü, IL-1'e hücresele reseptörlerin aktivasyonunu spesifik olarak önleyebilen herhangi bir protein veya molekül olabilmektedir, bu da herhangi bir sayıda mekanizmadan kaynaklanabilmektedir. Örnek teşkil eden yapılandırmalar, kapsamı olmayacak şekilde IL-1 üretiminin aşağıya regüle edilmesini, serbest IL-1'in bağlanması, reseptöre bağlanan IL-1'e müdahale edilmesini, IL-1 reseptör kompleksinin oluşumuna (örn. IL-1 reseptör aksesuar proteini ile IKL-1 reseptörünün birleştirilmesine) müdahale edilmesini ve reseptörüne bağlanmasından sonra IL-1 sinyalinin modülasyonuna müdahale edilmesini içermektedir.

Belirli interlökin-1 inhibitörleri, kapsamı olmayacak şekilde kolektif olarak "IL-1ra proteinleri" olarak adlandırılan Kineret™, IL-1ra, IL-1ra varyantlar ve IL-1ra türevleri dahil IL-1 reseptör antagonistleri; anti-IL-1 reseptör monoklonal antikolar (bkz. örn. EP 623674); kapsamı olmayacak şekilde çözülebilir IL-1 reseptörler (bkz. örn. ABD 5,492,888 Sayılı Patent Dokümanı, ABD 5,488,032 Sayılı Patent Dokümanı ve ABD 5,464,937 Sayılı Patent Dokümanı, ABD 5,319,071 Sayılı Patent Dokümanı ve ABD 5,180,812 Sayılı Patent dokümanı) dahil IL-1 bağlama proteinleri; anti-IL-1 monoklonal antikolar (bkz. örn. WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, ABD 4,935,343 Sayılı Patent Dokümanı, EP 364778, EP 267611 ve EP 220063 Sayılı Patent Dokümanları) IL-1 reseptör aksesuar proteinleri ve buraya karşı antikolar (bkz. örn. WO 96/23067 ve WO 99/37773 Sayılı Patent Dokümanları) IL-1 beta üretimini ve salgılamasını inhibe etmesi için kullanılabilen interlökin-1 beta dönüştürücü enzimin (ICE) veya

kaspaz I'in inhibitörleri (bkz. örn. WO 99/46248, WO 99/47545 ve WO 99/47154 Sayı Patent Dokümanları) interlökin-1 beta proteaz inhibitörleri; ve *in vivo* sentezi veya IL-1'in hücre dışı salınımını bloke eden diğer bileşikler ve proteinleri kapsayacak şekilde içermektedir.

- 5 Örnek teşkil eden IL-1 inhibitörleri, örneğin ABD 5,747,444; 5,359,032; 5,608,035; 5,843,905; 5,359,032; 5,866,576; 5,869,660; 5,869,315; 5,872,095; 5,955,480; 5,965,564 Sayı Patent Dokümanları; Uluslararası (WO) 98/21957, 96109323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 98/17661, 97/08174; 95/34326, 99/36426, 99/36415 Sayı Patent
- 10 Başvuruları; Avrupa (EP) 534978 ve 894795 Sayı Patent Başvuruları; ve Fransız FR 2762514 Sayı Patent Başvurusunda tarif edilmektedir.

İnterlökin-1 reseptör antagonisti (IL-1ra), interlökin-1'in bir doğal inhibitörü olarak hareket eden bir insan proteindir ve IL-1 α ve IL-1'i içeren IL-1 ailesinin bir elemanıdır. IL-1ra ve varyantları içeren belirli reseptör antagonistleri ve bunların türevleri ve bunların oluşturulması ve kullanılması yöntemleri, ABD 5,075,222; WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93121946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828; ve WO 99/36541 Sayı Patent Dokümanlarında açıklanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapıları ve/veya kullanımlarında, bir IL-1 reseptör antagonisti, glikosile edilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapıları ve/veya kullanımlarında, bir IL-1 reseptör antagonisti, glikosile edilmeyebilmektedir.

15

20

IL-1ra'nın üç formu ve bunun varyantları, 5,075,222 Sayı Patent Dokümanında ('222 patent) açıklanmaktadır. '222 patentte "IL-1i" olarak adlandırılan birinci form, pH 7.6 Tris tamponu içerisinde yaklaşık 52 mM NaCl civarında bir Mono Q FPLC klonundan ayrılan 4.8 bir uygun izoelektrik noktasıyla SDS-PAGE'de bir 22-23 kD molekülü olarak karakterize edilmektedir. IL-1ra β olarak adlandırılan ikinci form, 48 nM NaCl'de bir Mono Q kolonundan ayrılan bir 22-23 kD proteini olarak karakterize edilmektedir. IL-1ra α ve IL-1ra β glikosile edilmektedir. IL-1rax olarak adlandırılan üçüncü form, 48 nM NaCl'de bir Mono Q kolonundan ayrılan ve glikosile olmayan bir 20 kD proteini olarak karakterize edilmektedir. '222 patent aynı zamanda inhibitörleri kodlayan genlerin izole edilmesine, bu genlerin uygun vektörlerde klonlanması, bu genlerin belirli hücre türlerine dönüştürülmesi ve transfekte edilmesi ve inhibitörleri üretmek üzere bu genlerin eksprese edilmesine yönelik belirli yöntemleri açıklamaktadır.

25

30

35

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, delesyonlar, eklemeler ve/veya ikameler (bireysel olarak veya kolektif olarak "varyantlar" olarak ifade edilmektedir), IL-1ra'nın amino asit sekansları içerisinde oluşturulmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir IL-1ra varyantı biyolojik olarak aktiftir (örn. IL-1'i inhibe edebilme kabiliyetine sahiptir).

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, en az bir TNF α inhibitörü ile kombinasyon halinde tedavide kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikör sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir tedavi, OPGL ve bir TNF α inhibitöre karşı bir antikoru ve burada açılan en az bir ek molekülü içermektedir.

Belirli hastalıklar ve tıbbi koşullar, TNF ile yönlendirilmektedir ve inflamatuvar koşullar olarak kategorize edilebilmektedir. Burada kullanılan üzere, bir "TNF-aracı hastalık", kısıtlı olmayacak şekilde vücut sıvılarında veya dokuda yüksek TNF seviyeleri ile ilişkili olan ve/veya vücuttan alınan hücrelerin veya dokuların, kültürde yüksek TNF seviyelerini ürettiği bir hastalık veya tıbbi koşulu içermektedir. Bir hastalık (1) hastalıkla veya tıbbi koşul ile ilişkili patolojik bulguların, IL-1'in uygulanması veya IL-1'in ekspresyonunun yukarı regülasyonu vasıtasıyla hayvanlarda deneysel olarak taklit edilebilmesi halinde; ve/veya (2) hastalık veya tıbbi koşulun deneysel hayvan modellerinde indüklenen bir patoloji, IL-1'in eylemini inhibe eden maddelerle tedavi vasıtasıyla inhibe edilebilmesi veya engellenebilmesi halinde bir TNF aracı hastalık olabilmektedir.

Belirli akut ve kronik TNF aracı hastalıklar, kısıtlı olmayacak şekilde: kaşeksi ve anoreksi; lösemi dahil kanser; kronik yorgunluk sendromu; kısıtlı olmayacak şekilde konjestif kalp yetmezliği, koroner restenoz, miyokard infarktüsü, miyokart disfonksiyonu (kısıtlı olmayacak şekilde, sepsis ile ilişkili bu koşul dahil) ve koroner arter baypas grefti dahil koroner koşullar ve/veya endikasyonlar; depresyon; erişkin başlangıç Tip 1 diyabet, diabetes mellitus ve insülin direnci dahil (kısıtlı olmayacak şekilde, obezite ile ilişkili insülin direnci dahil) diyabet; endometriozis, endometrit ve ilgili durumlar; fibromiyalji ve analjezi; greft ve host reddi; hiperaleji; kısıtlı olmayacak şekilde Crohn hastalığı ve Klostridyum difisil ilişkili diyare dahil inflamatuvar bağırsak hastalıkları; kısıtlı olmayacak şekilde serebral iskemide dahil, kısıtlı olmayacak şekilde travma, epilepsi, hemoraji ve/veya inmenin bir sonucu olarak beyin hasarına giren iskemide; kısıtlı olmayacak şekilde, yetişkin respiratuar distres sendromu, astım ve pulmoner fibroz dahil akciğer kanseri; multipl skleroz;

nöroinflamatuvar hastalıklar; kısıtlayıcı olmayacak şekilde korneal transplant, oküler dejenerasyon ve üveit dahil oküler hastalıklar ve koşullar; kısıtlayıcı olmayacak şekilde, kanser ile ilişkili ağrı dahil ağrı pankreas iltihabı periodontal hastalıklar; Pityriasis rubra pilaris (PRP); bakteriyel ve bakteriyel olmayan prostatit ve ilişkili koşullar dahil prostatit; 5 sedef hastalığı ve ilişkili koşullar; pulmoner fibroz; Reperfüzyon hasarı kısıtlayıcı olmayacak şekilde romatoid artrit, osteoartrit, erişkin artrit (kısıtlayıcı olmayacak şekilde, erişkin romatoid artrit dahil), seronegatif poliartrit, ankilozan spondilit, Reiter sendromu ve reaktif artrit, Still hastalığı, psoriatik artrit, enteropatik artrit, polimiyozit, dermatomiyozit, skleroderma, sistemik skleroz, vaskülit (örn. Kawasaki hastalığı), serebral vaskülit, Lyme 10 hastalığı, stafilokok kaynaklı ("septik") ") artrit, Sjögren sendromu, romatizmal ateş, polikondrit ve polimiyalji romatika ve dev hücreli arterit) dahil romatik hastalıklar; septik şok; radyasyon terapisinden yan etkiler; sistemik lupus eritematozus (SLE); temporal mandibular eklem hastalığı, tiroiditi; ve örneğin, incinme burkulma, kırılma hasarı travma, ortopedik cerrahi, enfeksiyon (örn., HIV, Klostridyum difisil ve ilgili türler) veya diğer hastalık 15 sürecinden ortaya çıkan doku transplantasyonu ve/veya bir inflamatuvar koşul.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, TNF inhibitörleri, TNF üretiminin aşağı regüle edilmesi veya inhibe edilmesi, serbest TNF'nin bağlanması reseptörüne bağlanan TNF'ye müdahale edilmesi ve reseptörüne bağlanmasından sonra TNF 20 sinyalinin modülasyonuna müdahale edilmesi arasından en az birisi ile hareket edebilmektedir. "TNF inhibitörü" terimi, kısıtlayıcı olmayacak şekilde çözülebilir tümör nekroz faktörü reseptör tip I (sTNF-RI; p55 reseptörü olarak da adlandırılmaktadır), çözülebilir tümör nekroz faktör reseptörü tip II (p75 reseptörü olarak da adlandırılmaktadır) ve Enbrel™ dahil çözülmüş TNF reseptörlerini; kısıtlayıcı olmayacak şekilde Remicade™ ve D2E7 (bkz. örn. 25 ABD 6,090,382 ve 6,258,562 Sayılı Patent Dokümanı) dahil TNF'ye karşı antikolar; TNF reseptörüne karşı antikolar; TNF-RI (bkz. örn. WO 98/24463), etanercept (Enbrel™), Avakine™; TNF-α dönüştürücü enzimin (TACE) inhibitörleri; ve TNF aktivitesini etkileyen diğer molekülleri içermektedir.

30 Örnek teşkil eden TNF-α inhibitörleri, örneğin Avrupa EP 308 378; EP 422 339; EP 393 438; EP 398 327; EP 412 486; EP 418 014, EP 417 563, EP 433 900; EP 464 533; EP 512 528; EP 526 905; EP 568 928; EP 607 776, which describes the use of leflunomide for inhibition of TNF-α; EP 663 210; EP 542 795; EP 818 439; EP 664 128; EP 542 795; EP 741 707; EP 874 819; EP 882 714; EP 880 970; EP 648 783; EP 731 791; EP 895 988; EP 550 376; EP 882 35 714; EP 853 083; EP 550 376; EP 943 616; EP 939 121; EP 614 984 ; EP 853 083 Sayılı

Patent Dokümanları'nda; ABD 5,136,021; 5,929,117; 5,948,638; 5,807,862; 5,695,953; 5,834,435; 5,817,822; 5,830,742; 5,834,435; 5,851,556; 5,853,977; 5,359,037; 5,512,544; 5,695,953; 5,811,261; 5,633,145; 5,863,926; 5,866,616; 5,641,673; 5,869,677; 5,869,511; 5,872,146; 5,854,003; 5,856,161; 5,877,222; 5,877,200; 5,877,151; 5,886,010; 5,869,660; 5,859,207; 5,891,883; 5,877,180; 5,955,480; 5,955,476; 5,955,435; 5,994,351; 5,990,119; 5,952,320; 5,962,481 Sayılı Patent Başvuruları'nda; Uluslararası WO 90/13575, WO 91/03553, WO 92/01002, WO 92/13095, WO 92/16221, WO 93/07863, WO 93/21946, WO 93/19777, WO 95/34326, WO 96/28546, WO 98/27298, WO 98/30541, WO 96/38150, WO 96/38150, WO 97/18207, WO 97/15561, WO 97/12902, WO 96/25861, WO 96/12735, WO 96/11209, WO 98/39326, WO 98/39316, WO 98/38859, WO 98/39315, WO 98/42659, WO 98/39329, WO 98/43959, WO 98/45268, WO 98/47863, WO 96/33172, WO 96/20926, WO 97/37974, WO 97/37973, WO 97/47599, WO 96/35711, WO 98/51665, WO 98/43946, WO 95/04045, WO 98/56377, WO 97/12244, WO 99/00364, WO 99/00363, WO 98/57936, WO 99/01449, WO 99/01139, WO 98/56788, WO 98/56756, WO 98/53842, WO 98/52948, WO 98/52937, WO 99/02510, WO 97/43250, WO 99/06410, WO 99/06042, WO 99/09022, WO 99/08688, WO 99/07679, WO 99/09965, WO 99/07704, WO 99/06041, WO 99/37818, WO 99/37625, WO 97/11668, WO 99/50238, WO 99/47672, WO 99/48491 Sayılı Patent Başvuruları'nda; Japon 10147531, 10231285, 10259140 ve 10130149, 10316570, 11001481 ve 127,800/1991 Sayılı Patent Başvuruları'nda; Alman 19731521 Sayılı Patent Başvuruları'nda; ve İngiliz 2 218 101, 2 326 881, 2 246 569 Sayılı Patent Başvuruları'nda açılmaktadır

EP 393 438 ve EP 422 339, kolektif bir şekilde "sTNFR'ler" olarak adlandırılan bir çözülebilir TNF reseptörü tip I (aynı zamanda sTNFR-I veya 30kDa TNF inhibitörü olarak bilinmektedir) ve bir çözülebilir TNF reseptörü tip II'nin (sTNFR-II veya 40kDa TNF inhibitörü olarak da bilinmektedir) amino asidini ve nükleik asit sekansları'na açıklamaktadır EP 393 438 ve EP 422 339 aynı zamanda, kısıyıcı olmayacak şekilde fragmanlar, işlevsel türevler ve varyantlar dahil modifiye edilmiş sTNFR-I ve sTNFR-II formları'na açıklamaktadır Dahası EP 393 438 ve EP 422 339, inhibitörleri kodlayan genlerin izole edilmesi, genlerin uygun vektörlere klonlanması, genlerin belirli hücre türlerine dönüştürülmesi veya transfekte edilmesi ve inhibitörleri üretmek üzere genlerin eksprese edilmesine yönelik yöntemleri açıklamaktadır

sTNFR-I ve sTNFR-II, sinir büyüme faktörü reseptörünü (NGF), B hücresi antijenini (CD40, 4-1BB), sıçan T hücresi antijenini (MRC OX40), fas antijeni ve CD27 ve CD30 antijenleri içeren reseptörlerin sinir büyüme faktörü/TNF reseptörü süper ailesinin elemanlarıdır (Smith ve ark.

(1990) Science, 248:1019-1023). Hücre yüzeyi reseptörlerinin bu grubunun korunan bir özelliği, iyi korunan konumlarda 4-6 sistein kalıntılarını içeren yaklaşık kırk amino asidin dört yinelenen motifine bölünebilen bir sistein açısından zengin hücre dışı ligand bağlama alanıdır (Smith ve ark. (1990), supra).

5

EP 393 438 Sayılı Patent Dokümanı tam uzunlukta rekombinant 40kDa TNF inhibitör proteininin tepesi kesik versiyonları olan bir 40kDa TNF inhibitörünü ($\Delta 51$) ve bir 40kDa TNF inhibitörünü ($\Delta 53$) öğretmektedir. $\Delta 51$ ve $\Delta 53$, olgun proteinin karboksil terminalinden silinmiş olan sırasıyla 51 veya 53 amino aside sahiptir.

10

Yayınlanmış PCT WO 98/01555 Sayılı Patent Başvurusu, dördüncü alanı içermeyen (sTNFR-I'nin amino asit kalıntılarını Thr^{127} - Asn^{161}) ve sTNFR-II'nin amino asit kalıntılarını (Pro^{141} - Thr^{179})); üçüncü alanın bir bölümünü (sTNFR-I'nin amino asit kalıntılarını (Asn^{111} - Cys^{126}) ve sTNFR-II'nin amino asit kalıntılarını (Pro^{123} - Lys^{140})); ve tercihe bağlı olarak, birinci alanın bir bölümünü (amino asit kalıntılarını (Asp^1 - Cys^{19} of sTNFR-I) ve amino asit kalıntılarını (Leu^1 - Cys^{32} of sTNFR-II)) içermeyen sTNFR-I ve sTNFR-II'nin tepesi kesik formlarını açıklamaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, tepesi kesik sTNFR'ler, formül (R_1 - $[\text{Cys}^{19}$ - $\text{Cys}^{103}]$ - R_2 ve R_4 - $[\text{Cys}^{32}$ - $\text{Cys}^{115}]$ - R_5) ile temsil edilen proteinleri içermektedir. Bu proteinler, sırasıyla sTNFR-I ve sTNFR-II'nin tepesi kesik formlarıdır.

20

Burada kullanıldığı üzere, " R_1 - $[\text{Cys}^{19}$ - $\text{Cys}^{103}]$ - R_2 ", bir veya birden fazla proteini temsil etmektedir, burada $[\text{Cys}^{19}$ - $\text{Cys}^{103}]$, 19 ila 104 sTNFR-I'dir, bunun sekansı WO 98/01555 Sayılı Patent Dokümanının Şekil 1'inde sağlanmaktadır burada R_1 , Cys^{19} 'un bir metiyonile veya metiyonile olmayan amine grubu veya Cys^{18} ile Asp^1 'den seçilen bir veya birden fazla amino-terminal amino asit kalıntılarını temsil etmektedir; ve burada R_2 , Cys^{103} 'nin bir karboksi grubunu veya Phe^{104} ile Leu^{110} arasından seçilen bir veya birden fazla karboksi-terminal amino asit kalıntılarını temsil etmektedir.

25

Mevcut buluşun örnek teşkil eden tepesi kesik sTNFR-I'ler, kesilmeden olmayacak şekilde metiyonile olan veya metiyonile olmayan sTNFR-I 2.6D/C105, sTNFR-I 2.6D/C106, sTNFR-I 2.6D/N105, sTNFR-I 2.3D/d8, sTNFR-I 2.3D/d18, sTNFR-I 2.3D/d15'i ve bunların varyantları ve türevlerini içermektedir. Belirli örnek teşkil eden tepesi kesik sTNFR-I'ler, yayınlanmış PCT WO 98/01555 Sayılı Patent Dokümanında açıklanmaktadır.

30

Burada kullanılabildiği üzere, "R₃-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₄", bir veya birden fazla proteini temsil etmektedir, burada [Cys³²-Cys¹¹⁵], sTNFR-II'nin Cys³² ile Cys¹¹⁵ kalıntılarıdır, bunun sekansı WO 98/01555 Sayılı Patent Dokümanının Şekil 8'inde sağlanmaktadır burada R₃, Cys³²'nin bir metiyonile veya metiyonile olmayan amine grubu veya Cys³¹ ile Leu¹'den seçilen bir veya birden fazla amino-terminal amino asit kalıntısını temsil etmektedir; ve burada R₄, Cys¹¹⁵'in bir karboksi grubunu veya Ala¹¹⁶ ile Arg¹²² arasından seçilen bir veya birden fazla karboksi-terminal amino asit kalıntısını temsil etmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPG'ye karşı bir antikor, en az bir serin proteaz inhibitörü ile kombinasyon halinde tedaviye yöneliktir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikor, burada açıklanan bir serin proteaz inhibitörü ve en az bir ek molekül ile kombinasyon halinde tedavide kullanıma yöneliktir.

Endojen proteolitik enzimler, işgalci organizmaların antijen-antikor komplekslerini ve artı gerekliliği veya kullanılabilmeyen belirli doku proteinlerini bozabilmektedir. Enfektif maddeler, organizmaya ek proteolitik enzimleri ekleyebilmektedir. Proteaz inhibitörleri, endojen ve işgalci proteolitik enzimleri regüle edebilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, doğal yollarla oluşan proteaz inhibitörleri, reaksiyonları lokal olarak ve geçici olarak kısıtlayarak endojen proteazların kontrol edilmesine hizmet etmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, proteaz inhibitörleri, enfektif maddelerle vücuda dahil edilen proteazları inhibe edebilmektedir. Belirli durumlarda, kısıtlayıcı olmayacak şekilde solunum yoluna ait olanları içeren, özellikle proteolitik saldırıya ve enfeksiyona meyilli olan dokular, proteaz inhibitörleri açısından zengindir.

Proteaz inhibitörleri, insan plazma proteinlerinin yaklaşık olarak %10'unu içermektedir. Bu kaynaktan en az sekiz inhibitör izole edilmiştir ve bunlar, literatürde karakterize edilmektedir.

Bunlar, kısıtlayıcı olmayacak şekilde alfa-2-makroglobulin (alfa 2M), alfa 1-proteaz inhibitörü (alfa 1PI), alfa 1-antikimotripsin (alfa 1Achy), alfa 1 antikolagenaz (alfa 1AC) ve inter-alfa-tripsin inhibitörü (I-alfa-I) içermektedir.

Belirli durumlarda, proteaz/proteaz inhibitörü dengesinin bozulması kısıtlayıcı olmayacak şekilde amfizem, artrit, glomerülonefrit, periodontitis, musküler distrofi, tümör invazyonu ve

diğer çeşitli patolojik durumlar içeren proteaz-aracılı doku yıkımına yol açabilmektedir. Belirli durumlarda, örneğin sepsis veya akut lösemi gibi çeşitli patolojik süreçlerde, mevcut serbest proteolitik enzim miktarı salgılayan hücrelerden enzim salınımından dolayı artabilmektedir.

Dahası belirli durumlarda, organizmanın bozulmuş regüle edici inhibitör kapasitesi aynı zamanda, proteaz/proteaz inhibitörü dengesinde değişimlere yol açabilmektedir. Bu tarz bozulmuş bir regüle edici inhibitör kapasitesinin kısıtlayıcı olmayan bir örneği, pulmoner enfizem gelişimi ile ilişkili bir alfa 1-proteaz inhibitörü eksikliğidir.

Belirli durumlarda, proteolitik enzimlerin kontrol edilmesi için önlemler alınmadıkça bu tarz anormal koşulların mevcut olduğu durumlarda organizmaya ciddi hasar gelebilmektedir. Bu şekilde, proteolitik enzimlerin kontrol edilmesi için bir organizmaya uygulanabilen proteaz inhibitörleri aranmıştır.

Lökosit elastaz, tripsin, katepsin G ve pankreatik elastaz, serin proteazlar olarak bilinen proteazların bir sınıfının kısıtlayıcı olmayan örnekleridir.

Belirli durumlarda, lökosit elastaz, hücre dışı olarak salındığında, bağ dokuyu ve diğer değerli proteinleri bozmaktadır. Normal olarak işlev gösteren bir organizma, belirli miktarda bağ dokuyu ve diğer proteinleri bozarken, aşırı miktarda lökosit elastaz mevcudiyeti, kısıtlayıcı olmayacak şekilde enfizem ve romatoid artrit dahil çeşitli patolojik koşullarla ilişkilendirilebilmektedir. Normalden daha büyük miktarlarda mevcut olduğunda lökosit elastazın etkilerini yok etmek için, lökosit elastaza özgü bir proteaz inhibitör aranmıştır. Bu tarz bir proteaz inhibitörü, saflaştırılmış bir formda ve farmasötik olarak kullanılan yeterli miktarlarda izole edilebilmeleri veya hazırlanabilmeleri halinde kullanılabilmektedir.

Belirli lökosit elastaz inhibitörleri, Schiessler ve ark., Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leucocytes’de “Acid-Stable Inhibitors of Granulocyte Neutral Proteases in Human Mucous Secretions: Biochemistry and Possible Biological Function” açıklanmaktadır. Havemann ve ark. (eds), Urban and Schwarzenberg, Inc. (1978), ve Travis and Salvesen’de, Ann. Rev. Biochem. 52: 655-709 (1983) referansında açıklanmaktadır.

Belirli durumlarda, tripsin, kısıtlayıcı olmayacak şekilde pankreatiti içeren çeşitli akut koşullar esnasında pankreatik doku gibi belirli yumuşak organ dokusunun bozulmasına başlatmaktadır. Bir tripsin inhibitörü, saflaştırılmış bir formda ve farmasötik olarak kullanılan yeterli miktarlarda izole edilebilmesi ve hazırlanabilmesi halinde kullanılabilmektedir.

Katepsin G, lökositlerde mevcut bir diğer proteazdır. Belirli yapılandırılmalarda, katepsin G, kompleman yoluna ait olanlar dahil çeşitli proteinleri *in vitro* olarak bozabilmektedir. Pankreatik elastaz, pankreatitte bir role sahip olabilen bir diğer proteazdır. Bu sebepten 5 ötürü, bu proteazların inhibitörleri, farmasötik değere de sahip olabilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, serin proteazların farklı inhibitörlerine sübstrat özgüllüğü ve hassasiyetinin, sadece bir kaç amino asit kalıntısında 10 değişimlerden meydana geldiğine inanılmaktadır. Kısa yoluyla, nispeten bir kaç amino asitte olan değişimin, farklı proteazların inhibisyonu ile sonuçlanacağı serin proteaz inhibitörlerin bir sınıfının tasarlanması mümkün olabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bu sınıfın bir elemanı her bir serin proteazı inhibe etmektedir.

Bir örnek teşkil eden serin proteaz inhibitörü, salgılayıcı lökosit proteaz inhibitörü (SLPI) ve 15 bunların fragmanları ve analoglarıdır. Örnek teşkil eden serin proteaz inhibitörleri aynı zamanda, kısıtlayıcı olmayacak şekilde anti-lökoroteaz (ALP), mukoza proteaz inhibitörü (MPI), insan seminal plazma inhibitörü-I (HUSI-I), bronşiyal mukus inhibitörü (BMI) ve servikal mukus inhibitörü (CUSH) içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir serin proteaz inhibitörü aynı zamanda LPS modülatörü olabilmektedir. 20 Bkz. örn. Jin ve ark. (1997), Cell 88(3): 417-26. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bu moleküller, tercihe bağlanarak kıkırdığa yönlendirildikleri için kemik kaybına yol açan koşullarda kullanılmak için uygundur.

Örnek teşkil eden serin proteaz inhibitörleri, örneğin US 4,760,130; US 5,900,400; ve US 25 5,633,227 Sayılı Patent Dokümanlarında açıklanmaktadır. Yukarıdaki referanslarda ve aynı zamanda, bunların herhangi bir varyantında veya analogunda tarif edilen moleküller, kolektif olarak "serin proteaz inhibitörleri" olarak adlandırılmaktadır.

IL-18, interferon- γ 'yi indüklediği keşfedilen ve faktörü (IGIF) indükleyen, öncesinde interferon 30 gama olarak adlandırılan bir pro-inflamatuvar sitokindir. Belirli durumlarda, IL-1'in, IL-18 üretimini yukarı regüle ettiği gösterilmiştir ve IL-18, IL-6 ve MMP-1 dahil bir dizi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indüklemektedir. Bkz. örn. Dinarello ve ark. (1998), J. Leukocyte Biol. 63: 658-64. Belirli durumlarda, kaspaz 1, IL-18 üretimi için de önemlidir. Deneyler aynı zamanda, TNF- α 'nın, IL-18 üretimini regüle ettiğini ve TNF- α ve IL-18'in eş

zamanlı inhibisyonunun, karaciğer toksisitesine kar  koruma yapt n  göstermektedir. Bkz.  rn. Faggioni ve ark. (2000), PNAS 97: 2367-72.

5 IL-18, IL-1 sisteminin hat lat s  olan bir reseptör sistemi vas as yla *in vivo* hareket etmektedir. IL-18, bir aksesuar proteini (IL-18RAcP) ile etkileşime geçen bir hücre yüzeyi reseptörü (IL-18R) ile etkileşime geçmektedir. IL-18-arac   sinyalle me, IL-18, IL-18R ve IL-18RAcP'nin kompleksinin oluşumuna ba lı  olarak ilerlemektedir. IL-18'in bir doğal inhibitörü, IL-18bp'dir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yap land r malarda, IL-18bp, I-18 moleküllerini ba layacak ve IL-18R etkileşimini önleyecek şekilde bir "sahte reseptör" olarak 10 hareket etmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yap land r malarda, OPGL'ye kar  bir antikor, en az bir IL-18 inhibitörü ile kombinasyon halinde tedavide kullan ma yöneliktir ve sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yap land r malarda, burada 15 a  lanan bir IL-18 inhibitör ve en az bir ek molekül ile kombinasyon halinde kullan ma yönelik OPGL'yi kar  bir antikor sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yap land r malarla uyumlu bir şekilde tedavi edilebilen örnek teşkil eden koşullar, k st lay c  olmayacak şekilde inflamasyon, otoimmün hastalıklar, IL-1 arac   hastalıklar ve TNF-arac   hastalıklar  i ermektedir. OPGL'ye kar  bir antikorla ve burada tarif edilen ve/veya 20 talep edilen belirli yap land r malara göre en az bir IL-18 inhibitörü ile tedavi edilebilen örnek teşkil eden koşullar, k st lay c  olmayacak şekilde romatoid artrit; sistemik lupus eritematozus (SLE); graft versus host hastal   (GvHD); hepatit; sepsis; ve bu hastalıklara eşlik eden kemik ve k k r dak kaybı dahil artriti içermektedir.

25  rnek teşkil eden IL-18 inhibitörleri, k st lay c  olmayacak şekilde IL-18'e ba lanan antikorlar  IL-18R'ye ba lanan antikorlar  IL-18RAcP'ye ba lanan antikorlar  IL-18bp; IL-18R fragmanlar  ( rn. IL-18 reseptörünün bir c z lm   hücre d   alan  ) IL-18'e ba lanan ve IL-18R ile etkileşimi azaltan veya önleyen peptitler; IL-18R'ye ba lanan ve IL-18 ile veya IL-18RAcP ile etkileşimi azaltan veya önleyen peptitleri; IL-18RAcP'ye ba lanan ve IL-18R ile 30 etkileşimi azaltan veya önleyen peptitler; ve IL-18 üretimini veya herhangi IL-18, IL-18R ve IL-18RAcP arasında etkileşimi azaltan veya önleyen küçük molekülleri içermektedir.

Belirli IL-18 inhibitörleri,  rne in 14 Temmuz 1994 tarihinde yay lanan US 5,912,324; yay lanan 8 Aralık 1999 tarihinde yay lanan EP 0 962 531; 15 Kasım 1994 tarihinde 35 yay lanan EP 712 931; 14 Temmuz yay lanan US 5,914,253; 10 Temmuz 1997 tarihinde

yayınlanan WO 97/24441; 9 Mayıs 2000 tarihinde yayınlanan US 6,060,283; 26 Aralık 1996 tarihinde yayınlanan EP 850 952; 16 Eylül 1998 tarihinde yayınlanan EP 864 585; 24 Eylül 1998 tarihinde yayınlanan WO 98/41232; 25 Nisan 2000 tarihinde yayınlanan US 6,054,487; 14 Ağustos 1997 tarihinde yayınlanan WO 99/37772; 20 Mart 1998 tarihinde yayınlanan WO 99/37773; 26 Ocak 2000 tarihinde yayınlanan EP 0 974 600; 9 Mart 2000 tarihinde yayınlanan WO 00/12555; 31 Ekim 1997 tarihinde yayınlanan Japon JP 111,399/94 Sayılı Patent Başvurusu; 8 Şubat 1998 tarihinde yayınlanan İsrail IL 121554 A0 Sayılı Patent Başvurusunda açıklanmaktadır

- 10 Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, inflamasyon için en az bir terapötik madde ile kombinasyon halinde tedavide kullanıma yönelik olan, OPGL'ye karşı bir antikor sağlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir immün rahatsızlığı için en az bir terapötik madde ile kombinasyon halinde tedavide kullanıma yönelik olan, OPGL'ye karşı bir antikor sağlanmaktadır. İnflamasyona ve immün
- 15 rahatsızlıklara yönelik örnek teşkil eden terapötik maddeler, kısıtlanmayacak şekilde prednisolon dahil kortikosteroidleri; siklooksijenaz tip 1 (COX-1) ve siklooksijenaz tip 2 (COX-2) inhibitörleri dahil steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler); metotreksat, hidroksiklorokin, klorokin, siklosporin, altı bileşikler (örneğin auranofin, aurotiomalat ve aurotiyoglukoz) ve leflunomid dahil hastalığı modifiye edici antirömatik ilaçlar (DMARD'lar);
- 20 kısıtlanmayacak şekilde Rolipram ve Pentoksifilin dahil tip IV fosfodiesteraz inhibitörleri; Tacrolimus (FK-506); Sirolimus (rapamisin); mikofenolik asit; kısıtlanmayacak şekilde Zileuton dahil 5-lipoksijenaz inhibitörleri; interlökin-6'nın (IL-6) modulatorleri; 38 kDa mitojeni aktif halde protein kinazı (p38-MAPK) küçük molekül modulatorleri; inflamasyon yollarında yer alan hücre içi moleküllerin küçük molekül modulatorlerini içermektedir, burada
- 25 bu hücre içi moleküller, kısıtlanmayacak şekilde jnk, IKK, NF-κB, ZAP70 ve Ick'yi içermektedir. İnflamasyona yönelik belirli örnek teşkil eden terapötik maddeler, C.A. Dinarello and L.L. Moldawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians Third Edition (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA referansında açıklanmaktadır. İnflamasyona ve otoimmün hastalıklara yönelik belirli örnek
- 30 teşkil eden terapötik maddeler, kısıtlanmayacak şekilde interferon gama (IFN-γ) modulatorleri; OX40/OX40L modulatorleri (OX40'ın çözünebilir formları dahil); 4-1 BB/4-1 BB ligandının modulatorleri (4-1BB'nin çözünebilir formları dahil); ve kısıtlanmayacak şekilde reseptör ligand çiftlerinin (CD28/B7, CD40/CD40L, ICOS/B7RP1 ve AGP-3/TACI/BAFFR) modulatorleri dahil (AGP-3, TACI ve BAFFR reseptörlerine bağlanmaktadır) B hücresi-T
- 35 hücresi yardımcı uyaran yolları modulatorlerini içermektedir. B hücresi-T hücresi eş uyaran

yolların belirli örnek teşkil eden örnekleri, kapsayıcı olmayan şekilde CD28, B7.1 ve B7.2 inhibitörleri (B7.1 veya B7.2'nin çözülebilir formları ve CTLA4'ün çözülebilir formları dahil, her ikisi de bozulmayacak azaltan veya önleyen ve/veya yaşamı arttıran, toksisiteyi azaltan, immünojenisiteyi azaltan veya çözülebilirlik veya dolaşım yaşamı arttırarak bir terapötik proteinin biyolojik aktivitesini arttıran bir heterolog peptide veya proteine kaynaşmış olabilmektedir); CD40 ve CD40L inhibitörleri (bir heterolog peptide veya proteine kaynaşmış olabilen CD40'ün çözülebilir formları dahil); ICOS ve B7RP1 inhibitörleri (bir heterolog peptide veya proteine kaynaşmış olabilen ICOS'un çözülebilir formları dahil); ve AGP-3, TACI ve BAFFR inhibitörlerini (TACI ve BAFFR'nin çözülebilir formları dahil) içermektedir. ICOS, B7RP1 ve bunların inhibitörleri, örneğin WO00/46240. AGP-3, TACI ve BAFFR'de açıklanmaktadır ve bunların inhibitörleri, WO00/47740, WO01/85872, WO02/15273, WO98/39361 ve von Bulow and Bram (1997) Science 278:138-140 referansında açıklanmaktadır

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, kapsayıcı olmayan şekilde malignan veya metastatik tümörlerin yol açtığı kemiğin osteolitik yıkımından ortaya çıkan kemik kaybı dahil kemik kaybının tedavi edilmesinde kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikor sağlanmaktadır Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, kanserle ilişkili kemik kaybının tedavi edilmesi için kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikor sağlanmaktadır Örnek teşkil eden kanserler, meme, prostat, tiroid, böbrek, akciğer, özofagus, rektal, mesane, servikal, yumurtalık ve karaciğer kanserleri ve aynı zamanda gastrointestinal yolu içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, kapsayıcı olmayan şekilde Hodgkin Hastalığı dahil multipl miyelom ve lenfomayı içeren belirli hematolojik maligniteler ile ilişkili kemik kaybının tedavi edilmesi için kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikor sağlanmaktadır

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, tedavide kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikor tek başına uygulanmaktadır Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, tedavide kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikor, kapsayıcı olmayan şekilde en az bir diğer kanser tedavi maddesi dahil en az bir diğer terapötik madde ile uygulanmaktadır Örnek teşkil eden kanser tedavi maddeleri, kapsayıcı olmayan şekilde radyasyon tedavisini ve kemoterapiyi içermektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, kemoterapi, aşağıdakilerden bir veya birden fazlasıyla tedaviyi içerebilmektedir: antrasiklinler, taksol, tamoksifen, doksorubisin, 5-florourasil ve teknikte bilinen diğer ilaçlar. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırmalarda, bir kanser tedavisi maddesi, bir lüteinizan hormon salgılatıcı hormon

(LHRH) antagonistidir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir LHRH antagonisti, bir peptit antagonistidir.

5 Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir LHRH antagonisti, peptidi içermektedir: Ac-D-Nal-4-Cl-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 20), burada Nal, 3-(2-naftil)alaninil; 4-Cl-Phe(4'-klorofenil)alaninildir; Pal, 3-(3'-piridil)alaninildir; ve Lys(iPr), N-epsilon-2-propil-lisinildir.

10 Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir LHRH antagonisti, bir LHRH antagonisti dekaeptittir. Örnek teşkil eden belirli dekaeptitler, örneğin US 5,843,901 Sayılı Patent Dokümanında açıklanmaktadır

15 Belirli yapılandırılmalara göre örnek teşkil eden terapötik antikörler, kullanılacak şekilde antikör kütüphanelerinin görüntülenmesi sayesinde seçilenler dahil fare, fare-insan kimerik, CDR-aşırıinsanlaştırılmış ve tamamen insan antikörleri ve sentetik antikörler içermektedir. Örnek teşkil eden antikörler, kullanılacak şekilde tümör hücrelerde mevcut hücre yüzey proteinlerine (Her2, CDC20, CDC33), müsin benzeri glikoproteine ve tümör hücrelerde epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) bağlananları içermektedir ve tercihe bağlı olarak, bu proteinleri gösteren tümör hücrelerde bir sitostatik ve/veya 20 sitotoksik etkiyi indüklemektedir. Örnek teşkil eden antikörler aynı zamanda meme kanserinin ve diğer kanser formlarının tedavi edilmesi için kullanılabilen HERCEPTIN™ (trastuzumab) ve non-Hodgkin lenfomanın ve diğer kanser formlarının tedavi edilmesi için kullanılabilen RITUXAN™ (rituksimab), ZEVALIN™ (ibritumomab tiuksetan) ve LYMPHOCIDE™ (epratuzumab) içermektedir. Belirli örnek teşkil eden antikörler aynı zamanda, ERBITUX™ 25 (IMC-C225), BEXXAR™ (iyodin 131 tositumomab) ve Campath'ı içermektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, kanser tedavi maddeleri, kullanılacak şekilde TNF ile ilişkili polipeptit TRAIL içeren tümör hücrelerde apoptozu seçici bir şekilde indükleyen polipeptitlerdir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikör, bir kanser tedavi maddesi ile tedaviden 30 öncesinde, kanser tedavisi ile birlikte ve sonrasında uygulanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, tedavide kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikör, metastatik kanser ile kemik kaybının başlangıcını profilaktik olarak önlemek veya gidermek için uygulanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli

yapılandırılmalarda, metastazdan dolayı kemik kaybının mevcut bir koşulunun tedavisi için kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikor sağlanmaktadır

5 Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, çoklu miyelom ile ilişkili kemik kaybını önlemek ve/veya tedavi etmek için ve/veya hastalığın kendisini önlemek ve/veya tedavi etmek için kullanıma yönelik OPGL'ye karşı bir antikor sağlanmaktadır. Multipl miyelom, önemli morbiditeyle ve/veya mortaliteyle sonuçlanabilen bir B hücreli türevi bir tümördür. Belirli durumlarda, multipl miyelomun bir klinik manifestasyonu, lokalize bölgelerde artan osteoklast aktivasyonundan kaynaklanabilen fokal kemik kaybıdır. Bir çok miyelom hastası radyolojik analiz ile görülebilen kemik kaybını yaşamaktadır ve iskelet ağrısından muzdarip olmaktadır. Belirli durumlarda, miyelom hastaları spontane bir şekilde veya yaralanmadan dolayı oluşabilen ilgili kemiğin patolojik kırılma riskine karşı hassastır. Belirli durumlarda, miyelom esnasında oluşan iskelet lezyonları sadece kemik kırılmalarına değil, aynı zamanda özellikle omurgada deformiteye ve bazen sinir sıkışmasına yol açmaktadır. Bazı hastalarda, serum kalsiyumda (hiperkalsemi) bir patolojik artış olmaktadır ve hastaların tedavisi esnasında önemli problemlere yol açabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, kemik rezorpsiyonunun azaltılması veya bloke edilmesi ve kalsiyumunun salınım şekliyle kullanımı için OPGL'ye yönelik olan, kırılma ve omurga deformite riskini azaltabilen bir antikor sağlanmaktadır.

20 Belirli durumlarda, miyelom hücreleri, kemik yıkımına doğrudan katkıda bulunmamaktadır, bunun yerine osteoklast farklılaşmasına ve aktivasyona yol açan hücre dışı sinyalleri üretmektedir. Belirli durumlarda, osteoklastlar, özellikle aktif hale getirildiklerinde yüksek sitokin IL-6 seviyelerini üretmektedir. IL-6, bir B-hücreli büyüme faktörüdür ve *in vitro* mürin ve insan miyelom hücrelerinin büyümesine katkı göstermektedir. Miyelom hücreleri aynı zamanda OPGL'yi doğrudan veya dolaylı olarak üretebilmektedir, bu da kemik iliği boşluklarında gömülü miyelom hücrelerini çevreleyen lokal kemik lizisi ile sonuçlanabilmektedir. Belirli durumlarda, miyelom hücrelerine bitişik normal osteoklastlar bu şekilde IL-6'yı üretmektedir, bu da tümör hücrelerinin lokal olarak genişlemesine yol açabilmektedir. Miyelom hücreleri, bir klonal modelde genişlemektedir ve uygun olmayan bir kemik rezorpsiyonu ile oluşturulan kemik aralıklarını işgal edebilmektedir.

Kemirgenlerde OPG uygulamasının, osteoklast popülasyonunun hızı ölümünü indüklediği gözlemlenmiştir (bkz. örn. Lacey ve ark. (2000) Am. J. Pathol. 157:435-448). Osteoklastların sayısındaki bir azalma, bu hücrelerle artan IL-6 üretiminin etkisini yok edebilmektedir ve bu

şekilde, trabeküler kemik içerisindeki miyelom hücrelerinin büyümesini ve sağkalımını etkileyebilmektedir. Bu sebepten ötürü, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir miyelom hastasında, OPGL'ye karşı bir antikorun uygulanması sadece hiper kemik rezorpsiyonunu değil, aynı zamanda tümörün kendi genişlemesini ve sağkalımını etkileyebilmektedir.

B-hücreleri, OPGL, ODAR'a yönelik reseptörü eksprese etmektedir. Miyelom hücreleri aynı zamanda ODAR'ı eksprese etmektedir ve ek olarak, OPGL'yi üretebilmektedir. Belirli durumlarda, aynı hücre popülasyonunda OPGL ve ODAR'ın ekspresyonu, miyelom hücresinin sağkalımını etkileyen bir otokrin uyarıcı olarak çalıştırabilmektedir. Bu sebepten ötürü, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikorun uygulanması miyelom hastalarında görülen tümör yükünün azaltıldığı veya elimine edildiği şekilde tümör hücresi sağkalımını azaltabilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, farmasötik olarak kabul edilebilir bir seyreltici, taşıyıcı, çözündürücü, emülsifiye edici, koruyucu ve/veya yardımcı ile birlikte OPGL'ye karşı terapötik olarak etkili bir antikor miktarı içeren farmasötik bileşimler sağlanmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikorun terapötik olarak etkili bir miktar ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir seyreltici, taşıyıcı, çözündürücü, emülsifiye edici, koruyucu ve/veya yardımcı ile birlikte en az bir ek terapötik maddenin terapötik olarak etkili bir miktarı içeren farmasötik bileşimler sağlanmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, en az bir ek terapötik madde, kısıtlayıcı olmayacak şekilde BMP-1 ile BMP-12 arasında belirlenen kemik morfojenik faktörleri; dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve TGF- β aile elemanları kısıtlayıcı olmayacak şekilde, IL-1ra ve bunların türevleri ve Kineret™ dahil interlökin-1 (IL-1) inhibitörleri; çözülebilir bir TNF α reseptörü, Enbrel™, anti-TNF α antikorları Remicade™ ve D2E7 antikorları dahil TNF α inhibitörleri; paratiroid hormon ve bunların analogları paratiroid ile ilişkili protein ve analogları E serisi prostaglandinler; bifosfonatlar (örneğin alendronat ve diğerleri); florür ve kalsiyum gibi kemik geliştirici mineraller; kısıtlayıcı olmayacak şekilde Celebrex™ ve Vioxx™ gibi COX-2 inhibitörleri dahil steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler); metotreksat veya leflunomid gibi immünosüpresanlar; kısıtlayıcı olmayacak şekilde, salgılayıcı lökosit proteaz inhibitörü (SLPI) dahil serin proteaz inhibitörleri; IL-6 inhibitörleri (kısıtlayıcı olmayacak şekilde IL-6'ya karşı antikorlar dahil), IL-8 inhibitörleri

(kısıtlı olmayacak şekilde, IL-8'e karşı antikorlar dahil); IL-18 inhibitörleri (kısıtlı olmayacak şekilde IL-18 bağlama proteini ve IL-18 antikorları dahil); İnterlökin-1 dönüştürücü enzim (ICE) modulatorleri; FGF-1 ile FGF-10 arasında fibroblast büyüme faktörleri ve FGF modulatorleri; PAF antagonistleri; keratinosit büyüme faktörü (KGF), KGF ile ilişkili moleküller veya KGF modulatorleri; matris metaloproteinaz (MMP) modulatorleri; kısıtlı olmayacak şekilde indüklenebilir NOS modulatorleri dahil Nitrik oksit sintaz (NOS) modulatorleri; glukokortikoid reseptörün modulatorleri; glutamat reseptörünün modulatorleri; lipopolisakkarit (LPS) seviyelerinin modulatorleri; ve noradrenalin ve modulatorler ve bunların mimetikleri arasından seçilmektedir.

10

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, kabul edilebilir formülasyon malzemeleri tercihen, kullanılan dozajlarda ve konsantrasyonlarda alıcıya toksik değildir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, farmasötik bileşim, örneğin pH, ozmolalite, viskozite, berraklık, renk, izotonisite, koku, sterillik, kararlılık, çözünme hızı veya bileşimin salınım süresini veya penetrasyonunun değiştirilmesi, sürdürülmesi veya engellenmesi için formülasyon malzemelerini içerebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, uygun formülasyon malzemeleri, kısıtlı olmayacak şekilde amino asitler (örneğin glisin, glutamin, asparagin, arjinin veya lisin); antimikrobiyaller; antioksidanlar (örneğin askorbik asit, sodyum sülfat veya sodyum hidrojen-sülfat); tamponlar (örneğin borat, bikarbonat, Tris-HCl, sitratlar, fosfatlar veya diğer organik asitler); hacim arttırıcı maddeler (örneğin mannitol veya glisin); kenetleme maddeleri (örneğin etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)); kompleksleştirici maddeler (örneğin kafein, polivinilpirrolidon, beta-siklodekstrin veya hidroksipropil-beta-siklodekstrin); dolgu maddeleri; monosakkaritler; disakkaritler; ve diğer karbonhidratlar (örneğin glukoz, mannoz veya dekstrinler); proteinler (örneğin serum albümini, jelatin veya immünoglobulinler); renklendirici, lezzet verici ve seyreltici maddeler; emülsifiye edici maddeler; hidrofilik polimerler (örneğin polivinilpirrolidon); düşük molekül ağırlıklı polipeptitler; tuz oluşturan karşıyonlar (örneğin sodyum); koruyucular (örneğin benzalkonyum klorür, benzoik asit, salisilik asit, timerosal, fenetil alkol, metilparaben, propilparaben, klorheksidin, sorbik asit veya hidrojen peroksit); çözücüler (örneğin gliserin, propilen glikol veya polietilen glikol); şeker alkolleri (örneğin mannitol veya sorbitol); askıda alma maddeleri; yüzey aktif maddeler veya stabilizatör maddeler (örneğin pluroniks, PEG, sorbitan esterleri, polisorbitat 20, polisorbitat 80, triton, trometamin, lesitin, kolesterol, tiloksapal gibi polisorbitatlar); stabilite arttırıcı maddeler (örneğin sukroz veya sorbitol); tonisite arttırıcı maddeler (örneğin alkali metal halitler,

35

tercihen sodyum veya potasyum klorür, mannitol sorbitol); teslimat araçları seyrelticiler; eksipiyenler ve/veya farmasötik yardımcı maddeleri içermektedir. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990). Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılarda, OPGL'ye karşı bir antikör ve/veya bir terapötik molekül, teknikte bilinen bir yarı ömrü uzatılacak şekilde taşıyıcıya bağlanmaktadır. Bu taşıyıcılar, kısıtlanmayacak şekilde Fc alanları polietilen glikolü ve dekstranları içermektedir. Bu taşıyıcılar, örneğin US 09/428,082 Seri Sayılı Patent Başvurusunda ve yayımlanan PCT WO 99/25044 Sayılı Patent Başvurusunda açıklanmaktadır.

- 10 Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılarda, optimal farmasötik bileşim, örneğin uygulamanın arzu edilen rotası, iletim formatı ve istenilen dozajı bağlanarak teknikte tecrübe sahibi kişi tarafından belirlenecektir. Bkz. örneğin *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılarda, bu tarz bileşimler, burada tarif edilen ve/veya talep edilen antikörlerin fiziksel durumunu, stabilitesini, *in vivo* salınım oranı ve *in vivo* klerens oranı etkileyebilmektedir.

- Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılarda, farmasötik bir bileşim üzerinde birincil taşıyıcı yapısal olarak sulu olabilmekte veya susuz olabilmektedir. Örneğin, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılarda, uygun bir taşıyıcı parenteral uygulamaya yönelik bileşimlerde yaygın diğer malzemeler ile desteklenmesi muhtemel olan enjeksiyona yönelik bir su, fizyolojik salin çözeltisi veya yapay beyin omurilik sıvısı olabilmektedir; nötr tamponlu salin veya serum albumin ile karıştırılmış salin aynı zamanda örnek teşkil eden taşıyıcılardır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılarda, farmasötik bileşimler, yaklaşık 7.0-8.5 pH Tris tamponunu veya yaklaşık 4.0-5.5 pH asetat tamponunu içermektedir ve ayrıca sorbitolü veya bunları uygun bir ikamesini içerebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılarda, en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı bir antikörü içeren bir bileşim, bir liyofilize kek veya bir sulu çözelti formunda tercihe bağlı formülasyon maddeleri (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) ile arzu edilen saflık derecesine sahip olan seçilmiş bileşim karıştırılarak depolama için hazırlanabilmektedir. Dahası, burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılarda, en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı bir antikörü içeren bir bileşim, sakaroz gibi uygun eksipiyenler kullanılarak bir liyofilizat olarak formüle edilebilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, burada tarif edilen ve/veya talep edilen farmasötik bileşimler, parenteral iletim için seçilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bileşimler, oral yolla olduğu gibi sindirim yolu vasıtasıyla solunum veya iletim için seçilebilmektedir. Bu tarz farmasötik olarak kabul edilebilir bileşimlerin preparasyonu, teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından bilinmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, formülasyon bileşenleri tercihen uygulama alanına için kabul edilebilir olan konsantrasyonlarda mevcuttur. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, tamponlar, tipik olarak yaklaşık 5 ila yaklaşık 8 aralığında bir pH aralığı içerisinde olmak üzere fizyolojik olarak pH'da veya hafifçe düşük olan bir pH'da bileşimin sürdürülmesi için kullanılmaktadır.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, parenteral uygulama tasarlandığında, bir terapötik bileşim, farmasötik olarak kabul edilebilir bir vehikülde ek terapötik maddelerle veya bu maddeler olmadan OPGL'ye karşı arzu edilen bir antikoru içeren pirojensiz, parenteral olarak kabul edilebilir sulu çözeltinin formunda olabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, parenteral enjeksiyonuna yönelik bir vehikül, en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı antikorun, uygun olarak korunmuş bir steril, izotonik çözelti olarak formüle edildiği steril distile sudur. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, preparasyon, bir depot enjeksiyon sayesinde iletilebilen ürünün kontrollü veya sürdürülen salınımını sağlayabilen enjekte edilebilir mikrosferler, biyo-aşındırılabilir tanecikler, polimerik bileşikler (örneğin, polilaktik asit ya da poliglikolik asit), tanecikler veya lipozomlar gibi bir madde ile istenilen molekülün formülasyonunu içerebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, hiyalüronik asit de kullanılabilmektedir ve dolaşımında sürdürülen sürecin arttırılmasına yönelik etkiye sahip olabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, implante edilebilir ilaç iletim cihazları istenilen moleküle dahil edilmesi için kullanılabilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, solunuma yönelik farmasötik bir bileşim formüle edilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı bir antikor, solunuma yönelik bir kuru toz olarak formüle edilebilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı bir antikoru içeren bir solunum çözeltisi,

aerosol iletimine yönelik bir püskürtücü ile formüle edilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, çözeltiler nebulize edilebilmektedir. Pulmoner uygulama, kimyasal olarak modifiye edilmiş proteinlerin pulmoner iletimi açığıklayan WO 94/20069 A1 olarak yayımlanan Uluslar Arası Patent Başvurusunda açıklanmaktadır

5

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, formülasyonlar oral olarak uygulanabildiği tasarlanmaktadır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı bir antikor, tabletler ve kapsüller gibi katı dozaj formların bileşik hale getirilmesinde geleneksel olarak kullanılan bu taşıyıcılarla veya taşıyıcılar olmadan formüle edilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, biyoyararlanma maksimuma çıkarıldığında ve pre-sistemik bozulma minimize edildiğinde, bir kapsül, gastrointestinal yolda bulunan noktada formülasyonun aktif bölümünün salınması için tasarlanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, en az bir ek madde, OPGL'ye karşı antikorun ve/veya herhangi bir ek terapötik maddenin absorpsiyonuna olanak sağlayacak şekilde dahil edilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, seyrelticiler, aromalar, düşük erime noktalı vakslar, bitkisel yağlar, yağlayıcılar, süspanse edici maddeler, tablet parçalayıcı maddeler ve bağlayıcılar da kullanılabilmektedir.

20

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir farmasötik bileşim, tabletlerin üretimi için uygun olan, toksik olmayan eksipyanlarla bir karışıkda en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı etkili miktarda antikorlar içerebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, steril suda veya bir diğer uygun vehikülde tabletler çözünerek, çözeltiler, birim doz formunda hazırlanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, uygun eksipyanlar, karışık olmayacak şekilde kalsiyum karbonat, sodyum karbonat veya bikarbonat, laktoz veya kalsiyum fosfat gibi inert seyrelticileri; veya nişasta, jelatin veya akasya gibi bağlayıcı maddeleri; veya magnezyum stearat, stearik asit veya talk gibi yağlayıcı maddeleri içermektedir.

30

Ek farmasötik bileşimler, sürekli veya kontrollü iletim formülasyonlarında en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı antikorlar içeren formülasyonlar dahil edilmesi, teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından anlaşılacaktır

35

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, lipozom taşıyıcılar, biyolojik

olarak aşılabilir mikropartiküller veya gözenekli tanecikler ve depot enjeksiyonlar gibi diğer çeşitli sürekli veya kontrollü iletim araçları formüle edilmesine yönelik teknikler de teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından bilinmektedir. Bkz. örneğin, WO 93/15722 A1 olarak yayımlanan PCT başvurusu, farmasötik bileşimlerin iletimleri için gözenekli polimerik mikro partiküllerin kontrollü salınımına ilişkin olarak. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, yavaş salınım preparasyonları, örneğin filmler veya mikro kapsüller gibi şekilli maddelerin formunda yarı geçirgen polimer matrisleri içerebilmektedir. Sürekli salınım matrisleri, poliesterler, hidrojel, polilaktitler (U.S. 3,773,919 ve EP 058,481), L-glutamik asidin ve gama etil-L-glutamatın kopolimerleri (Sidman ve ark., Biopolymers, 22:547-556 (1983)), poli (2-hidroksietilmetakrilat) (Langer ve ark., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) and Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)) etilen vinil asetat (Langer ve ark., *supra*) veya poli-D(-)-3-hidroksibutirik asidi (EP 133,988) içerebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, sürekli salınım bileşimleri ayrıca teknikte bilinen çeşitli yöntemlerin herhangi birisi ile hazırlanabilen lipozomları içerebilmektedir. Bkz. 15 örn. Eppstein ve ark., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); EP 036,676; EP 088,046 ve EP 143,949.

In vivo uygulama için kullanılacak olan farmasötik bileşim genellikle sterildir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bu, steril filtrasyon membranları 20 boyunca filtrasyon vasıtasıyla tamamlanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bileşimin liyofilize olduğu yerde, liyofilizasyon ve sulandırma öncesi veya sonrasında bu yöntem kullanılarak sterilizasyon uygulanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, parenteral uygulamaya yönelik bileşimler, liyofilize formda veya bir çözeltide depolanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir intravenöz çözelti poşeti gibi bir steril erişim yuvasına 25 sahip olan bir kaba veya bir hipodermik enjeksiyon iğnesi ile delinebilen bir stopere sahip olan ilaç şişesine konulabilmektedir.

Buradatarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, farmasötik bileşim formüle edildiğinde, bir çözelti, süspansiyon, jel, emülsiyon, katı olarak veya dehidre veya liyofilize toz 30 olarak steril şişelerde depolanabilmektedir; bu formülasyonlar, bir kullanıma hazır formda veya uygulamadan önce yeniden oluşturulan bir formda (örn. liyofilize) depolanabilmektedir.

Buradatarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir tek dozlu uygulama 35 biriminin üretilmesine yönelik kitler sağlanmaktadır; her bir kit, bir kurutulmuş proteine sahip

olan bir birinci kabı ve bir sulu formülasyona sahip olan bir ikinci kabı içerebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, tek ve çok hazneli önceden doldurulmuş şişeler içeren kitler (örn., sırt şişeler ve liyos şişeler) sağlanmaktadır.

- 5 Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, en az bir ek terapötik madde ile veya madde olmadan, OPGL'ye karşı bir antikoru içeren, terapötik olarak kullanılacak olan etkili bir farmasötik bileşim miktarı (örneğin terapötik bağlama ve amaçlara bağlı olacaktır). Teknikte tecrübe sahibi kişi, tedavi için uygun olan dozaj seviyelerinin, iletilen moleküle, en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı antikorun kullanıldığı endikasyona, uygulama yoluna ve hastanın boyutuna (vücut ağırlığı, vücut yüzeyi veya organ boyutu) ve/veya koşuluna (yaş ve genel sağlığı) bağlı olarak değişkenlik gösterecek olması takdir edilecektir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, klinisyen, dozaj titre edebilmektedir ve optimal terapötik etkinin elde edilmesi için uygulama yolunu değiştirebilmektedir. Belirli yapılandırılmalarda, tipik bir dozaj, yukarıda bahsi geçen faktörlere
- 10 bağlı olarak, yaklaşık 0.1 µg/kg ila yaklaşık 100 mg/kg veya daha fazla bir aralıkta olabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, dozaj, yaklaşık olarak 0.1 µg/kg ila yaklaşık 100 mg/kg; veya 1 µg/kg ila yaklaşık 100 mg/kg; veya 5 µg/kg ila yaklaşık 100 mg/kg aralığında olabilmektedir.
- 15
- 20 Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, dozaj sıklığı OPGL'ye karşı antikorun farmakokinetik parametrelerini ve/veya kullanılan formülasyonda herhangi bir ek terapötik maddeyi hesaba katacaktır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir klinisyen, arzu edilen etkiye ulaşan bir dozaj elde edilene kadar, bileşimi uygulayacaktır. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda,
- 25 bileşim bu şekilde tek bir doz olarak veya zamanla iki veya daha fazla doz olarak (istenilen molekülün aynı miktarı içerebilen veya içermeyebilen) veya bir implantasyon cihazı veya kateter sayesinde bir devamlı infüzyon olarak uygulanabilmektedir. Uygun dozajın bir diğer gelişimi, teknikte tecrübe sahibi kişi tarafından rutin bir şekilde oluşturulması ve bunlar tarafından rutin bir şekilde uygulanan görevlerin alanı içerisinde olmasıdır. Burada tarif edilen
- 30 ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, uygun dozajlar, uygun doz-yanıt verisinin kullanılması sayesinde doğrulanabilmektedir.

Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, farmasötik bileşimin uygulama yolu, intravenöz, intraperitoneal, intraserebral (intra-parankimal),

35 intraserebroventriküler, intramusküler, intra-oküler, intraarteriyel, intraportal veya

intralezyonel yollar vasıtasıyla; sürekli aslımlı sistemleri veya implantasyon cihazları vasıtasıyla oral yollarla bilinen yöntemlere göre gerçekleştirilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bileşimler, bolus enjeksiyonu veya aralıklı olarak infüzyon veya implantasyon cihazı sayesinde uygulanabilmektedir.

- 5 Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bileşim ayrıca istenilen molekülün, absorbe edildiği veya enkapsüle edildiği bir membran, süngerin veya bir diğer uygun malzemenin implantasyonu vasıtasıyla lokal olarak uygulanabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir implantasyon cihazını kullanıldığı yerde cihaz, herhangi bir uygun dokuya veya organa implante edilebilmektedir ve istenilen
- 10 molekülün iletimi, difüzyon, zaman salımlı bolus veya aralıklı uygulama olabilmektedir.

- Buradatarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir *in vitro* şekilde en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı bir antikoru içeren bir farmasötik bileşimin kullanılması arzu edilebilmektedir. Bu tarz durumlarda, hastadan çıkarılan
- 15 hücreler, dokular veya organlar, hücrelerin, dokular ve/veya organlar daha sonrasında hastaya geri implante edilmesinden sonra en az bir ek terapötik madde ile veya bu madde olmadan OPGL'ye karşı bir antikoru içeren bir farmasötik bileşime maruz bırakılmaktadır

- Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, OPGL'ye karşı bir antikor
- 20 ve/veya herhangi bir ek terapötik madde, polipeptitleri eksprese etmek ve salgılamak üzere burada açılanlar gibi yöntemler kullanılarak genetik olarak tasarlanmış belirli hücreler implante edilerek iletilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bu hücreler, hayvan veya insan hücreler olabilmektedir ve otolog, heterolog ve ksenogenik olabilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli
- 25 yapılandırılmalarda, hücreler ölümsüzleştirilebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, bir immünolojik yanıt şansı azaltılması için, hücreler, çevreleyen dokuların infiltrasyonunu önlemek için kapsüllenebilmektedir. Burada tarif edilen ve/veya talep edilen belirli yapılandırılmalarda, enkapsülasyon malzemeler genellikle biyolojik olarak uyumlu, protein ürünlerinin salınması olarak sağlayan, fakat hastanın immün sistemi
- 30 sayesinde veya çevreleyen dokulardan kademeli diğer faktörler sayesinde hücre yıkımı önleyen yarıgeçirgen polimerik muhafazalar veya membranlardır

ÖRNEKLER

Yürütülen deneyler ve ulaşılan sonuçlar dahil olmak üzere aşağıdaki örnekler, sadece görsel amaçlar için sağlanmaktadır ve mevcut buluşu kapsayıcı olarak yorumlanmamaktadır

Örnek 1

5 α OPGL-1 Ağır ve Hafif Zincirlerin Klonlaması

Tam uzunlukta insan OPGL cDNA'yı eksprese eden CHO hücreleri, insan immünoglobulin genleri içeren transjenik farelerini immünize edecek şekilde kullanılmaktadır. Immünize farelerden alınan lenf bezleri, hibridomlar üretmek için mürin miyelom hücrelerine
10 birleştirilmektedir. Hibridom dizilerinden gelen süpernatantlar, insan OPGL ile reaksiyona giren antikorlara yönelik bir ELISA deneyinde test edilmektedir. Hibridom hatları (AMG 6.5, AMG 6.4 ve AMG 6.1) eksprese eden Anti-OPGL'nin, OPGL'ye yönelik yüksek affiniteli antikorları (sırasıyla 0.28 nM, 0.29 nM ve 0.23 nM Kd) eksprese ettiği bulunmaktadır ve AMG
15 6.5, klonlama için seçilmektedir. AMG 6.5 ve AMG 6.4'den ağır ve hafif cDNA klonları elde edilir ve AMG 6.5, α OPGL-1 hafif zincirli cDNA'yı klonlayacak şekilde kullanılırken, AMG 6.4, α OPGL-1 ağır zincirli cDNA'yı klonlayacak şekilde kullanılmaktadır

α OPGL-1 hafif zincirin klonlanması

20 α OPGL-1 kappa hafif zincirli değişken bölge, AMG 6.5 toplam RNA'dan hazırlanan birinci sarmal cDNA'dan PCR amplifikasyon yöntemleri kullanılarak elde edilmektedir. Birinci sarmal cDNA, bir genişletilmiş 5'-adaptör (5'-GGCCGGATAGGCCTCACNNNNNT-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 15)) ile bir rastgele primer ve Birinci Sarmal cDNA Sentez kitine (kat. no. 18089-011) yönelik Gibco SuperScript II™ Preamplifikasyon Sistemi ile sağlanan malzemeler ve
25 yöntemler kullanılarak AMG 6.5 toplam RNA'dan hazırlanmaktadır. Aşağıda bulunan oligonükleotidler, PCR için kullanılmaktadır

5' kappa RACE primeri:

5' - GAT GAC CCA GTC TCC AGC CAC CCT G - 3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5)

3' kappa RACE primeri:

30 5' - AAG GGT CAG AGG CCA AAG GAT GG - 3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6)

Güçlendirilmiş DNA'lar, pCRII-TOPO'ya (Invitrogen) klonlanmaktadır ve elde edilen plazmidler sekanslanmaktadır. Kappa zincirli konsensüs sekansı, tam uzunlukta α OPGL-1 kappa

zincirinin PCR amplifikasyonuna yönelik primerleri tasarlayacak şekilde kullanılmaktadır. 5'αOPGL-1 kappa primeri, klonlamaya yönelik bir *Xba*I bölgesini (TCTAGA) ve başlatıcı Met kodonundan önce bir "CCACC" Kozak sekansını içermektedir. 3'αOPGL-1 kappa primeri, klonlamaya yönelik stop kodonundan sonra bir *Sa*I bölgesini (GTCTGAC) içermektedir.

5 5'αOPGL-1 kappa primeri:

5'-CAA CTC TAG ACC ACC ATG GAA ACC CCA GCG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7)

*Xba*I Bölgesi Kozak M E T P A (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 16)

3'αOPGL-1 kappa primeri:

10 5'-TTT GAC GTC GAC TTA TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA G -3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8)

*Sa*I Bölgesi * * C E G R N F (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 17)

15 Tam uzunlukta αOPGL-1 kappa zincirli cDNA klonu, 5' ve 3'αOPGL-1 kappa primerleri ile amplifikasyon vasıtasıyla, yukarıda açıklanan AMG 6.5 birinci sarmal cDNA kullanılarak elde edilmektedir. PCR reaksiyonu, αOPGL-1 kappa zincirinin (Şekil 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4) 235 amino asit kalıntısını (20 amino asit kappa zincirli sinyal sekansı dahil) kodlayan bir 738 bp fragmanı üretmektedir. Bir QIAquick PCR Saflaştırma kiti (Qiagen kat. no. 28104) kullanılarak yapılan saflaştırmadan sonra, bu fragman, kappa hafif zincirli ekspresyon vektörünü oluşturacak şekilde kullanılmaktadır.

20 Yukarıda üretilen 738 bp tam uzunlukta kappa fragmanı *Xba*I ve *Sa*I ile kesilmekte, Promega Wizard DNA Temizleme Sistemi (Promega kat. no. A7100) kullanılarak saflaştırılmakta ve plazmid αOPGL-1-kappa/pDSRα19 üretmek üzere pDSRα19'a klonlanmaktadır (Şekil 5). pDSRα19 öncesinde açıklanmıştır (bkz. burada herhangi bir amaca yönelik olarak referansla dahil edilen WO 90/14363 (bkz. örn. Şekil 12)). Kısacası pDSRα19'u 25 oluşturmak için, pDSRα2, aşağıdaki yöntemlerle modifiye edilmektedir: FSH polyA, yaklaşık olarak 1400 baz çifti ile 885 baz çiftine kısaltılmaktadır ve şimdi NdeI bölgesinde sona ermektedir; dihidrofolat redüktaz (DHFR), yaklaşık olarak 1 kilobaz ile 5' ucundan kısaltılmış olan 209 baz çiftini içermektedir; ve DHFR polyA sekansından yaklaşık olarak 550 baz çift BglII silinmektedir.

30

α OPGL-1 kappa hafif zincirli ekspresyon klonu, AMG 6.5 hibridomda tanımlanan aynı peptit için kodlandı ve doğrulayacak şekilde sekanslanmaktadır. Nihai ekspresyon vektörü (α OPGL-1-kappa/pDSR α 19), 5476 bp'dir ve Tablo 2'de gösterilen 7 işlevsel bölgeyi içermektedir.

Tablo 2: α OPGL-1-kappa/pDSR α 19'un özellikleri

Plazmid Baz Çifti

Sayı

5	2 ila 881	bovin hipofiz glikoprotein hormonunun (α -FSH) α -alt biriminden bir transkripsiyon sonlandırma/poliadenilasyon sinyali (Goodwin, ve ark, Nucleic
10		Acids Res. 1983 11: 6873-82; Genbank Erişim Numarası X00004)
	882 ila 2027	Endojen fare DHFR promoterini, cDNA kodlama sekansları ve DHFR transkripsiyon sonlandırma/poliadenilasyon sinyallerini içeren bir fare dihidrofolat redüktaz (DHFR) minigeni (Gasser ve ark, Proc Natl Acad Sci U S
15		A. 1982 79:6522-6.; Nunberg ve ark, Cell 1980 19:355-64; Setzer ve ark, J Biol Chem. 1982 257: 5143-7; McGrogan ve ark, J Biol Chem. 1985 260:2307-14)
	2031 ila 3947	Amfisilin direnç işaretleyici genini ve E.coli'de plazmid replikasyonun kaynağı içeren pBR322 sekansları (Genbank Erişim Numarası 01749)
	3949 ila 4292	Bir SV40 erken promoteri, geliştiricisi ve replikasyon kaynağı (Takebe ve ark, Mol Cell Biol. 1988 8: 466-72., Genbank Erişim Numarası 02400)
20		
	4299 ila 4565	HTLV-1 LTR alanında bir dönüşümsel geliştirici eleman (Seiki ve ark, Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 80: 3618-22, Genbank Erişim Numarası 02029)
	4574 ila 4730	SV40 16S, 19S splay donör/almak sinyallerinden bir intron (Okayama and Berg, Mol Cell Biol. 1983 3: 280-9, Genbank Erişim Numarası 02400)
25	4750 ila 5476	<i>Xba</i> I ve <i>Sa</i> I bölgeleri arasında α OPGL-1 Kappa hafif zincirli cDNA
		Vektörün bir dairesel plazmid haritası Şekil 5'te gösterilmektedir.

α OPGL-1 hafif zincirin klonlanması

30 α OPGL-1 IgG2 ağır zincir, Clontech Marathon™ cDNA Amplifikasyon kiti (kat. no. K1802-1) ile üretilen AMG 6.4 hibridom çift sarmal cDNA'dan klonlanmaktadır. AMG 6.4 ağır zincirli

cDNA'nın amplifikasyonu, insan germ hattı IgG2 ağı zincirli sabit bölgeye özgü primerler (aşağıda gösterilmektedir) ve Marathon™ cDNA amplifikasyon kitinde sağlanan diğer malzemeler ve yöntemler ile uygulanan cDNA uçları (RACE) 5' ve 3' hızlı amplifikasyon teknikleri ile tamamlanmaktadır

5 5' IgG2 RACE primeri

5'- GGC ACG GTC ACC ACG CTG CTG AG -3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9)

3' IgG2 RACE primeri

5'- CCT CCA CCA AGG GCC CAT CGG TCT -3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10)

600 bp 5' RACE ürünü ve 1200 bp 3' RACE ürünü, pCR2.1'e (Invitrogen) klonlanmaktadır ve sekanslanmaktadır. Bu sekans bilgisi, tam uzunlukta sekansın klonlanması için αOPGL-1 ağı zincire özgü primerleri tasarlayacak şekilde kullanılmaktadır. Ağı zincirli 5' primeri (5'αOPGL-1 IgG2 Primeri), yolcu sarmalına karşı yönlendirilmektedir ve bir HindIII bölgesine ve doğal başlangıç bölgesinden önce konsensüs Kozak sekansına sahiptir. Ağı zincirli 3' primeri (3'αOPGL-1 IgG2 Primeri), ağı zincirli IgG2 sekansının son amino asidinden sonra bir *SaI* bölgesini ve stop kodonunu içeren bir rehber primeridir.

5' αOPGL-1 IgG2 Primeri:

5'- CAGAAGCTTGACCACCATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GC - 3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11) *HindIII*Kozak M E F G L S W L F L V A (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 18)

20 3'αOPGL-1 IgG2 Primeri:

5'- GCA TGTCGAC TTA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG - 3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 12)

SaI * * K G P S L S L (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 19)

25 Yukarıda açıklanan çift sarmal cDNA, 5'- ve 3'- αOPGL-1 IgG2 primerlerle PCR amplifikasyonu vasıtasıyla tam uzunlukta ağı zincirli cDNA'yı üretecek şekilde kullanılmaktadır. PCR, αOPGL-1 IgG2 ağı zincirli proteinin 467 amino asit kalıntısından 19 amino asit IgG sinyal sekansına (dahil) kodlayan bir 1433 bp fragman üretmektedir (Şekil 2, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2). Bir QIAquick PCR Saflaştırma kiti (Qiagen kat. no. 28104) kullanılarak yapılan saflaştırmadan sonra, bu fragman, aşağıdaki gibi ağı zincirli ekspresyon vektörünü oluşturacak şekilde kullanılmaktadır

Yukarıda üretilen tam uzunlukta IgG2 ağırlık fragmanı kodlayan DNA, *Hind*III ve *Sal*I ile kesilmektedir, QIAquick Jel Ekstraksiyon kiti (Qiagen kat. no.28704) kullanılarak saflaştırılmaktadır ve bu fragman, pDSR α 19'a klonlanmaktadır. Elde edilen ekspresyon plazmidi, α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19 olarak adlandırılmaktadır (Şekil 6). Tüm vektör bileşenleri, α OPGL-1 IgG2 ağırlık zincirli cDNA'nın, *Xba*I ve *Sal*I bölgeleri arasında α OPGL-1 kappa hafif zincirli cDNA'yı değiştirmesinin haricinde yukarıda açıklanan α OPGL-1-kappa/pDSR α 19 vektörüne özdeştir. α OPGL-1 IgG2 ağırlık zincirli ekspresyon klonu, AMG 6.4 hibridomda tanımlanan aynı polipeptit için kodlandığına doğrulayacak şekilde sekanslanmaktadır.

10

Örnek 2

CHO hücrelerinde α OPGL-1 ekspresyonu

15 α OPGL-1 antikorunun stabil ekspresyonuna, dihidrofolat redüktaz eksik (DHFR⁻) Çin hamster yumurtalı hücrelerine (CHO AM-1/D, US 6,210,924 Sayılı Patent Dokümanı) α OPGL-1-kappa/pDSR α 19 ve α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19 plazmidlerinin birlikte transfeksiyonu ile ulaşılmaktadır. Bunu da bireysel klonların izolasyonu ve test edilmesi takip etmiştir.

20 Bir 100 mm doku kültürü kabı CHO ortamında (DME yüksek glikoz, %10 fetan bovin serumu, %1 penisilin/streptomisin/glutamin, 1X NaPiruvat, %1 esas olmayan amino asitler (NEAA))(Gibco®) ve %1 ht takviyesi (Gibco®)) transfeksiyondan önceki gün (0. Gün) büyütülen 1.5x10⁶ AM-1/D hücrelerle plakalanmaktadır. Birinci günde, 400 μ l serumsuz RPMI 1640 ortam (Gibco®), bir 12x75mm polipropilen tüpe bölünmektedir. Yirmi dört mikrolitre

25 *TransIT*®-LT1 reaktif (Mirus Corporation), ortama damlatılarak eklenmektedir ve karıştırılır, oda sıcaklığında 10 dakika inkube edilmesine olanak sağlanmaktadır. Daha sonrasında toplam 15 μ g linearize plazmid DNA (Pvu1 ile sindirilmiş, 7.5 μ g α OPGL-1-kappa/pDSR α 19 ve 7.5 μ g α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19), karışıma damlatılarak eklenmektedir ve oda sıcaklığında 10 dakikalık inkube edilmektedir.

30

CHO ortamı 10 ml Dulbecco fosfat tamponlu salinle (Gibco®) yıkanan hücrelerden çıkarılmaktadır. Altı mililitre serum içermeyen, HT, L-glu, NEAA ve Na piruvat ile takviye edilen (Gibco®) MEM ortamı hücrelere eklenmektedir. DNA/LT1 kompleksi, DNA'yı hücreler üzerine eşit olarak dağıtmak için nazikçe geriye ve ileriye sallanan plakalara damlatılarak

35 eklenmektedir. Bir doku kültürü inkubatoründe 6 saat kaldıktan sonra, ortam, yeni CHO d-

ortam ile değiştirilmektedir. Kırk sekiz saat sonra, hücreler, CHO seçim ortamında (DMEM yüksek glikoz, %10 diyalize fetal bovin serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin/glutamin, %1 esas olmayan amino asitler ve 1X Na piruvat) (Gibco®) on 100 mm kültür kabında bölünmektedir. Ortam, koloniler görülene kadar haftada iki defa değiştirilmektedir.

- 5 10-14 gün sonra, koloniler, 1x tripsin-EDTA'da (Gibco®) 5 mm klonlama diskleri (Labcore®) kullanılarak toplanmaktadır ve CHO seçim ortamı ile 24 hazneli doku kültürü plakalarında kültürlenmektedir. Hücreler birbirine karışık hale geldiğinde, serum içermeyen ortamlar (CHO seçim ortamı eksisi FBS) eklenmektedir ve 48 saat sonra toplanmaktadır. Bu koşullarda ortamlar, α OPGL-1 ağı zinciri tespit etmek için yabancıturpu peroksidaz (HRP)-konjüge keçi anti-insan IgG Fc antikoru (Pierce, Rockford, IL) ve keçi anti-insan kappa zincir antikoru (Pierce, Rockford, IL), bundan sonra α OPGL-1 hafif zinciri tespit etmek için HRP konjüge tavşan anti-keçi IgG (H+L) antikoru (Pierce, Rockford, IL) ile Western blotu vasıtasıyla antikor ekspresyonu için analiz edilmektedir. En yüksek eksprese edici klonlar genişletilmekte ve sıvı nitrojende depolanmaktadır.

15

Örnek 3

α OPGL-1 üretimi

20 Hücre Dizisi 125Q'nun Preparasyonu ve Oluşumu

- α OPGL-1'i üreten CHO hücreleri, serum içermeyen koşullar altında 96 hazneli plakada seyreltiyi iki tur kısımlayarak klonlanmaktadır. Klonlar, çeşitli süspansiyon haznelerinde üretim ve büyüme özelliklerine bağlı olarak seçilmektedir. EIA'lar, en yüksek α OPGL-1 seviyesini üreten klonu seçmek için uygulanmaktadır. İki katlı çikma sürelerini ve yoğunlukları içeren büyüme özellikleri daha sonrasında 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 L ve 3 L döner kaplarda ve aynı zamanda 3 L Aplikon biyoreaktörlerinde klonlar büyütürölçülmektedir. Kültürde en yüksek yoğunluğa ulaşan en hızlı iki katlı çikma süresine sahip klon seçilmektedir ve Hücre Dizisi 125Q olarak adlandırılmaktadır. Klon, yaklaşık olarak 1×10^7 hücre/mL miktarda 360 ampulü dondurmak üzere yeterince hücre sunacak şekilde genişletildiğinde, hücreler, bir kriyo koruyucu, serum içermeyen ortamda (10 ml/L esas olmayan amino asitler ve 10 ml/L L-Glutamin (Gib-co/LTI/Invitrogen) ve %10 dimetil sülfoksit (JT Baker) ile takviye edilen %90 VM-soy Batch Ortamı (Detaylar için bkz. Tablo 3) yeniden askıya alınmakta ve dondurulmaktadır. Ampuller, kısımlı erişim sağlanan bir tesiste depolanmaktadır ve sıvı nitrojen temaslarında sıvı nitrojene daldırılmaktadır.

35

Küçük ölçekli çeviricilerde ve büyük ölçüde biyoreaktörlerde büyümeye ve üretime bağlı olarak, Hücre Dizisi 125Q, α OPGL-1 üretimine yönelik hücre dizisi olarak seçilmektedir.

5 Hücre Kültürü

α OPGL-1, plazmidlerden (α OPGL-1-kappa/pDSR α 19 ve α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19) α OPGL-1'i eksprese eden CHO hücrelerinin bir klonal dizisi olan Hücre Dizisi 125Q'da ekspresyonla üretilmektedir. α OPGL-1'in hücre kültür süreci, Şekil 19'da gösterilmektedir. Her bir üretim çalışması için, Hücre Dizisi 125Q'nun bir ilaç şişesinden gelen hücreler, ilk olarak 125 ml erlenmeyer çalkalayıcılarında 5 günlüğüne 100 rpm'de 10 ml/L önemsiz amino asitler ve 10 ml/L L-glutamin (Gibco/LTI/Invitrogen) (VM-Soy Supp) ile desteklenen 50 mL VM-Soy Batch Ortamında (bileşim için bkz. Tablo 3) büyütülmektedir. Tüm kültür daha sonrasında, VM-Soy Supp'yi 500 ml bir döner kaptan, 3×10^5 canlı hücre/ml (3×10^5 vc/ml) aşılacak şekilde kullanılmaktadır 3-4 günlüğüne 70 rpm döndürme ile gösterilmektedir. 500 ml döner şişeden tüm kültür, bir 3L döner kaptan VM-Soy Supp'yi 3×10^5 vc/ml'ye aşılacak şekilde kullanılmaktadır ve 3-4 günlüğüne 70 rpm ile döndürülerek büyütülmektedir.

3L döner kaptan gelen kültür, fenol klenzilemeden VM-Soy Supp'de 3×10^5 vc/ml'de iki 3 L döner kaba bölünmektedir ve aynı koşullar altında büyütülmektedir. Bu döner kaptan gelen kültürler, fenol klenzilemeden VM-Soy Supp'de 3×10^5 vc/ml'de dört döner kaba aşılacak şekilde kullanılmaktadır ve aynı koşullar altında büyütülmektedir. Dört 3 L döner kaptan dört litre kültür, bir 20 L biyoreaktörde fenol klenzilemeden 10 L VM-Soy Supp'yi aşılacak şekilde kullanılmaktadır ve biyoreaktör, 7-10 günlüğüne beslemeli modda çalışmaktadır. Beslemeli modda, konsantre ortam bileşenlerini içeren bir besin maddesi (aşağıda Tablo 3'te belirlenen "besleme maddesi" terimi), hücre büyümesini ve kültür canlılığını sürdürmek için eklenmektedir.

20L biyoreaktörden alınan tüm kültür, bir 150L biyoreaktörde fenol klenzilemeden 70 L VM-Soy Supp'yi aşılacak şekilde kullanılmaktadır ve biyoreaktör, 9-10 günlüğüne beslemeli modda çalışmaktadır. Son olarak, 150 L biyoreaktörden alınan tüm kültür, bir 2000L biyoreaktörde yaklaşık olarak 880L VM-Soy (takviye veya fenol klenzilemeyen) aşılacak şekilde kullanılmaktadır ve biyoreaktör, beslemeli modda çalışmaktadır. Beslemeli mod esnasında besleme oranı kültürde bulunan glikoz seviyesinin, her bir

biyoreaktör için 0.6 g/L miktarda sürdürüldüğü şekilde belirlenmektedir. Hücre yoğunluğu ve glikoz konsantrasyonu günlük olarak ölçülmektedir ve besleme oranı bu şekilde ayarlanmıştır.

2000L biyoreaktörde üretim, α OPGL-1'in, temel olarak hücreler tarafından üretildiği ve hücre kültürü ortamına salgılandığı sürece esnasında yaklaşık olarak iki hafta sürmektedir.

Üretim reaktörü, pH, sıcaklık ve çözülmüş oksijen seviyesinin ayarlanması kontrol edilmektedir: pH, 7.0'dır ve karbon dioksit gazı ve sodyum karbonat eklentisi ile kontrol edilmektedir; çözülmüş oksijen, 120 mmHg'dir ve hava, nitrojen ve oksijen gaz akışları ile kontrol edilmektedir. Hücreler, süreç boyunca 37°C'de sürdürülmektedir. Tüm gazlar, 0.22 μ m veya daha az gözenek boyutuna sahip membran filtreleri üzerinden geçirilmektedir.

Üretimin sonunda, hücre suyu, bir disk yığı santrifüjüne beslenmektedir ve kültür süpernatantı hücrelerden ayrılacaktır. Sentrat, bir Cuno 90SP derinliğinde filtre ve bundan sonra bir 0.2 μ m Posidyne filtresi (Pall Co.) üzerinden daha fazla saflaştırılmaktadır. Saflaştırılarak koşullandırılmış ortamlar, 50kD NMWL membranlar (Millipore Biomax 50) kullanılarak teğetse akış ultrafiltrasyon (UF) ile konsantre edilmektedir. Koşullandırılmış ortam, 15- ila 30- kat konsantre edilmektedir. Elde edilen konsantre koşullandırılmış ortam (CCM), saflaştırma vasıtasıyla işlenmekte veya sonraki bir tarihte saflaştırma için dondurulmaktadır. Üretim süreci, Şekil 19'da özetlenmektedir.

Hücre Kültürü Ortamı

Tüm hücre kültür süreci boyunca kullanılan hücre kültürü ortamı Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Ortamı (Ham'ın Besini F12'ye (DMEM/F12, 1:1) bağlandı ve amino asitlerin, ek besinlerin ve tuzların takviye seviyelerini, bir soya hidrolizatı ve rekombinant insan insülini (Nucellin®Zn, Eli Lilly) içermektedir. Bileşenler, Tablo 3'te listelenmektedir. Bu ortam, VM-Soy olarak ifade edilmektedir. Ortam çözeltileri, kullanılmadan önce 0.2 μ m gözenek boyutunun membran filtreleri vasıtasıyla filtrelenmektedir.

Tablo 3. Hücre Kültürü Ortamı Bileşenleri

BAZAL Ortam ve BESLEME MADDELERİNE YÖNELİK BİLEŞENLER		
BİLEŞEN	VM Soy Yığılma Ortamı (mg/L)	BESLEME MADDESİ (mg/L)
DMEM/F12 BİLEŞENLERİ		
İnorganik Tuzlar		

CaCl ₂ (anhidrit)	116.60	233.2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0026	0.0052
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.1000	0.2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.8340	1.668
KCl	311.80	623.6
MgCl ₂ (anhidrit)	57.280	114.56
MgSO ₄ (anhidrit)	97.680	195.36
NaCl	905.990	1811.98
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	125.00	250
Na ₂ HPO ₄	142.040	284.08
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.8640	1.728
Diğer Bileşenler		
D-Glikoz	3151.00	12302
Na Hipoksantin	5.40	10.8
Linoleik asit	0.090	0.18
Lipoik asit	0.2060	0.412
Fenol Klorür	8.10	16.2
Putresin.2HCl	0.1620	0.324
Sodyum Piruvat	110.00	220
Amino asitler		
L-Alanin	26.70	53.4
L-Arjinin HCl	295.00	590
L-Asparajin.H ₂ O	45.00	90
L-Aspartik asit	39.90	79.8
L-Sistein.HCl.H ₂ O	35.120	70.24
İnorganik Tuzlar		
L-Sistin.2HCl	62.580	125.16
L-Glutamik asit	44.10	88.2
L-Glutamin	657.00	1314
Glisin	52.50	105
L-Histidin.HCl.H ₂ O	62.950	125.9
L-İzolösin	108.940	217.88
L-Lösin	118.10	236.2
L-Lisin HCl	182.50	365
L-Metiyonin	34.480	68.96
L-Fenilalanin	70.960	141.92
L-Prolin	57.50	115
L-Serin	73.50	147
L-Treonin	106.90	213.8
L-Triptofan	18.040	36.08
L-Tirosin.2Na.2H ₂ O	111.580	223.16
L-Valin	105.70	211.4
Vitaminler		
Biyotin	0.0073	0.0146
D-Ca Pantotenat	4.480	8.96
Kolin Klorür	17.960	35.92
Folik Asit	5.30	10.6
i-İnositol	25.20	50.4
Niasinamid	4.040	8.08
Piridoksal HCl	4.00	8
Piridoksin HCl	0.0620	0.124

Riboflavin	0.4380	0.876
Tiamin HCl	4.340	8.68
Timidin	0.3635	0.727
B12 Vitamini	1.360	2.72
EK BİLEŞENLER		
Etanolamin	0.0012	0.0037
Nuselin Zn, (rhu insulin)	5.00	15
Selenoz Asit	0.0050	0.015
Triiodotironin	0.000040	0.00012
Hidrokortizon	0.020	0.06
Ferik Sitrat	122.450	122.450
Pluronik F-68	1000.00	500
Soya Hidrolizat	6000.00	6000.00
NaHCO ₃	3000.00	3000.00
NaCl	3500.00	

Saflaştırma Süreci

CHO hücrelerinde eksprese edilen α OPGL-1, hücre dışı ortama salgılanmaktadır. Saf malzemeyi üretecek şekilde bir dizi adım kullanılabilmektedir. Süreç, bir düşük pH adımı ve viral filtre ile birlikte hidrofobik yük indüksiyonunu, katyon değişimini ve hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanmaktadır. Aşağıda bu prosedürler açıklanmaktadır.

A. Hidrofobik Yük İndüksiyon Kromatografisi (HCIC)

Bu kromatografi, konak hücresi proteinlerinin ve DNA'nın yoğunluğunu çıkarmaktadır. Konsantre koşullarda ortam (CCM), bir Cuno 30SP filtresi vasıtasıyla ve daha sonrasında bir Cuno VR07 yüklü selüloz bazlı filtre vasıtasıyla filtrelenmektedir ve daha sonrasında bir MEP HyperCel reçinesine yüklenmektedir. Yüklemeden sonra, kolon, denge tamponu (20 mM Tris pH 7.2) ile yıkanmaktadır. Antikor, bir düşük pH tamponu kullanılarak reçineden ayrıştırılmaktadır (20 mM Sodyum Asetat, pH 5.0). Kolondan ayrıştırıldığı üzere, 280 nm kolon akıtında absorbansa dayalı ürün toplanmaktadır.

B. Viral İnaktivasyon

MEP havuzu, pH 3.7'ye titre edilmektedir ve potansiyel olarak kontamine edici retrovirüsü etkisiz hale getirecek şekilde yaklaşık olarak 60 dakikalığına tutulmaktadır. Tutma süresinden sonra, pH, yaklaşık olarak 6.0'a ayarlanmaktadır.

C. Viral Filtrasyon

5 pH'ı ayarlanmış havuz bir Millipore Viresolve NFR filtre veya eşdeğeri vasıtasıyla filtrelenmektedir. Antikor, filtre vasıtasıyla akarken, potansiyel olarak kontamine edici virüsler ≥ 50 nm, tutulmaktadır

D. Katyon Değişim Kromatografisi (CEX)

10 Antikor, SP Sepharose HP (Amersham Pharmacia) veya eşdeğeri kullanılarak katyon değişim kromatografisi ile daha fazla saflaştırılmaktadır Katyon değişim kromatografisi adımları ek CHO hücre proteinleri, DNA, düşük moleküler ağırlıkta proteinler ve α OPGL-1'in kümelenmiş formlarını çıkarmaktadır Katyon değişim reçinesine, viral filtrelenmiş havuz yüklenmektedir. Yüklemeden sonra, kolon, denge tamponu (20 mM NaMES pH 6.2) ile yıkanmaktadır Daha
15 sonrasında, antikor, artan tuzun (20 mM NaMES pH 6.2, 0 M NaCl ila 20 mM NaMES pH 6.2, 0.3 M NaCl) bir lineer gradyan ile ayrıştırılmaktadır Kolondan ayrıştırıldığı üzere, 280 nm kolon akıntıda absorbansa dayalı ürün toplanmaktadır

E. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC)

20 Antikor, Phenyl Toyopearl 650S (Tosoh Biosep) veya eşdeğeri kullanılarak hidrofobik etkileşim kromatografisi ile daha fazla saflaştırılmaktadır Katyon değişim kromatografisi adımları ek cilalama adımları olarak kullanılmaktadır ve ek CHO hücre proteinleri, DNA, düşük moleküler ağırlık proteinleri ve α OPGL-1'in kümelenmiş formlarını çıkarmaktadır Katyon
25 değişim havuzu, 15-25°C'de >105 mS/cm bir iletkenliğe amonyum sülfat eklentisi ile kolona yüklenmeden önce koşullandırılmaktadır Yükleme sonrasında, kolon, denge tamponu (1M Potasyum Fosfat pH 8) ile yıkanmaktadır Daha sonrasında, antikor, artan tuz konsantrasyonunun bir lineer gradyan ile ayrıştırılmaktadır (1M Potasyum Fosfat, 0mM Tris pH 8 ila 0M Potasyum Fosfat, 20 mM Tris pH 8). Kolondan ayrıştırıldığı üzere, 280 nm kolon
30 akıntıda absorbansa dayalı ürün toplanmaktadır

F. Konsantrasyon ve Diafiltrasyon

35 HIC kolon havuzu, 50kD NMWL membranlar (Millipore Biomax 50) kullanılarak teğetsel akış ultrafiltrasyon ile formülasyon tamponuna konsantre edilmekte ve diafiltrelenmektedir.

Formülasyon tamponu, 10 mM Asetat, %5 Sorbitol, pH 5.2'yi içermektedir ve 30 mg/mL α OPGL-1'i içermektedir.

Son Filtrasyon ve Depolama

5

Saflaştırılmış yığın, bir 0.22 μ m PVDF filtresi (Millipore) üzerinden geçirilmekte, örneklenmekte ve sabitlenmiş bir dondurucuda yaklaşık olarak -30°C'de depolanmaktadır.

Örnek 4

10 α OPGL-1'in Bağlantı Özgüllüğü

Örnek 1 ve 2'de açıklandığı üzere iki ekspresyon vektörü ile transfekte olan CHO hücrelerinde üretilen antikorlar, aşağıdaki örnekler 4, 5 ve 6'da kullanılabilmektedir.

- 15 İnsan OPG, sıçanlarda, farelerde ve sinomolgus maymunlarda ve aynı zamanda insanlarda OPGL'yi bağlamakta ve nötrleştirmektedir. α OPGL-1, insan yüksek affiniteli insan OPGL'ye bağlanmaktadır fakat mürin OPGL'sine önemli ölçüde bağlanmamaktadır (Tablo 4).

Tablo 4: İnsan, Sinomolgus, Maymun veya Fare Sekanslı Hücre Membranı Eksprese Edilen OPGL'ye α OPGL-1'in Affinitesi

OPGL Türleri	α OPGL-1 ED ₅₀ (ng/ml)
İnsan	16
Sinomolgus	19
Fare	Herhangi Spesifik Bağlantı Yok

Bu türlerin OPGL'si, tam uzunlukta, membrana bağlı protein olarak CHO hücrelerinde eksprese edilmektedir. Hücre yüzeyi eksprese OPGL'ye α OPGL-1'in bağlanması α OPGL-1 ile inkube edilen hücrelerin FACS analizi ve insan IgG2'ye bir FITC-işaretli ikincil antikorla değerlendirilmektedir. α OPGL-1, insan ve sinomolgus OPGL'sini bağlanmaktadır fakat fare OPGL'sine herhangi bir spesifik bağlantı yoktur.

- 20 Ek olarak, insan OPG'sinin, TNF ailesinin ilgili bir elemanı olan, DNA'yı ve OPGL'ye amino asit sekans homolojisini sergileyen tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici liganda (TRAIL) (Truneh ve ark, 2000) zayıf bağlantı sergilediği bildirilmiştir (Lacey ve ark., 1998). Fakat OPG, TNF α , TNF β veya CD40 ligandı gibi TNF ile ilişkili diğer proteinlere tespit edilebilir şekilde bağlanmamaktadır.

25

α OPGL-1, spesifik olarak EIA plakalarında OPGL'ye bağlanmaktadır (Şekil 7). Rekombinant çözülebilir OPGL (2 μ g/ml), 16 ila 24 saatliğine oda sıcaklığında 96 hazneli EIA plakalarında kaplanmaktadır. PBS'de %1 BSA ile bloklama sonrasında, %1 BSA/PBS'de seyreltilen çeşitli α OPGL-1 konsantrasyonları (yaklaşık olarak 2 ng/ml ila 1000 ng/ml), haznelere eklenmektedir ve plakalar, oda sıcaklığında yaklaşık 2 saatliğine inkube edilmektedir. TMB-H₂O₂ (tetrametilbenzidin ve hidrojen peroksit) Sübstrat kokteyli kullanılarak keçi anti-İnsan IgG (Fab')-HRP ile bağli antikor tespit edilmektedir. Absorbans, 450 nm ve 650nm'de okunmaktadır

10 α OPGL-1, transfekte hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen OPGL'ye spesifik olarak bağlanmaktadır. FACS tamponunda (PBS, %0.1 BSA, %0.01 Sodyum Azid) seyreltilen α OPGL-1 (100 ng/ml), OPGL, TNF α , TNF β , TRAIL veya CD40 ligandı (yaklaşık olarak 0.1 ng/ml ila 1000 ng/ml) çeşitli konsantrasyonlarla önceden inkube edilmektedir ve daha sonrasında, hücre yüzeyinde membrana bağli OPGL'yi stabil olarak eksprese eden CHO
15 hücreleri olan yaklaşık olarak 200,000 CHO REN 218-9 hücrelerine eklenmektedir. 2-8°C'de 1 saat sonra, bağlanmamış antikor, santrifüjleme ve yıkama ile çıkarılmaktadır. Daha sonrasında hücreler, FITC-işaretli F(ab')₂ Keçi anti-İnsan IgG (Fc γ fragmanına özgü) ile 2-8°C'de 30 dakikalık inkube edilmektedir. Santifüjleme ve yıkama sonrasında, hücre yüzeyi floresanlaştırmak için sitometrisi kullanılarak ölçülmektedir. Şekil 8, α OPGL-1'in, CHO REN 218-9
20 hücrelerine bağlanmasını spesifik olduğunu ve çözülebilir OPGL eklentisi ile, fakat TNF α , TNF β , TRAIL veya CD40 ligandı eklentisi olmadan, rekabetçi bir şekilde azaltıldığını göstermektedir.

Rekabet deneylerinde, EIA plakalarında OPGL'ye bağlanan α OPGL-1, eksojen OPGL eklentisi
25 ile (Şekil 9), fakat TNF α , TNF β , TRAIL veya CD40 ligand eklentisi olmadan (Şekil 10), inhibe edilmektedir. Bu prosedür, α OPGL-1'in bir sabit konsantrasyonunun (100ng/mL), OPGL kapli plakalara eklenmeden önce çözülebilir OPGL veya diğer ligandları çeşitli konsantrasyonlarda (her birisi için yaklaşık olarak 1 ng/ml ila 1000 ng/ml) önceden inkube edilmesinin haricinde EIA plakalarında α OPGL-1'in OPGL'ye bağlanması için büyük ölçüde
30 yukarıda olduğu gibi aynı şekilde uygulanmaktadır

Örnek 5

α OPGL-1 Nötrleştirme Aktivitesi

Osteoklast Oluşumunun İnhibisyonu

RAW 264.7 (ATCC No. TIB-71, Manassas, VA), bir Abelson mürin lösemi virüs ile indüklenmiş tümörden türevlendirilmiş bir mürin makrofaj hücre dizisidir. RAW 264.7 hücreleri, OPGL mevcudiyetinde osteoklast benzeri hücrelere ayrışacaktır. OPGL mevcudiyetinde RAW hücrelerinden kültürde osteoklastların oluşumuna yönelik temel deney, Simonet ve ark (1997) Cell 89 s. 309, and Lacey ve ark (1998) Cell 93 s. 165 referansında kapsamlı bir şekilde açıklanmıştır.

- 10 RAW hücreleri, osteoklast benzeri hücrelere farklılaşmak üzere ligand tarafından uyarılmaktadır ve farklılaşmış, osteoklastların bir özelliği olan TRAP aktivitesi ile ölçülmektedir. Bu sebepten ötürü, osteoklastogeneizde α OPGL-1 etkisi ölçülebilmektedir.

- 15 RAW hücreleri, hücre kültürü ortamında (DMEM, %10 FBS, 0.292 mg/ml L-Glut, 100 birim/ml Penisilin G, 100 μ g/ml Streptomisin sülfat) bir sabit OPGL miktarında (40 ng/ml) ve çeşitli α OPGL-1 miktarlarında (6.3 ng/ml ila 200 ng/ml) mevcudiyetinde 4 günlüğüne inkube edilmektedir. 4. günün sonunda, hücreler, geçirimli hale getirme ve asitleştirme vasıtasıyla ve bundan sonra, 5 dakikalığına para-nitrofenilfosfat ile tedavi vasıtasıyla tartrata dirençli asit fosfataz (TRAP) aktivitesi için boyanmaktadır. Kısacası, ortamlar, hücrelerden emilmektedir.
- 20 ve 100 μ l sitrat tamponu (410 ml 0.1M sitrik asit, 590 ml 0.1 M sitrat, trisodyum tuz, 1 mL triton X-100), her bir hazneye eklenmektedir ve plakalar, oda sıcaklığında 3 ila 5 dakikalığına inkube edilmektedir. Daha sonrasında, PNPP çözeltisinin yüz mikrolitre eklenmektedir (157.8 mg asit fosfataz reaktifi (Sigma 104-100), 7.2 ml tartrat çözeltisi (Sigma kat. no. 387-3) ve 22.8 ml sitrat tamponu) ve plakalar, oda sıcaklığında 3 ila 5 dakikalığına inkube edilmektedir.
- 25 Reaksiyon, 50 μ l 0.5 M NaOH çözeltisinin eklentisi sonlandırılmaktadır.

- TRAP, 405 nm'de optik yoğunluk ölçümü ile ölçülebilen para-nitrofenilfosfatı para-nitrofenole dönüştürecektir. Osteoklast gelişimine yönelik bir vekil işaretleyici olan TRAP aktivitesi, 405 nm'de optik yoğunlukla ilişkilidir. Optik yoğunluğa karşı α OPGL-1 konsantrasyonunun bir çizimi, Şekil 11'de gösterilmektedir ve α OPGL-1'in, bu deneyde osteoklast oluşumunu inhibe ettiğini göstermektedir.

Reseptöre OPGL Bağlantısının İnhibisyonu

α OPGL-1 potansiyeli, aynı türden reseptöre, osteoklast farklılaşma ve aktif hale getirici reseptöre (ODAR, RANK olarak da bilinmektedir) OPG ligandının bağlantısını bloke edebilme kabiliyeti vasıtasıyla gösterilmektedir. Bu deney, Evropiyum-konjüge osteoprotegerin liganda (Eu-OPGL) α OPGL-1 bağlantısını tespit etmek için homojen zamanla çözölen floresan rezonans (HTRF) kullanılmaktadır. α OPGL-1'in, ODAR'a Eu-OPGL bağlantısını inhibe etmesi halinde, floresan miktarı azaltacaktır ve mevcut α OPGL-1 miktarı ile floresan miktarı arasında tersten ilişkili olacaktır.

OPGL, 337 nm ışıkla uyarıldığında 620 nm'de ışık yayan evropiyum ile işaretlenmektedir. ODAR, FLAG'ye ve Fc'ye birleştirilmektedir ve Fc-ODAR-FLAG füzyon proteini, 620 nm'de ışıkla uyarıldığında 665 nm ışık yayan bir florofor olan allofikosiyanine (APC) bağlanan bir anti-FLAG antikoru ile işaretlenmektedir. Bu şekilde, Eu işaretli OPG ligandının Fc-ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC kompleksine bağlandığında, üçlü kompleks, 337 nm'de ışıkla uyarıldığında 665 nm ışık yayacaktır.

0.05 μ g/ml Eu-OPGL, yaklaşık olarak bir saatliğine (Ön inkübasyon karışımı) oda sıcaklığında deney tamponunda (50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, %0.05 NaN₃, %0.1 BSA ve %0.05 Tween 20) α OPGL-1'in çeşitli konsantrasyonlarıyla (0.1 ila 150 ng/ml) önceden inkübe edilmektedir. Bir Fc-ODAR-FLAG (1 μ g/ml) ve anti-FLAG-APC (2.5 μ g/ml) karışımını aynı zamanda deney tamponunda hazırlanmaktadır ve bir saatliğine (Florokrom karışımı) oda sıcaklığında inkübe edilmektedir. Ön inkübasyon karışımının ve Florokrom karışımının eşit hacimleri daha sonrasında birleştirilmekte ve 3 saatliğine oda sıcaklığında inkübe edilmektedir. Floresan, 337 nm bir uyarım dalga uzunluğu ve 665 nm bir emisyon dalga uzunluğu kullanılarak Packard Discovery HTRF mikroploka analiz cihazında plakalar okuyarak ölçülmektedir.

α OPGL-1, OPG ligandıyla önceden inkübe edildiğinde ve daha sonrasında Fc-ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC ile karıştırıldığında, 665 nm floresan yoğunluğu, Şekil 12'de gösterildiği gibi bir doza bağlı olarak şekilde azalabilmektedir, bu da α OPGL162'nin, ODAR'a OPGL bağlantısını etkili bir şekilde inhibe edebildiğini göstermektedir.

Örnek 6

Sinomolgus Maymunlarda Farmakokinetikler

4.5 yaşından büyük olmayan ve 2 ila 4 kg ağırlığında olan altı erkek ve altı dişi sinomolgus maymunu, 4 doz grubuna atanmaktadır. 1. Grup, 3 erkekten ve 3 dişiden oluşmaktadır. 2, 3 ve 4. gruplar, 1 erkek ve 1 dişiden oluşmaktadır. 1. grupta bulunan hayvanlara, tek bir 1 mg/kg α OPGL-1 SC dozu uygulanırken, 2, 3 ve 4. Gruplarda bulunan hayvanlara, sırasıyla 0.1, 1.0 veya 10.0 mg/kg α OPGL-1'nin tek IV dozları uygulanmaktadır.

Hayvanlar, transfekte Çin hamster yumurtalığı (CHO) hücrelerinden eksprese edilen α OPGL-1 ile dozlanmaktadır. Serum numuneleri, α OPGL-1 seviyelerinin, antikor analizinin ve kemik döngüsü belirteç serumu N-telopeptidin (serum N-Tx), alkalın fosfatazı (ALP) ve serum kalsiyumun (serum Ca) analizini saptaması için alınmaktadır. Ürün aynı zamanda, N-telopeptidin (ürin N-Tx) ve kreatinin analizi için toplanmaktadır.

IV uygulamasından sonra serum konsantrasyon-süre profilleri, bir tri-fazik dağılım ile karakterize edilmektedir (Şekil 13). İlk olarak, bir hızlı dağılım aşaması mevcut olmaktadır. bunu konsantrasyona bağlı olarak görülen, önemli ölçüde yavaş plato aşaması takip etmiştir. Üçüncü gözlemlenen aşama, hızlı bir eliminasyon aşamasıdır.

WinNonlin Professional (v1.5) kullanılarak tam serum konsantrasyon süresi profillerinin bölümlü olmayan analizi ve test maddesinin uygulanmasından sonra 14 güne kadar ve SAAM II (v1.1.2) kullanılarak 10,000 ng/mL miktarı üzerinde üstel veri analizi, maymunlarda α OPGL-1'in farmakokinetiklerini inceleyecek şekilde kullanılmaktadır. Tüm IV dozlarından ilk dağılım hacmi, plazma hacmine benzer olarak 28.9 ml/kg'dir. Dağılımı hızı koşullarda hacmi (V_{ss}), tüm IV dozları boyunca 39 ml/kg'dir. Üstel analiz, α OPGL-1'in, 6.02 saatlik bir ortalama dağılım yarı ömrüne ($t_{1/2\alpha}$), 0.1 mg/kg bir dozda 86.0 saat ila 10.0 mg/kg bir dozda maksimum 444 saat aralığında dozla artışı gösteren bir yarı ömürle ($t_{1/2\beta}$) genişletilmiş bir ikinci aşamaya sahip olduğunu göstermektedir. Terminal eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2z}$), tüm IV doz grupları boyunca bölümlü olmayan 31 saatlik ortalamaları tahmin etmiştir. α OPGL-1 (CL, CL/F) klerensinin, 0.1 mg/kg (0.401 ml/saat/kg) alanlardan 3.3 kat daha düşük olan bir ortalama klerense (0.120 ml/saat/kg) sahip olan 10 mg/kg IV dozları alan hayvanlarla lineer olmadığı keşfedilmiştir.

Subkütanöz olarak uygulandıktan sonra, 132 saatte 11,600 ng/mL ortalama zirve konsantrasyonlarla absorpsiyon yavaşlığı SC uygulamasından sonra maruziyet aralığında yüksek bir değişkenlik vardı. Bu da 0.387 ± 0.281 ml/saat/kg bir ortalama klerense ve 202

± 80.1 saatlik bir ortalama süreye (C_{max}) neden olmaktadır. Ortalama biyoyararlanım, %89'dur.

Önceki veriler, Tablo 5'te özetlenmektedir.

Tablo 5: α OPGL-1 IV ve SC'nin Tek Bir Dozu Uygulandıktan Sonra Sinomologus Maymunlarda Ortalama ($\pm$ SD) Bölümlü Olmayan Farmakokinetik Parametreler^a

Bölümlü Olmayan Parametre Tahminleri						
Parametre	Birim	1.0 mg/kg		0.1 mg/kg	1.0 mg/kg	10 mg/kg
		SC (n=6)		IV (n=2)	IV (n=2)	IV (n=2)
		Ortalama	SD	Ortalama	Ortalama	Ortalama
T_{max}	saat	132	60.2	0	0	0
C_{max}	ng/ml	11600	3410	4330	38200	326000
$T_{1/2z}$	saat	34.9	11.1	30.7	31.4	ND ^b
$AUC(0-\infty)$	$\mu\text{g}\cdot\text{saat}/\text{ml}$	3520	1750	253	3950	99900
CL, CL/F	ml/ saat /kg	0.387	0.281	0.401	0.256	0.120
MRT	saat	202	80.1	84.8	124	519
Vss	ml/kg	N/A ^c	N/A	33.7	31.7	55.9

^aDeğerleri, 3 önemli şekle bildirilmektedir

^bBelirlenmemiş, plato (β) aşaması bu şekilde terminal aşaması esnasında sona eren PK numuneleri gözlemlenmemektedir

^cUygulanabilir değil

5

α OPGL-1, dozdan sonra 24 saat içerisinde serum N-Tx seviyelerinde hızlı bir azalmaya yol açmaktadır. IV dozlar 0.1 ila 10 mg/kg arasında artış gösterirken, dozdan sonra 12 saat ve 7 gün arasında ve 1.0 mg/kg bir SC dozunu alan hayvanlarda 12 saat ve 11 gün arasında maksimum etkili ortalama sürenin olduğu gözlemlenmektedir. Maksimum etki, 0.1 ila 1 mg/kg doz aralığında yaklaşık olarak %80 ila 91 aralığında dozla artış göstermektedir. Fakat, daha yüksek dozlarda, maksimum %91 inhibisyonla herhangi bir diğer süpresyon gözlemlenmemektedir. Ortalama serum N-Tx seviyeleri, 0.1 mg/kg IV uygulandıktan sonra 28. gün itibarıyla ve 1 mg/kg SC uygulandıktan sonra 70. gün itibarıyla referans değerine geri dönmektedir. Ürün N-Tx, tüm grupları, 105 gün itibarıyla referans değerlerine geri dönmesinin haricinde serum N-Tx'inkilere benzer eğilimler sergilemektedir (Şekil 15).

10

15

Serum (Ca) süpresyonu, 10.0 mg/kg IV uygulamasından ortalama yedi gün sonra referans değerinin altında bir ortalama %31.6 dozla artış göstermektedir. Tüm diğer doz grupları serumda (Ca), referans değeri ortalamalarından %26.4'den daha az ortalama azalmalara sahiptir. 17. gün itibarıyla, tedavi edilen hayvanlarda tüm serum (Ca) seviyeleri, referans değeri ortalamalarından %10'u içerisinde geri dönmektedir (Şekil 20).

20

Kemik rezorpsiyonu ve oluşumu yakından bağlanırken, kemik oluşumu belirteçlerinde (ALP) olan değişimler de ALP seviyelerinde, oluşum belirtecinden (N-Tx) çok daha yavaş düşüle ve çok daha uzatılmış süpresyonla gözlemlenmektedir (Şekil 21). AOPGL-1 ile dozlamayı takip eden kemik oluşum belirteçlerinden (ALP) önce kemik rezorpsiyon belirteçlerindeki düşüşün gözlemlenmesi, α OPGL-1'in, bir kemik anti-rezorptif madde olduğunu onaylamaktadır

Hayvanların büyük çoğunluğu (12'den 9'u), α OPGL-1'e antikorlar geliştirmektedir. α OPGL-1'e karşı antikorların insidansı, doza veya uygulama yoluna bağlı değildir. Herhangi bir doz grubu, antikoru negatif ve pozitif hayvanlara sahip olmadığında, 0.1 mg/kg üzerinde α OPGL-1 farmakokinetiklerinde α OPGL-1'e antikorların etkisini ölçmek mümkün değildir. 0.1 mg/kg IV'de, α OPGL-1'in büyük çoğunluğu, antikor gelişiminden önce temizlenmektedir ve bu şekilde, α OPGL-1 birikimine dair etkiler gözlemlenmemektedir (Şekil 16).

Yukarıdaki buluşun yönleri, aşağıdaki özel maddeye referans açılacaktır

1. Bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren, ağır zincirin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'de belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içerdigi ve hafif zincirin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içerdigi bir antikor.

2. Bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren, ağır zincirin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir değişken bölgeyi ve hafif zincirin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir değişken bölgeyi içerdigi bir antikor.

3. Ağır zincirin ve hafif zincirin, tek zincirli bir antikoru oluşturmak üzere esnek bir bağlayıcı ile bağlandığı tek zincirli bir Fc antikoru olan madde 3'e göre antikor.

4. Bir tek zincirli Fv antikoru olan madde 3'e göre antikor.

5. Bir Fab antikoru olan madde 2'ye göre antikor.

6. Bir Fab' antikoru olan madde 2'ye göre antikor.

7. Bir (Fab')₂ antikoru olan madde 2'ye göre antikor.

8. Tamamen insan olan madde 2'ye göre antikor.

9. Antikoru, OPGL'nin bir osteoklast farklılaşma ve aktivasyon reseptörüne (ODAR) bağlantısını inhibe ettiği madde 2'ye göre antikor.

10. SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'de belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir ağır zincir.

11. SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir

fragmanı içeren bir ağır zincir.

12.SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir hafif zincir.

13.SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir hafif zincir.

14.Bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren, bir ağır zincirin ve bir hafif zincirin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2'de belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içerdği bir antikor.

15.Bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren, ağır zincirin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir değişken bölgeyi içerdği bir antikor.

16.Bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren, bir hafif zincirin SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içerdği bir antikor.

17.Bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren, hafif zincirin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen bir amino asit sekansı veya bunun bir fragmanı içeren bir değişken bölgeyi içerdği bir antikor.

18.Bir ağır zinciri ve bir hafif zinciri içeren,

(a) ağır zincirin, bir birinci değişken bölgeyi içerdği ve birinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansı en az %90 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içerdği ve

(b) hafif zincirin, bir ikinci değişken bölgeyi içerdği ve ikinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansı en az %90 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içerdği bir antikor ve

(c) burada antikor, bir osteoprotegerin ligandı (OPGL) ile etkileşime geçmektedir.

19.Birinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansı en az %95 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içerdği ve ikinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansı en az %95 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içerdği madde 8'e göre antikor.

20.Birinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13'te belirlenen amino asit sekansı en az %99 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içerdği ve ikinci değişken bölgenin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14'te belirlenen amino asit sekansı en az %99 özdeşliğe sahip olan bir sekansı içerdği madde 18'e göre antikor.

21.Madde 1 ila 9 veya 14 ila 20 arasından herhangi birine göre bir antikoru içeren bir

farmasötik bileşim.

22. Bir kemik morfojenik faktöründen, dönüştürücü büyüme faktörü- β 'dan (TGF- β), bir interlökin-1 (IL-1) inhibitöründen, IL-1ra Kineret™'den, bir TNF α inhibitöründen, bir çözülebilir TNF α reseptöründen, Enbrel™, bir anti-TNF α antikorundan, Remicade™, D2E7 antikorundan, bir paratiroid hormonundan, bir paratiroid hormonunun bir analogundan, bir paratiroid hormonu ile ilişkili proteinden, bir paratiroid hormonu ile ilişkili bir proteinin bir analogundan, bir prostaglandinden, bir bifosfonattan, bir alendronattan, florürden, kalsiyumdan, bir steroidal olmayan antiinflamatuvar ilaçtan (NSAID), bir COX-2 inhibitöründen Celebrex™, Vioxx™; bir immünoşüpresandan, metotreksattan, leflumidden, bir serin proteaz inhibitöründen, bir salgılayıcı makrofaj proteaz inhibitöründen (SLPI), bir IL-6 inhibitöründen, IL-6'ya karşı bir antikordan, bir IL-8 inhibitöründen, IL-8'e karşı bir antikordan, bir IL-18 inhibitöründen, bir IL-18 bağlayıcı proteinden, bir IL-18 antikorundan, bir İnterlökin-1 dönüştürücü enzim (IC) modülatöründen, bir fibroblast büyüme faktöründen (FGF), bir FGF modülatöründen, bir PAF antagonistinden, bir keratinosit büyüme faktöründen (KGF), bir KGF ile ilişkili bir molekülden, bir KGF modülatöründen; bir matris metaloproteinaz (MMP) modülatöründen, bir nitrik oksit sintaz (NOS) modülatöründen, glukokortikoid reseptörünün bir modülatöründen, glutamat reseptörünün bir modülatöründen, bir lipopolisakkarit (LPS) seviyelerinin bir modülatöründen, bir nöradrenalinden, bir nöradrenalin mimetiğinden ve bir nöroadrenalin modülatöründen seçilen en az bir terapötik maddeyi içeren madde 21'e göre farmasötik bileşim.

23. En az bir terapötik maddenin, Kineret™, Enbrel™, Remicade™, D2E7 antikor ve metotreksattan seçildiği madde 22'ye göre farmasötik bileşim.

24. Madde 2'ye göre antikorla numunenin temasa geçirilmesini içeren, bir biyolojik numunede OPGL seviyesinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem.

25. Madde 21'e göre farmasötik bileşimin uygulanması içeren, bir hastada bir osteopenik rahatsızlığın tedavi edilmesine yönelik bir yöntem.

26. Madde 22'ye göre farmasötik bileşimin uygulanması içeren, bir hastada bir osteopenik rahatsızlığın tedavi edilmesine yönelik bir yöntem.

27. Madde 22'ye göre farmasötik bileşimin uygulanması içeren, bir hastada kemik kaybıyla sonuçlanan bir inflamatuvar koşulun tedavi edilmesine yönelik bir yöntem.

28. Madde 22'ye göre farmasötik bileşimin uygulanması içeren, bir hastada kemik kaybıyla sonuçlanan bir otoimmün koşulun tedavi edilmesine yönelik bir yöntem.

29. Madde 22'ye göre farmasötik bileşimin uygulanması içeren, bir hastada bir romatoid artrit tedavisi için tedavi edilmesine yönelik bir yöntem.

SEKANS LİSTESİ

	<110> Boyle, William J	
5	Martin, Francis H	
	Corvalan, Jose R	
	Davis, C. Geoffrey	
	<120> OPGL'ye karşı antikorlar	
10	<130> 06843.0049-00000	
	<150> 60/301,172	
	<151> 2001-06-26	
15	<160> 20	
	<170> PatentIn sürüm 3.1	
20	<210> 1	
	<211> 1426	
	<212> DNA	
	<213> Mus musculus	
25	<400> 1	
	aagcttgacc accatggagt ttgggctgag ctggcctttt cttgtggcta ttttaaaagg	60
	tgtccagtgt gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc	120
	cctgagactc tctgtgcag cctctggatt caccctttagc agctatgcc aagactgggt	180
	cggccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attactggga gtggtggtag	240
	tacatactac gcagactccg tgaagggcgc gttcaccatc tccagagaca attccaagaa	300
	cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac accgccgtat attactgtgc	360

gaaagatcca gggactacgg tgattatgag ttgggttcgac ccc̄tggggcc agggaaccct 420
 ggtaacccgtc tcttcagcct ccaccaaggg cccatccgtc tccccctgg cggcctgctc 480
 caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgectg gtcaaggact acttcccga 540
 acgggtgacg gtgtcgtgga actcaggccc tetgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc 600
 tgtcctacag tcttcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa 660
 cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcccaag cccagcaaca ccaagggtgga 720
 caagacagtt gagcgcaat gttgtgtgga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc 780
 aggacccgtca gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac 840
 ccttgaggtc acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcna 900
 ctgghacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt 960
 caacagcagc ttcgltgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg 1020
 caggagctac aagtgcnaagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat 1080
 ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catcccggga 1140
 ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga 1200
 catcgcctg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc 1260
 catgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag 1320
 gtggcagcag gggaaagctt tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctc acaaccacta 1380
 cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgataa gtcgac 1426

<210> 2

<211> 467

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

10

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe
 115 120 125
 Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
 210 215 220
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
 225 230 235 240
 Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

275

280

285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Ile Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 3

<211> 728

5 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

```

totagaccac catggaacc ccagcgcagc ttctcttctt cctgctactc tggtcccag      60
ataccacccg agaaattgtg ttgacgcagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg     120
aaagagccac cctctctgt agggccagtc agagtgttcg cggcaggtae ttagcctggc     180
accagcagaa acctggccag gctcccagge tctcatctta tggcgcctcc agcagggcca     240
ctggcctccc agacagggtc agtggcagtg ggtctgggac agacttcaat ctaccatca     300
gcagactgga gctgaagat ttgacagtg tttactgtca gcagtatggc agttcacctc     360
ggacgttcgg ccaagggacc aaagtggaaa tcaaacgaac tggggctgca ccatctgtct     420
tctctctccc gccatctgat gacgagttga attctggaac tgcctctgtt gtctgcctgc     480
tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat     540
cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggcagcaa ggcagcacc tacagcctca     600
gcagcaccct gacgtcgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gctgcagaag     660
tcaccatca gggcctgagc tgcctcgtca caaagagctt caacagggga gagtgttgat     720
aagtccac                                         728

```

5 <210> 4

<211> 235

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <400> 4

```

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1              5              10              15

```

```

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
          20              25              30

```

```

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          35              40              45

```

```

Val Arg Gly Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
          50              55              60

```

```

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

```

65		70		75		80									
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
			85					90					95		
Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Phe	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr
		100						105					110		
Gly	Ser	Ser	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
		115					120					125			
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
	130					135					140				
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
145					150					155					160
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
			165						170					175	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
		180						185					190		
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
		195					200					205			
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
210						215					220				
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
225					230					235					

<210> 5

5 <211> 25

<212> DNA

<213>Yapay Sekans

<220>

10 <223> 5' kappa RACE primer

<400> 5

gatgacccagtcctccagccaccctg

25

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213>Yapay Sekans
 5
 <220>
 <223> 3' kappa RACE primer
 <400> 6
 aaggggtcagaggccaaaggatgg 23
 10
 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213>Yapay Sekans
 15
 <220>
 <223> 5' anti-OPGL-1 kappa primer
 <400> 7
 caactctagaccaccatggaaaccccagcg 30
 20
 <210> 8
 <211> 37
 <212> DNA
 <213>Yapay Sekans
 25
 <220>
 <223> 3' anti-OPGL-1 kappa primer
 <400>B
 tttgacgtcgacttatcaacactctcccctgttgaag 37
 30
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213>Yapay Sekans
 35
 <220>
 <223> 5' IgG2 RACE primer
 <400> 9
 Ggcacgggtcaccacgtgct gag 23
 40
 <210> 10

<211> 24
 <212> DNA
 <213>Yapay Sekans

5 <220>
 <223> 3' IgG2 RACE primer
 <400> 10
 cctccaccaagggcccatcggtct 24

10 <210> 11
 <211> 51
 <212> DNA
 <213>Yapay Sekans

15 <220>
 <223> 5' anti-OPGL-1 IgG2 Primer
 <400> 11
 cagaagcttgaccaccatggagtttgggctgagctggctttttcttgtgg c 51

20 <210> 12
 <211> 37
 <212> DNA
 <213>Yapay Sekans

25 <220>
 <223> 3' anti-OPGL-1 IgG2 Primer
 <400> 12
 gcatgtcgacttatcattttacccggagacagggagag 37

30 <210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <400> 13

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr 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 Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 15

<211> 24

5 <212> DNA

<213>Yapay Sekans

<220>

<223> rastgele primer

10 <220>

<221> diğer_özellik

<222> (18)..(23)

<223> N; A, C, G, veya T'dir

15 <400> 15

ggccggataggcctcacnnnnnnt

24

<210> 16

<211> 5

20 <212> PRT

<213>Yapay Sekans

<220>

<223> 5' anti-OPGL-1 kappa primerin bölümünün kalıt okuması

<400> 16

5 Met Glu Thr Pro Ala
1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

10 <213>Yapay Sekans

<220>

<223> 3' anti-OPGL-1 kappa primerin bölümünün kalıt okuması

15 <400> 17

Cys Glu Gly Arg Asn Phe
1 5

<210> 18

<211> 12

20 <212> PRT

<213>Yapay Sekans

<220>

<223> 5' anti-OPGL-1 IgG2 Primerin bölümünün kalıt okuması

25

<400> 18

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala
1 5 10

<210> 19

30 <211> 7

<212> PRT

<213>Yapay Sekans

<220>

35 <223> translation of portion of 3' anti-OPGL-1 IgG2 Primerin bölümünün kalıt okuması

<400> 19

Lys Gly Pro Ser Leu Ser Leu
1 5

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213>Yapay Sekans
 5
 <220>
 <223> LHRH antagonist peptid
 <220>
 <221>DİĞER_ÖZELLİK
 10 <222> (1)..(1)
 <223>Xaa,Ac-D-Nal'dir, Nal, 3-(2-naftil)alaninildir

 <220>
 <221>DİĞER_ÖZELLİK
 15 <222> (2)..(2)
 <223>Xaa (4'-klorofenul)alaninildir

 <220>
 <221>DİĞER_ÖZELLİK
 20 <222> (3)..(3)
 <223>Xaa, D-Pal'dir, Pal, 3-(3'-piridil)alaninildir

 <220>
 <221>DİĞER_ÖZELLİK
 25 <222> (5)..(5)
 <223>Xaa, N-metil tiroosindir

 <220>
 <221>DİĞER_ÖZELLİK
 30 <222> (6)..(6)
 <223>Xaa, D-asparajindir

 <220>
 <221>DİĞER_ÖZELLİK
 35 <222> (8)..(8)
 <223>Xaa, N-epsilon-2-propil-lisinildir

 <220>
 <221>DİĞER_ÖZELLİK
 40 <222> (10)..(10)
 <223>Xaa, D-alanin,-NH2'dir

<400> 20

Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Pro	Xaa
1				5					10

5

ŞEKİL 1

 α OPGL-1 Ağır Zincirli cDNA

SaII bölgesi boyunca HindIII bölgesinde başlayan ağır zincirli ekspresyon plazmidinin DNA sekansı Başlangıç kodonu, nt 14'te başlamaktadır stop kodonu nt 1415'te başlamaktadır

```

1  AAGCTTGACC ACCATGGAGT TTGGGCTGAG CTGGCTTTT CTTGTGGCTA TTTTAAAAGG
61  TGTCCAGTGT GAGGTGCAGC TGTTCGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC
121 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT
181 CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTACTGGGA GTGGTGGTAG
241 TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA
301 CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC
361 GAAAGATCCA GGGACTACGG TGATTATGAG TTGGTTCGAC CCCTGGGGCC AGGGAACCTT
421 GGTCACCGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC
481 CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA
541 ACCGGTGACG GTGTCTGTGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GCGCTGCACA CTTCCCAGC
601 TGTCCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAA
661 CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA
721 CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCTG GTGCCACCG TGCCAGCAC CACTGTGGC
781 AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA ACGCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC
841 CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA
901 CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
961 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG
1021 CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT
1081 CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATECCGGGA
1141 GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA
1201 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
1261 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CTTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG
1321 GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
1381 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGATAA GTCGAC (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1)

```

ŞEKİL 2

 α OPGL-1 Ağır Zincirli Amino Asit Sekansı

IgG2 sinyal peptidinin altı çizilmektedir, değişken bölge büyük harfle yazılmaktadır ve altı çizilmemektedir ve sabit bölge, küçük harfle yazılmaktadır

```

1  MEFGLSWLFL VAILKGVOCE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
61  GKGLEWVSGI TGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
121 TTVIMSWFDP WGQGTlVTVS Sastkgpsvf plapcsrstS estaalgclv kdyfpepvtv
181 swnsгалtsг vhtfpavlgS sglyslssvv typssnfgtq tytcnvdhkp sntkvdkte
241 rkccvecppc pappvagpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevqfnwyvd
301 gvevhnaktk preeqfnstf rvsvltvvh qdwlngkeyk ckvsnkglpa piektisktk
361 gqprepvyt lppsreemtk nqvsltcivk gfypsdiave wesngqpenn ykttppmlds
421 dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe alhnhytqks lslspgk (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2)

```

ŞEKİL 3

 α OPGL-1 kappa Hafif Zincirli cDNA

SaII bölgesi boyunca XbaI bölgesinden kappa zincirli ekspresyon plazmid sekansı DNA sekansıBaşlangıkodonu, nt 12'de başlamaktadır stop kodonu nt 717'de başlamaktadır

```

1  TCTAGACCAC CATGGAAACC CCAGCGCAGC TTCTCTTCCT CCTGCTACTC TGGCTCCCAG
61 ATACCACCGG AGAAATTGTG TTGACGCAGT CTCCAGGCAC CCTGTCTTTG TCTCCAGGGG
121 AAAGAGCCAC CCTCTCCTGT AGGGCCAGTC AGAGTGTTCT CGGCAGGTAC TTAGCCTGGT
181 ACCAGCAGAA ACCTGGCCAG GCTCCAGGC TECTCATCTA TGGTGCATCC AGCAGGGCCA
241 CTGGCATCCC AGACAGGTTT AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGACTTCACT CTCACCATCA
301 GCAGACTGGA GCCTGAAGAT TTTGCAGTGT TTTACTGTCA GCAGTATGGT AGTTCACCTC
361 GGACGTTCCG CCAAGGGACC AAGGTGGAAA TCAAACGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT
421 TCATCTTCCC GCCATCTGAT GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC
481 TGAATAACTT CTATCCCAGA GAGGCCAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT
541 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC TACAGCCTCA
601 GCAGCACCTT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG
661 TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTGAT
721 AAGTCGAC (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3)

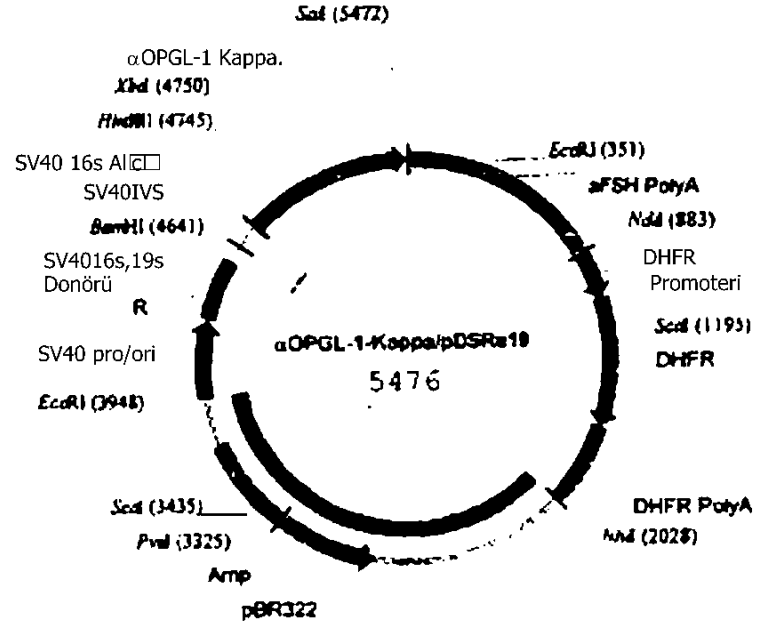
```

ŞEKİL 4 **α OPGL-1 kappa Hafif Zincirli Amino Asit Sekansı**

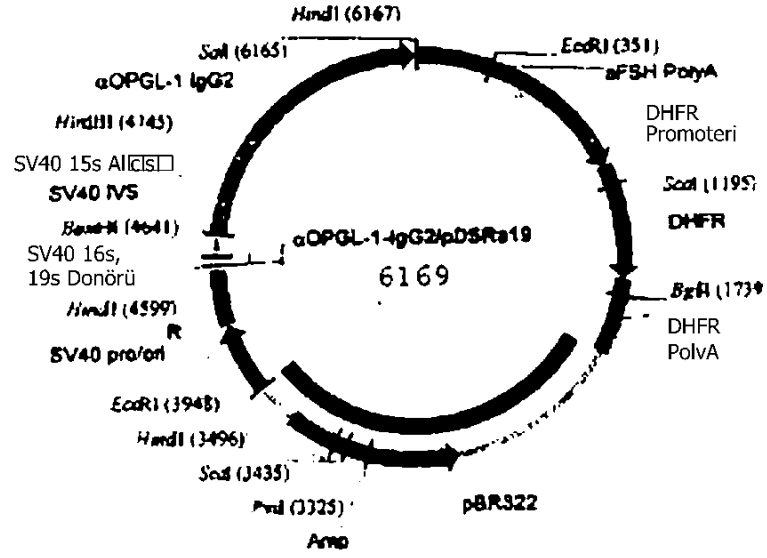
Kappa sinyal peptidinin altı çizilmektedir, değişken bölge büyük harfle yazılmaktadır ve altı çizilmemektedir ve sabit bölge, küçük harfle yazılmaktadır

1 METPAQLLFL LLLWL P D T T G EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR
 51 GRYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
 101 PEDFAVFYQC QYGSSPRTEG QGTKVEIKrt vaapsvfifp psdeqlksgt
 151 asvvcllnnf ypreakvqwk vdnalqsgns qesvteqdsd dstyslsstl
 201 tlskadyekh kvvacevthq glsspvtksf nrgec (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4)

ŞEKİL 5

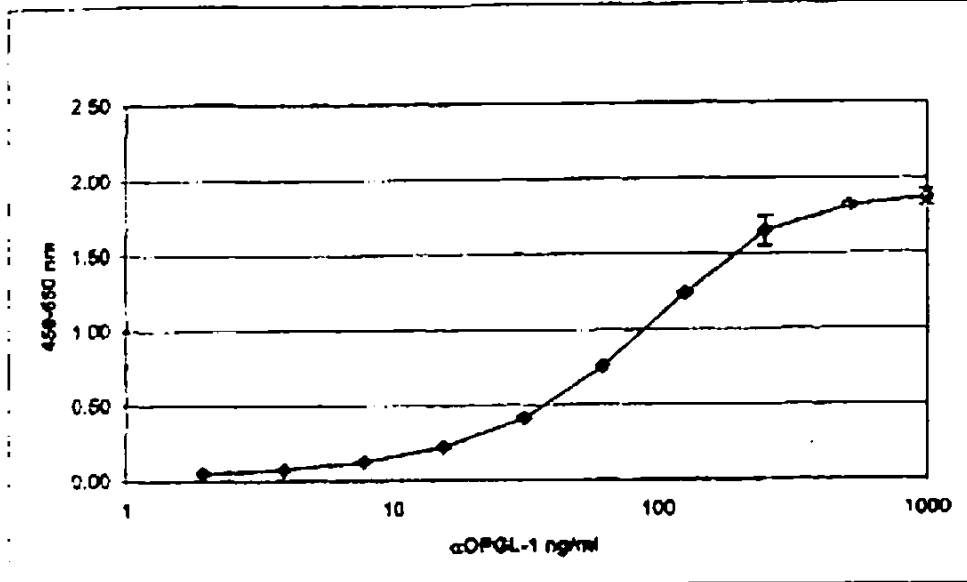
 α OPGL-1-kappa/pDSR α 19'un Dairesel Plazmid Haritası

ŞEKİL 6

 α OPGL-IgG2/pDSR α 19'un Dairesel Plazmid Haritası

ŞEKİL 7

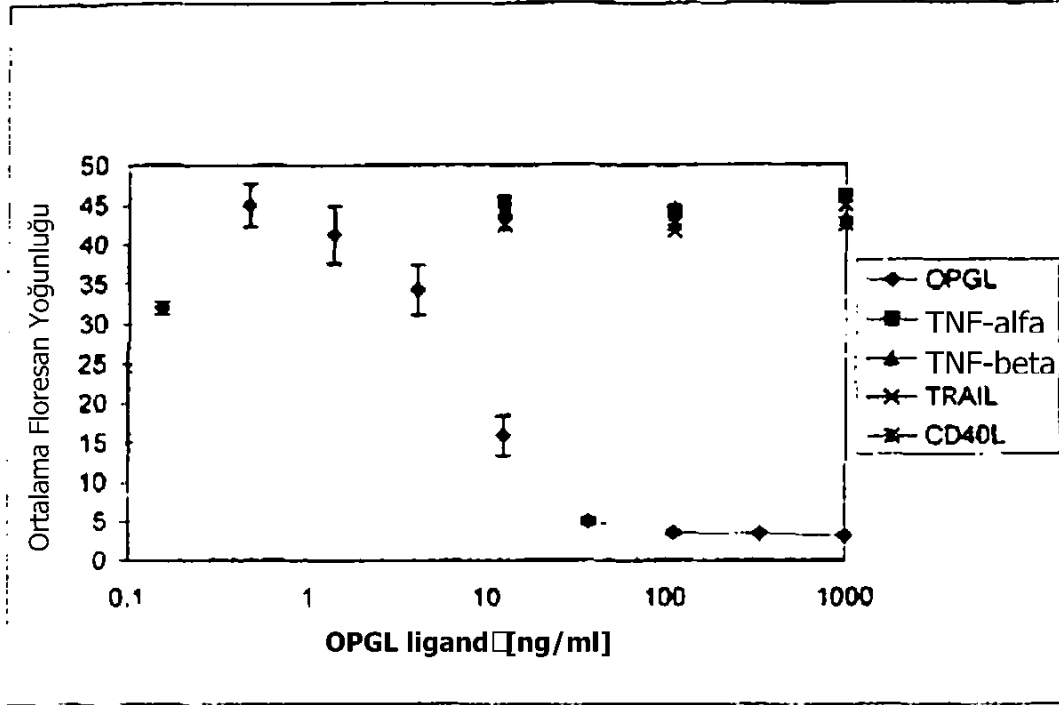
α OPGL-1 Doza Bağlı Bir Şekilde EIA Plakasında Kaplanan Çözülebilir OPG Ligandına Bağlanmaktadır



96 hazneli EIA plakalar, rekombinant çözülebilir OPGL ile kaplanmaktadır. α OPGL-1'in çeşitli konsantrasyonları haznelere eklenmektedir ve oda sıcaklığında 2 saatliğine inkube edilmektedir. Keçi anti-İnsan IgG (Fab')-Yaban Turpu Peroksidaz Absorbans, 450 nm ve 650 nm'de okunmaktadır.

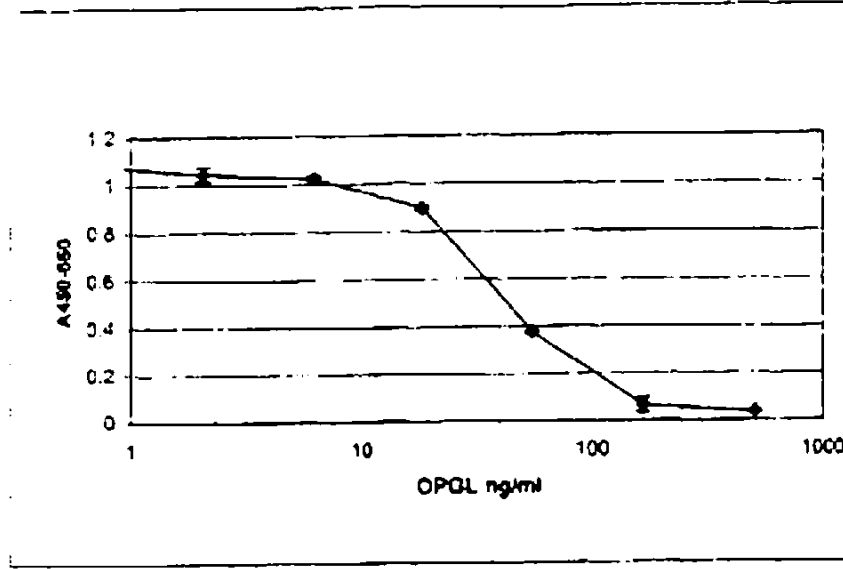
ŞEKİL 8

α OPGL-1 Membrana Bağlı OPGL'ye Belirgin Bir Şekilde Bağlanmaktadır



α OPGL-1 bir doza bağlanarak CHO REN 218-9 hücrelerin bir hücre yüzeyinde eksprese edilen OPGL'ye bağlanmaktadır. Bu bağlantı eksojen olarak eklenen insan OPGL ile tamamlanmaktadır fakat TNF- α , TNF- β , TRAIL veya CD40 ile tamamlanamamaktadır. α OPGL-1 (100 ng/ml), çözülebilir OPGL'nin veya diğer ligandların çeşitli konsantrasyonlarıyla önceden inkube edilmektedir ve daha sonrasında, yüzeyde OPGL'yi eksprese eden CHO REN 218-9 hücreleri ile inkube edilmektedir. Hücreler, Fc γ Fragmanına Özgü FITC-işaretli F(ab')₂, Keçi anti-İnsan IgG ile 2-8°C'de 30 dakikalık süre inkube edilmektedir. Santrifüjleme ve yıkama sonrasında, hücre yüzeyi floresan okuyucu sitometrisi kullanılarak ölçülmektedir.

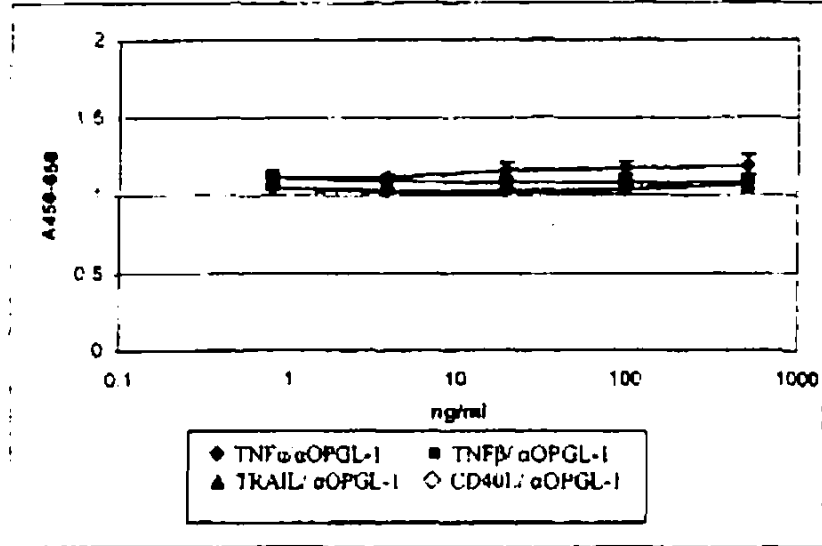
ŞEKİL 9

 α OPGL-1 Çözülebilir OPGL'ye Bağlanmaktadır

Bir EIA plakasında OPGL'ye bağlanan α OPGL-1, eksojen olarak eklenen çözülebilir OPGL.

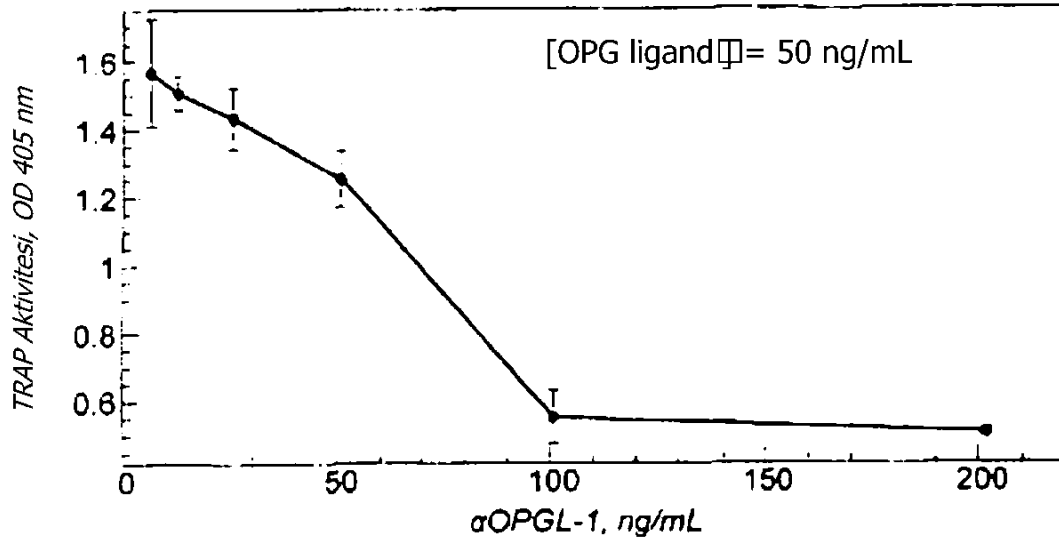
Şekil 10

α OPGL-1, TNF aile elemanları (TNF- α , TNF- β , TRAIL veya CD40 ligandı)



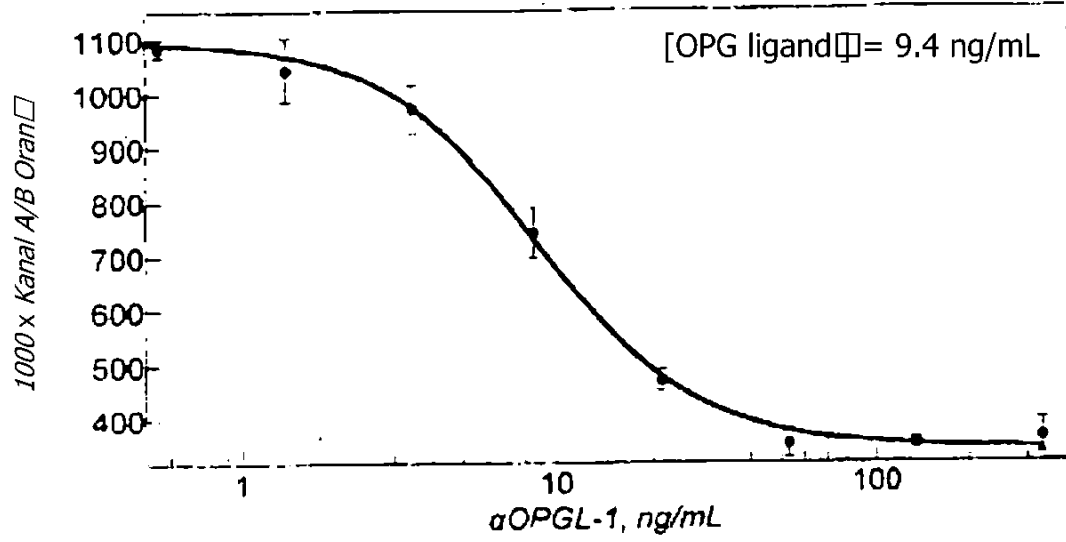
bir EIA plakasında OPGL'ye bağlanan α OPGL-1, eksojen olarak eklenen TNF- α , TNF- β , TRAIL veya CD40 ligandıyla azaltılmaktadır

SEKİL 11

RAW 264.7 Hücrelerinde OPG Ligandı ile indüklenen TRAP Aktivitesinin α OPGL-1 ile Doza Bağlı İnhibisyon

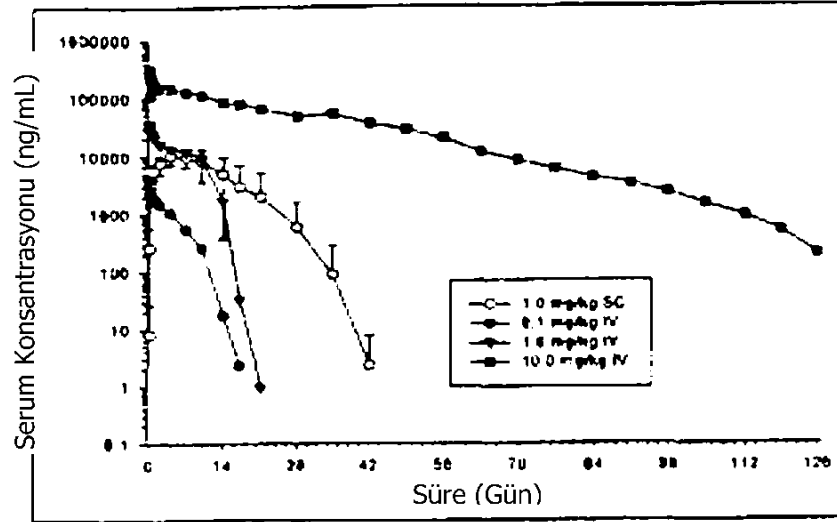
SEKİL 12

ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC'ye Bağlanan Evropiyum-işaretli OPG
Ligand α OPGL-1'i ile Doza Bağlı İnhibisyon



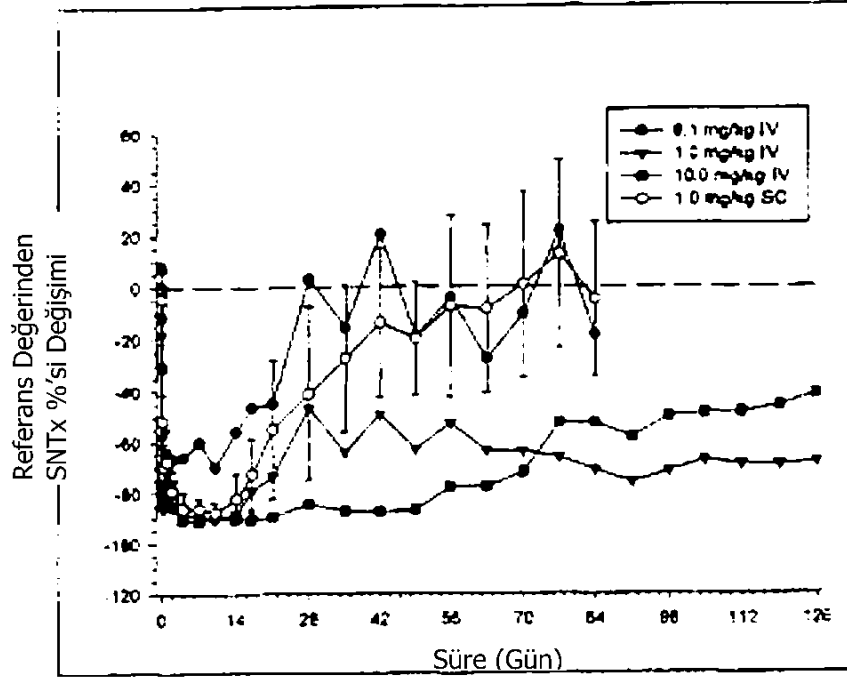
SEKİL 13

α OPGL-1'in, 0.1, 1 ve 10.0 mg/kg IV (n=2/doz) ve 1.0 mg/kg SC (n=6/doz) Dozlarda Sinomolgus Maymunlara Tek Dozlu Uygulamadan Sonra Ortalama ($\pm$ SD) Serum-Konsantrasyon Süre Profilleri



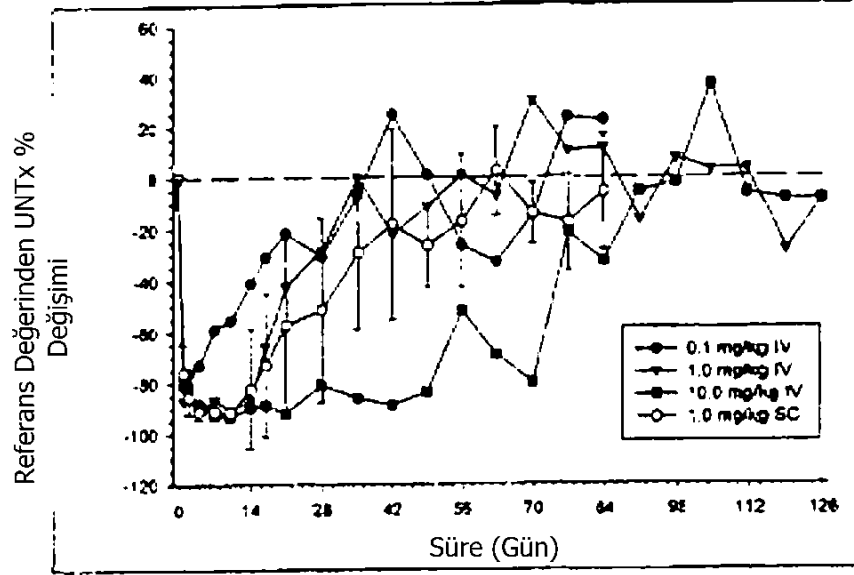
SEKİL 14

α OPGL-1'in tek bir dozunun IV (n=2/doz) veya SC (n=6), 0.1,1 ve 10.0 mg/kg Dozlarda Sinomolgus Maymunlara uygulanmasından sonra serum N-Tx Konsantrasyonunda Ortalama ($\pm$ SD) Yüzde Değişimi.



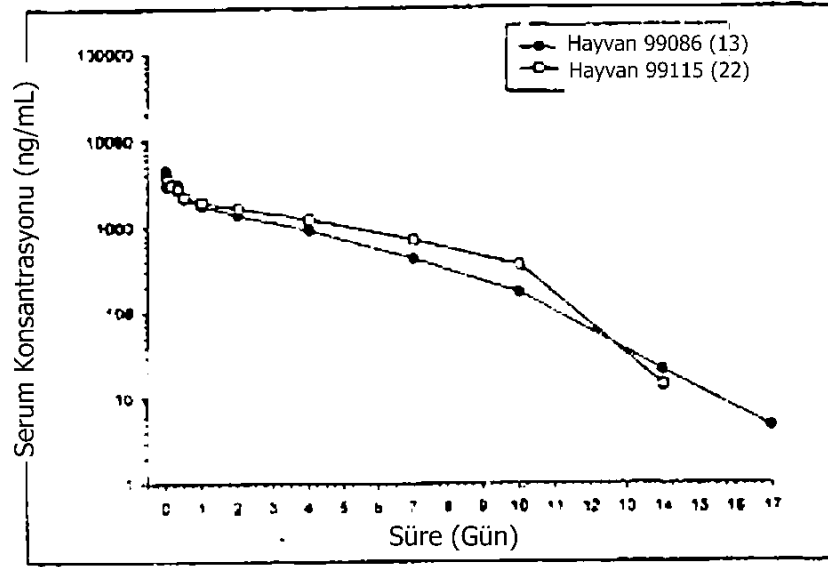
SEKİL 15

α OPGL-1'in tek bir dozunun IV (n=2/doz) veya SC (n=6), 0.1,1 ve 10.0 mg/kg Dozlarda Sinomolgus Maymunlara uygulanmasından sonra Ürın N-Tx Konsantrasyonunda Ortalama ($\pm$ SD) Yüzde Değişimi.



SEKİL 16

α OPGL-1 IV'ün tek bir dozunun, 0.1, 1 ve 10.0 mg/kg Dozlarda Sinomolgus Maymunlara Uygulanmasından Sonra Antikor pozitif (açık siyah semboller) ve Negatif (kapalı kare semboller) Hayvan Serum-Konsantrasyon Süre Profilleri



ŞEKİL 17 **α OPGL-1 Ağır Zincirli Değişken Bölge Amino Asit**

1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA
 41 PGKGLEWVSG ITGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
 81 LQMNSLRAED TAVYYCAKDP GTTVIMSWFD PWGQGT LVTV
 121 SS (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13)

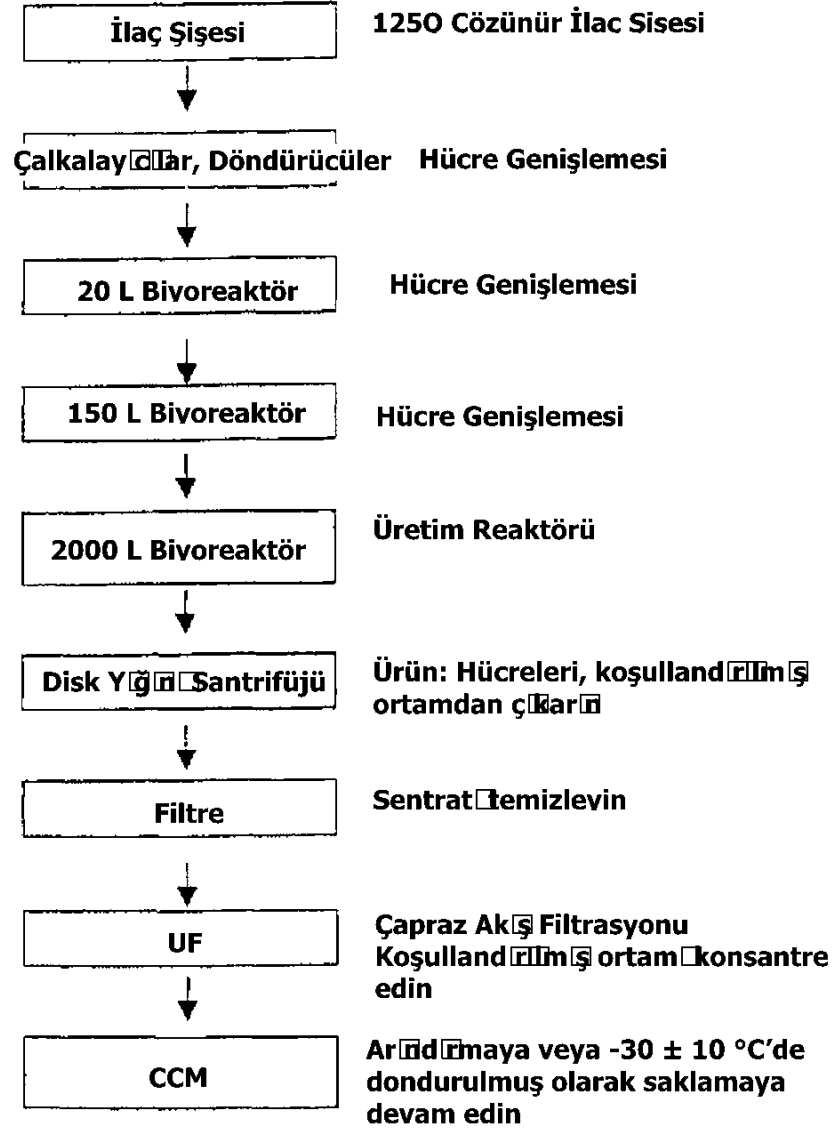
ŞEKİL 18

α OPGL-1 Hafif Zincirli Değişken Bölge Amino Asit Sekansı□

1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR GRYLAWYQQK
41 PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
81 PEDFAVFYCQ QYGSSPRTFG QGTKVEIK (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14)

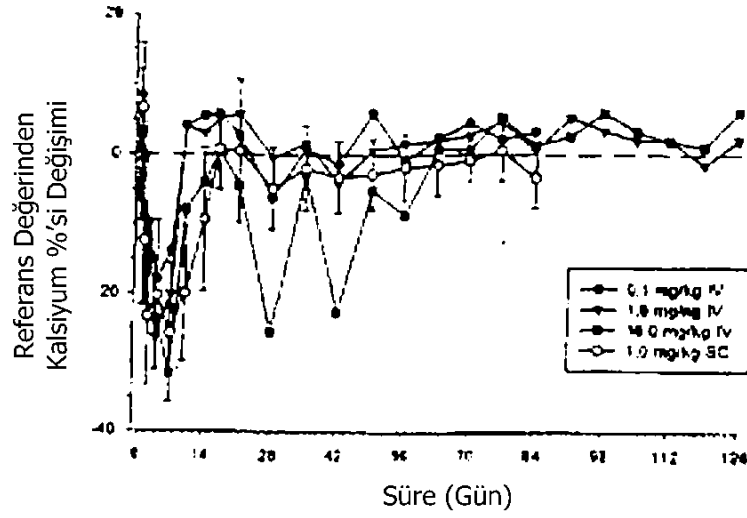
ŞEKİL 19

Hücre Kültürü Süreci Akış Şeması



ŞEKİL 20

α OPGL-1'in tek bir dozunun, Sinomolgus Maymunlara
Uygulanmasından Sonra Referans Değerinden Ortalama Serum
Kalsiyum Yüzde Değişimi



ŞEKİL 21

α OPGL-1'in tek bir dozunun, Sinomolgus Maymunlara
Uygulanmasından Sonra Referans Değerinden Ortalama Serum
Alkalın Fosfataz Yüzde Değişimi

