

ÖZET

İYON DEĞİŞİM KROMATOĞRAFİSİ GİRDİ OPTİMİZASYONUNUN AÇIKLAMASI

- 5 Mevcut buluş, örneğin bir polipeptid ve bunun yük varyantlarının ayrılması gibi kromatografik ayırma koşullarının belirlenmesi için yöntemler sağlar. Mevcut buluş ayrıca kromatografi ayırma koşulları için bir tampon koşulu belirlemek için yöntemler sağlar.
- 10 Mevcut buluş ayrıca çoklu polipeptid ürünlerini analiz etmek için güçlü bir yöntem sağlar.

İSTEMLER

1. Çok sayıda bileşimi analiz etmek amacıyla bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu tespit etmek için
5 bir yöntem olup, özelliği; burada her bir bileşimin bir polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içermesi, yöntemin şunları kapsamasıdır:

a) iki veya daha fazla bileşimin polipeptidlerinin amino asit bileşimi baz alınarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH
10 eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi, ve

b) a) adımının çizimlerinin ikinci türevinin belirlenmesiyle, nötr veya nötre yakın pH'deki pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının tespit edilmesi;

burada optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu,
15 bir veya daha fazla bileşimin polipeptid(ler)i için ortak bir bükülme noktasındaki bir pH'dir.

2. Bir polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bir bileşimi analiz etmek amacıyla bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu tespit etmeye yönelik bir yöntem
20 olup, özelliği; aşağıdakileri kapsamasıdır:

a) polipeptidin amino asit bileşimi baz alınarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi, ve

b) a) adımının çiziminin ikinci türevinin
25 belirlenmesiyle, nötr veya nötre yakın pH'deki pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının tespit edilmesi;

burada optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulunun, polipeptid için bükülme noktasına yakın bir pH olmasıdır.

3. İstem 1 veya 2'ye göre yöntem olup, özelliği; burada bükülme noktasındaki net yükün pozitif olması halinde, bir katyon değişim malzemesinin, iyon değişim kromatografisi için kullanılmasıdır.

4. İstem 2'nin yöntemi olup, özelliği; burada katyon

değişimi kromatografisi malzemesinin, bir sülfonatlı kromatografi malzemesi veya bir karboksilatlı kromatografi malzemesi olmasıdır.

5. İstem 1 veya 2'nin yöntemi olup, özelliği; burada bükülme noktasındaki net yükün negatif olması halinde, bir anyon değişim malzemesinin kromatografi için kullanılmasıdır.

6. İstem 5'in yöntemi olup, özelliği; burada, anyon değişimi kromatografisi malzemesinin, bir dördüncül amin kromatografi malzemesi veya bir üçüncül amin kromatografi malzemesi olmasıdır.

7. İstem 1 veya 2'nin yöntemi olup, özelliği; burada bir karma kipli kromatografi malzemesinin, kromatografi için kullanılmasıdır.

8. İstem 7'nin yöntemi olup, özelliği; burada karma kipli iyon değişim malzemesinin, bir sıralı olarak doldurulmuş sülfonatlı kromatografi malzemesi veya karboksilatlı kromatografi malzemesi ve bir dördüncül amin kromatografi malzemesi veya üçüncül amin kromatografi malzemesi karışımı olmasıdır.

9. İstem 1, 3-8'den herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; aşağıdakileri içermesidir,

c) iki veya daha fazla bileşimin polipeptidleri için sıcaklıktaki (dIP/dT) bir değişim ile pH eğrisine karşı net yükün pH değerindeki değişimin belirlenmesi,

d) kromatografide kullanıma yönelik bir tampon seçilmesi, burada tamponun asit ayrışma sabitindeki bir değişim ile sıcaklıktaki değişimin (dpKa/dT), polipeptidlerin dIP/dT'si ile aslen aynı olmasıdır.

10. İstem 2 ila 8'den herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; ayrıca aşağıdakileri içermesidir:

c) polipeptid için sıcaklıktaki (dIP/dT) bir değişim ile pH eğrisine karşı net yükün pH değerindeki değişimin belirlenmesi,

d) kromatografide kullanıma yönelik bir tampon seçilmesi,

burada tamponun asit ayrışma sabitindeki bir değişim ile sıcaklıktaki değişimin (dpK_a/dT), polipeptidin dIP/dT 'si ile aslen aynı olmasıdır.

11. İstem 9 veya 10'un yöntemi olup, özelliği; burada tamponun, pH bükülme noktasında etkili bir tampon kapasitesi sağlamasıdır.

12. İstemler 1-11'in herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada bir veya daha fazla bileşimin polipeptidlerinin dIP/dT 'sinin, yaklaşık -0,02 pH birim olmasıdır.

13. İstemler 1-12'den herhangi birine göre yöntem olup, özelliği; sıcaklıktaki değişimin aşağıdaki gibi olmasıdır:

a) 20 °C'den 70 °C'ye; ve/veya

b) 20 °C'den 50 °C'ye.

14. İstemler 9-13'ün herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada $dpK_a/dT = dIP/dT \pm \%50$ olmasıdır.

15. İstemler 9-14'ün herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada d) adımıda seçilen tampondaki polipeptidin net yükünün, 30 °C üzerinde 0,5'ten az değişmesidir.

16. İstemler 9-15'in herhangi birinin yöntemi olup, özelliği;

burada d) adımıda seçilen tamponun, yaklaşık 5 mM ila yaklaşık 250 mM arasındaki bir konsantrasyondaki bir kromatografide kullanılmasıdır.

17. İstemler 1-16'nın herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada tampon bileşimlerinin ayrıca bir tuz içermesidir.

18. İstem 17'nin yöntemi olup, özelliği; burada

a) tuzun, NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ veya Na_2SO_4 olması; ve/veya

b) tuzun yoğunluğunun, yaklaşık 1 mM ila yaklaşık 1M arasında olmasıdır.

19. Bir bileşimi analiz etmeye yönelik bir yöntem olup, özelliği; burada bileşimin, bir polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içermesi, burada yöntemin polipeptidi kontaminantlardan etkili bir şekilde ayırması, yöntemin aşağıdakileri içermesidir:

a) her bir bileşimin bir hedef polipeptid ve istem 1'in yöntemine göre bir veya daha fazla kontaminant içerdiği çok sayıda bileşime yönelik iyon değişimi ayırma koşullarının optimal pH ve sıcaklığının belirlenmesi,

5 b) polipeptid ve bileşimdeki bir veya daha fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponunun istemler 9-16'nın herhangi birinin yönteminde tanımlanan bir tampon olması;

10 c) polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantının iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponunun tampon ve bir tuz içermesi, burada gradyandaki tuz konsantrasyonunun zamanla artması, burada
15 polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın gradyanla ayrılması; ve

d) polipeptidin ve bir veya daha fazla kontaminantın saptanmasıdır.

20. Bir polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren
20 bir bileşimi analiz etmek için bir yöntem olup, özelliği; burada yöntemin polipeptidi kontaminantlardan etkili bir şekilde ayırması, yöntemin aşağıdakileri içermesidir:

a) polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir yükleme tamponu
25 kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponunun bir tampon içermesi ve burada kromatografinin pH ve sıcaklığının, çok sayıda hedef polipeptit için aşağıdaki şekilde optimize edilmesidir:

i) seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı
30 net yük eğrisinin çizilmesi, burada eğrinin, iki veya daha fazla hedef polipeptidinin amino asit bileşimine dayalı olması, ve

ii) i) adımının çizimlerinin ikinci türevinin belirlenmesiyle, pH eğrisine karşı net yük eğrisinin

bükülme noktasının tespit edilmesi;

burada en uygun iyon değişim kromatografisi şartının, iki veya daha fazla hedef polipeptidi için bir ortak bükülme noktasındaki bir pH olması;

- 5 b) polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponunun tampon ve bir tuz içermesi, burada polipeptidin ve bir veya daha fazla kontaminantın
10 gradyanla ayrılması; ve

c) polipeptidin ve bir veya daha fazla kontaminantın saptanması.

21. İstem 20'nin yöntemi olup, özelliği; burada seçilen sıcaklığın, ortam sıcaklığı olmasıdır.

- 15 **22.** İstem 20 veya 21'in yöntemi olup, özelliği; burada tamponun, aşağıdakilerle tespit edilmesidir:

a) iki veya daha fazla hedef polipeptid için sıcaklıktaki (dIP/dT) bir değişim ile pH eğrisine karşı net yükün pH değerindeki değişimin belirlenmesi,

- 20 b) sıcaklıkta değişiklik ile asit ayrışma sabit tamponunda bir değişikliğin, esasen ortak bükülme noktalarına sahip bir veya daha fazla hedef polipeptitin dIP/dT'si ile aynı olduğu bir tampon (dpKa/dT) seçilmesi.

25 **23.** İstem 22'nin yöntemi olup, özelliği; burada tamponun, pH bükülme noktasında etkili bir tampon kapasitesi sağlamasıdır.

24. İstem 19 ila 23'ün yöntemi olup, özelliği; burada tamponun, N-(2-asetamido)-2-aminoetansülfonik asit (ACES) veya 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (HEPES) olmasıdır.

- 30 **25.** İstemler 19-24'ün herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada tampon konsantrasyonunun yaklaşık 5 mM ila yaklaşık 20 mM arasında olmasıdır.

26. İstemler 19-25'in herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada tampon pH'sinin aşağıdaki aralıklarda

olmasıdır:

a) yaklaşık 20 °C ila yaklaşık 70 °C'lik bir sıcaklık aralığında yaklaşık 6.5 ila yaklaşık 8.5 arasında; ve/veya

b) yaklaşık 20 °C ila yaklaşık 50 °C'lik bir sıcaklık aralığında yaklaşık 6.5 ila yaklaşık 8.5 arasında.

27. İstemler 19-26'nın herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada tamponun ve bükülme noktasındaki polipeptidin pH'si, yaklaşık 22°C'de yaklaşık 7.8, yaklaşık 37°C'de yaklaşık 7.5 veya yaklaşık 50°C'de yaklaşık 7.2 olmasıdır.

28. İstemler 19-27'nin herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada tuz gradyanının aşağıdakiler olmasıdır:

a) bir lineer gradyan; ve/veya

b) bir basamaklı gradyan; ve/veya

c) bir NaCl gradyanı, bir KCl gradyanı, (NH₄)₂SO₄ gradyanı veya bir Na₂SO₄ gradyanı.

29. İstemler 19-28'in herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada gradyandaki tuz konsantrasyonunun aşağıdaki şekilde artmasıdır:

a) yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 1M'ye; veya

b) yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 100 mM'ye, yaklaşık 100 dakika içerisinde; veya

c) yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 80 mM'ye, yaklaşık 40 dakika içerisinde.

30. İstemler 1-29'un herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada polipeptidin aşağıdakiler olmasıdır:

a) bir antikor veya immünoadezin veya bunların fragmanı; ve/veya

b) bir monoklonal antikor veya bunun fragmanı.

31. İstem 30'un yöntemi olup, özelliği; burada antikoru aşağıdakiler olmasıdır:

a) bir insan antikoru, bir hümanize antikor veya bir kimerik antikor; ve/veya

b) bir antikor fragmanı.

32. İstemler 1-31'in herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada kontaminantın aşağıdakiler olmasıdır:

- a) polipeptidin bir varyantı; ve/veya
- b) polipeptidin bir bozunma ürünü; ve/veya
- 5 c) polipeptidin bir yük varyantı.

33. İstemler 19-32'nin herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada kromatografi malzemesinin, bir katyon değişimi kromatografisi malzemesi olmasıdır.

34. İstem 33'nin yöntemi olup, özelliği; burada katyon
10 değişimi kromatografisi malzemesinin, bir sülfonatlı kromatografi malzemesi veya bir karboksilatlı kromatografi malzemesi olmasıdır.

35. Çok sayıda polipeptid bileşiminin analiz edilmesi için bir yöntem olup, özelliği; burada her bir polipeptid
15 bileşiminin bir polipeptit ve polipeptidin bir veya daha fazla yük varyantını içermesi, burada yöntemin polipeptidi yük varyantlarından etkili bir şekilde ayırmasıdır;

her bir polipeptid bileşimi için yöntemin şunları içermesidir:

20 a) polipeptid ve bir veya daha fazla yük varyantının, bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine, bir yükleme tamponu kullanılarak yaklaşık 1 mL/dakikalık bir akış hızında bağlanması, burada yükleme tamponunun, yaklaşık 40 °C'de yaklaşık pH 7.6'da 10 mM HEPES tamponu içermesidir;

25 b) polipeptid ve yük varyantlarının, iyon değişimi kromatografisi malzemesindeki kontaminantlardan, bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponunun, yaklaşık pH 7.6'daki yaklaşık 10 mM HEPES tamponu ve bir NaCl içermesi, burada gradyandaki NaCl
30 konsantrasyonunun, yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 80 mM'ye yaklaşık 40 dakika içerisinde yükselmesi, burada polipeptid ve yük varyantlarının gradyanla ayrılması; ve

c) polipeptid ve bir veya daha fazla yük varyantının tespit edilmesi.

36. İstem 35'in yöntemi olup, özelliği; burada çok sayıdaki polipeptid bileşimlerinin farklı polipeptidleri içermesidir.

37. İstem 35 veya 36'nın yöntemi olup, özelliği; burada çok sayıdaki polipeptid bileşimlerinin farklı pIs'lere sahip

5 polipeptidler içermesidir.

38. İstemler 35-37'nin herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada polipeptid bileşimlerinin, antikor bileşimleri olmasıdır.

TARİFNAME

İYON DEĞİŞİM KROMATOĞRAFİSİ GİRDİ OPTİMİZASYONUNUN AÇIKLAMASI

5 BULUŞUN ALANI

Mevcut buluş, protein yük varyantları için iyonik güç gradyanı iyon değişim kromatografisi kullanılarak polipeptidlerin preparasyonlarının analiz edilmesine yönelik yöntemler sağlar.

BULUŞUN GEÇMİŞİ

- 10 Monoklonal antikorlar (mAb'ler) gibi proteinler, sulu bir ortamda yüzeyde çoğunlukla yüklü ve polar amino asitlere sahiptir (Barlow, DJ ve Thornton, JM (1986) *Biopolymers* 25:1717). Çözelti bileşenleri ile moleküler etkileşimden dolayı, yüzey artıkları çok sayıda kimyasal ve enzimatik
- 15 modifikasyona maruz kalarak, elektrostatik yüzeylerinde küçük farklılıklar gösteren heterojen bir protein varyantı karışımına yol açabilir (Dick, LW ve diğerleri, (2009) *J. Chromatogr. B* 877:3841; Liu, HW ve diğerleri, (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22:4081; Miller, AK, ve diğerleri, (2011) *J. Pharm. Sci.* 100:2543; Wang, WR ve diğerleri, (2011) *Mol. Immunol.* 48:860). Katyon değişim kromatografisi (CEC), Vlasak, J and Ionescu, R (2008 *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468) tarafından yapılan yakın tarihli bir incelemeye göre protein terapötiklerinin yük heterojenliğinin profillenmesi konusunda
- 25 altın standardı olarak kabul edilir. Yüke duyarlı ayırma yönteminin, üretim sırasında üretim tutarlılığının sağlanması ve protein terapötiklerinin bozunma seviyesinin izlenmesi, düzenleyici kurumlar tarafından çoğunlukla olarak talep edilmektedir (Miller, AK, ve diğerleri, (2011) *J. Pharm. Sci.* 100:2543; He, XPZ (2009) *Electrophoresis* 30:714; Sosic, Z ve diğerleri, (2008) *Electrophoresis* 29:4368; Kim, J ve diğerleri, (2010) *J. Chromatogr. B* 878:1973; Teshima, G ve diğerleri, (2010) *J. Chromatogr. A* 1218:2091).

- İyon Değişim Kromatografisi (IEC), tipik olarak bir bağlama ve
- 35 elüte etme modunda gerçekleştirilir. Genel olarak bir mAb gibi

bir protein örneği, sütuna protein bağlanmasını kolaylaştıran koşullar altında (yani %100 tampon A'da) durağan faza sokulur. Sırayla ayrılmak üzere farklı yüklü proteinlerin uyarılması için bir tuz veya pH gradyanı (yani, tampon B'nin %'si artar) uygulanır. IEC yöntemleri, tipik olarak ürüne özgüdür. Hem sağlam hem de sıcaklık ve pH'daki dalgalanmalara dayanabilen ve yük heterojenliğini yeterince çözebilen bir yöntemin geliştirilmesi kaynak yoğundur. Çoklu polipeptid ürünlerinde kirletici maddelerin varlığını belirlemek için sağlam analizlerin geliştirilmesine imkan veren bir optimal tampon sistemi geliştirme yöntemleri arzu edilir.

Kelley ve diğerleri (*Biotechn. and Bioengin.*, (2008) 100(5): 950-963) iyon değiştirme kromatografisi adımlarını optimize etmek için yüksek verimli tarama sisteminin kullanımını açıklar. Bir tarama çalışmasında 11 reçine, 4 pH seviyesi ve 3 başlangıç tuzu konsantrasyonu (toplam 144 kombinasyon) test edilmiştir. Ahamed ve diğerleri (*J. Chromatogr. A*, (2007), 1164: 181-188) bir pH gradyanı iyon değişim kromatografisi kullanarak optimal pH için tarama ve teorik pI değerlerini elde etmek için toplanan pH değerlerini proteinlerin net yüklerine karşı çizmek için bir yöntemi açıklamaktadır.

Mevcut buluş, hem polipeptidin hem de tamponlama sisteminin matematiksel modellemesine dayalı olarak iyon değişimine yönelik en uygun koşulları öngörmek için yöntemler sağlar.

25 KISA ÖZET

Mevcut buluşun konusu istemlerde tanımlanmıştır. Bazı görünümelerde, mevcut buluş, çok sayıda bileşimi analiz etmek için bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu tanımlanmasına yönelik yöntemler sağlamakta olup, burada her bir bileşim, bir veya daha fazla kontaminantlı bir polipeptid içerir, yöntem şunları kapsar: a) iki veya daha fazla bileşimin polipeptitlerinin amino asit bileşimine dayalı olarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi ve b) pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının nötr veya nötre yakın pH'da a) adımının

çizimlerinin ikinci türevi belirlenerek tespit edilmesi; burada optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulunun, bir veya daha fazla bileşimin polipeptidleri için ortak bir bükülme noktasına yakın bir pH'tır. Bazı uygulamalarda, yöntemler ayrıca şunları kapsar: c) iki veya daha fazla bileşimin polipeptidleri için sıcaklıktaki (dIP/dT) bir değişimle pH eğrisine karşı net yükün pH değişim noktasındaki değişimin belirlenmesi, d) kromatografide kullanmak için bir tampon seçilmesi, burada sıcaklıktaki değişikliklerle tamponun asit ayrışma sabitinde bir değişiklik ($dpKa/dT$), polipeptidlerin dIP/dT 'si ile aslen aynıdır.

Başka görünümelerde, mevcut buluş, bir veya daha fazla kontaminantlı bir polipeptid içeren bir bileşimi analiz etmek için bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu tanımlanmasına yönelik yöntem sağlamakta olup, yöntem şunları kapsar: a) polipeptidin amino asit bileşimine dayalı olarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi ve b) pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının nötr veya nötre yakın pH'de a) adımının çizimlerinin ikinci türevi belirlenerek tespit edilmesi; burada optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu, bir veya polipeptid için bükülme noktasına yakın bir pH'dir.

Bazı uygulamalarda, bükülme noktasındaki net yük pozitifse, bir katyon değişim malzemesi, iyon değişim kromatografisi için kullanılır. Bazı uygulamalarda, katyon değişimi kromatografisi malzemesi, bir sülfonatlı kromatografi malzemesi veya bir karboksilatlı kromatografi malzemesidir. Başka uygulamalarda, bükülme noktasındaki net yük negatifse, bir anyon değişim malzemesi, kromatografi için kullanılır. Bazı uygulamalarda, anyon değişimi kromatografisi malzemesi, bir dördüncül amin kromatografi malzemesi veya bir üçüncül amin kromatografi malzemesidir. Daha başka uygulamalarda, bir karma kipli kromatografi malzemesi, kromatografi için kullanılır. Bazı uygulamalarda, karma kipli iyon değişim malzemesi, bir sıralı olarak doldurulmuş sülfonatlı kromatografi malzemesi veya

karboksilatlı kromatografi malzemesi ve bir dördüncül amin kromatografi malzemesi veya üçüncül amin kromatografi malzemesi karışımıdır.

5 Bazı uygulamalarda, tampon, pH bükülme noktasında etkili bir tampon kapasitesi sağlar. Bazı uygulamalarda, bir veya daha fazla bileşimin polipeptidlerinin dIP/dT 'si, yaklaşık -0,02 pH birimdir. Bazı uygulamalarda, sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 70 °C arasındadır. Daha başka uygulamalarda, sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 50 °C arasındadır. Bazı uygulamalarda, $dpKa/dT = dIP/dT \pm \%50$ 'dir. Bazı uygulamalarda, d) adımında seçilen tampondaki polipeptidin net yükü 30 °C üzerinde 0,5'ten az değişir. Bazı uygulamalarda, d) adımında seçilen tampon, yaklaşık 5 mM ila yaklaşık 250 mM arasındaki bir konsantrasyondaki bir kromatografide kullanılır.

15 Yukarıda uygulamaların bazı uygulamalarında, tampon bileşimleri ayrıca bir tuz içerir. Daha başka uygulamalarda, tuz, NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ veya Na_2SO_4 'tür. Bazı uygulamalarda, tuzun yoğunluğu, yaklaşık 1 mM ila yaklaşık 1M arasındadır.

Buluşun yöntemlerinin bazı uygulamalarında, polipeptid, bir antikor veya immünoadezin veya bunların fragmanını içerir. Bazı uygulamalarda polipeptid, bir monoklonal antikor ya da bunun fragmanıdır. Bazı uygulamalara göre antikor bir insan antikorudur. Bazı uygulamalara göre antikor insanlaştırılmış bir antikordur. Daha başka uygulamalara göre antikor bir kimerik antikordur. Bazı yapılanmalarda antikor bir antikor fragmanıdır.

20 Buluşun yöntemlerinin bazı uygulamalarında, kontaminant, polipeptidin bir varyantıdır. Bazı uygulamalarda, kontaminant, polipeptidin bir bozunma ürünüdür. Bazı uygulamalarda, kontaminant, polipeptidin bir yük varyantıdır.

Bazı görünümelerde, mevcut buluş, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bir bileşimi analiz etmeye yönelik polipeptidleri kontaminantlardan etkili bir şekilde ayıran yöntemler sağlar, yöntem şunları kapsar: a) her biri bir hedef polipeptid ve buluşun yöntemlerine göre bir veya daha fazla

kontaminant içeren çok sayıda bileşim için optimal pH ve sıcaklık iyon değişimi ayırma koşullarının belirlenmesi, b) polipeptid ve bileşimdeki bir veya daha fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir yükleme 5 tamponu kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponu mevcut buluşun yöntemi tarafından tespit edilen bir tampondur; c) polipeptid ve iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir veya daha fazla kontaminant bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponu, 10 tampon ve bir tuz içerir, burada bir gradyandaki tuz konsantrasyonu zamanla artar, burada polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant gradyanla ayrılır; ve d) polipeptidin ve bir veya daha fazla kontaminantın saptanması.

Bazı görünümelerde, mevcut buluş, polipeptidi kontaminantlardan 15 etkili şekilde ayıran bir polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bir bileşimi analiz etmek için yöntemler sağlar, yöntem şunları kapsar: a) polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanması, 20 burada yükleme tamponu bir tampon içerir ve burada kromatografinin pH ve sıcaklığı çok sayıda hedef polipeptid için optimize edilmiştir i) iki veya daha fazla hedef polipeptidin polipeptidinin amino asit bileşimi baz alınarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük 25 eğrisinin çizilmesi, ve ii) i) adımının çizimlerinin ikinci türevini belirleyerek pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının tespit edilmesi; burada optimal iyon değişim kromatografisi koşulu, iki veya daha fazla hedef polipeptid için ortak bir bükülme noktasındaki bir pH'dir; b) 30 polipeptid ve iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir veya daha fazla kontaminantın bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponu, tampon ve bir tuz içerir, burada polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant gradyanla ayrılır; ve c) polipeptidin ve bir 35 veya daha fazla kontaminantın tespit edilmesi. Bazı

uygulamalarda, seçilen sıcaklık, ortam sıcaklığıdır. Bazı uygulamalarda, tampon, şunlarla tespit edilir: a) iki veya daha fazla hedef polipeptid için sıcaklıktaki bir değişimle (dIP/dT) pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktası

5 pH'sindeki değişimin tespit edilmesi, b) sıcaklıktaki değişiklik ile asit ayrışma sabiti tamponundaki bir değişikliğin ($dpKa/dT$), ortak bükülme noktalı bir veya daha fazla polipeptidin dIP/dT 'si ile aslen aynı olduğu bir tamponun seçilmesi. Bazı uygulamalarda, tampon, pH bükülme

10 noktasında etkili bir tampon kapasitesi sağlar.

Burada, bir polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bir bileşimi analiz etmek için polipeptidi kontaminantlardan etkili şekilde ayıran yöntemler açıklanmakta olup, yöntem şunları kapsar: a) polipeptid ve bir veya daha

15 fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponu bir tampon içerir ve burada kromatografinin pH ve sıcaklığı çok sayıda hedef polipeptid için optimize edilmiştir; b) polipeptid ve bir veya daha fazla

20 kontaminantın iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponu tampon ve bir tuz içerir, burada polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant gradyanla ayrılır; ve c) polipeptidin ve bir veya daha fazla

25 kontaminantın saptanması. Mevcut beyanın bazı görünümünde, tampon, N-(2-asetamido)-2-aminoetansülfonik asit (ACES) veya 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asittir (HEPES). Mevcut beyanın başka görünümünde, tampon konsantrasyonu, yaklaşık 5 mM ila yaklaşık 20 mM arasında değişir. Bazı

30 uygulamalarda, sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 70 °C arasındadır. Mevcut beyanın başka görünümünde, sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 50 °C arasındadır. Bazı uygulamalarda, $dpKa/dT = dIP/dT \pm \%50$ 'dir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, tampondaki polipeptidin net yükü 30 °C üzerinde 0,5'den az

35 değişir. Bazı uygulamalarda, tampon, yaklaşık 5 mM ila

yaklaşık 250 mM arasındaki bir konsantrasyondaki bir kromatografide kullanılır.

Yukarıda uygulamaların bazı uygulamalarında, tampon bileşimleri ayrıca bir tuz içerir. Daha başka uygulamalarda,

5 tuz, NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ veya Na_2SO_4 'tür. Bazı uygulamalarda, tuzun yoğunluğu, yaklaşık 1 mM ila yaklaşık 1M arasındadır. Bazı uygulamalarda, tuz konsantrasyonu yaklaşık 100 dakikada yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 100 mM'ye çıkar. Başka uygulamalarda, tuz konsantrasyonu, yaklaşık 40 dakikada
10 yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 80 mM'ye çıkar.

Buluşun yöntemlerinin bazı uygulamalarında, polipeptid, bir antikor veya immünoadezin veya bunların fragmanını içerir. Bazı uygulamalarda polipeptid, bir monoklonal antikor ya da bunun fragmanıdır. Bazı uygulamalara göre antikor bir insan
15 antikorudur. Bazı uygulamalara göre antikor insanlaştırılmış bir antikordur. Daha başka uygulamalara göre antikor bir kimerik antikordur. Bazı yapılanmalarda antikor bir antikor fragmanıdır.

Buluşun yöntemlerinin bazı uygulamalarında, kontaminant,
20 polipeptidin bir varyantıdır. Bazı uygulamalarda, kontaminant, polipeptidin bir bozunma ürünüdür. Bazı uygulamalarda, kontaminant, polipeptidin bir yük varyantıdır.

Bazı uygulamalarda, iyon değişim kromatografi malzemesi bir katyon değişim kromatografi malzemesidir. Başka uygulamalarda,
25 katyon değişimi kromatografisi malzemesi, bir sülfonatlı kromatografi malzemesi veya bir karboksilatlı kromatografi malzemesidir.

Bazı görünümelerde, mevcut buluş çok sayıda polipeptid bileşiminin analiz edilmesi için yöntemler sağlar, burada her
30 bir polipeptid bileşimi bir polipeptid ve polipeptidin bir veya daha fazla yük varyantını içerir, burada yöntem polipeptidi yük varyantlarından etkili bir şekilde ayırır; her bir polipeptid bileşimi için yöntem şunları kapsar: a) polipeptid ve bir veya daha fazla yük varyantının bir iyon
35 değişimi kromatografisi malzemesine yaklaşık 1 mL/dakikalık

bir akış hızında bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponunun yaklaşık pH 7.6'da yaklaşık 40 °C'de 10 mM HEPES tamponu içermesi; b) polipeptid ve yük varyantları kontaminantlarının iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponu yaklaşık pH 7.6'da yaklaşık 10 mM HEPES tamponu ve bir NaCl içerir, gradyandaki burada NaCl konsantrasyonu yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 80 mM'ye yaklaşık 40 dakika içerisinde çıkar, burada polipeptid ve yük varyantları gradyanla ayrılır; ve c) polipeptid ve bir veya daha fazla yük varyantının saptanması. Bazı uygulamalarda, çok sayıdaki polipeptid bileşimi farklı polipeptidleri içerir. Bazı uygulamalarda, çok sayıdaki polipeptid bileşimi, farklı pIs'lere sahip polipeptidler içerir. Bazı uygulamalarda, polipeptid bileşimleri, antikor bileşimleridir.

ÇİZİMLERİN KISA AÇIKLAMALARI

Şekil 1, monoklonal antikor mAb1 (düz boş çizgi) ve bunun iki yük varyantı için pH'ye karşı hesaplanan net yükü çizen bir grafiktir. Kesik çizgiler, iki negatif yüklü bir asidik varyant ve iki pozitif yüklü bir bazik varyantı temsil eder. Eğriler, mAb1 ve bunun varyantlarının amino asit dizisi bileşimi kullanılarak oluşturulmuştur. Yıldız, eğrinin bükülme noktasını gösterir. PH'ın bükülme noktasında çalışan bir platform IEC yöntemi, pH'a göre optimal çözünürlük ve sağlamlık sağlayacaktır.

Şekil 2A, bir popülasyondaki (örneğin, bir polipeptid çözeltisi) pH ölçeği üzerinde protonlanmış histidinlerin (pozitif yüklü) yüzdesinin bir grafiğini göstermektedir.

Şekil 2B, pH 6.5 ve pH 7.5'de on histidin kalıntısı içeren bir polipeptiddeki deprotonize histidinlerin (yük frekansı) sayısını göstermektedir. Enfeksiyon noktasının (pH 7.5), histidin artıklarının çoğunun deprotonize olduğunu ve yüklü olmadığını göstermektedir.

Şekil 2C, her biri iki histidin kalıntısına sahip dört polipeptid molekülünün bir örneğini göstermektedir. His'in

pKa'sında (pH 6.0), His kalıntılarının %50'si protonlanmış ve %50'si protonsuzlaştırılmıştır. Bu dört moleküldeki His kalıntılarının yük durumu, pKa'da bir binom dağılımıdır: birisi her iki His'i protonlanmış; ikisi bir His'i protonlanmış ve diğeri protonsuzlaştırılmış; ve birisi her iki His'i protonsuzlaştırılmış.

Şekil 3, pH'nin bir fonksiyonu olarak polar amino asitler için yük frekansına ilişkin tipik bir monoklonal antikorun bir grafiğidir. 37 °C'de yük hesaplamasına katkıda bulunan altı amino asit için farklı pH'larda farklı en bol yük durumunun olasılığı, düz çizgiler halinde çizilmiş ve mAb1 için bu amino asit kalıntılarının ağırlıklı kombinasyonu, kesikli bir çizgi halinde çizilmiştir.

Şekil 4, 22 °C'de farklı pH'larda mAb1'in Shannon entrofisini göstermektedir. Net yük hesaplamasına katkıda bulunan amino asit kalıntılarının türü ve sayısı Tablo 3'te listelenmiştir.

Şekil 5, 37 °C'de farklı pH'taki bir mAb1 popülasyonunda yük dağılımının 3D görünümünü ve yük dağılımı frekansını göstermektedir. Net yük vs. pH eğrisinin bükülme noktasında, yük dağılımının yaklaşık 0,7 ile en homojen iken, bükülme noktasından uzaktaki pH'ta, yük dağılımının 0,15'lik bir frekansla daha geniş olduğunu göstermektedir. IEC ayırması yüke dayalı olduğu için, yük dağılımı frekansı ne kadar yüksek olursa, tepe noktası o kadar dar ve çözünürlük o kadar yüksek olur.

Şekil 6, Şekil 5'in 2D gösterimi olup, mAb1 için bir net yüke karşı pH eğrisidir. Sıcaklık 37 °C iken bükülme noktası pH 7.5'tedir.

Şekil 7, 37 °C'de çeşitli mAb ürünü için pH'nin bir fonksiyonu olarak net yükü gösteren bir grafik. Her bir mAb'nin hesaplanan net yükü, mAb'nin amino asit sekansına göre hesaplanmıştır. Bazı mAb'ler farklı çerçeve amino asit sekanslarına sahip olmuştur. Tüm eğrilerin bükülme noktası 37 °C'de pH 7.5 civarındadır.

Şekil 8, çok sayıdaki mAb ürününün 22 °C'de (elmaslar), 37°C'de (üçgenler) ve 50°C'de (kareler) hesaplanan bükülme noktalarını gösteren bir grafiktir.

Şekil 9, net yükün mAb2 için pH değerini 22 °C ila 50 °C arasındaki sıcaklıklarda gösteren bir grafiktir.

Şekil 10A, bükülme noktası değişim hızını göstermektedir.

Şekil 10B, seçilen mAb'ler için sıcaklığın bir fonksiyonu olarak dIP'deki değişikliği göstermektedir. Değişim oranı hemen hemen aynıdır.

Şekil 11, belirli bir tamponda bir mAb2 için net yükü gösteren bir sıcaklıktır (fosfat, HEPES, ACES ve Tris).

Şekil 12, aynı kromatografi prosedürünü kullanarak farklı pI'lere sahip birkaç mAb'nin örtüştürülen kromatogramlarını göstermektedir. Tampon A, 37 °C'de 5 mM ACES pH 7.5'tir.

Tampon B, Tampon A içinde 180 mM NaCl'dir. Tuz gradyanı, 100 dakika içerisinde veya 1 mM/dakikada 37 °C'de 0 mM NaCl ila 100 mM NaCl'dir. Akış hızı, 0,8 mL/dk olmuştur. Kolon, bir MabPac SCX-10 kolonu (4×250 mm) olmuştur.

Şekil 13, pH'nin bir fonksiyonu olarak mAb4 için bir IEC'nin dayanıklılığını göstermektedir. Kromatografi şartları, gradyanın 1,5 mM NaCl/dk olması haricinde Şekil 12'de gösterildiği gibidir.

Şekil 14, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak üç mAb için bir IEC'nin dayanıklılığını göstermektedir. Kromatografi koşulları, üç antikorun tümü için ve Şekil 13'te tarif edilenlerle aynı olmuştur.

Şekil 15, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak üç mAb için bir IEC'nin dayanıklılığını göstermektedir. Kromatografi şartları, tüm üç antikor için de aynı olmuştur. Kromatografi şartları, tamponun 10 mM HEPES olması haricinde Şekil 13'teki gibidir.

Şekil 16, çoklu ürün prosedürünü kullanarak üç mAb'nin IEX kromatografisini karşılaştıran ve her mAb için geliştirilmiş prosedürleri kullanan grafikleri göstermektedir. Çoklu ürünlü yöntem, 37 °C'de (1,5 mM/dk) 50 dakika içerisinde ve 0,8 mL/dk'lık bir akış hızında bir 0 mM NaCl ila 75 mM NaCl

gradyanı ile 5 mM ACES pH 7.5 olmuştur. Ürüne özel yöntemler için tampon ve sıcaklık farklı olmuştur. mAb8 için bu, 30 °C'de 20 mM MES pH 6.5'tir; mAb25 için bu, 42 °C'de 20 mM HEPES pH 7.6'dır; ve mAb26 için bu, 40 °C'de 20 mM ACES pH

Şekil 17, dört farklı kromatografi kolonları üzerinde mAb8 kullanılarak çok ürünlü kromatografi koşullarının kullanımını göstermektedir; ProPac WCX-10 (10 µm, 4×250 mm), YMC (5 µm, 4×100 mm), AntiBodix (5 µm, 4×250 mm), ve MabPac SCX-10 (10 µm, 4×250 mm). Kromatografi koşulları, Şekil 13'te tarif edilen şekilde olmuştur. Ekleme, varyant piklerinin genişlemesini gösterir.

Şekil 18, farklı boyutlardaki ProPac WCX-10 kromatografi kolonlarında; 4×250 mm, 4×100 mm, 4×50 mm, mAb8 kullanılarak çoklu ürünlü kromatografi şartlarının kullanımını göstermektedir. Çalışma süreleri, daha kısa kolonlar ile daha kısa olmaktadır. Kromatogramlar, ana tepe noktasına normalleştirilmiştir. Kromatografi koşulları, gradyan koşulları haricinde Şekil 15 için tarif edilen şekilde olmuştur.

Şekil 19, bir GMP Dayanıklılık DOE çalışmasının ana pik görelî yüzdesinin bir grafiğini göstermektedir.

Şekil 20, bir GMP Dayanıklılık DOE çalışmasının ana pik görelî yüzdesinin bir grafiğini göstermektedir.

Şekil 21, bir GMP Dayanıklılık DOE çalışmasının ana pik görelî yüzdesinin bir grafiğini göstermektedir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, bir veya daha fazla kontaminantlı bir polipeptid içeren bir bileşimi analiz etmek için bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu tanımlanmasına yönelik yöntemler sağlamakta olup, yöntem şunları kapsar: a) polipeptidin amino asit bileşimine dayalı olarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi ve b) pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının nötr veya nötre yakın pH'de a) adımının çizimlerinin ikinci türevi

belirlenerek tespit edilmesi; burada optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu, bir veya polipeptid için bükülme noktasına yakın bir pH'dir. Bazı uygulamalarda, yk frekansının dağılımı, verilen bir sıcaklık için farklı pH değerlerinde polipeptidin Shannon entrofisinin hesaplanmasıyla belirlenir. Shannon entrofisi azalırken, bir bileşimdeki polipeptidin yük dağılımı daha homojen olur. Sonuç olarak, polipeptid ve yk varyantları arasındaki çözünme kabiliyeti iyileşir.

10 Bazı uygulamalarda, mevcut buluş, bir veya daha fazla kontaminantlı bir polipeptid içeren bir bileşimi analiz etmek amacıyla, bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulunda kullanım için bir tampon tanımlamak için yöntemler sağlar. Bazı uygulamalarda, sıcaklıkla ($dpKa/dT$) asit ayrışma

15 sabitindeki değişimin, sıcaklık (dIP/dT) ile yukarıda tarif edilen şekilde bükülme noktasındaki değişime yaklaşık olarak eşit olduğu bir tampon seçilir.

Bazı görünümlerde, mevcut buluş, çok sayıda bileşimi analiz etmek için bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu tanımlanmasına yönelik yöntemler sağlamakta olup,

20 burada her bir bileşim, bir veya daha fazla kontaminantlı bir polipeptid içerir, yöntem şunları kapsar: a) iki veya daha fazla bileşimin polipeptitlerinin amino asit bileşimine dayalı olarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi ve b) pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının nötr veya nötre yakın pH'de a) adımının çizimlerinin ikinci türevi belirlenerek tespit edilmesi; burada optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulunun, bir veya daha fazla bileşimin polipeptidleri için ortak bir

25 bükülme noktasına yakın bir pH'tır. Dolayısıyla, yöntem, her ürün için spesifik protokoller geliştirmeye gerek kalmadan birden çok ürünü analiz etmek için kullanılabilir.

I. Tanımlar

Burada birbirlerinin yerine kullanılan "polipeptid" ve

35 "protein" terimleri, herhangi bir uzunluktaki amino asit

polimerlerini ifade eder. Polimer, düz veya dallı olabilir, modifiye amino asitler içerebilir ve amino olmayan asitler ile kesintiye uğrayabilir. Bu terimler, ayrıca doğal olarak veya müdahaleyle, örneğin disülfid bağı oluşumu, glikosilasyon, 5 lipidasyon, asetilasyon, fosforilasyon veya başka manipülasyon veya modifikasyonlar, mesela bir işaret bileşeni veya toksin ile koagülasyon ile meydana gelmiş olan bir amino asit polimerini de kapsar. Ayrıca, tanıma, örneğin, bir amino asidin bir veya birden fazla analogunu içeren (örneğin, doğal 10 olmayan amino asitler vs.) polipeptidlerin yanı sıra teknikte bilinen diğer modifikasyonlar dahildir. Burada kullanıldığı haliyle "polipeptid" ve "protein" terimleri spesifik olarak antikorları kapsar.

Burada kullanıldığı şekliyle "polipeptid yük varyantı" terimi, 15 polipeptidin yükünün değiştirileceği şekilde kendi doğal durumundan modifiye edilmiş polipeptide karşılık gelir. Bazı örneklerde, yük varyantları, ana polipeptidden daha asidiktir; *başka bir deyişle* ana polipeptidden daha düşük bir pI'ye sahiptir. Diğer örneklerde, yük varyantları, ana polipeptidden 20 daha baziktir; *başka bir deyişle* ana polipeptidden daha yüksek bir pI'ye sahiptir. Bu tür modifikasyonlar mühendislik yoluyla yapılabilir veya doğal proseslerin; örneğin, oksidasyon, deamidasyon, lizin kalıntılarının C ucu işlenmesi, N ucu piroglutamat oluşumu ve glikasyonun sonucu olabilir. Bazı 25 örneklerde, bir polipeptid yük varyantı, proteine bağlı olan glikanın, glikoproteinin yükünün, ana glikoproteine kıyasla değiştirileceği şekilde, örneğin, siyalik asit veya türevlerinin eklenmesiyle modifiye edildiği bir glikoproteindir. Burada kullanıldığı şekliyle bir "antikor 30 yükleme varyantı", antikoru veya fragmanının, antikoru veya fragmanının yükünün değiştirileceği şekilde kendi doğal halinden modifiye edileceği şekilde modifiye edildiği bir antikor veya fragmanıdır.

"Saflaştırılmış" polipeptid (örneğin antikor veya immünoadezin) 35 terimi, polipeptidin saflığının, doğal ortamında bulunduğu

durumdan ve/veya başlangıçta laboratuvar koşullarında sentezlendiği ve/veya amplifiye edildiği durumlardan daha saf bir formda mevcut olacak şekilde artırılmış olduğunu ifade eder. Saflık bağıl bir terimdir ve her zaman mutlak saflığı ifade etmeyebilir.

"Antagonist" terimi en geniş anlamıyla kullanılır ve bir natif polipeptidin bir biyolojik aktivitesini kısmen veya tamamen bloke eden, inhibe eden veya nötrleştiren herhangi bir molekülü kapsar. Benzer bir şekilde, "agonist" terimi de en geniş anlamıyla kullanılır ve bir natif polipeptidin bir biyolojik aktivitesini taklit eden herhangi bir molekülü kapsar. Uygun agonist veya antagonist molekülleri, spesifik olarak agonist veya antagonist antikorları veya antikor fragmanlarını, doğal polipeptitlerin fragmanlarını veya amino asit sekansı varyantlarını içerir. Bir polipeptidin agonistlerini veya antagonistlerini tanımlamak için yöntemler, polipeptidin, bir aday agonisti veya antagonist molekülü ile temas ettirilmesi ve normalde polipeptid ile ilişkili bir veya daha fazla biyolojik aktivitede tespit edilebilir bir değişimin ölçülmesini içerebilir.

İlgili bir antijene, *örneğin* tümörle ilişkili bir polipeptit antijen hedefine "bağlanan" bir polipeptid, polipeptidin antijeni ifade eden bir hücreyi veya dokuyu hedef almada tanılayıcı ve/veya terapötik bir ajan olarak faydalı olmasını sağlayacak şekilde, antijene yeterli afiniteyle bağlanan ve diğer polipeptitlerle önemli ölçüde çapraz reaksiyona girmeyen bir polipeptittir. Bu tür yapılanmalarda, polipeptidin "hedef dışı" bir polipeptide bağlanma derecesi, floresans ile aktiveleştirilmiş hücre ayırma (FACS) analizi veya radyoimmünopresipitasyon (RIA) ile belirlendiği üzere, polipeptidin belirli hedef polipeptidine bağlanma derecesinin yaklaşık %10'undan daha düşük olacaktır.

Bir polipeptidin bir hedef moleküle bağlanması ile ilgili olarak, belirli bir polipeptit veya belirli bir polipeptit hedefi üzerindeki bir epitop için "spesifik bağlanma" veya

"spesifik olarak bağlanmak" veya "... için spesifik" terimleri, spesifik olmayan bir etkileşimden ölçülebilir düzeyde farklı olan bağlanmayı belirtir. Spesifik bağlanma, örneğin bir molekülün bağlanmasının, bir kontrol molekülünün bağlanması ile karşılaştırmalı olarak belirlenmesiyle ölçülebilir, burada kontrol molekülü genellikle bağlanma aktivitesine sahip olmayan benzer yapıda bir moleküldür. Örneğin, spesifik bağlanma, hedefe benzer bir kontrol molekülü, örneğin işaretlenmemiş bir hedefin fazla miktarı ile rekabet yoluyla belirlenebilir. Bu durumda, işaretlenmiş hedefin bir proba bağlanması, işaretlenmemiş hedef fazlası tarafından rekabetçi olarak inhibe edilirse, spesifik bağlanma gösterilmiş olur.

"Antikor" terimi burada en geniş anlamıyla kullanılır ve spesifik olarak monoklonal antikorları, poliklonal antikorları, en az iki adet eksiksiz/intakt antikordan oluşan multispesifik antikorları (örneğin bispesifik antikorlar) ve istenen biyolojik aktiviteyi göstermeleri kaydıyla antikor fragmanlarını kapsar. "İmmünoglobülin" (Ig) terimi burada antikor yerine kullanılmaktadır.

Antikorlar, tümü immünoglobülin katlanmasına dayanan, farklı yapılara sahip, doğal yoldan meydana gelen immünoglobülin molekülüdür. Örneğin IgG antikorları, işlevsel bir antikor oluşturmak üzere disülfid bağıyla bağlı olan iki "hafif" zincire ve iki "ağır" zincire sahiptir. Her bir ağır ve hafif zincir bir "sabit" (C) ve bir "değişken" (V) bölge içerir. V bölgeleri antikorum antijene bağlanma spesifikliğini belirlerken, C bölgeleri yapısal destek sağlar ve immün efektörlerle antijene spesifik olmayan etkileşimlerde görev alır. Bir antikorum veya bu antikora ait antijen bağlayıcı fragmanın antijene bağlanma spesifikliği, bir antikorum belirli bir antijene spesifik olarak bağlanma becerisidir.

Bir antikorum antijene bağlanma spesifikliği V bölgesinin yapısal özelliklerine göre belirlenir. Değişkenlik, değişken domenlerin 110 amino asitlik bir kısmı boyunca homojen bir dağılım göstermez. Bunun yerine, V bölgeleri, her biri 9-12

amino asit uzunluğunda olan "hiperdeğişken bölgeler" (HVR'ler) olarak adlandırılan aşırı değişken kısa bölgelerle ayrılan 15-30 amino asitlik, çerçeve bölgeleri (FR'ler) adı verilen nispeten değişmez bölümlerden oluşur. Doğal ağır ve hafif zincirlerin değişken domenlerinin her biri, β yaprağı yapısını bağlayan ve bazı durumlarda β yaprağı yapısının bir kısmını oluşturan ilmekleri meydana getiren, üç aşırı değişken bölge ile bağlı bir β yaprağı konfigürasyonunu büyük ölçüde benimseyen dört FR içermektedir. Her zincirde aşırı değişken bölgeler FR'ler ile birbirlerine yakın tutulur ve, diğer zincirden aşırı değişken bölgelerle, antikorların antijen bağlanma bölgesinin oluşmasına katkıda bulunurlar (*bakınız Kabat ve diğerleri, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5'inci Baskı, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)*). Sabit bölgeler bir antikorun bir antijene doğrudan bağlanmasında rol almaz; ancak, antikorun, antikora bağımlı hücrel sitotoksositeye (ADCC) katılımı gibi çeşitli efektör fonksiyonlar gösterir. Her V bölgesi tipik olarak, üç HVR, örneğin, tamamlayıcılık belirleme bölgeleri ("CDR'ler", her biri bir "aşırı değişken ilmek" içerir) ve dört çerçeve bölgesi içerir. Dolayısıyla, arzu edilen belirli bir antijene yüksek afinite ile bağlanması gereken minimal yapısal birim olan bir antikor bağlanma bölgesi, tipik olarak, üç CDR'yi ve CDR'leri uygun konformasyonda tutmak ve sunmak için aralara serpilmiş en az üç, tercihen dört çerçeve bölgesini içerecektir. Klasik dört zincirli antikorlar, birlikte V_H ve V_L domenleriyle tanımlanan antijen bağlanma bölgelerine sahiptir. Deve ve köpek balığı antikorları gibi belirli antikorların hafif zincirleri yoktur ve bunlar sadece ağır zincirlerin oluşturduğu bağlanma bölgelerine sahiptir. V_H ve V_L arasında işbirliği olmadığında, bağlanma bölgelerinin sadece ağır zincirler veya hafif zincirler ile oluşturulduğu tek domenli tasarlanmış (insan yapımı) immüoglobülinler hazırlanabilir.

"Değişken" terimi, değişken domenlerin belirli kısımlarının antikorlar arasında sekanslarda yoğun farklılıklar gösterdiğini ve bunların, her özel antikoru kendi özel antijeni için bağlanmasında ve spesifikliğinde kullanıldığını ifade eder. Bununla birlikte, değişkenlik, antikorların değişken domenleri boyunca homojen bir dağılım göstermez. Hem hafif zincir hem de ağır zincir değişken domenlerinde aşırı değişken bölgeler olarak adlandırılan üç segmentte yoğunlaşmaktadır. Değişken domenlerin daha fazla korunan bölümlerine çerçeve bölgeleri (FR) adı verilir. Doğal ağır ve hafif zincirlerin değişken domenlerinin her biri, β yaprağı yapısını bağlayan ve bazı durumlarda β yaprağı yapısının bir kısmını oluşturan ilmekleri meydana getiren, üç aşırı değişken bölge ile bağlı bir β yaprağı konfigürasyonunu büyük ölçüde benimseyen dört FR içermektedir. Her zincirde aşırı değişken bölgeler FR'ler ile birbirlerine yakın tutulur ve, diğer zincirden aşırı değişken bölgelerle, antikorların antijen bağlanma bölgesinin oluşmasına katkıda bulunurlar (*bakınız Kabat ve diğerleri, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5'inci Baskı. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))*). Sabit bölgeler bir antikoru bir antijene doğrudan bağlanmasında rol almaz; ancak, antikoru, antikora bağımlı hücrel sitotoksiniteye (ADCC) katılımı gibi çeşitli efektör fonksiyonlar gösterir.

"Aşırı değişken bölge" (HVR) terimi, burada kullanıldığında, bir antikoru antijen bağlanmasından sorumlu olan amino asit kalıntılarını belirtir. Aşırı değişken bölge, bir "tamamlayıcılık belirleme bölgesi" veya "CDR" den amino asit kalıntılarını (örneğin, V_L 'deki yaklaşık 24-34 (L1), 50-56 (L2) ve 89-97 (L3) ve V_H 'deki yaklaşık 31-35B (H1), 50-65 (H2) ve 95-102 (H3) kalıntıları (*Kabat ve diğerleri, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5'inci Baskı, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))* ve/veya bir "aşırı değişken ilmek"teki kalıntıları (örneğin V_L 'deki 26-32 (L1), 50-52 (L2) ve 91-96 (L3)

kalıntıları ve V_H'deki 26-32 (H1), 52A-55 (H2) ve 96-101 (H3) kalıntılarını (Chothia ve Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)) içerebilir.

"Çerçeve" veya "FR" kalıntıları, burada tarif edildiği üzere aşırı değişken bölge kalıntılarının dışında kalan değişken domen kalıntılarıdır.

"Antikor fragmanları" bir bozulmamış (intakt) antikorun bir kısmını içermekte olup, tercihen bunun antijen bağlanma bölgesini içerir. Antikor fragmanlarının örnekleri arasında Fab, Fab', F(ab')₂ ve Fv fragmanları; diyakorlar (Db); tandem diyakorlar (taDb), doğrusal antikorlar (örneğin, U.S. Patent No. 5,641,870, Örnek 2; Zapata ve diğerleri, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); tek kollu antikorlar, tek değişken domenli antikorlar, minikorlar, tek zincirli antikor molekülleri; antikor fragmanlarından oluşturulmuş multispesifik antikorlar (örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH₃, (scFV)₄-Fc, di-scFv, bi-scFv, veya tandem (di,tri)-scFv); ve Bi-spesifik T-hücresi angajörleri (BiTEs) bulunur.

Antikorların papain ile kesimi, her biri tek bir antijen bağlayıcı bölge içeren "Fab" fragmanları olarak adlandırılan iki özdeş antijen bağlayıcı fragman ve kolayca kristalleşebildiği adından anlaşılan bir kalıntı "Fc" fragmanını üretir. Pepsin ile muamele, iki antijen bağlayıcı bölgeye sahip olan ve antijeni hala çapraz bağlayabilen bir F(ab')₂ fragmanı üretir.

"Fv", tam bir antijen tanıma ve antijen bağlanma bölgesi içeren minimum antikor fragmanıdır. Bu bölge, sıkı, kovalent olmayan bağlanmada bir ağır zincir ve bir hafif zincir değişken domeninin dimerinden oluşmaktadır. Bu konfigürasyonda, her değişken domenin üç aşırı değişken bölgesi, V_H-V_L dimerinin yüzeyinde bir antijen bağlayıcı bölge tanımlamak üzere etkileşime girer. Bu altı aşırı değişken bölge birlikte antikora antijene bağlanma spesifikliğini kazandırır. Bununla birlikte, tek bir değişken domen (veya sadece bir antijen için

spesifik üç aşırı değişken bölge içeren bir Fv'nin yarısı) bile, tüm bağlanma bölgesine göre daha düşük afiniteli olsa da antijeni tanıma ve bağlama yeteneğine sahiptir.

5 Fab fragmanı aynı zamanda hafif zincirin sabit domenini ve ağır zincirin birinci sabit domenini (CH1) içermektedir. Fab' fragmanları, antikor menteşe bölgesine ait bir veya daha fazla sistein içeren ağır zincir CH1 domeninin karboksi ucunda ilave birkaç kalıntıya sahip olması bakımından Fab fragmanlarından farklıdır. Fab'-SH burada sabit domenlerindeki sistein
10 kalıntısı/kalıntıları en az bir serbest tiyol grubu taşıyan Fab' için verilen isimdir. F(ab')₂ antikor fragmanları başlangıçta aralarında menteşe sisteinleri olan Fab' fragman çiftleri olarak üretilmiştir. Antikor fragmanlarının diğer kimyasal kenetlenmeleri de bilinmektedir.

15 Herhangi bir omurgalı türünden antikorların (immünoglobülinler) "hafif zincirleri", sabit alanlarının amino asit dizilerine dayalı olarak, kappa (κ) ve lambda (λ) olarak adlandırılan açıkça farklı iki tipten birine atanabilir.

Antikorlar ağır zincirlerinin sabit domeninin amino asit
20 sekansına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılabilir. Beş ana bozulmamış (intakt) antikor sınıfı vardır: IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM ve bunların birkaçı ayrıca alt sınıflara (izotipler) ayrılabilir; örn. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA ve IgA2. Antikorların farklı sınıflarına karşılık gelen ağır zincir
25 sabit alanları sırasıyla α, δ, ε, γ ve μ olarak adlandırılır. Farklı immünglobülin sınıflarının alt birim yapıları ve üç boyutlu konfigürasyonları layıkıyla bilinmektedir.

"Tek zincirli Fv" veya "scFv" antikor fragmanları, antikorum V_H ve V_L domenlerini içermekte olup, burada bu domenler bir tek
30 polipeptit zinciri içinde bulunur. Bazı yapılanmalarda Fv polipeptidi ayrıca V_H ve V_L domenleri arasında scFv'nin antijen bağlanımı için istenen yapıyı oluşturmasını sağlayan bir polipeptit bağlantı molekülü içerir. scFv ile ilgili bir inceleme için bkz. Plücker, *The Pharmacology of Monoclonal*

Antibodies, cilt 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, ss. 269-315 (1994).

"Diyakorlar" terimi, iki antijen bağlanma bölgesine sahip olan küçük antikör fragmanlarını belirtmekte olup, bu fragmanlar, aynı polipeptit zincirinde ($V_H - V_L$) bir hafif zincir değişken domenine (V_L) bağlı olan bir ağır zincir değişken domeni (V_H) içerir. Aynı zincir üzerinde iki domen arasında eşleşme sağlamak için çok kısa olan bir bağlantı molekülü kullanılarak domenler başka bir zincirin tamamlayıcı domenleriyle eşleşmeye zorlanır ve böylece iki adet antijen bağlanma bölgesi oluşturulur. Diyakorların daha ayrıntılı açıklaması için bkz. örneğin EP 404,097; WO 93/11161; ve Hollinger vd., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

"Multispesifik antikör" terimi burada en geniş anlamında kullanılır ve spesifik olarak poliepitopik spesifikliğe sahip bir antikörü kapsar. Bu tür multispesifik antikörlerin arasında, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir ağır zincir değişken domeni (V_H) ve bir hafif zincir değişken domeni (V_L) içeren ve V_HV_L biriminin poliepitopik spesifikliğe sahip olduğu bir antikör, iki veya daha fazla V_L ve V_H domenine sahip olan ve her bir V_HV_L biriminin farklı bir epitopa bağlandığı antikörler, iki veya daha fazla tek değişkenli domene sahip olan ve her bir tek değişkenli domenin farklı bir epitopa bağlandığı antikörler, tam uzunluklu antikörler, Fab, Fv, dsFv, scFv gibi antikör fragmanları, diakorlar, bispesifik diakorlar, triakorlar, üç fonksiyonlu antikörler ve kovalent olarak veya kovalent olmayan biçimde bağlanmış olan antikör fragmanları bulunur. "Poliepitopik spesifiklik" ifadesi, aynı veya farklı hedef(ler)de iki veya daha fazla farklı epitopa spesifik olarak bağlanma kabiliyetini ifade eder. "Monospesifik" ifadesi, yalnızca bir epitopa bağlanma kabiliyetini ifade eder. Bir uygulamaya göre, multispesifik antikör, her bir epitopa 5 μM ila 0,001 pM, 3 μM ila 0,001 pM, 1 μM ila 0,001 pM, 0,5 μM ila 0,001 pM veya 0,1 μM ila 0,001 pM'lik bir afinite ile bağlanan bir IgG antikörüdür.

"Tek domenli antikorlar" (sdAb'ler) veya "tek değişken domenli (SVD) antikorlar" ifadesi genellikle, içerisinde tek bir değişken domenin (VH veya VL) antiğene bağlanma sağlayabildiği antikorları ifade eder. Başka bir deyişle, tek değişken domenin hedef antiğeni tanımak için başka bir değişken domen ile etkileşime girmesi gerekmez. Tek domenli antikorların örnekleri arasında deveğillerden (lamalar ve develer) ve kıkırdaklı balıklardan (rneğin hemşire köpekbalıkları) türetilenler ve insan ve fare antikorlarından rekombinant metotlarla türetilenler bulunur (Nature (1989) 341:544-546; Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56; Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235; Trends Biotechnol (2003):21:484-490; WO 2005/035572; WO 03/035694; Febs Lett (1994) 339:285-290; WO00/29004; WO 02/051870).

"Monoklonal antikor" terimi, burada kullanıldığı şekliyle, monoklonal antikorun üretimi sırasında ortaya çıkabilecek olan ve genellikle küçük miktarlarda olan olası varyantlar haricinde bk ölçüde homojen bir antikor popülasyonundan, yani popülasyonu içeren her bir antikorun özdeş olduğu ve/veya aynı epitopa bağlandığı bir antikor popülasyonundan elde edilen bir antikoru belirtir. Farklı determinantlara/belirleyicilere (epitoplar) yöneltilen farklı antikorlar içeren poliklonal antikor preparatlarının aksine, her bir monoklonal antikor tipik olarak antiğen üzerindeki tek bir belirleyiciye yöneltilir. Spesifik olmalarının yanı sıra, monoklonal antikorlar, diğer immünoglobülinler tarafından kirletilmemiş olmaları bakımından da avantajlıdır. "Monoklonal" niteleyicisi, antikorun bk ölçüde homojen bir antikor popülasyonundan elde edilmiş nitelikte olduğunu belirtir ve antikorun belirli herhangi bir metotla üretilmesi gerektiği yönünde yorumlanmamalıdır. Örneğin burada sağlanan metotlara göre kullanılacak olan monoklonal antikorlar, ilk olarak Kohler vd., Nature, 256:495 (1975) tarafından tarif edilen hibridom metoduyla ya da rekombinant DNA metotlarıyla retililebilir (bkz. Örneğin US Patent No 4,816,567).

"Monoklonal antikörler" ayrıca, Clackson vd., *Nature*, 352:624-628 (1991) ve Marks vd., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) referanslı belgelerde tarif edilen teknikler kullanılarak faj antikör kütüphanelerinden izole edilebilir.

- 5 Burada bahsi geçen monoklonal antikörler arasında özellikle, ağır ve/veya hafif zincirin bir kısmının özel bir antikör sınıfı veya alt sınıfına ait veya özel bir türden köken alan antikörlardaki ilgili sekanslarla özdeş veya bu sekansların homologu olduğu "kimerik" antikörleri (immünoglobülinleri)
- 10 içerirken, zincir(ler)in geri kalanı, istenen biyolojik etkinliği sergilemek koşuluyla, bir başka antikör sınıfına veya alt sınıfına ait veya bir başka türden köken alan antikörlardaki ilgili sekansların yanı sıra bu tür antikörlerin fragmanlarıyla özdeş veya bunların homoloğudur
- 15 (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison vd., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). İlgili kimerik antikörler burada bir insan dışı primattan (örneğin Eski Dünya Maymunu, örneğin babun, al yanaklı maymun veya sinomolgus maymunu) türetilen değişken domen antijen bağlanma sekansları ve insan
- 20 sabit bölge sekansları (US Pat. No 5,693,780) içeren "primatlaştırılmış" antikörleri içerir.

- İnsan dışı (örn., murin) antikörlerin "insanlaştırılmış" biçimleri, minimum düzeyde insan dışı immünoglobülininden türetilen dizi içeren kimerik antikörlardır. İnsanlaştırılmış
- 25 antikörler çoğu zaman insan immünoglobülinleridir (alıcı antikör), burada alıcının bir aşırı değişken bölgesine ait kalıntılar, insan olmayan bir türün (verici antikör), örneğin fare, sıçan, tavşan ya da istenen antikör spesifikliğine, afinitesine ve kapasitesine sahip olan insan dışı primatın bir
- 30 aşırı değişken bölgesinden elde edilen kalıntılarla ikame edilir. Bazı durumlarda, insan immünoglobülinin çerçeve bölgesi (FR) kalıntıları, karşılık gelen insan olmayan kalıntılarla değiştirilir. Ayrıca, insanlaştırılmış antikörler, alıcı antikorda veya verici antikorda bulunmayan kalıntılar
- 35 içerebilir. Bu modifikasyonlar antikör performansını daha da

iyileştirmek için yapılır. Genellikle, insanlaştırılmış antikor, en az bir ve tipik olarak iki değişken domenin büyük ölçüde tamamını içerecek olup, bunların içinden aşırı değişken ilmeklerin tamamı veya büyük ölçüde tamamı, insan olmayan bir immünoglobülininkilere denk düşer ve yukarıda belirtildiği gibi FR ornatımları dışında FR'lerin tamamı veya büyük ölçüde tamamı bir insan immünoglobülin sekansına aittir. İnsanlaştırılmış antikor, isteğe bağlı olarak ayrıca, immünoglobülin sabit bölgesinin, tipik olarak bir insan immünoglobülinin en az bir kısmını içerir. Daha fazla ayrıntı için, bkz. Jones ve diğerleri, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann ve diğerleri, *Nature* 332:323-329 (1988); ve Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Buradaki amaçlara uygun olarak, "bozulmamış (intakt) antikor", ağır ve hafif değişken domenler ve aynı zamanda bir Fc bölgesi içeren bir antikordur. Sabit alanlar, doğal dizi sabit alanlar (örneğin, insan doğal dizi sabit alanları) veya bunların amino asit dizisi varyantı olabilir. Tercihen bozulmamış antikor bir veya birden fazla efektör fonksiyona sahiptir.

"Doğal antikorlar" genellikle iki özdeş hafif (L) zincir ve iki özdeş ağır (H) zincirden oluşan yaklaşık 150.000 daltonluk heterotetramerik glikoproteinlerdir. Her bir hafif zincir, bir kovalent disülfid bağı ile bir ağır zincire bağlanırken, disülfid bağlarının sayısı, farklı immünoglobülin izotiplerine ait ağır zincirler arasında değişkenlik gösterir. Her bir ağır ve hafif zincir aynı zamanda düzenli aralıklı zincir içi disülfid köprülerine sahiptir. Her bir ağır zincirin bir ucunda bir değişken domen (V_H) ve bunu takiben birkaç sabit domen bulunur. Her bir hafif zincirin bir ucunda bir değişken domen (V_L) ve diğer ucunda bir sabit domen bulunmakta olup; hafif zincirin sabit domeni ağır zincirin birinci sabit domeniyle hizalıdır ve hafif zincir değişken domeni ağır zincirin değişken domeniyle hizalıdır. Belirli amino asit kalıntıların, hafif zincir ve ağır zincir değişken alanları arasında bir ara-yüz oluşturduğu düşünülür.

"Çıplak antikör", bir sitotoksik parça veya radyoaktif işaret gibi heterolog bir moleküle konjuge edilmemiş bir antikördür (burada tanımlandığı gibi).

Bazı yapılanmalarda, antikör "efektör fonksiyonları" ifadesi, bir antikörün Fc bölgesine (bir natif sekans Fc bölgesi veya amino asit sekans varyantı Fc bölgesi) atfedilebilen biyolojik aktiviteleri belirtir ve antikör izotipine göre değişir. Antikör efektör fonksiyonlarının örnekleri arasında aşağıdakiler bulunmaktadır: Clq bağlanması ve komplemana bağlı sitotoksosite; Fc reseptör bağlanması; antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksosite (ADCC); fagositoz; hücre yüzeyi reseptörlerinin aşağı regülasyonu.

"Antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksosite" ve "ADCC", Fc reseptörlerini (FcR'ler) (örneğin Doğal Öldürücü (NK) hücreler, nötrofiller ve makrofajlar) ifade eden spesifik olmayan sitotoksik hücrelerin, bir hedef hücre üzerine bağlı antikoru tanıdığı ve ardından hedef hücrenin lizisine yol açtığı bir hücre aracılı tepkimeyi belirtir. ADCC'ye aracılık etmek için temel hücreler olan NK hücreleri yalnızca FcγRIII'ü eksprese ederken, monositler ise FcγRI, FcγRII ve FcγRIII'ü eksprese eder. Hematopoietik hücreler üzerinde FcR ekspresyonu, Ravetch ve Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991) referanslı belgede, sayfa 464'teki Tablo 3'te özetlenmiştir. İlgili bir molekülün ADCC aktivitesini değerlendirmek için bir laboratuvar ortamında (in vitro) ADCC analizi, örneğin ABD Patent No. 5,500,362 veya 5,821,337 belgelerinde tarif edilenlere benzer bir analiz gerçekleştirilebilir. Bu tür deneyler için kullanışlı efektör hücreler arasında periferik kan tek çekirdekli hücreler (PBMC) ve doğal öldürücü (NK) hücreler bulunur. Alternatif olarak ya da bunlara ek olarak, ilgili molekülün ADCC aktivitesi, *in vivo*, örneğin, Clynes ve diğerleri, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998) belgesinde tarif edilen şekilde bir hayvan modelinde değerlendirilebilir.

"İnsan efektör hücreleri", bir veya daha fazla FcR'yi ifade eden ve efektör fonksiyonlar sergileyen lökositlerdir. Bazı yapılanmalarda, hücreler en azından FcγRIII'ü ifade eder ve ADCC efektör fonksiyonu gerçekleştirir. ADCC'ye aracılık eden

5 insan lökositlerinin örnekleri arasında periferik kan tek çekirdekli hücreleri (PBMC), doğal öldürücü (NK) hücreleri, monositler, sitotoksik T hücreleri ve nötrofiller bulunmakta olup; PBMC ve NK hücreleri tercih edilir.

"Komplemana bağımlı sitotoksikite" veya "CDC" terimi, bir

10 molekülün, ortamda bir kompleman mevcutken bir hedefi parçalayabilme yeteneğini belirtir. Kompleman aktivasyon yolağı, kompleman sisteminin birinci bileşeninin (C1q), aynı kökenli bir antijenle kompleks oluşturmuş olan bir moleküle (örneğin polipeptit (örneğin bir antikor)) bağlanmasıyla

15 başlatılır. Komplement aktivasyonunu değerlendirmek üzere bir CDC testi, örneğin, Gazzano-Santoro ve diğerleri, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) belgesinde tarif edilen şekilde gerçekleştirilebilir.

"Fc reseptörü" veya "FcR" terimleri, bir antikorun Fc

20 bölgesine bağlanan bir reseptörünü tanımlamada kullanılır. Bazı yapılanmalarda FcR bir natif sekans insan FcR'sidir. Ayrıca, tercih edilen bir FcR, bir IgG antikorunu bağlayan bir FcR'dir (bir gama reseptörü) ve FcγRI, FcγRII ve FcγRIII alt sınıflarını ve bu reseptörlerin alelik varyantlarını ve

25 karşılıklı uçbirleştirilmiş biçimlerini de içerir. FcγRII reseptörleri, temel olarak sitoplazmik domenleri bakımından farklılık gösteren benzer amino asit sekanslarına sahip FcγRIIA ("aktif edici bir reseptör") ve FcγRIIB'yi ("inhibe edici bir reseptör") içerir. Aktifleştirici reseptör FcγRIIA,

30 sitoplazmik alanında bir immünoresptör tirozine dayalı aktivasyon motifi (ITAM) içerir. İnhibe edici reseptör FcγRIIB, sitoplazmik alanında bir immünoresptör tirozine dayalı inhibisyon motifi (ITIM) içerir (bakınız Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR'ler şu metinlerde ele

35 alınmıştır: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92

(1991); Capel ve diğeri, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); ve de Haas ve diğeri, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Gelecekte tanımlanacak olanlar da dahil olmak üzere diğeri FcR'ler, burada verilen "FcR" ifadesinin kapsamı dahilindedir.

5 Terim ayrıca, maternal IgG'lerin fetusa transfer edilmesinden sorumlu olan neonatal reseptör FcRn'yi de içerir (Guyer ve diğeri, *J. Immunol.* 117:587 (1976) ve Kim ve diğeri, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

"Kirleticiler" istenen polipeptit ürününden farklı
10 materyalleri ifade etmektedir. Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, kontaminantlar polipeptidin yük varyantlarını içerir. Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, kontaminantlar bir antikör veya antikör fragmanının yük varyantlarını içerir. Mevcut buluşun diğeri uygulamalarında kontaminant, bunlarla
15 sınırlı olmamak kaydıyla şunları kapsar: CHOP gibi konakçı hücre materyalleri; süzölmüş Protein A; nükleik asit; istenen polipeptidin bir varyantı, fragmanı, agregatı veya türevi; başka bir polipeptit; endotoksin; viral kontaminant; hücre kültürü ortamı bileşeni, vd. Bazı örneklerde kontaminant,
20 bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, E. coli hücresi, bir böcek hücresi gibi bir bakteri hücresi, bir prokaryotik hücre, bir ökaryotik hücre, bir maya hücresi, bir memeli hücresi, bir kuş hücresi, bir mantar hücresinden bir konakçı hücre proteini (HCP) olabilir.

25 Burada kullanıldığı şekliyle, "immünoadezin" terimi, heterolog bir polipeptidin bağlanma spesifikliğini, immüoglobülin sabit domenlerinin efektör fonksiyonlarıyla birleştiren antikör benzeri molekülleri işaret eder. Yapısal olarak, immünoadezinler, bir antikörün antijen tanıma ve bağlanma
30 bölgesinden farklı olan (başka bir ifadeyle, "heterolog" olan) istenen bağlanma spesifikliğine sahip bir amino asit sekansı ile bir immüoglobülin sabit domen sekansının bir füzyonunu içerir. Bir immünoadezin molekülünün adezin kısmı tipik olarak, bir reseptör veya bir ligandın en azından bağlama bölgesini
35 içeren bir bitişik amino asit sekansıdır. İmmünoadezin

içindeki immünoglobülin sabit domen sekansı herhangi bir immünoglobülinden, örneğin IgG-1, IgG-2, IgG-3 veya IgG-4 alt tipleri, IgA (örneğin IgA-1 ve IgA-2), IgE, IgD veya IgM'den elde edilebilir.

5 Burada kullanıldığı şekilde "esasen aynı" ifadesi, bir değer veya parametrenin anlamlı bir etki tarafından değiştirilmemiş olduğunu belirtir. Örneğin, kolon çıkışındaki bir kromatografi hareketli fazının bir iyonik kuvveti, iyonik kuvvet önemli ölçüde değişmemişse esas olarak hareketli fazın ilk iyonik
10 kuvveti ile aynıdır. Örneğin, %10, %5 veya %1'lik ilk iyonik kuvvet olan kolon çıkışındaki bir iyonik kuvvet, ilk iyonik kuvvet ile esasen aynıdır.

Burada bir değer veya parametre "yaklaşık" olarak verildiğinde, kendi başına bu değer veya parametreye yönelik varyasyonları
15 içerir (ve tanımlar). Örneğin "yaklaşık X" olarak belirtilen bir açıklama "X" tanımını kapsar.

Burada ve ekte verilen istemlerde kullanıldığı şekliyle, "bir" veya "bu" gibi tekil biçimler, aksi bağlamda açıkça belirtilmediği sürece çoğul biçimleri de içerir. Anlaşılacağı
20 üzere, buluşun burada tarif edilen yönleri ve varyasyonları, yönler ve varyasyonlardan "oluşan" ve/veya "'esasen ...'dan oluşan" biçimlerini içerir.

II. Kromatografi Yöntemleri

A. Optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşullarının 25 belirlenmesi

Mevcut buluş, çözünürlük kaybının pH ve sıcaklıktaki değişimlerin minimize olacağı şekilde bir polipeptid üzerinde IEC yapmak için optimal iyon değişimi şartlarını tahmin etme yöntemleri sağlar. Bazı uygulamalarda, iyon değişim
30 kromatografisi, bir polipeptid içeren bir bileşimdeki kontaminantları saptamak için kullanılır. Bazı uygulamalarda, polipeptid, bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı fragmanıdır. Bazı uygulamalarda, kontaminant, bir yük varyantı; örneğin, antikorlar veya antikor fragmanlarının bazik yük
35 varyantları ve/veya asidik yük varyantları dahil olmak üzere

polipeptidin bir bazik yük varyantı ve/veya bir asit yük varyantıdır.

Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, polipeptidin yük dengesinde olduğu şartlar tespit edilmiştir. Bir polipeptidin net yük durumu (z) vs. pH 'ın grafiği bu dengeyi göstermektedir. Eğri, polipeptidin amino asit sekansı kullanılarak oluşturulur. Sıfıra en yakın eğimli eğrinin bölgesi, yük dengesini temsil eder. Dengede polipeptidin net yük durumu, bir pH değişimi nedeniyle değişmeye direnç gösterir, bu grafiksel olarak eğrideki en basık bölgede belirtilmiştir (Şekil 1). Polipeptidin yük durumunun kararlılığı, test dayanıklılığına katkı sağlar. Bir polipeptidin dengede olduğu durum, z 'nin pH 'ın 0'a eşit olduğu çizgisi için olan denklemin 2'nci türevinin ayarlanması ile çözülebilir. Bu, eğrinin konkavdan konvekse veya tam tersine geçtiği bir eğrinin bükülme noktasındadır. Bu eğrinin (Şekil 1'de gösterilmemiştir) üstündeki çoklu bükülme noktalarının (IP) bulunmasına rağmen, ilgilenilen bükülme noktası, biyolojik bölge içerisinde olup, burada eğimin mutlak değeri artık düşmemektedir. Bu IP, yük durumunun pH 'ye göre stabilitesinden dolayı oldukça sağlam bir yöntem üretmektedir.

Bir polipeptidin yük dengesi IEC çözünürlüğü için ideal bir optimal yüküdür, çünkü net yükte küçük bir farklılık gösteren kontaminantlar bir hedef polipeptide kıyasla bir dizi pH değeri üzerinde tespit edilebilir. Bu, polipeptidi içeren amino asitlerin yapısı ve özellikleri nedeniyle. Net yük durumunu (z) (Tablo 1) hesaplamak için altı amino asit kullanılır, çünkü bir proteinin pH -bağımlı özelliklerinin tanımlanmasında önemli bir rol oynarlar. Asit ayrışma sabitleri, $(-\log_{10}K_a)$ olarak ve $[A^-] / [HA]$ sabit oranı baz alınarak tanımlanmış pK_a , bir amino asidin yük durumunu hesaplamak için kullanılır. Sonuç gerçek değer değildir, ancak bu yük durumunun olasılığı, P' 'dir.

Tablo 1. Belirli amino asitlerin asit ayrışma sabitleri.

Amino asit	pKa ₃
Asparagin; D	3,65
Glutamik asit; E	4,25
Histidin; H	6,02
Tirozin; Y	10,1
Lizin; K	10,53
Arginin; R	12,48

$$P = \left(\frac{10^{(pH-pKa)}}{10^{(pH-pKa)} + 1} \right)$$

Denklem 1

Örneğin, pH 6.5'te, $P = 10^{(6.5-6)} / (10^{(6.5-6)} + 1) \approx 0.76$ 'da histidin için Denklem 1 kullanılarak. Bu, pH 6.5'te on histidin kalıntısı ihtiva eden bir polipeptid içindeki her bir histidin kalıntısının, +0,24 yükten (1 -0,76) ziyade %76'lık bir oranda protonsuzlaşma olasılığına sahip olacağını gösterir. Başka bir deyişle, pH 6.5'te, polipeptit içindeki her dört histidin kalıntısının yaklaşık üçü protonsuzlaştırılacaktır. Bu, histidin kalıntılarının neredeyse tamamının protonlandığı, pH 7.5'teki (Şekil 2B) polipeptidin hesaplanmasıyla karşılaştırılabilir. En yaygın yük durumunun frekansı, pH'ın bir amino asidin yan zincirinin pKa'sına yaklaşmasıyla azalır. Bu denklemin kritik amino asitlere uygulanması, dengede çalıştırmanın neden optimal çözünürlük sağladığını gösterir. pH aralığı boyunca altı amino asit olasılıklarını ağırlıklandırarak, en homojen yük durumları çözülebilir (Şekil 3). Protonasyona uğramış türlerin muhtemel dağılımı nedeniyle farklı bir yük durumunun varlığı, sonuçları bulanıklaştıracak ve söz konusu polipeptid ile karşılaştırıldığında, net yük dağılımındaki küçük değişikliklerle kontaminantları tespit etme yeteneğini engelleyecektir. Bazı uygulamalarda, pH karşısında net yük dağılımının bir 3D grafiği çizilmektedir. Yükün pH değerine karşı frekansın en keskin olduğu yerlerde

yüksek çözünürlük elde edilir (Şekil 5). Bu yüzden, sağlamlık için aynı pH ve sıcaklık koşulları optimal çözünürlük yaratır. Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, yük frekansının dağılımı, bir rastgele değişkende (Denklem 2) belirsizliğin bir ölçütü olan Shannon entrofisi ile belirlenir. Polipeptidde (lisin, histidin, aspartat, glutamat, tirozin ve arginin) bulunan her altı amino asidin kalıntılarının sayısına, belirli bir pH değerindeki Shannon entrofisine dayanarak, verilen bir sıcaklıktaki pH'nin (Şekil 4) bir fonksiyonu olarak polipeptid çizilir. Shannon entropisi ne kadar düşükse, yük dağılımı o kadar homojen olur. Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, kromatografi, Shannon entrofisinin yaklaşık minimum olduğu bir pH ve sıcaklıkta gerçekleştirilir.

Denklem 2

$$H(X) = - \sum_{i=1}^n p(x_i) \log_b p(x_i)$$

burada

n = olası sonuçlar (n=2, protonlanmış ya da protonlanmamış)

p = sonuç veya olay olasılığı (x_i) (bakınız Denklem 1)

b = # deneme (yükli amino asit kalıntılarının #'sı)

Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulları, çoklu polipeptid ürünlerini; *örneğin* çoklu antikor ürünlerini analiz etmek için ortak bir kromatografi prosedürü kullanılacak şekilde çok sayıda farklı polipeptid için kullanılır. Bazı uygulamalarda, çoklu polipeptid ürünleri (*örneğin*, çoklu antikor ürünleri), burada tarif edilen yöntemler tarafından tanımlanan ortak bir kromatografi prosedürü *örneğin* yük varyantları gibi kontaminantların varlığı açısından analiz edilir. Mevcut buluşun önemli bir avantajı, sadece bu noktadaki yüklerin sayısı açısından farklılık göstermesi dışında pek çok mAb dahil olmak üzere birçok polipeptid için IP'nin, aynı pH'ta (Şekil 7) oluşmasıdır. Bu nedenle, bu polipeptidler için tüm

IEC'ler için optimal koşullar; yani polipeptidin yük dengesinde olduğu pH ve sıcaklık aynı olacaktır.

Koşullardaki değişikliklerin IP'den ayrılmasına neden olmasını sağlamak için dIP/dT değeri kullanılır. Bir

5 proteinin dIP/dT'si, sıcaklıktaki bir değişime görelî olarak net yük vs. pH eğrisindeki bir polipeptidin bükülme noktasındaki bir değişimdir. Belirli bir polipeptidin bükülme noktası, net yüke karşı pH'ın belirlendiği sıcaklığa bağılı olarak dalgalanma gösterecektir. Ancak, bükülme noktası pH'si
10 artan sıcaklıkla azalsa da (örneğin Şekil 8 ve 9'u inceleyiniz), net yük sabit kalır. Bu yüzden, kromatografiyi bükülme noktası için optimize etmek ayrıca sıcaklık dalgalanmalarına karşı iyon değişimi yöntem sağlamlığı sağlar. Bazı uygulamalarda, mevcut buluş, çoklu polipeptidin verilen
15 bir polipeptidi için kullanılacak olan iyon değişim kromatografisinin türünü belirlemek için bir araç sağlar. Örneğin, bükülme noktasındaki net yük, pozitifse, bir katyon değişimi kromatografisi malzemesi kullanılır. Katyon değişimi kromatografisi malzemelerinin sınırlayıcı olmayan örnekleri
20 aşağıda sunulmaktadır. Bazı uygulamalarda, çok sayıdaki polipeptidi (örneğin antikor) analiz etmek için ortak bir katyon değişim kromatografisi prosedürü kullanılır, burada çok sayıdaki polipeptid, bir ortak bükülme noktasındaki bir net pozitif yüke sahiptir. Bükülme noktasındaki net yük, negatifse,
25 bir anyon değişimi kromatografisi malzemesi kullanılır. Anyon değişimi kromatografisi malzemelerinin sınırlayıcı olmayan örnekleri aşağıda sunulmaktadır. Bazı uygulamalarda, çok sayıdaki polipeptidi (örneğin antikor) analiz etmek için ortak bir anyon değişim kromatografisi prosedürü kullanılır, burada
30 çok sayıdaki polipeptid, bir ortak bükülme noktasındaki bir net negatif yüke sahiptir.

B. Optimal tampon sisteminin belirlenmesi

Bazı uygulamalarda, mevcut buluş, kromatografi prosedüründe kullanım için bir optimal tampon seçmeye yönelik yöntemler
35 sağlar. Bazı uygulamalarda, kromatografi prosedüründe

sıcaklıktaki değişim ile bükülme noktasında değişim olarak asit ayrışma sabitinde (pKa) benzer bir değişim hızına sahip bir tampon sistemi kullanılır. Yaklaşık olarak proteinin dIP/dT'sine eşit olan sıcaklıkta değişim (yani dpKa/dT) ile pKa'da bir değişim gösteren bir tamponun seçilmesi, sıcaklıktaki herhangi bir değişikliğin, proteinin IP'de kalmasına imkan tanımasını ve böylece analitik kromatografinin sağlamlığına katkıda bulunmasını sağlar. Bazı uygulamalarda, (dIP/dT)_{polipeptid(ler)} $\approx$ (dpKa/dT)_{tampon}. Bazı uygulamalarda, tampon, ACES tamponu veya HEPES tamponudur. Örneğin, ACES veya HEPES tamponu kullanılarak, bükülme noktasındaki bir örnek mAb'ın yük durumu, 30 °C üzerinde 0,5'den az değişir (Şekil 11).

Denklem 3 $dIP/dT \approx dpKa/dT$

Bazı uygulamalarda, tampon, pH bükülme noktasında etkili bir tamponlama kapasitesi sağlar. Bazı uygulamalarda, polipeptit(ler)in dIP/dT'si yaklaşık -0,02'dir. Bazı uygulamalarda, sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 50 °C arasındadır. Bazı uygulamalarda, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 1%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 2%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 3%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 4%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 5%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 6%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 7%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 8%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 9%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 10%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 20%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 30%, dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 40% veya dIP/dT=dpKa/dT $\pm$ 50'dir. Bazı uygulamalarda, seçilen tampondaki polipeptid(ler)in net yükü, yaklaşık 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C veya 30 °C'den daha fazlada 1'den az değişim gösterir.

Bazı uygulamalarda, buluş, yük varyantları gibi kontaminantların tespit edilmesi için yüksek çözünürlüklü ve sağlam bir çok ürünlü polipeptit IEC geliştirmek için yöntemler sağlar. Koşullar, polipeptidin (örneğin mAb), ana polipeptitten yüklü varyantların çözünürlüğünü iyileştirmek için yük dengesinde olacağı şekilde tasarlanır. Yük dengesi, hesaplanan net yük durumunu (z) pH'ye göre grafikleyerek bir dizi polipeptit ürünü (mAb ürünleri) için belirlenir. Bir

polipeptidin dengede olduğu durum, denklemin 2'nci türevi, z'nin pH değerine eşit olarak 0'a ayarlanmasıyla çözülmüştür.

Belirli bir pH'ta bir polipeptidin net yükü, yan zincirlerinden dolayı bir proteinin pH-bağımlı özelliklerinin

5 tanımlanmasında önemli bir rol oynayan mAb'deki altı amino asit içeriğine dayanarak belirlenir. Altı amino asit, asparagin, glutamik asit, histidin, tirozin, lizin ve arginindir. Altı amino asidin asit ayrışma sabitleri (pK_a , $-\log_{10}K_a$ olarak tanımlanmış) net yük durumunu (z) hesaplamak
10 için kullanılır (Tablo 1). Örneğin, 6.02'nin altındaki pH değerlerinde, ortalama olarak, bir histidin protonlanır ve pozitif bir yük taşırken, 6.02'nin üzerindeki pH değerlerinde ortalama olarak bir histidin protosuzlaştırılır ve herhangi bir yük taşımaz. Belirli bir pH için en bol yük durumunun
15 olasılığı, altı amino asidin her biri için belirlenmiş ve belirli bir pH'ta mAb1 yükünün ağırlıklandırılmış olasılığı, antikorda mevcut olan bu altı amino asidin her birinin kalıntı sayısına dayanarak belirlenmiştir. Yük frekansının dağılımı, rastgele bir değişkendeki belirsizliğin bir ölçütü olan
20 Shannon entrofisi ile de belirlenebilir (Denklem 3). Polipeptid içinde mevcut olan bu altı amino asitin her birinin kalıntı sayılarına dayanarak, polipeptid için verilen bir pH değerindeki Shannon entrofisi, pH'ın bir fonksiyonu olarak çizilebilir. Shannon entropisi ne kadar düşükse, yük dağılımı
25 o kadar homojen olur. Bu verilerden, polipeptidin net yükünün pH'ın bir fonksiyonu olarak dağılımı çizilir ve nötr pH'ye en yakın olan bükülme noktası (IP) belirlenir. Bu, en homojen yük durumuna sahip olan pH olup, IEC ayırmasında en keskin piklere neden olur. Bir çoklu ürünlü IEC protokolü geliştirmek için,
30 farklı p_i 'lere sahip çok sayıdaki hedef polipeptidi (örneğin hedef MAb'ler) belirlenmiştir. IP'nin hedeflenmesi, IEC'nin pH dayanıklılığını iyileştirebilir.

dIP/dT terimi, sıcaklıktaki bir değişim ile birlikte bir molekülün IP'sindeki değişimi temsil eder. Bu sonuçlardan,
35 sıcaklık etkisinin en aza indirilmesi ve test sağlamlığının

arttırılması için dIP/dT 'ye (yani, $dIP/dT \approx dpKa/dT$) yaklaşan sıcaklığın bir fonksiyonu olarak tamponun asit ayrışma sabitindeki değişimin seçildiği optimal bir tampon seçilebilir. Çok sayıdaki tampon madde için sıcaklığın ($dpKa/dT$) bir

5 fonksiyonu olarak pKa 'daki değişime ilişkin yayınlanan değerler aşağıdaki gibidir: Fosfat: -0,0028, HEPES: -0,014, ACES: -0,02, Tris: -0,028, Bisin: -0,018, Trisin: -0,021, TAPS: -0,02 ve CHES: -0,018 (Benyon, RJ & Easterby, JS, Buffer Solutions The Basics, IRL Press, 1996).

- 10 Bazı görünümelerde, mevcut buluş çok sayıda antikor bileşiminin analiz edilmesi için yöntemler sağlar, burada her bir antikor bileşimi bir antikor ve antikorun bir veya daha fazla yük varyantını içerir, burada yöntem antikoru yük varyantlarından etkili bir şekilde ayırır; her bir antikor bileşimi için
- 15 yöntem şunları kapsar: a) antikor ve bir veya daha fazla yük varyantının bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine yaklaşık 1 mL/dakikalık bir akış hızında bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponunun yaklaşık pH 7.6'da yaklaşık 40 °C'de 10 mM HEPES tamponu içermesi; b)
- 20 antikor ve yük varyantları kontaminantlarının iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponu yaklaşık pH 7.6'da yaklaşık 10 mM HEPES tamponu ve bir NaCl içerir, gradyandaki burada NaCl konsantrasyonu yaklaşık 0
- 25 mM'den yaklaşık 80 mM'ye yaklaşık 40 dakika içerisinde çıkar, burada antikor ve yük varyantları gradyanla ayrılır; ve c) antikor ve bir veya daha fazla yük varyantının saptanması. Bazı uygulamalarda, çok sayıdaki antikor bileşimi farklı antikorları içerir. Bazı uygulamalarda, çok sayıdaki antikor
- 30 bileşimi, farklı pIs 'lere sahip antikorlar içerir.

C. Kromatografi

- Bazı görünümelerde, mevcut beyan, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bileşimleri, *örneğin* polipeptid varyantlarını analiz etmek için yöntemler sağlar, burada
- 35 yöntem, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın bir

iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir ilk iyonik kuvvetli bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanmasını, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın iyon-değişim kolonundan bir elüsyon tamponu kullanılarak elüte edilmesini, 5 burada elüsyon tamponunun iyonik kuvvetinin, bir iyonik kuvvet gradyanı ile polipeptidler ve bir veya daha fazla kontaminantın ayrı entiteler halinde kromatografi malzemesinden elüte edileceği şekilde değiştirilmesini içerir. Mevcut beyanın bazı görünümlerinde, kromatografi yöntemleri, 10 değişen pI'lara sahip çoklu polipeptidler (rneğin polipeptid ürünler) için uygundur. Örneğin, yöntemler, 6.0 ila 9.5 arasındaki pI'lara sahip çok sayıdaki farklı antikör ürünü için kullanılabilir. Mevcut beyanın başka görünümlerinde, kromatografi yöntemleri, burada tarif edilen yöntemler 15 tarafından tanımlanan bir optimal tamponun kullanımını kapsar. Burada tarif edilen metotlardan herhangi birinin bazı yapılanmalarında kromatografi materyali bir katyon değiştirme materyalidir. Bazı uygulamalarda, burada tarif edilen şekilde bükülme noktasındaki polipeptid pozitif yüklü olduğunda bir 20 katyon değişim malzemesi kullanılır. Bazı yapılanmalarda katyon değiştirme materyali, negatif yüklü olan ve katı fazın üzerinden veya içerisinden geçirilen bir sulu çözelti içindeki katyonlarla değiştirilmek üzere serbest katyonlara sahip olan bir katı fazdır. Burada tarif edilen metotlardan herhangi 25 birinin bazı yapılanmalarında katyon değiştirme materyali bir membran, bir monolit veya reçine olabilir. Bazı yapılanmalarda katyon değiştirme materyali bir reçine olabilir. Katyon değiştirme materyali bir karboksilik asit fonksiyonel grubunu veya bir sülfonik asit fonksiyonel grubunu, örneğin bunlarla 30 sınırlı olmamak kaydıyla sülfonat, karboksilik, karboksimetil sülfonik asit, slfoizobtil, slfoetil, karboksil, slfopropil, sülfonil, slfoksietil veya ortofosfatı içerebilir. Yukarıdaki yapılanmaların bazılarında katyon değiştirme kromatografi materyali bir katyon değiştirme 35 kromatografi kolonudur. Bazı uygulamalarda,, yaklaşık 7.0 ila

yaklaşık 9.5 arasındaki pI'lere sahip farklı polipeptidler, *örneğin* farklı antikorlar veya fragmanı için bir katyon değişimi kromatografisi malzemesi kullanılır. Bazı uygulamalarda, katyon değişimi kromatografisi malzemesi burada

5 tarif edilen metotlarla tanımlanan optimal bir tampon kullanan kromatografi yöntemlerinde kullanılır.

Katyon değiştirme materyallerinin teknikte bilinen örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, Mustang S, Sartobind S, SO3 Monolith, S Ceramic HyperD, Poros XS, Poros

10 HS50, Poros HS20, SPSFF, SP-Sepharose XL (SPXL), CM Sepharose Fast Flow, Capto S, Fractogel Se HiCap, Fractogel SO3 veya Fractogel COO bulunur. Burada tarif edilen metotlardan herhangi birinin bazı yapılanmalarında katyon değiştirme materyali Poros HS50'dir. Bazı uygulamalarda Poros HS reçinesi,

15 Poros HS 50 µm veya Poros HS 20 µm parçacıkları olabilir. Buluşun yöntemlerinde kullanmak amacıyla katyon değişim kromatografisi kolonları arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, ProPac WCX-10, ProPac WCX-10HT, MabPac SCX-10 5µm, ve MabPac SCX-10 10µm bulunur.

20 Burada tarif edilen metotlardan herhangi birinin bazı yapılanmalarında kromatografi materyali bir anyon değiştirme materyalidir. Bazı uygulamalarda, burada tarif edilen şekilde bükülme noktasındaki polipeptid negatif yüklü olduğunda bir anyon değişim malzemesi kullanılır. Bazı yapılanmalarda anyon

25 değiştirme kromatografi materyali, pozitif yüklü olan ve katı fazın üzerinden veya içerisinden geçirilen bir sulu çözelti içindeki anyonlarla değiştirilmek üzere serbest anyonlara sahip olan bir katı fazdır. Burada tarif edilen metotlardan herhangi birinin bazı yapılanmalarında anyon değiştirme

30 materyali bir membran, bir monolit veya reçine olabilir. Bir yapılanmada anyon değiştirme materyali bir reçine olabilir. Bazı yapılanmalarda anyon değiştirme materyali bir birincil amin, bir ikincil amin, bir üçüncül amin veya bir dördüncül amonyum iyonu fonksiyonel grubu, bir poliamin fonksiyonel

35 grubu veya bir dietilaminoetil fonksiyonel grubu içerebilir.

Yukarıdaki yapılanmaların bazılarında anyon değiştirme kromatografi materyali bir anyon değiştirme kromatografi kolonudur. Bazı uygulamalarda, yaklaşık 7'den daha azlık bir pI'ye sahip bir polipeptid, *örneğin* ve antikor veya bunun
5 fragmanı için, bir anyon değişimi kromatografisi malzemesi kullanılır. Bazı uygulamalarda,, yaklaşık 4.5 ila yaklaşık 7.0 arasındaki pI'lere sahip farklı polipeptidler, *örneğin* farklı antikorlar veya fragmanı için bir anyon değişimi kromatografisi malzemesi kullanılır. Bazı uygulamalarda, anyon
10 değişimi kromatografisi malzemesi burada tarif edilen metotlarla tanımlanan optimal bir tampon kullanan kromatografi yöntemlerinde kullanılır.

Anyon değiştirme materyallerinin örnekleri teknikte bilinmektedir ve bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla Poros HQ 50,
15 Poros PI 50, Poros D, Mustang Q, Q Sepharose FF ve DEAE Sepharose'u kapsar. Mevcut buluşun yöntemlerinde kullanım için anyon değişim kromatografisi kolonları örnekleri arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, Dionex ProPac 10 SAX ve Tosoh GSKgel Q STAT 7 µM WAX bulunur.

20 Burada tarif edilen metotlardan herhangi birinin bazı yapılanmalarında, kromatografi materyali bir karışık mod materyali olup, şu fonksiyonelliklerden bir veya daha fazlasına sahip fonksiyonel gruplar içerir: anyon değiştirme, katyon değiştirme, hidrojen bağlama ve hidrofobik etkileşimler.

25 Bazı yapılanmalarda karışık mod materyali, anyon değiştirme kapasitesine sahip olan ve hidrofobik etkileşimlere girebilen fonksiyonel gruplar içerir. Karışık mod materyali, ligand olarak N-benzil-N-metil etanol amin, 4-merkapt-etil-piridin, hekzilamin veya fenilpropilamin içerebilir veya çapraz bağlı
30 polialilamin içerebilir. Karışık mod materyallerinin örnekleri arasında Capto MMC reçinesi, QMA reçinesi, Capto MMC reçinesi, MEP HyperCel reçinesi, HEA HyperCel reçinesi, PPA HyperCel reçinesi veya ChromaSorb membranı veya Sartobind STIC bulunur. Bazı yapılanmalarda karışık mod materyali Capto Adhere

reçinesidir. Yukarıdaki yapılanmaların bazılarında karışık mod materyali bir karışık mod kromatografi kolonudur.

Burada tarif edilen metotlardan herhangi birinin bazı yapılanmalarında, iyon değiştirme materyalinde bir

5 konvansiyonel kromatografi materyali veya bir konvektif kromatografi materyali kullanabilir. Konvansiyonel kromatografi materyalleri arasında, örneğin perfüzif materyaller (örneğin poli(stiren-divinilbenzen) reçinesi) ve difüzif materyaller (örneğin çapraz bağlı agaroz reçinesi) 10 bulunur. Bazı uygulamalarda, poli(stiren-divinilbenzen) reçinesi, Poros reçinesi olabilir. Bazı yapılanmalarda, çapraz bağlı agaroz reçine süfopropil-Sepharose Fast Flow ("SPSFF") reçinesi olabilir. Konvektif kromatografi materyali bir membran (örneğin polietersülfon) veya monolit materyal 15 (örneğin çapraz bağlı polimer) olabilir. Polietersülfon membran Mustang olabilir. Çapraz bağlı polimer monolit materyal, çapraz bağlı poli(glisidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat) olabilir.

Buluşun yöntemlerinin herhangi birinin bazı uygulamalarında, 20 kromatografi malzemesi, bir kromatografi kolonunda; örneğin bir katyon değişim kromatografisi kolonu veya bir anyon değişim kromatografisi kolonundadır. Bazı uygulamalarda, kromatografi kolonu sıvı kromatografisi için kullanılır. Bazı uygulamalarda, kromatografi kolonu, Yüksek Basıncılı Sıvı 25 Kromatografisi (HPLC) için kullanılır. Bazı uygulamalarda, kromatografi kolonu, bir HPLC kromatografi kolonudur; örneğin, bir katyon değişimi HPLC kolonu veya bir anyon değişimi HPLC kolonudur.

Mevcut buluşun çoklu ürünlü kromatografi yöntemleri için 30 kullanılacak örnek bir HPLC prosedürü aşağıdaki gibidir; ancak, buluşun yöntemlerinin bu prosedürlere bağlı olduğu anlamı çıkarılmamalıdır. Örnekler, otomatik örnekleyiciye eklenmiş ve dolaba kaldırılmıştır ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Kolonlar, kolon kompartmanına yerleştirilmiş ve kompartman sıcaklığını analiz 35 sırasında ayarlanan noktadan dar bir aralıkta ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) tutmak

için bir sıcaklık kontrol özelliği kullanılabilir. Kolon atık sıvısı 280 nm'de izlenir.

Örnekler, hareketli faz ile yaklaşık 1-2 mg/mL'lik bir hedef polipeptid konsantrasyonuna seyreltilmiştir. Bazı

5 uygulamalarda, polipeptid, 1:100'lük (a/a) bir oranda ilave edilen karboksipeptidaz B (CpB) ile sindirilebilir ve 37 °C'de 20 dakika süreyle enkübe edilebilir. Numuneler analize kadar 5 °C'de saklanabilir.

Alet, düşük basınçlı bir dörtlü degrade pompası, sıcaklık
10 kontrol özelliğine sahip hızlı bir ayırma otomatik örnekleyici, bir termal kontrollü kolon bölmesi ve bir diyot dizisi UV detektörü içerebilir. Detektörün çıkışında, gerçek zamanlı olarak pH ve iletkenlik verilerini toplamak için bir PCM-3000 pH ve iletkenlik monitörü bağlanabilir. Alet kontrolü, veri
15 toplama ve veri analizi; örneğin, Thermo Scientific Dionex Chromeleon yazılımı, versiyon 6.8 kullanılarak gerçekleştirilebilir

Örnekler, deiyonize su ile 2 mg/mL'ye seyreltilebilir ve otomatik örnekleyicide 5±3 °C'de tutulabilir. Bir MabPac SCX-
20 10, 4 × 250 mm kolonu, 37±1 °C'deki sıcaklık ayarı ile kolon kompartmanına yerleştirilir. Her bir kromatografik çalıştırma için, 10 µL protein (20 µg) enjekte edilir. Tampon A, pH 7.5 37 °C'de 5 mM ACES'tir. Tampon B, tampon A içindeki 180 mM NaCl'dir. Gradyan, tampon B'nin tampon A'da 100 dakika içinde
25 1 mM/dk'da karıştırıldığı 0-100 mM NaCl'dir. Akış hızı, 0,8 mL/dk'dır. Protein, 280 nm'de absorbands yoluyla tespit edilir. Bazı uygulamalarda, Tampon A, 40 °C'de 10 mM HEPES tamponu pH 7.6 ve tampon B, 100 mM NaCl'dir.

Elüsyon, burada kullanıldığı haliyle, ürünün, örneğin
30 polipeptidin kromatografi materyalindeki kontaminantlardan uzaklaştırılmasıdır. Elüsyon tamponu, polipeptidin veya diğer ilgili ürünün bir kromatografi materyalinden ayrıştırılmasında kullanılan tampondur. Bazı uygulamalarda, elüsyon tamponu, kromatografinin hareketli fazı için parçadır. Bazı
35 uygulamalarda, polipeptidi ve kontaminantları ihtiva eden

bileşim hareketli fazın parçası olarak kromatografisi malzemesine uygulanır. Daha sonra, hareketli faz, polipeptid ve kontaminantların kromatografi malzemesinden ayrıldığından polipeptidin kontaminantlardan ayrılmasına imkan vermek için değiştirilir. Bir elüsyon tamponu çoğu durumda yükleme tamponundan farklı fiziksel özelliklere sahiptir. Bazı uygulamalarda elüsyon tamponunun iyonik kuvveti, yük tamponuna kıyasla elüsyon seyri boyunca arttırılır. Bazı uygulamalarda, kromatografi, çoklu ürünlü bir kromatografi prosedürüdür. Bazı uygulamalarda, elüsyon tamponu, burada tarif edilen yöntemlerle tanımlanan bir optimal tampon içerir. Bazı uygulamalarda, iyonik kuvvet gradyanı, bir tuz gradyanıdır. Bazı uygulamalarda tuz gradyanı, yaklaşık 0 mM tuz ile yaklaşık 200 mM tuz arasındaki bir gradyandır. Bazı uygulamalarda, tuz gradyanı, yaklaşık 0 mM ile yaklaşık 100 mM, 0 mM ile yaklaşık 60 mM, 0 mM ile yaklaşık 50 mM, 0 mM ile yaklaşık 40 mM, 0 mM ile yaklaşık 30 mM, 0 mM ile yaklaşık 20 mM, 0 mM ile yaklaşık 10 mM, 10 mM ile yaklaşık 200 mM, 10 mM ile yaklaşık 100 mM, 10 mM ile yaklaşık 50 mM, 10 mM ile yaklaşık 40 mM, 10 mM ile yaklaşık 30 mM, 10 mM ile yaklaşık 20 mM, 20 mM ile yaklaşık 200 mM, 20 mM ile yaklaşık 100 mM, 20 mM ile yaklaşık 50 mM, 20 mM ile yaklaşık 30 mM, 30 mM ile yaklaşık 200 mM, 30 mM ile yaklaşık 100 mM, ve 30 mM ile yaklaşık 50 mM aralığının herhangi biridir. Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, hareketli fazın, *örneğin* elüsyon tamponunun iyonik kuvveti, mobil fazın iletkenliğiyle ölçülür. İletkenlik, bir sulu solüsyonun iki elektrot arasında bir elektrik akımını iletme yeteneğidir. Solüsyonda akım iyon taşınımıyla aktarılır. Bu nedenle sulu solüsyon içinde bulunan iyon miktarları arttığında solüsyon daha yüksek bir iletkenliğe sahip olacaktır. İletkenlik için temel ölçü birimi Siemen (veya mho), mho'dur (mS/cm) ve bir iletkenlik ölçer kullanılarak, *örneğin* çeşitli Orion iletkenlik ölçer modelleri kullanılarak ölçülebilir. Elektrolitik iletkenlik, bir solüsyon içindeki iyonların elektrik akımı taşıma kapasitesi

olduğundan, bir solüsyonun içindeki iyon konsantrasyonunun değiştirilmesi yoluyla, solüsyonun iletkenliğinin değiştirilmesi mümkündür. Örneğin istenen iletkenliği elde etmek amacıyla, solüsyon içindeki bir tamponlayıcı ajanın konsantrasyonu ve/veya bir tuzun (örneğin sodyum klorür, sodyum asetat veya potasyum klorür) konsantrasyonu değiştirilebilir. Tercihen, istenen iletkenliği elde etmek için çeşitli tamponların tuz konsantrasyonları değiştirilir.

Bazı uygulamalarda, kromatografinin hareketli fazı, 0,0 mS/cm, 0,5 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm, 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm veya 20,0 mS/cm'nin yaklaşık herhangi birinden daha fazlalık bir ilk iletkenliğe sahiptir. Bazı uygulamalarda, mobil fazın iletkenliği kromatografinin seyri boyunca, örneğin bir iyonik kuvvet gradyanı ile arttırılır. Bazı uygulamalarda, elüsyonun tamamlandığında mobil fazın iletkenliği, yaklaşık 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm, 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm veya 20,0 mS/cm'nin herhangi birinden daha fazladır. Bazı uygulamalarda, hareketli fazın iletkenliği bir lineer gradyan ile arttırılır. Bazı uygulamalarda, mobil fazın iletkenliği, bir veya daha fazla adım içeren bir basamaklı gradyan ile arttırılır.

Burada tarif edilen yöntemlerin herhangi birinin bazı uygulamalarında; örneğin, bir çoklu ürünlü kromatografi prosedürü veya burada tarif edilen yöntemler tarafından tanımlanan bir optimal tampon içeren bir kromatografi prosedürü, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bileşim, yaklaşık 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7

µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg veya 50 µg'nin herhangi birinden daha fazla bir miktardaki kromatografi malzemesi üzerine yüklenir. Bazı uygulamalarda, bileşim, yaklaşık 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, ve 5,0 mg/mL'nin herhangi birinden daha fazla bir konsantrasyonda kromatografi malzemesi üzerine yüklenir. Bazı uygulamalarda, bileşim, kromatografi malzemesi üzerine yüklenmeden önce; örneğin, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10'a veya 1:10'un daha fazlasına seyreltilir. Bazı uygulamalarda, bileşim, kromatografinin hareketli fazına seyreltilir. Bazı uygulamalarda, bileşim, bir yükleme tamponuna seyreltilir. Burada tarif edilen yöntemlerin herhangi birinin bazı uygulamalarında, akış hızı, yaklaşık 0,5 mL/dk, 0,6 mL/dk, 0,7 mL/dk, 0,8 mL/dk, 0,9 mL/dk, 1,0 mL/dk, 1,1 mL/dk, 1,2 mL/dk, 1,3 mL/dk, 1,4 mL/dk, 1,5 mL/dk, 1,75 mL/dk ve 2,0 mL/dk'nin herhangi birinden daha fazladır.

Burada tarif edilen yöntemlerin bazı uygulamalarında, kromatografi malzemesi bir kolon içindedir. Bazı uygulamalarda kolon, bir HPLC kolonudur. Bazı uygulamalarda kolon, aşağıdaki boyutlardan herhangi birine sahiptir: 4 × 50 mm, 4 × 100 mm, 4 × 150 mm, 4 × 200 mm, 4 × 250 mm veya 2 × 250 mm.

D. Yük varyantlarının saptanması

Bazı görünümelerde, mevcut beyan, polipeptidi ihtiva eden bir bileşimdeki bir polipeptidin (örneğin bir antikor) varyantları ve polipeptidin bileşimindeki bir veya daha fazla varyantı tespit etme yöntemleri sağlar. Mevcut beyanın bazı görünümelerinde, polipeptidin varyantları yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilmiş iyon değişim kromatografisi ayırma koşulları kullanılarak analiz edilir. Mevcut beyanın bazı görünümelerinde, polipeptidin varyantları, iyon değişim kromatografisi kullanılarak analiz edilir, burada tampon yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilmiştir. Mevcut beyanın bazı görünümelerinde, polipeptidin varyantları, iyon değişim kromatografisi kullanılarak analiz edilir, burada ayırma koşulları ve tampon yukarıda tarif edilen şekilde

optimize edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, iyon değişim kromatografisi ayırma koşulları ve/veya tampon çok sayıdaki polipeptid (örneğin bir veya daha fazla antikör) için; örneğin bir veya daha fazla hedef polipeptit için ortak bir dIP/dT değerini belirleyerek optimize edilir. Yöntem, polipeptid ve bir veya daha fazla varyantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir ilk iyonik kuvvetli bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanmasını, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın iyon-değişim kolonundan bir elüsyon 5 tamponu kullanılarak elüte edilmesini, burada elüsyon tamponunun iyonik kuvvetinin, bir iyonik kuvvet gradyanı ile polipeptidler ve bir veya daha fazla kontaminantın ayrı entiteler halinde kromatografi malzemesinden elüte edileceği şekilde değiştirilmesini içerir. Kromatografinin eluentleri 10 daha sonra ana polipeptit ve varyantların varlığı açısından analiz edilir. Polipeptidin varyantları, polipeptidin asidik varyantlarını ve ana polipeptidin temel varyantlarını içerebilir. Asidik varyantların örnekleri, yani ana polipeptidin pI'sinden daha düşük bir pI'a sahip varyantlar, 20 bir veya daha fazla glutamin ve/veya asparagin tortusunun deamide edildiği polipeptitleri içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Bazı polipeptid varyantı, yani ana polipeptidin pI'sinden daha büyük bir pI'a sahip varyant örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, bir aspartik asit kalıntısının 25 bir süksinimit parçasına modifiye edilmesine yol açan varyantlar bulunur. Mevcut beyanın başka görünümünde polipeptidler, yaklaşık 6.0 ila 9.5'lik bir pI'a sahiptir. Mevcut beyanın başka görünümünde polipeptid, yaklaşık 6.0 ila 9.5'lik bir pI'a sahip olan bir antikordur.

30 **E. Bir bileşimdeki bir polipeptidin saflığının belirlenmesi**

Bazı görünümünde, mevcut beyan polipeptidi ihtiva eden bir bileşimdeki bir polipeptidin saflığını belirleme yöntemleri sağlar. Mevcut beyanın bazı görünümünde, bileşimdeki polipeptidin saflığı, yukarıda tarif edilen şekilde optimize 35 edilmiş iyon değişim kromatografisi ayırma koşulları

kullanılarak analiz edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, bileşimdeki polipeptidin saflığı, iyon değişim kromatografisi kullanılarak analiz edilir, burada tampon yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilmiştir. Mevcut beyanın bazı
5 görünümünde, bileşimdeki polipeptidin saflığı, iyon değişim kromatografisi kullanılarak analiz edilir, burada ayırma koşulları ve tampon yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, iyon değişim kromatografisi ayırma koşulları ve/veya tampon çok sayıdaki
10 polipeptid (örneğin bir veya daha fazla antikör) için; örneğin bir veya daha fazla hedef polipeptit için ortak bir dIP/dT değerini belirleyerek optimize edilir. Yöntem, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir ilk iyonik kuvvetli bir yükleme
15 tamponu kullanılarak bağlanmasını, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın iyon-değişim kolonundan bir elüsyon tamponu kullanılarak elüte edilmesini, burada elüsyon tamponunun iyonik kuvvetinin, bir iyonik kuvvet gradyanı ile polipeptidler ve bir veya daha fazla kontaminantın ayrı
20 entiteler halinde kromatografi malzemesinden elüte edileceği şekilde değiştirilmesini içerir. Polipeptidin saflığı, kromatografi malzemesinden elüte edilen polipeptidin miktarının, kromatografi malzemesinden elüte edilen kontaminantların, örneğin yük varyantlarının miktarına
25 oranının belirlenmesiyle değerlendirilebilir. Mevcut beyanın başka görünümünde polipeptidler, yaklaşık 6.0 ila 9.5'lik bir pI'a sahiptir. Mevcut beyanın başka görünümünde polipeptid, yaklaşık 6.0 ila 9.5'lik bir pI'a sahip olan bir antikördür.

30 **F. Bir bileşimdeki bir polipeptidin stabilitesinin belirlenmesi**

Bazı görünümünde, mevcut beyan polipeptidi ihtiva eden bir bileşimdeki bir polipeptidin stabilitesinin belirlenmesi için yöntemler sağlar. Mevcut beyanın bazı görünümünde, bileşimdeki polipeptidin stabilitesi, iyon değişim
35 kromatografisi kullanılarak belirlenir, burada ayırma

koşulları yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, bileşimdeki polipeptidin stabilitesi, iyon değişim kromatografisi kullanılarak belirlenir, burada tampon yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilmiştir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, bileşimdeki polipeptidin stabilitesi, iyon değişim kromatografisi kullanılarak belirlenir, burada ayırma koşulları ve tampon yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, iyon değişim kromatografisi ayırma koşulları ve/veya tampon çok sayıdaki polipeptid (örneğin bir veya daha fazla antikör) için; örneğin bir veya daha fazla hedef polipeptit için ortak bir dIP/dT değerini belirleyerek optimize edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, polipeptidi içeren bileşimin örnekleri zamana karşı analiz edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, bileşim, analizden önce çeşitli zamanlarda analiz edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, bileşim, analiz öncesinde yaklaşık 0°C, 20°C, 37°C veya 40°C'nin herhangi birinden daha fazlasında enkübe edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, bileşim, analizden önce 1 gün, 2 gün, 3 gün, 5 gün, 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta, 6 hafta, 2 ay, 3 ay, 6 ay, 1 yıl'ın biri veya daha fazlası süreyle enkübe edilir. Bileşim daha sonra, bileşimdeki polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir ilk iyonik kuvvetli bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanmasını, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın iyon-değişim kolonundan bir elüsyon tamponu kullanılarak elüte edilmesini, burada elüsyon tamponunun iyonik kuvvetinin, bir iyonik kuvvet gradyanı ile polipeptidler ve bir veya daha fazla kontaminantın ayrı entiteler halinde kromatografi malzemesinden elüte edileceği şekilde değiştirilmesi ile analiz edilir. Polipeptidin kontaminantlara oranındaki değişim, bileşimdeki polipeptidin stabilitesini göstermektedir. Örneğin, polipeptidin kontaminantlara oranı zaman içinde değişmezse, polipeptid stabil olarak kabul edilebilir, ancak bileşimdeki

polipeptid miktarındaki eşzamanlı bir azalma ile kontaminantların hızlı birikmesi, bileşimde bulunan polipeptidin daha az kararlı olduğunu gösterir. Mevcut beyanın bazı görünümlerinde, bileşimdeki polipeptidin stabilitesi, 5 iyon değişim kromatografisi kullanılarak analiz edilir, burada ayırma koşulları yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilir. Mevcut beyanın bazı görünümlerinde, bileşimdeki polipeptidin stabilitesi, iyon değişim kromatografisi kullanılarak analiz edilir, burada tampon yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilmiştir. Mevcut beyanın bazı görünümlerinde, bileşimdeki polipeptidin stabilitesi, iyon değişim kromatografisi kullanılarak analiz edilir, burada ayırma koşulları ve tampon yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilir. Mevcut beyanın bazı görünümlerinde, iyon değişim kromatografisi ayırma 15 koşulları ve/veya tampon çok sayıdaki polipeptid (örneğin bir veya daha fazla antikor) için; örneğin bir veya daha fazla hedef polipeptit için ortak bir dIP/dT değerini belirleyerek optimize edilir. Mevcut beyanın başka görünümlerinde polipeptidler, yaklaşık 6.0 ila 9.5'lik bir pI'a sahiptir. 20 Mevcut beyanın başka görünümlerinde polipeptid, yaklaşık 6.0 ila 9.5'lik bir pI'a sahip olan bir antikordur. Polipeptitlerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, antikorlar ve antikor fragmanları bulunur.

G. Polipeptidlerin saflaştırılması

25 Bazı görünümlerde mevcut beyan, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bir bileşimden bir antikor gibi bir polipeptidin saflaştırılması için yöntemler sağlar. Yöntem olup, kromatografi ayırma koşullarının yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilmesini içerir. Mevcut beyanın bazı 30 görünümlerinde, polipeptid, tamponun yukarıda tarif edilen şekilde optimize edilmiş olduğu kromatografi kullanılarak saflaştırılır. Mevcut beyanın bazı görünümlerinde, polipeptid, ayırma koşulları ve tampon yukarıda tarif edilen şekilde optimize edildiği kromatografi kullanılarak saflaştırılır. 35 Mevcut beyanın bazı görünümlerinde, kromatografi ayırma

koşulları ve/veya tampon çok sayıdaki polipeptid (örneğin bir veya daha fazla antikor) için; örneğin bir veya daha fazla hedef polipeptit için ortak bir dIP/dT değerini belirleyerek optimize edilir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, 5 kromatografi, iyon değişim kromatografisidir; örneğin katyon değişim kromatografisi veya anyon değişim kromatografisidir. Mevcut beyanın bazı görünümünde, kromatografi, karma kipli kromatografidir.

Mevcut beyanın bazı görünümünde, polipeptid ve 10 kontaminantları, bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine veya karma kipli kromatografi malzemesine kromatografi sıcaklıktaki polipeptidin bir pH bükülme noktasındaki bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanır. Yükleme tamponu, bir ilk iyonik kuvvete sahiptir. Polipeptid daha sonra, elüsyon 15 tamponunun iyonik kuvvetinin, polipeptidler ve bir veya daha fazla kontaminantın, ayrı varlıklar halinde kromatografi malzemesinden ayrılacağı şekilde bir iyonik kuvvet gradyanınca değiştirildiği bir elüsyon tamponu kullanılarak iyon değişim kromatografisi ortamından veya karışık mod kromatografi 20 ortamından ayrıştırılır. Fraksiyonlar, kromatografinin elüsyon fazı sırasında toplanır ve hiç veya minimal kirletici içermeyen polipeptit içeren fraksiyonlar, daha fazla işlem veya farmasötik formülasyon için havuzlanır. Polipeptitlerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, 25 antikorlar ve antikor fragmanları bulunur.

III. Polipeptitler

Polipeptidler, iyon değişim kromatografisinin yöntemlerinin herhangi birinde kullanım için olup, burada ayırma koşulları, burada tarif edilen şekilde optimize edilmiştir. Mevcut 30 buluşun bazı uygulamalarında, bir polipeptidin bileşimleri iyon değişim kromatografisi ile analiz edilir. Bu tür yöntemler, bileşim içindeki polipeptitin yük varyantlarını tanımlamakta yararlıdır. Bazı yapılanmalarda polipeptit bir antikor ya da bunun fragmanıdır. Bazı uygulamalarda 35 polipeptidler, yaklaşık 6.0 ila 9.5'lik bir pI'a sahiptir.

- Bazı uygulamalarda, polipeptid, yaklaşık 6.0 ila yaklaşık 9.5 arasında değişen bir pI'ye sahip olan bir antikordur. Bazı uygulamalarda, bir polipeptidin yükü vs. pH değeri eğrisindeki Bükülme Noktası (IP), buluşun yöntemleri ile sağlanmaktadır.
- 5 Bazı uygulamalarda, sıcaklıktaki bir değişimle IP'deki değişim (dIP/dT), buluşun yöntemleri tarafından sağlanmaktadır.
- Bazı yapılanmalarda polipeptit bir terapötik polipeptittir. Bazı yapılanmalarda polipeptit bir antikordur. Bazı uygulamalarda, polipeptid, bir immünoadezindir.
- 10 Bazı yapılanmalarda polipeptidin molekül ağırlığı yaklaşık 5.000 Dalton, 10.000 Dalton, 15.000 Dalton, 25.000 Dalton, 50.000 Dalton, 75.000 Dalton, 100.000 Dalton, 125.000 Dalton veya 150.000 Dalton'dan herhangi birinden daha büyüktür. Polipeptidin molekül ağırlığı yaklaşık 50.000 Dalton ile
- 15 200.000 Dalton veya 100.000 Dalton ile 200.000 Dalton arasında olabilir. Alternatif olarak, burada kullanılmaya yönelik polipeptidin molekül ağırlığı yaklaşık 120.000 Dalton veya yaklaşık 25.000 Dalton olabilir.
- pI izoelektrik noktadır ve belirli bir molekülün veya yüzeyin
- 20 hiçbir net elektrik yükü taşımadığı pH değeridir. Bazı uygulamalarda, buluşun yöntemi, bileşimdeki polipeptidin pI'sinin, örneğin bir antikoron, yaklaşık 6.0 ila yaklaşık 9.5 arasında olduğu bir polipeptidi içeren birçok bileşimde kullanılabilir. Bazı uygulamalarda, polipeptid, yaklaşık
- 25 9,5'ten daha büyük; örneğin, yaklaşık 9,5 ila yaklaşık 12'lik bir pI'ye sahiptir. Burada tarif edilen yöntemlerin bazı uygulamalarında, polipeptidin, örneğin bir antikoron pI'si, yaklaşık 7'den daha az; örneğin, yaklaşık 4 ila yaklaşık 7 olabilir.
- 30 Burada tarif edilen yöntemlerin herhangi birinde, bir polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bir bileşimdeki bir veya daha fazla kontaminant, polipeptit yük varyantlarıdır. Bazı uygulamalarda, polipeptid yük varyantı, polipeptidin yükünün değiştirileceği şekilde kendi doğal
- 35 durumundan modifiye edilmiş bir polipeptiddir. Bazı

uygulamalarda, yük varyantları, ana polipeptidden daha asidiktir; *başka bir deyişle* ana polipeptidden daha düşük bir pI'ye sahiptir. Başka uygulamalarda, yük varyantları, ana polipeptidden daha baziktir; *başka bir deyişle* ana polipeptidden daha yüksek bir pI'ye sahiptir. Bazı uygulamalarda, polipeptid yük varyantları, geliştirilmiştir. Bazı uygulamalarda, polipeptid yük varyantı doğal proseslerin; örneğin, oksidasyon, deamidasyon, lizin kalıntılarının C ucu işlenmesi, N ucu piroglutamat oluşumu ve glikasyonun sonucudur.

10 Bazı uygulamalarda, polipeptid yük varyantı, proteine bağlı olan glikanın, glikoproteinin yükünün, ana glikoproteine kıyasla değiştirileceği şekilde, örneğin, siyalik asit veya türevlerinin eklenmesiyle modifiye edildiği bir glikoproteindir. Bazı uygulamalarda, polipeptid yük varyantı,

15 bir antikor yük varyantıdır.

Burada tarif edilen metotlar kullanılarak analiz edilecek polipeptitler genellikle rekombinasyon teknikleriyle üretilir. Rekombinant proteinlerin üretimine yönelik metotlar örneğin U.S. Pat. No. 5,534,615 ve 4,816,567 belgelerinde tarif

20 edilmektedir. Bazı yapılanmalarda ilgili protein bir CHO hücresi içinde üretilir (*bkz. örneğin* WO 94/11026). Bazı uygulamalarda, ilgi duyulan polipeptid, bir *E. coli* hücresinde üretilir. Örneğin, translasyon başlatma bölgesini (TIR) ve ekspresyon ve sekresyonun optimize edilmesi için sinyal sekanslarını açıklayan, U.S. Pat. No. 5,648,237; U.S. Pat. No. 5,789,199 ve U.S. Pat. No. 5,840,523 belgesini inceleyiniz. Ayrıca, *E. coli*'de antikor fragmanlarının ekspresyonunu açıklayan Charlton, Methods in Molecular Biology, Cilt 248 (B. K. C. Lo, *baskı.*, Humana Press, Totowa, N.J., 2003), sf. 245-

25 254 belgesini inceleyiniz. Rekombinasyon teknikleri kullanılırken polipeptitler hücre içinde periplazmik boşlukta üretilir ya da doğrudan ortamın içine salgılanabilir.

Polipeptitler kültür ortamından veya konakçı hücre lizatlarından geri kazanılabilir. Polipeptitlerin ifadesinde

35 kullanılan hücreler çeşitli fiziksel veya kimyasal yollarla,

örneğin donma-çözülme çevrimi, sonikasyon, mekanik tahribat veya hücre parçalayıcı ajanlar yoluyla tahrip edilebilir. Polipeptidin hücre içinde üretilmesi durumunda, birinci adım olarak, konakçı hücreler veya parçalanmış fragmanlar 5 biçimindeki parçacıklı kalıntılar, örneğin santrifüjleme veya ultrafiltreleme yoluyla uzaklaştırılır. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992), E. coli'nin periplazmik boşluğuna salgılanan polipeptidleri izole etmek için bir prosedür tarif eder. Özetle, ortamda sodyum asetat (pH 3,5), 10 EDTA ve fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) mevcutken yaklaşık 30 dk. boyunca hücre pastası eritilir. Hücre kalıntıları santrifüjleme yoluyla uzaklaştırılabilir. Polipeptit ortama salgılandığında, bu tür ifade sistemlerinin süpernatantları genellikle ilk olarak piyasada bulunabilen bir polipeptit 15 konsantrasyon filtresi, örneğin bir Amicon veya Millipore Pellicon ultrafiltreleme birimi kullanılarak konsantre edilir. Bir proteaz inhibitörü, örneğin PMSF, proteolizi inhibe etmek üzere yukarıdaki adımlardan herhangi birine dahil edilebilir ve harici kirleticilerin büyümesinin önlemesi için 20 antibiyotikler dahil edilebilir.

Bazı uygulamalarda, polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bileşimdeki polipeptid, buluşun yöntemleri ile analizden önce saflaştırılmış veya kısmen saflaştırılmıştır. Örneğin, metotlardaki polipeptit bir 25 afinite kromatografisi, bir katyon değiştirme kromatografisi, bir anyon değiştirme kromatografisi, bir karışık mod kromatografisi ve bir hidrofobik etkileşim kromatografisinden elde edilen bir elüentin içindedir. Bazı yapılanmalarda polipeptit, bir Protein A kromatografisinden elde edilen bir 30 elüentin içindedir.

Mevcut buluşun metotları ile analiz edilebilecek polipeptitlerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, immüoglobülinler, immünoadezinler, antikorlar, enzimler, hormonlar, füzyon proteinleri, Fc içeren proteinler, 35 immünokonjugatlar, sitokinler ve interleokinler bulunur.

(A) *Antikorlar*

Burada tarif edilen yöntemlerden herhangi birinin bazı yapılanmalarında, polipeptitlerin analiz edilmesine yönelik yöntemlerden herhangi birinde ve burada tarif edilen yöntemlerle polipeptitleri içeren formülasyonlarda kullanımı amaçlanan polipeptit bir antikordur.

Antikorlar için moleküler hedefler CD proteinlerini ve bunların ligandlarını, örneğin bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla aşağıdakileri kapsar: (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD11a, CD20, CD22, CD34, CD40, CD79 α (CD79a) ve CD79 β (CD79b); (ii) ErbB reseptör ailesinin üyeleri, örneğin EGF reseptörü, HER2, HER3 veya HER4 reseptörü; (iii) hücre adezyon molekülleri, örneğin LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM ve α v/ β 3 integrini ve bunların alfa veya beta alt birimleri (örneğin anti-CD11a, anti-CD18 veya anti-CD11b antikorları); (iv) büyüme faktörleri, örneğin VEGF; IgE; kan grubu antijenleri; flk2/flt3 reseptörü; obezite (OB) reseptörü; *mpl* reseptörü; CTLA-4; protein C, BR3, c-met, doku faktörü, β 7 vs.; ve (v) hücre yüzeyi antijenleri ve transmembran tümörle ilişkili antijenler (TAA), örneğin U.S. Patent No 7,521,541 belgesinde açıklananlar.

Örnek niteliğindeki diğer antikorlar, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, anti-östrojen reseptörü antikor, anti-projesteron reseptörü antikor, anti-p53 antikor, anti-HER-2/neu antikor, anti-EGFR antikor, anti-katepsin D antikor, anti-Bcl-2 antikor, anti-E-kaderin antikor, anti-CA125 antikor, anti-CA15-3 antikor, anti-CA19-9 antikor, anti-c-erbB-2 antikor, anti-P-glikoprotein antikor, anti-CEA antikor, anti-retinoblastom protein antikor, anti-ras onkoprotein antikor, anti-Lewis X antikor, anti-Ki-67 antikor, anti-PCNA antikor, anti-CD3 antikor, anti-CD4 antikor, anti-CD5 antikor, anti-CD7 antikor, anti-CD8 antikor, anti-CD9/p24 antikor, anti-CD10 antikor, Anti-CD11a Antikor, anti-CD11c antikor, anti-CD13 antikor, anti-CD14 antikor, anti-CD15 antikor, anti-CD19 antikor, anti-CD20 antikor, anti-CD22 antikor, anti-

CD23 antikoru, anti-CD30 antikoru, anti-CD31 antikoru, anti-CD33 antikoru, anti-CD34 antikoru, anti-CD35 antikoru, anti-CD38 antikoru, anti-CD41 antikoru, anti-LCA/CD45 antikoru, anti-CD45RO antikoru, anti-CD45RA antikoru, anti-CD39 antikoru, anti-CD 100 antikoru, anti-CD95/Fas antikoru, anti-CD99 antikoru, anti-CD106 antikoru, anti-ubikitin antikoru, anti-CD71 antikoru, anti-c-myc antikoru, anti-sitokeratin antikoru, anti-vimentin antikoru, anti-HPV proteinleri antikoru, anti-kappa hafif zincirleri antikoru, anti-lambda hafif zincirleri antikoru, anti-melanozom antikoru, anti-prostat spesifik antijen antikoru, anti-S-100 antikoru, anti-tau antijen antikoru, anti-fibrin antikoru, anti-keratin antikoru ve anti-Tn-antijen antikoru arasından seçilenleri kapsar.

(i) *Monoklonal antikorlar*

Bazı yapılanmalarda antikorlar monoklonal antikorlardır. Monoklonal antikorlar, monoklonal antikorum üretimi sırasında ortaya çıkan ve genellikle küçük miktarlarda olan olası varyantlar haricinde büyük ölçüde homojen bir antikorum popülasyonundan, yani popülasyonu içeren her bir antikorum özdeş olduğu ve/veya aynı epitopa bağlandığı bir antikorum popülasyonundan elde edilir. Bu nedenle, "monoklonal" niteleyicisi, antikorum özelliğini, ayrı veya poliklonal antikorların bir karışımı olmaması biçiminde belirtir.

Örneğin monoklonal antikorlar ilk olarak Kohler vd., *Nature*, 256:495 (1975) tarafından tarif edilen hibridom metodu kullanılarak yapılabilir ya da rekombinant DNA metotlarıyla yapılabilir (US Patent No. 4,816,567).

Hibridom metodunda, bir fare veya uygun başka bir konakçı hayvan, örneğin bir hamster, bağışıklama için kullanılan polipeptide spesifik olarak bağlanan antikorları üreten ya da bunları üretebilme kapasitesine sahip olan lenfositler sağlamak üzere burada tarif edildiği gibi bağışıklanır. Alternatif olarak lenfositler laboratuvar ortamında (*in vitro*) bağışıklanabilir. Daha sonra, lenfositler, örneğin bir polietilen glikol gibi uygun bir kaynaştırma maddesi

kullanılarak miyelom hücreleri ile kaynaştırılır ve bir hibridom hücresi oluşturulur (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, sayfa 59-103 (Academic Press, 1986)).

Bu şekilde hazırlanan hibridom hücreleri, tercihen kaynaşmamış ana miyelom hücrelerinin gelişimini veya sağkalımını inhibe eden bir veya daha fazla madde içeren uygun bir kültür ortamına ekilir ve burada yetiştirilir. Örneğin ana miyelom hücrelerinin enzim hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT veya HPRT) içermemesi durumunda, hibridomlar için kültür ortamı tipik olarak HGPRT'den yoksun hücrelerin gelişimini önleyen hipoksantin, aminopterin ve timidin (HAT ortamı) içerecektir.

Bazı yapılanmalarda miyelom hücreleri, seçilen antikor üreten hücreler vasıtasıyla verimli biçimde kaynaşan ve yüksek düzeyde stabil antikor üretimini destekleyen miyelom hücreleridir ve örneğin HAT ortamı gibi bir ortama duyarlıdır. Bunların arasından, bazı yapılanmalarda, miyelom hücre hatları murin miyelom hatları olup, örneğin Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California ABD'den temin edilebilen MOPC-21 ve MPC-11 fare tümörlerinden türetilenler ve American Type Culture Collection, Rockville, Maryland ABD'den temin edilebilen SP-2 veya X63-Ag8-653 hücreleridir. İnsan monoklonal antikorlarının üretimi için, insan miyelom ve fare-insan heteromiyelom hücre hatları da tarif edilmiştir (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur ve diğerleri, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* sf. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Hibridom hücrelerinin büyütüldüğü kültür ortamı, antijene yönelik monoklonal antikorların üretimi için analiz edilir.

Bazı yapılanmalarda, hibridom hücreleri tarafından üretilen monoklonal antikorların bağlanma spesifikliği immünopresipitasyon yoluyla veya bir in vitro bağlanma deneyiyle, örneğin radyo immün analiz (RIA) veya enzime bağlı immünsorban analizi (ELISA) ile belirlenir.

Monoklonal antikorun bağlanma afinitesi, örneğin Munson vd., *Anal. Biochem.* 107:220 (1980) belgesinde açıklanan Scatchard analizi ile belirlenebilir.

Hibridom hücrelerinin, istenen spesifikliğe, afiniteye ve/veya aktiviteye sahip antikorları ürettiği tespit edildiğinde, klonlardan, sınırlayıcı seyreltme prosedürleri ile alt klonlar oluşturulabilir ve bunlar, standart yöntemlerle yetiştirilebilir (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, sayfa 59-103 (Academic Press, 1986)). Bu amaca uygun kültür ortamları arasında örneğin D-MEM veya RPMI-1640 ortamı bulunur. Ayrıca, hibridom hücreleri, bir hayvan içinde assit tümörleri olarak in vivo büyütülebilir.

Alt klonlar tarafından salgılanan monoklonal antikorlar, kültür ortamı, assit sıvısı veya serumdan konvansiyonel immünoglobülin saflaştırma prosedürleriyle, örneğin Polipeptit A-Sepharose, hidroksilapatit kromatografisi, jel elektroforezi, diyaliz veya afinite kromatografisi ile uygun şekilde ayrılır.

Monoklonal antikorları kodlayan DNA, konvansiyonel prosedürler üzerinden (mesela murin antikorların ağır ve hafif zincirlerim kodlayan genlere spesifik olarak bağlanabilen oligonükleotit problemleri kullanılarak) halihazırda izole edilir ve sekanslanır. Bazı yapılanmalarda hibridom hücreleri bu tür DNA için bir kaynak işlevi görür. DNA izole edildikten sonra rekombinant konakçı hücrelerde monoklonal antikorların sentezinin elde edilmesi amacıyla ifade vektörlerine konulabilir ve bunlar da daha sonra konakçı hücrelere, örneğin E. coli hücreleri, simian COS hücreleri, Çin Hamsteri Over (CHO) hücreleri veya aksi takdirde immünoglobülin polipeptit üretmeyen miyelom hücrelerine transfekte edilir. Bakterilerin içinde antikor kodlayan DNA'nın rekombinant ifadesiyle ilgili makaleler için Skerra ve diğerleri, *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262 (1993) ve Plükthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992) yayınlarını inceleyiniz.

Başka bir yapılanmada antikorlar veya antikor fragmanları, McCafferty vd., *Nature* 348:552-554 (1990) belgesinde tarif

edilen teknikler kullanılarak oluşturulan antikor faj kütüphanelerinden izole edilebilir. Clackson ve diğ erleri, *Nature* 352:624-628 (1991) ve Marks ve diğ erleri, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) belgelerinde, faj kütüphaneleri kullanılarak sırasıyla murin ve insan antikorlarının izolasyonu tarif edilmektedir. Sonraki yayınlar, zincir karma yoluyla yüksek afiniteli (nM aralığında) insan antikorlarının üretimini (Marks ve diğ erleri, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)) ve aynı zamanda çok büyük faj kütüphanelerinin oluşturulması için bir strateji olarak birleşimsel enfeksiyon ve in vivo rekombinasyonu (Waterhouse ve diğ erleri, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)) tarif eder. Dolayısıyla bu teknikler, monoklonal antikorların izolasyonu için geleneksel monoklonal antikor hibridom tekniklerine uygulanabilir alternatiflerdir.

DNA ayrıca örneğın homolog murin sekansları yerine insan ağır ve hafif zincir sabit domenlerine yönelik kodlayıcı sekansın ornatılmasıyla (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison ve diğ erleri, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)) ya da bir immünoglobülin harici polipeptide yönelik kodlayıcı sekansın tamamının veya bir kısmının immünoglobülin kodlayıcı sekansla kovalent olarak birleştirilmesi yoluyla modifiye edilebilir. Tipik olarak, bu tür immünoglobülin harici polipeptitler, bir antikorun sabit domenleri yerine ornatılır veya bir antikorun bir antijen birleştirme bölgesinin değişken domenleri yerine ornatılır ve böylece, bir antijene spesifikliği olan bir antijen birleştirme bölgesine ve farklı bir antijene spesifikliği olan başka bir antijen birleştirme bölgesine sahip bir kimerik iki değerlikli antikorun üretilmesi sağlanır. Burada tarif edilen metotlardan herhangi birinin bazı yapılanmalarında antikor IgA, IgD, IgE, IgG veya IgM'dir. Bazı yapılanmalarda antikor bir IgG monoklonal antikorudur.

(ii) *İnsanlaştırılmış antikorlar*

Bazı yapılanmalarda antikor bir insanlaştırılmış antikordur. İnsan kökenli olmayan antikorların insanlaştırılmasına yönelik metotlar teknikte tarif edilmiştir. Bazı yapılanmalarda

insanlaştırılmış bir antikör, insan harici bir kaynaktan dahil edilen bir veya daha fazla amino asit kalıntısına sahiptir. Bu insan kökenli olmayan amino asit kalıntılarına ayrıca "ithal" kalıntılar adı verilmekte olup, bunlar tipik olarak bir

5 "ithal" değişken domenden alınmaktadır. İnsanlaştırma, temel olarak Winter ve arkadaşlarının metodu izlenerek (Jones vd., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann vd., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen vd., *Science* 239:1534-1536 (1988)), aşırı değişken bölge sekanslarının, bir insan antikörünün karşılık

10 gelen sekanslarıyla ikame edilmesi yoluyla gerçekleştirilebilir. Buna göre, bu tür "insanlaştırılmış" antikörler kimerik antikörler olup (U.S. Patent No. 4,816,567), burada bir bozulmamış (intakt) insan değişken domeninden daha azı, bir insan olmayan türün karşılık gelen sekansı ile ikame

15 edilmiştir. Uygulamada, insanlaştırılmış antikörler tipik olarak bazı aşırı değişken bölge kalıntılarının ve muhtemelen bazı FR kalıntılarının, kemirgen antikörlerinin analog/benzer bölgelerine ait kalıntılarla ikame edildiği insanlaştırılmış antikörlerdir.

20 İnsanlaştırılmış antikörlerin yapımında kullanılacak olan hem hafif hem de ağır insan değişken domenlerinin seçimi antijenikliğin azaltılması bakımından çok önemlidir. "En iyi uyum" adı verilen metoda göre, bir kemirgen antikörünün değişken domeninin sekansı, insan değişken domen sekanslarının

25 bilinen tüm kütüphanesine karşı taranır. Daha sonra, kemirgeninkine en yakın insan sekansı, insanlaştırılmış antikörün insan çerçeve bölgesi (FR) olarak kabul edilir (Sims ve diğerleri, *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia ve diğerleri, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). Başka bir metotta,

30 hafif ve ağır zincir değişken bölgelerin belirli bir alt grubuna ait tüm insan antikörlerinin konsensus sekansından türetilen belirli bir çerçeve bölgesi kullanılır. Aynı çerçeve bölgesi, birkaç farklı insanlaştırılmış antikör için kullanılabilir (Carter ve diğerleri, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 89:4285 (1992); Presta ve diğ erleri, *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

Ayrıca, antikorların antijene yönelik yüksek afiniteleri ve diğ er avantajlı biyolojik özellikleri korunarak
5 insanlaştırılması da önemlidir. Bu amaç doğrultusunda, metotların bazı yapılanmalarında, insanlaştırılmış antikorlar, ana ve insanlaştırılmış sekansların üç boyutlu modelleri kullanılarak ana sekansların ve çeşitli kavramsal insanlaştırılmış ürünlerin incelenmesini içeren bir prosesle
10 hazırlanır. Üç boyutlu immünoglobülin modelleri yaygın olarak bulunabilir ve teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinir. Seçilen aday immünoglobülin sekanslarının olası üç boyutlu konformasyonel yapılarını örneklendiren ve gösteren bilgisayar programları mevcuttur. Bu görüntülerin incelenmesi,
15 kalıntıların, aday immünoglobülin sekansının fonksiyonundaki olası rolünün incelenmesine, yani aday immünoglobülinin, antijenine bağlanma yeteneğini etkileyen kalıntıların incelenmesine olanak tanır. Bu sayede FR kalıntıları alıcı ve ithal sekanslardan seçilebilir ve birleştirilebilir, böylece
20 istenen antikor özelliği, örneğin hedef antijene veya antijenlere yönelik afinitenin artırılması sağlanabilir. Genellikle, aşırı değişken bölge kalıntıları, antijen bağlanmasını doğrudan ve en önemli ölçüde etkilemede rol oynar.
(iii) *İnsan Antikorları*

25 Bazı uygulamalara göre antikor bir insan antikorudur. İnsanlaştırmaya alternatif olarak insan antikorları oluşturulabilir. Örneğin günümüzde, endojen immünoglobülin üretimi mevcut değilken, bağışıklamanın ardından insan antikorlarının tam bir repertuvarını üretebilen transgenik
30 hayvanların ( rneğin fareler)  retilmesi mümkündür. Örneğin kimerik ve germ hattı mutant farelerde antikor ağır zincir birleşme bölgesinin (J_H) homozigot olarak silinmesi, endojen antikor üretiminin tamamen inhibe olmasına neden olur. İnsan germ hattı immünoglobülin gen diziliminin bu tür germ hattı
35 mutant farelere aktarılması antijen yüklemesinden sonra insan

antikorlarının üretilmesiyle sonuçlanır. Ayrıca, örneğin, Jakobovits ve diğerleri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits ve diğerleri, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann ve diğerleri, *Year in Immuno.* 7:33 (1993); ve US Patent No. 5,591,669; 5,589,369; ve 5,545,807 belgelerini inceleyiniz.

Alternatif olarak, *in vitro*, bağışıklanmamış donörlerin immünoglobülin değişken (V) domen gen repertuvarlarından insan antikorlarının ve antikor fragmanlarının üretilmesi için faj sunum teknolojisi (McCafferty vd., *Nature* 348:552-553 (1990)) kullanılabilir. Bu tekniğe göre, antikor V domen genleri, bir filamentöz bakteriyofajın, örneğin M13 veya fd'nin bir majör veya minör kaplama polipeptit geninin içine aynı çerçevede klonlanır ve faj parçacığının yüzeyinde fonksiyonel antikor fragmanları olarak sunulur. Filamentöz parçacık faj genomunun tek iplikli bir DNA kopyasını içerdiğinden, antikoru fonksiyonel özelliklerine dayalı olarak yapılan seçimler de bu özellikleri gösteren antikoru kodlayan genin seçimiyle sonuçlanır. Böylece söz konusu faj, B hücrelerinin bazı özelliklerini taklit eder. Faj sunumu çeşitli formatlarda gerçekleştirilebilmekte olup, bunlarla ilgili inceleme için bkz. örneğin Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Faj sunumu için V-gen segmentlerinin çeşitli kaynakları kullanılabilir. Clackson vd., *Nature* 352:624-628 (1991), bağışıklanmış farelerin dalaklarından türetilen V genlerinin küçük bir rastgele birleşimsel kütüphanesinden alınan kapsamlı bir anti-oksazolon antikorları dizilimini izole etmiştir. Bağışıklanmamış insan donörlerden alınan bir V genleri repertuarı oluşturulabilir ve temel olarak ve diğerleri, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith ve diğerleri, *EMBO J.* 12:725-734 (1993) tarafından tarif edilen teknikler izlenerek antijenlerin (öz antijenler dahil) kapsamlı bir dizilimine karşı antikorlar izole edilebilir. Bkz. ayrıca US Patent No 5,565,332 ve 5,573,905.

İnsan antikorları ayrıca laboratuvar ortamında *in vitro* aktifleştirilmiş B hücreleriyle de oluşturulabilir (bakınız US Patent 5,567,610 ve 5,229,275).

(iv) Antikor fragmanları

- 5 Bazı yapılanmalarda antikor bir antikor fragmanıdır. Antikor fragmanlarının üretimi için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Geleneksel olarak bu fragmanlar bozulmamış antikorların proteolitik kesimi üzerinden türetilmiştir (bkz, örneğin, Morimoto ve diğerleri., *Journal of Biochemical and Biophysical*
10 *Methods* 24:107-117 (1992) and Brennan ve diğerleri., *Science* 229:81 (1985)). Ancak bu fragmanlar günümüzde rekombinant konakçı hücreler tarafından doğrudan üretilmektedir. Örneğin antikor fragmanları yukarıda ele alınan antikor faj kütüphanelerinden izole edilebilir. Alternatif olarak, Fab'-SH
15 fragmanları *E. coli*'den doğrudan geri kazanılabilir ve kimyasal olarak kenetlenerek F(ab')₂ fragmanları oluşturulabilir (Carter vd., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Başka bir yaklaşıma göre, F(ab')₂ fragmanları, doğrudan, rekombinant konak hücre kültüründen izole edilebilir. Antikor
20 fragmanlarının üretimine yönelik diğer teknikler ilgili alanın uzmanlarınca bilinmektedir. Diğer yapılanmalarda tercih edilen antikor bir tek zincirli Fv fragmanıdır (scFv). Bkz. WO 93/16185; US Patent No. 5,571,894 ve US Patent No. 5,587,458. Antikor fragmanı ayrıca örneğin US Patent 5,641,870 belgesinde
25 tarif edildiği üzere bir "doğrusal antikor" olabilir. Bu tür doğrusal antikor fragmanları, monospesifik veya bispesifik olabilir.

- Bazı yapılanmalarda burada tarif edilen antikorların fragmanları sağlanmaktadır. Bazı yapılanmalarda antikor
30 fragmanı bir antijen bağlayıcı fragmandır. Bazı yapılanmalarda antijen bağlayıcı fragman bir Fab fragmanı, bir Fab' fragmanı, bir F(ab')₂ fragmanı, bir scFv, bir Fv ve bir diakordan oluşan gruptan seçilir.

(v) Bispesifik antikorlar

Bazı yapılanmalarda antikor bir bispesifik antikordur. Bispesifik antikorlar, en az iki farklı epitop için bağlanma spesifikliğine sahip antikorlardır. Örnek niteliğindeki bispesifik antikorlar iki farklı epitopa bağlanabilir.

5 Alternatif olarak, bir bispesifik antikor bağlayıcı kol, bir lökosit üzerinde bir tetikleyici moleküle, örneğin bir T hücre reseptör molekülüne (örneğin CD2 veya CD3) veya örneğin FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) ve FcγRIII (CD16) gibi IgG'ye (FcγR) yönelik Fc reseptörlerine bağlanan bir kolla birleştirilebilir
10 ve böylece hücre sel savunma mekanizmaları hücreye odaklanabilir. Bispesifik antikorlar, tam uzunluklu antikorlar veya antikor fragmanları (örneğin F(ab')₂ bispesifik antikorları) olarak hazırlanabilir.

Bispesifik antikorların yapımına yönelik metotlar ilgili
15 teknikte bilinmektedir. Tam uzunluklu bispesifik antikorların geleneksel üretimi, iki immünoglobülin ağır zincir-hafif zincir çiftinin birlikte ifadesine dayalı olup, burada bu iki zincirin farklı spesifiklikleri bulunur (Millstein vd., *Nature* 305:537-539 (1983)). İmmünoglobülin ağır ve hafif
20 zincirlerinin rastgele düzenlenmesinden dolayı, bu hibridomlar (kuadromlar) 10 farklı antikor molekülünün potansiyel bir karışımını üretir ve bunlardan yalnızca birisi doğru bispesifik yapıya sahiptir. Doğru molekülün saflaştırılması genellikle afinite kromatografisi adımlarıyla yapılmakta olup,
25 bu işlem oldukça zahmetlidir ve ürün verimleri düşüktür. Benzer prosedürler WO 93/08829 ve Traunecker vd., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) belgelerinde açıklanmaktadır.

Farklı bir yaklaşıma göre, istenen bağlanma spesifikliklerine sahip antikor değişken domenleri (antikor-antijen birleşme
30 bölgeleri), immünoglobülin sabit domen sekanslarına kaynaştırılır. Bazı yapılanmalarda füzyon; menteşe, CH2 ve CH3 bölgelerinin en azından bir kısmını içeren bir immünoglobülin ağır zincir sabit domeniyile olur. Bazı yapılanmalarda hafif zincirin bağlanması için gerekli olan bölgeyi içeren birinci
35 ağır zincir sabit bölgesi (CH1) füzyonlardan en az birinde

mevcuttur. İmmünoglobülin ağır zincir füzyonlarını ve arzu edildiği takdirde immünoglobülin hafif zincirini kodlayan DNA'lar ayrı ifade vektörlerine yerleştirilir ve uygun bir konakçı organizmanın içine birlikte transfekte edilir. Bu
5 durum, yapımda kullanılan eşit olmayan oranlardaki üç polipeptit zinciri optimum verimler sağladığında, yapılanmalardaki üç polipeptit fragmanının oranlarının değiştirilmesi için daha büyük esneklik sağlar. Ancak, en az iki polipeptit zincirinin eşit oranlarda ifadesi yüksek
10 verimlerle sağlandığında ya da oranların belirli bir önemi olmadığında, iki veya üç polipeptit zincirinin kodlayıcı sekanslarının tek bir ifade vektörüne yerleştirilmesi de mümkündür.

Bu yaklaşımın bazı yapılanmalarında bispesifik antikorlar, bir
15 kolda bir birinci bağlanma spesifikliğiyle bir hibrit immünoglobülin ağır zincirinden ve diğer kolda bir hibrit immünoglobülin ağır zincir-hafif zincir çiftinden (ikinci bir bağlanma spesifikliği sağlar) oluşur. Bu asimetric yapının, istenen bispesifik bileşiğin immünoglobülin zincir
20 kombinasyonlarından ayrılmasını kolaylaştırdığı bulunmuştur; çünkü bir immünoglobülin hafif zincirinin, bispesifik molekülün yalnızca bir yarısında bulunması kolay bir ayrılma sağlar. Bu yaklaşım WO 94/04690 belgesinde açıklanmaktadır. Bispesifik antikorların üretimiyle ilgili daha fazla ayrıntı
25 için bkz. örneğin, Suresh vd., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

US Patent No. 5,731,168 belgesinde tarif edilen başka bir yaklaşıma göre, antikor moleküllerinin bir çifti arasındaki arayüz, rekombinant hücre kültüründen geri kazanılan
30 heterodimerlerin yüzdesini en üst düzeye çıkaracak şekilde değiştirilebilir. Bazı yapılanmalarda bu arayüz, bir antikor sabit domenine ait C_H3 domeninin en azından bir kısmını içerir. Bu metotta, birinci antikor molekülünün arayüzünden bir veya daha fazla küçük amino asit yan zinciri daha büyük yan
35 zincirlerle (örneğin tirozin veya triptofan) ikame edilir.

Büyük yan zincirle (zincirlerle) özdeş veya benzer boyuttaki telafi edici "boşluklar", ikinci antikor molekülünün arayüzü üzerinde büyük amino asit yan zincirlerinin daha küçük olanlarla (örneğin alanin veya treonin) ikame edilmesi yoluyla üretilir. Böylece heterodimerin, homodimerler gibi diğer istenmeyen son ürünler üzerindeki veriminin artırılması için bir mekanizma sağlanır.

Bispesifik antikorlar, çapraz bağlı veya "heterokonjüгат" antikorları içerir. Örneğin heterokonjüгат içindeki antikorlardan birisi avidine, diğeri biyotine kenetlenenir. Bu tür antikorların, örneğin bağışıklık sistemi hücrelerini istenmeyen hücrelere hedeflemek (US Patent No 4,676,980) ve HIV enfeksiyonu tedavisinde kullanılmak üzere ileri sürülmüştür (WO 91/00360, WO 92/200373 ve EP 03089).

Heterokonjüгат antikorlar, uygun herhangi bir çapraz bağlama metoduna göre hazırlanabilir. Uygun çapraz bağlama ajanları teknikte iyi bilinmektedir ve US Patent No 4,676,980 belgesinde birkaç çapraz bağlama tekniğıyle birlikte açıklanmaktadır.

Antikor fragmanlarından bispesifik antikorların üretimine yönelik teknikler de literatürde tarif edilmiştir. Örneğin bispesifik antikorlar kimyasal bağlama yoluyla hazırlanabilir. Brennan ve diğerkleri, *Science*, 229: 81 (1985), bozulmamış antikorların F(ab')₂ fragmanlarını oluşturmak üzere proteolitik olarak kesildiğı bir prosedürü tarif etmektedir. Bu fragmanlar, yakındaki ditiyollerin stabilize edilmesi ve moleküller arası disülfid oluşumunun önlenmesi amacıyla, ortamda ditiyol kompleks oluşturuocu ajan sodyum arsenit mevcutken indirgenir. Üretilen Fab' fragmanları daha sonra tiyonitrobenzoat (TNB) türevlerine dönüştürölür. Fab'-TNB türevlerinden birisi daha sonra merkaptotetilamin ile indirgeme yoluyla yeniden Fab'-tiyole dönüştürölür ve eşmolar miktardaki diğerk Fab'-TNB türeviyle karıştırılarak bispesifik antikor oluşturulur. Üretilen bispesifik antikorlar, enzimlerin seçici immobilizasyonu için ajanlar olarak kullanılabilir.

Bispesifik antikor fragmanlarının doğrudan rekombinant hücre kültüründe üretimi ve buradan izole edilmesine yönelik çeşitli teknikler de tarif edilmiştir. Örneğin bispesifik antikorlar lösin fermuarlar kullanılarak üretilmiştir. Kostelny ve diğ. *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Fos ve Jun proteinlerinden türetilen lösin fermuar peptitleri, iki farklı antikorun Fab' kısımlarına gen füzyonu yoluyla bağlanmıştır. Antikor homodimerleri menteşe bölgesinde indirgenerek monomerler oluşturulmuş ve ardından yeniden oksitlenerek antikor heterodimerleri oluşturulmuştur. Bu metot ayrıca antikor homodimerlerinin üretimi için de kullanılabilir. Hollinger ve diğ., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) belgesinde anlatılan "diyakor" teknolojisi, bispesifik antikor fragmanlarının üretimi için alternatif bir mekanizma sağlamıştır. Fragmanlar, aynı zincir üzerinde iki domen arasında eşleştirme yapmak için çok kısa olan bir bağlantı molekülü üzerinden bir hafif zincir değişken domenine (V_L) bağlı olan bir ağır zincir değişken domenine (V_H) sahiptir. Dolayısıyla bir fragmanın V_H ve V_L domenleri, başka bir fragmanın tamamlayıcı V_L ve V_H domenleriyle eşleşmeye zorlanır ve böylece iki antijen bağlanma bölgesi oluşturulur. Tek zincirli Fv (sFv) dimerleri kullanılarak bispesifik antikor fragmanlarının yapımı için başka bir strateji daha bildirilmiştir. Bkz. Gruber ve diğ. *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

İkiden fazla değerliğe sahip antikorlar düşünülmüştür. Örneğin trispesifik antikorlar hazırlanabilir. Tutt ve diğ. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(v) Çok Değerlikli Antikorlar

Bazı yapılanmalarda antikorlar çok değerlikli (multivalan) antikorlardır. Çok değerlikli bir antikor, antikorların bağlandığı bir antijeni ifade eden bir hücre tarafından bir iki değerlikli antikordan daha hızlı bir şekilde özümser (ve/veya katabolize edilir). Burada sağlanan antikorlar üç veya daha fazla antijen bağlayıcı bölgeye sahip olan (örneğin

tetravalan/dört değerlikli) çok değerlikli antikorlar (IgM sınıfından farklıdır) olabilir ve antikorun polipeptit zincirlerini kodlayan nükleik asidin rekombinant ifadesiyle kolaylıkla üretilebilir. Çok değerlikli antikor bir dimerizasyon domeni ve üç veya daha fazla antijen bağlanma bölgesi içerebilir. Tercih edilen dimerizasyon domeni bir Fc bölgesi veya bir menteşe bölgesi içerir (veya bundan oluşur). Bu senaryoda antikor bir Fc bölgesi ve Fc bölgesi amino terminalinde üç veya daha fazla antijen bağlanma bölgesi içerir. Tercih edilen çok değerlikli antikor burada üç ila yaklaşık sekiz; ancak tercihen dört tane antijen bağlanma bölgesi içerir (veya bunlardan oluşur). Çok değerlikli antikor en az bir polipeptit zinciri (ve tercihen iki polipeptit zinciri) içermekte olup, burada polipeptit zinciri/zincirleri iki veya daha fazla değişken domen içerir. Örneğin polipeptit zinciri/zincirleri $VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc$ içerebilir, burada VD1 bir birinci değişken domendir, VD2 bir ikinci değişken domendir, Fc bir Fc bölgesinin bir polipeptit zinciridir, X1 ve X2 bir amino asidi veya polipeptidi temsil eder ve n ise 0 veya 1 değerini alır. Örneğin polipeptit zinciri/zincirleri aşağıdakileri içerebilir: VH-CH1-esnek bağlantı molekülü-VH-CH1-Fc bölge zinciri veya VH-CH1-VH-CH1-Fc bölge zinciri. Buradaki çok değerlikli antikor tercihen en az iki (ve tercihen dört) hafif zincir değişken polipeptidi içerir. Buradaki çok değerlikli antikor, örneğin yaklaşık iki ila yaklaşık sekiz adet hafif zincir değişken domen polipeptidi içerebilir. Burada düşünülen hafif zincir değişken domen polipeptitleri bir hafif zincir değişken domeni içerir ve isteğe bağlı olarak ayrıca bir CL domeni içerir. Bazı yapılanmalarda antikor bir multispesifik antikordur. Multispesifik antikorların örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bir ağır zincir değişken domeni (V_H) ve bir hafif zincir değişken domeni (V_L) içeren ve V_HV_L biriminin poliepitopik spesifikliğe sahip olduğu bir antikor, iki veya daha fazla V_L ve V_H domenine sahip olan ve her bir V_HV_L

biriminin farklı bir epitopa bağlandığı antikorlar, iki veya daha fazla tek değişkenli domene sahip olan ve her bir tek değişkenli domenin farklı bir epitopa bağlandığı antikorlar, tam uzunluklu antikorlar, Fab, Fv, dsFv, scFv gibi antikor fragmanları, diakorlar, bispesifik diakorlar, triakorlar, üç fonksiyonlu antikorlar ve kovalent olarak veya kovalent olmayan biçimde bağlanmış olan antikor fragmanları bulunur. Antikorun poliepitopik spesifikliğıne sahip olduğu bazı yapılanmalarda, poliepitopik spesifiklik örneğın aynı veya farklı hedefte/hedeflerde iki veya daha fazla farklı epitopa spesifik olarak bağlanma becerisini belirtir. Bazı yapılanmalarda antikorlar monospesifiktir, örneğın yalnızca tek bir epitopu bağlayan bir antikordur. Bir uygulamaya göre, multispesifik antikor, her bir epitopa 5 µM ila 0,001 pM, 3 µM ila 0,001 pM, 1 µM ila 0,001 pM, 0,5 µM ila 0,001 pM veya 0,1 µM ila 0,001 pM'lik bir afinite ile bağlanan bir IgG antikorudur.

(vi) Diğer Antikor Modifikasyonları

Burada sağlanan antikorun efektör fonksiyona göre modifiye edilmesi ve böylece örneğın antikorun antiijene bağımlı hücre aracılı sitotoksisitesinin (ADCC) ve/veya komplemana bağımlı sitotoksisitesinin (CDC) güçlendirilmesi istenebilir. Bu, antikorun bir Fc bölgesine bir veya daha fazla amino asit ornatımının sunulmasıyla elde edilebilir. Alternatif veya ek olarak, sistein kalıntısı veya kalıntıları, Fc bölgesine sunulabilir ve böylece bu bölgede zincirler arası disülfid bağı oluşumuna olanak tanır. Bu şekilde üretilen homodimerik antikor, gelişmiş internalizasyon yeteneğın ve/veya arttırılmış kompleman aracılı hücre öldürmeye ve antikora bağımlı hücrel sitotoksisiteye (ADCC) sahip olabilir. *Bakınız Caron ve diğerleri, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) ve Shopes, B. J., Immunol. 148:2918-2922 (1992).* Güçlendirilmiş anti-tümör aktiviteye sahip homodimerik antikorlar da Wolff ve diğerleri, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993) belgesinde tarif edildiğı üzere heterobifonksiyonel

çapraz bağlantı molekülleri kullanılarak hazırlanabilir. Alternatif olarak, iki Fc bölgesi olan ve böylece muhtemelen gelişmiş kompleman aracılı liziz ve ADCC özellikleri olabilen bir antikör tasarlanabilir. *Bkz. Stevenson vd., Anti-Cancer*

5 *Drug Design* 3:219-230 (1989).

Antikörün serum yarı ömrünün arttırılması için, antikorda US 2006/0067930 belgesinde tarif edilen şekilde değişiklikler yapılabilir.

(B) *Polipeptit Varyantları ve Modifikasyonları*

10 Antikörler dahil olmak üzere polipeptitlerin burada tarif edilen amino asit sekansı modifikasyonu/modifikasyonları, burada tarif edilen polipeptitlerin (örneğin antikörler) saflaştırılma metotlarında kullanılabilir.

(i) *Varyant Polipeptitler*

15 "Polipeptit varyantı" terimi, burada tanımlanan şekilde, polipeptidin bir tam uzunluklu natif sekansıya, sinyal peptidi eksik olan bir polipeptit sekansıya, bir polipeptidin bir hücre dışı domeniyle, sinyal peptitli veya sinyal peptitsiz olarak en az yaklaşık %80 amino asit sekansı
20 özdeşliğine sahip olan bir polipeptit anlamına gelir. Bu tür polipeptit varyantları arasında, örneğin bir veya daha fazla amino asit kalıntısının, tam uzunluklu natif amino asit sekansının N veya C ucunda eklenmiş veya silinmiş olduğu polipeptitler bulunur. Normalde, bir TAT polipeptit varyantı,
25 bir polipeptidin bir tam uzunluklu natif sekansıya, sinyal peptidi eksik olan bir polipeptit sekansıya, bir polipeptidin bir hücre dışı domeniyle, sinyal peptitli veya sinyal peptitsiz olarak en az yaklaşık %80 amino asit sekansı özdeşliğine,
30 yaklaşık %85, %90, %95, %96, %97, %98 veya %99'dan herhangi biri kadar amino asit sekansı özdeşliğine sahip olacaktır. İsteğe bağlı olarak, varyant polipeptitler, natif polipeptit sekansıya karşılaştırıldığında bir taneden fazla konzervatif amino asit ornatımına sahip olmayacak olup, alternatif olarak,
35 natif polipeptit sekansıya karşılaştırıldığında 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9 veya 10'dan herhangi birinden fazla konzervatif amino asit ornatımına sahip olmayacaktır.

Varyant polipeptit N ucundan veya C ucundan budanabilir ya da örneğin bir tam uzunluklu natif polipeptitle

5 karşılaştırıldığında dahili kalıntıları eksik olabilir. Belirli varyant polipeptitlerde, istenen bir biyolojik aktivite için esansiyel olmayan amino asit kalıntıları bulunmayabilir. Budamalara, silinmelere ve yerleştirmelere sahip bu varyant polipeptitler, birtakım konvansiyonel
10 tekniklerden herhangi biriyle hazırlanabilir. İstenen varyant polipeptitler kimyasal olarak sentezlenebilir. Başka bir uygun teknik, istenen bir varyant polipeptidi kodlayan bir nükleik asit fragmanının, polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ile izole edilip amplifiye edilmesini içerir. Nükleik asit fragmanının
15 istenen uçlarını tanımlayan oligonükleotitler PCR'de 5' ve 3' primerlerde kullanılır. Tercihen, varyant polipeptitler, burada açıklanan natif polipeptitle en az bir biyolojik ve/veya immünolojik aktivite paylaşır.

Amino asit sekans eklemeleri, uzunluğu bir kalıntı ila yüz
20 veya daha fazla kalıntı içeren polipeptitler arasında değişen amino ve/veya karboksil terminal füzyonları ve aynı zamanda bir veya daha fazla amino asit kalıntısının sekans içi yerleştirmelerini kapsar. Terminal yerleştirmelerin örnekleri, bir N terminal metiyonil kalıntısına sahip bir antikör veya
25 bir sitotoksik polipeptide kaynaşmış antikörü içerir. Antikör molekülünün diğer yerleştirme varyantları, antikörün N veya C ucunun, antikörün serumdaki yarı ömrünü artıran bir enzime veya polipeptide kaynaştırılmasını içerir.

Örneğin polipeptidin bağlanma afinitesinin ve/veya diğer
30 biyolojik özelliklerinin geliştirilmesi istenebilir. Polipeptidin amino asit sekansı varyantları, antikör nükleik asidinin içine uygun nükleotit değişikliklerinin sunulmasıyla veya peptit senteziyle hazırlanabilir. Bu gibi modifikasyonlar arasında, örneğin polipeptidin amino asit sekansları içinde
35 kalıntılardan silinme ve/veya kalıntılara yerleştirme ve/veya

ornatım yapılması bulunur. Silme, yerleştirme ve ornatma işlemlerinin herhangi bir kombinasyonu yapılarak nihai konstrakta ulaşılır, ancak burada nihai konstraktın istenen özelliklere sahip olması koşulu aranır. Amino asit değişiklikleri ayrıca bir polipeptidin (örneğin antikorun) translasyon sonrası proseslerini de değiştirebilmekte olup, örneğin glikozilasyon bölgelerinin sayısını veya pozisyonunu değiştirebilir.

İstenen aktiviteyi olumsuz biçimde etkilemeden hangi amino asit kalıntısının yerleştirilebileceği, ornatılabileceği veya silinebileceğinin belirlenmesi için kılavuzluk, polipeptidin sekansının, bilinen homolog polipeptit molekülleriyle karşılaştırılması ve yüksek homoloji olan bölgelerde amino asit sekansı değişikliklerinin sayısının en aza indirilmesiyle sağlanabilir.

Polipeptidin (örneğin antikorun) mutagenез için tercih edilen konumları olan belirli kalıntıların veya bölgelerinin tanımlanmasına yönelik kullanışlı bir metot, Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989) adlı belgede tarif edilen şekilde "alanin tarama mutagenезi" olarak adlandırılır. Burada bir kalıntı veya hedef kalıntıların bir grubu belirlenir (örneğin arg, asp, his, lys ve glu gibi yüklü kalıntılar) ve bunlar nötr veya negatif yüklü bir amino asitle (en çok tercih edildiği haliyle alanin veya polialanin) ikame edilerek amino asitlerin antijenle etkileşimi değiştirilir. Ornatımlara fonksiyonel duyarlılık gösteren bu amino asit konumları daha sonra ornatım bölgelerinde ya da ornatım bölgeleri için daha fazla veya başka varyantların sunulması için işlenir. Böylece, bir amino asit sekansı varyasyonunun sunulması için bölge belirlenirken, tek başına mutasyonun yapısının önceden belirlenmesine gerek olmaz. Örneğin bir mutasyonun belirli bir bölgedeki performansını değerlendirmek için, hedef kodon veya bölgede ala taraması veya rastgele mutagenез gerçekleştirilir ve ifade edilen antikor varyantları istenen aktivite bakımından taranır.

Başka bir varyant tipi de bir amino asit ornatım varyantıdır. Bu varyantların antikör molekülünde, farklı bir kalıntı ile ikame edilmiş en az bir amino asit kalıntısı bulunur. Ornatımsal mutagenез için en çok ilgi çeken bölgeler arasında aşırı değişken bölgeler bulunur; ancak FR alterasyonları da ele alınmıştır. Konzervatif ornatımlar aşağıdaki Tablo 2'de "tercih edilen ornatımlar" başlığı altında gösterilir. Bu tür ornatımların biyolojik aktivitede bir değişikliğe yol açması durumunda, Tablo 2'de "örnek niteliğindeki ornatımlar" olarak adlandırılan veya amino asit sınıflarına referansta bulunularak aşağıda daha ayrıntılı olarak tarif edilen daha fazla belirgin değişiklik sunulabilir ve ürünler taranır.

Tablo 2.

Orjinal Kalıntı	Örnek Niteliğindeki Ornatımlar	Tercih Edilen Ornatımlar
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norlösın	Leu
Leu (L)	Norlösın; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norlösın	Leu

Poliipeptidin biyolojik özelliklerinde önemli modifikasyonlar, (a) ornatım alanındaki polipeptit omurga yapısının örneğın bir yaprak veya sarmal konformasyonunda muhafza edilmesi, (b) hedef bölgedeki molekülün yükünün veya hidrofobikliğının muhafaza edilmesi veya (c) yan zincirin büyüklüğünün muhafaza edilmesi üzerindeki etkileri önemli ölçüde değışiklik gösteren ornatımların seçilmesiyle sağlanır. Amino asitler yan zincirlerinin özelliklerindeki benzerliklere göre gruplandırılabilir (A. L. Lehninger, *Biochemistry*, ikinci baskı, ss. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) polar olmayan: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) yüksüz polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) asidik: Asp (D), Glu (E)
- (4) bazik: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternatif olarak, doğal yoldan meydana gelen kalıntılar, bilinen yan zincir özelliklerine dayalı olarak gruplara ayrılabilir:

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

Konservatif olmayan ornatmalar, bu sınıflardan birinin bir elemanının, başka bir sınıfla değıştirilmesini sağlar.

Antikorum uygun konformasyonunun korunmasında rol oynamayan herhangi bir sistein kalıntısı da, molekülün oksidatif stabilitesini geliştirmek ve anormal çapraz bağlanmayı önlemek üzere genel olarak serinle ornatılabilir. Bunun tersine, polipeptidin stabilitesini arttırmak için polipeptide sistein bağı veya bağları eklenebilir (özellikle antikor bir Fv fragmanı gibi bir antikor fragmanı olduğunda).

Özellikle tercih edilen bir ornatımsal varyant tipi, bir ana antikorum (örneğin bir insanlaştırılmış antikor) bir veya daha fazla aşırı değişken bölge kalıntısının ornatımını içerir. Genellikle, daha fazla geliştirilmek üzere seçilen elde edilen varyant veya varyantlar, üretildikleri ana antikora göre gelişmiş biyolojik özelliklere sahip olur. Bu gibi ornatımsal varyantların üretilmesi için uygun yollardan birisi, faj sunumu yoluyla afinite olgunlaştırmayı içerir. Özetle, her bölgede tüm olası amino ornatımlarını üretmek için çok sayıda aşırı değişken bölge alanları (örneğin 6-7 alan) mutasyona uğratılır. Bu şekilde üretilen antikor varyantları, filamentöz faj parçacıklarından, her bir parçacığın içine paketlenen M13'ün gen III ürününe füzyonlar olarak tek değerlikli bir biçimde sunulur. Fajlarda sunulan varyantlar daha sonra, burada açıklanan şekilde biyolojik aktiviteleri (örneğin bağlanma afinitesi) bakımından taranır. Modifikasyon için aday aşırı değişken bölge alanlarının tanımlanması için, antijen bağlanmasına belirgin ölçüde katkıda bulunan aşırı değişken bölge kalıntılarının tanımlanması amacıyla alanin tarama mutagenezi gerçekleştirilebilir. Alternatif veya ek olarak, antikor ve hedefi arasındaki temas noktalarının tanımlanması için, antijen-antikor kompleksinin bir kristal yapısını incelemek yararlı olabilir. Bu gibi temas kalıntıları ve komşu kalıntılar, burada ayrıntıları verilen tekniklere göre ornatım için adaydırlar. Böylesi varyantlar üretildikten sonra, varyant grubu burada tarif edilen şekilde taramaya tabi tutulur ve bir veya daha fazla ilgili deneyde üstün özelliğe

sahip olan antikorlar daha fazla geliştirilmek üzere seçilebilir.

5 Polipeptidin başka bir amino asit varyant tipi, antikoru orijinal glikozilasyon desenini değiştirir. Polipeptit amino asit olmayan parçalar içerebilir. Örneğin polipeptit glikozile edilebilir. Bu tür bir glikozilasyon, polipeptidin konakçı hücre veya konakçı organizmada ifadesi sırasında doğal olarak meydana gelebilir veya insan müdahalesinden kaynaklanan planlanmış bir modifikasyon olabilir. Değiştirme ile 10 anlatılmak istenen, polipeptitte bulunan bir veya daha fazla karbohidrat parçasının silinmesi ve/veya polipeptitte bulunmayan bir veya daha fazla glikozilasyon bölgesinin eklenmesidir.

15 Polipeptidin glikozilasyonu tipik olarak N-bağlı veya O-bağlıdır. N-bağlı ifadesi, karbohidrat parçasının, bir asparagin kalıntısının yan zincirine bağlanması anlamına gelir. İçerisinde X'in prolin haricinde herhangi bir amino asit olduğu asparajin-X-serin ve asparajin-X-treonin tripeptit sekansları, karbohidrat parçasının asparajin yan zincirine 20 enzimatik bağlanması için tanıma sekanslarıdır. Dolayısıyla bu tripeptit sekanslarının herhangi birinin bir polipeptitte mevcut olması bir potansiyel glikosilasyon pozisyonu üretir. O-bağlı glikozilasyon ifadesi, N-asetilgalaktozamin, galaktoz veya ksiloz şekerlerinden birinin bir hidroksiamino asidine ve 25 en yaygın haliyle serin veya treonine bağlanmasını belirtir; ancak burada 5-hidroksiprolin veya 5-hidroksilizin de kullanılabilir.

30 Polipeptide glikozilasyon bölgelerinin eklenmesi, amino asit sekansının, yukarıda tarif edilen tripeptit sekanslarından bir veya daha fazlasını içerecek şekilde değiştirilmesiyle (N-bağlı glikozilasyon bölgeleri için) uygun şekilde gerçekleştirilebilir. Değiştirme (alterasyon) ayrıca, orijinal antikor sekansına bir veya daha fazla serin veya treonin kalıntısının eklenmesiyle ya da ornatılmasıyla yapılabilir (O- 35 bağlı glikozilasyon bölgeleri için).

Poliipeptit üzerinde bulunan karbohidrat parçalarının uzaklaştırılması kimyasal olarak veya enzimatik olarak veya glikozilasyon için hedef görevi gören amino asit kalıntılarını kodlayan kodonların mutasyonal olarak ornatımıyla sağlanabilir.

5 Poliipeptitlerin üzerindeki karbohidrat parçalarının enzimatik kesimi, çeşitli endo- ve ekzo-glikozidazların kullanımıyla sağlanabilir.

Diğer modifikasyonlar arasında glutaminil ve asparaginil kalıntılarının sırasıyla karşılık gelen glutamil ve aspartil
10 kalıntılarına deamidasyonu, prolin ve lizinin hidroksilasyonu, seril veya treonil kalıntılarının hidroksil gruplarının fosforilasyonu, lizin, arginin ve histidin yan zincirlerinin α -amino gruplarının metilasyonu, N-terminal aminin asetilasyonu ve C-terminal karboksil grubunun amidasyonu
15 bulunur.

(ii) Kimerik Poliipeptitler

Burada tarif edilen poliipeptit, başka bir heterolog poliipeptide veya amino asit sekansına kaynaşmış olan poliipeptidi içeren kimerik moleküller oluşturacak şekilde
20 modifiye edilebilir. Bazı yapılanmalarda, bir kimerik molekül, poliipeptidin, bir anti-etiket antikoru bir epitopun seçici olarak bağlanmasını sağlayan bir etiket poliipeptidiyle füzyonunu içerir. Epitop etiketi genellikle poliipeptidin amino veya karboksil ucuna yerleştirilir. Poliipeptidin bu tür epitop
25 etiketli biçimlerinin bulunması, etiket poliipeptidine karşı bir antikor kullanılarak saptanabilir. Ayrıca, epitop etiketinin sağlanması, poliipeptidin, bir anti-etiket antikoru veya epitop etiketine bağlanan başka bir türde afinite matrisi kullanılarak afinite saflaştırması ile kolaylıkla
30 saflaştırılmasını sağlar.

Alternatif bir yapılanmada, kimerik molekül, poliipeptidin, bir immünoglobülin veya bir immünoglobülinin belirli bir bölgesiyle bir füzyonunu içerebilir. Kimerik molekülün iki değerlikli bir formuna "immünoadezin" adı verilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "immünoadezin" terimi, heterolog bir polipeptidin bağlanma spesifikliğini, immüoglobülin sabit domenlerinin efektör fonksiyonlarıyla birleştiren antikor benzeri molekülleri işaret eder. Yapısal olarak, 5 immünoadezinler, bir antikorun antijen tanıma ve bağlanma bölgesinden farklı olan (*başka bir ifadeyle*, "heterolog" olan) istenen bağlanma spesifikliğine sahip bir amino asit sekansı ile bir immüoglobülin sabit domen sekansının bir füzyonunu içerir. Bir immünoadezin molekülünün adezin kısmı tipik olarak, 10 bir reseptör veya bir ligandın en azından bağlama bölgesini içeren bir bitişik amino asit sekansıdır. Immünoadezin içindeki immüoglobülin sabit domen sekansı herhangi bir immüoglobülinde, örneğin IgG-1, IgG-2, IgG-3 veya IgG-4 alt tipleri, IgA (örneğin IgA-1 ve IgA-2), IgE, IgD veya IgM'den 15 elde edilebilir.

Ig füzyonları tercihen bir polipeptidin çözünür (transmembran domeni silinmiş veya etkisizleştirilmiş) bir biçiminin, bir Ig molekülü içindeki en az bir değişken bölge yerine 20 ornatılmasını içerir. Özellikle tercih edilen bir uygulamada, immüoglobülin füzyonu, bir IgG1 molekülünün menteşe, CH₂ ve CH₃ veya menteşe, CH₁, CH₂ ve CH₃ bölgelerini içerir.

(iii) *Polipeptit Konjugatları*

Polipeptit formülasyonlarında kullanılmaya yönelik polipeptit bir sitotoksik ajan, örneğin bir kemoterapötik ajan, bir 25 büyüme inhibe edici ajan, bir toksin (örneğin bakteri, mantar, bitki veya hayvan kökenli bir enzimatik olarak aktif toksin veya bunların fragmanları) ya da bir radyoaktif izotop (örneğin bir radyokonjüгат) ile konjüge edilebilir.

Bu tür konjüгатların üretiminde kullanışlı olan kemoterapötik 30 ajanlar kullanılabilir. Ayrıca, enzimatik olarak aktif toksinler ve bunların kullanılabilecek olan fragmanları arasında difteri A zinciri, difteri toksininin bağlayıcı olmayan aktif fragmanları, ekzotoksin A zinciri (*Pseudomonas aeruginosa*'dan), risin A zinciri, abrin A zinciri, modeccin A 35 zinciri, alfa-sarsin, *Aleurites fordii* proteinleri, *Phytolaca*

americana proteinleri (PAPI, PAPII ve PAP-S), momordica charantia (balsam armudu) inhibitörü, kursin, krotin, sapaonaria officinalis (sabun otu) inhibitörü, gelonin, mitogellin, restriktosin, fenomisin, enomisin ve trikotesenler bulunur. Radyo-konjüge polipeptitlerin üretimi için çeşitli radyonüklitler mevcuttur. Bunların örnekleri arasında ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y ve ¹⁸⁶Re bulunur. Polipeptit ve sitotoksik ajan konjüгатları, çeşitli bifonksiyonel protein kenetleyici ajanlar kullanılarak yapılmakta olup, bunların arasında

örneğin N-süksinimidil-3-(2-piridiltiyol) propiyonat (SPDP), iminotiyoloan (IT), bifonksiyonel imidoester türevleri (örneğin dimetil adipimidat HCl), aktif esterler (örneğin disüksinimidil suberat), aldehitler (örneğin glutaraldehit), bis-azido bileşikler (örneğin bis (p-azidobenzoil) heksandiamin), bis-diazonyum türevleri (örneğin bis-(p-diazonyumbenzoil)-etilendiamin), diizosiyanatlar (örneğin tolüen 2,6-diizosiyanat) ve bis-aktif flor bileşikleri (örneğin 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen) bulunur. Örneğin bir risin immünotoksini, Vitetta vd., Science, 238:1098 (1987)

adlı belgede tarif edilen şekilde hazırlanabilir. Karbon-14 işaretli 1-isotiyosiyanatobenzil-3-metildietilen triaminpentaasetik asit (MX-DTPA) bileşiği, radyonükleotidin antikora konjügasyonu için örnek niteliğindeki bir şelatlayıcı ajandır.

Bir polipeptit ve bir veya daha fazla küçük moleküllü toksinin, örneğin bir kalikeamisin, maytansinoidler, bir trikoten ve CC1065'in ve bu toksinlerin toksin aktivitesi olan türevlerinin konjüгатları da burada ele alınmaktadır. Maytansinoidler, tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek etki gösteren mitototik inhibitörlerdir. Maytansin ilk olarak doğu Afrika fundası *Maytenus serrata*'dan izole edilmiştir Ardından, belirli mikropların da maytansinoidleri, örneğin maytansinol ve C-3 maytansinol esterleri ürettiği bulunmuştur. Sentetik maytansiyol ve bunların türevleri ve analogları da ayrıca

düşünülmüştür. Teknikte polipeptit-maytansinoid

konjüгатlarının yapımına yönelik bilinen çok sayıda bağlayıcı grup bulunmakta olup, bunlar örneğin US Pat. No. 5,208,020 belgesinde tarif edilmektedir. Bağlayıcı gruplar arasında, yukarıda belirtilen patentlerde açıklandığı üzere disüfit grupları, tiyoeter grupları, aside dayanıksız gruplar, ışığa dayanıksız gruplar, peptidaza dayanıksız gruplar veya esteraza dayanıksız gruplar bulunmakta olup, burada disüfit ve tiyoeter grupları tercih edilir.

Bağlayıcı, bağıın türüne bağılı olarak maytansinoid molekülüne çeşitli pozisyonlarda bağlanabilir. Örneğin, bir ester bağı, konvansiyonel kenetlenme teknikleri kullanılarak bir hidroksil grubuyla tepkime yoluyla oluşturulabilir. Reaksiyon bir hidroksil grubuna sahip olan C-3 pozisyonunda, hidroksimetil ile modifiye edilmiş olan C-14 pozisyonunda, bir hidroksil grubu ile modifiye edilmiş olan C-15 pozisyonunda ve bir hidroksil grubu ile modifiye edilmiş olan C-20 pozisyonunda gerçekleşebilir. Tercih edilen bir uygulamada, bağlantı maytansiyol ya da bir maytansiyol analogunun C-3 pozisyonunda oluşturulur.

Başka bir ilgili konjüгат, bir veya daha fazla kalikeamisin molekülüne konjüge edilen bir polipeptit içerir. Kalikeamisin antibiyotik ailesi, pikomolar altı konsantrasyonlarda çift sarmal DNA kırılmaları üretebilme kapasitesine sahiptir. Kalikeamisin ailesinin konjüгатlarının hazırlanışı için bkz.

Örneğin U.S. Pat. No. 5,712,374. Kullanılabilecek olan yapısal kalikeamisin analogları arasında, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-asetil- γ_1^I , PSAG ve θ_1^I bulunur. Antikoron konjüge edilebileceğı diğer anti-tümör ilacı QFA olup, bu bir antifolattır. Hem kalikeamisin hem de QFA hücre içi etki bölgesine sahiptir ve plazma membranı kolaylıkla geçmez. Bu nedenle, bu ajanların polipeptit (örneğin antikor) aracılı internalizasyon vasıtasıyla hücresel alımı, bunların sitotoksik etkilerini büyük oranda arttırır.

Burada tarif edilen polipeptitlere konjüge edilen diğer antitümör ajanları arasında, toplu olarak LL-E33288 kompleksi

olarak bilinen ajanların ailesi olan BCNU, streptozosin, vinkristin ve 5-florourasil ve aynı zamanda esperamisinler bulunur.

5 Bazı yapılanmalarda, polipeptit, bir polipeptit ve nükleolitik aktiviteli bir bileşik arasında bir konjüгат olabilir (örneğin bir ribonükleaz veya bir DNA endonükleaz, örneğin bir deoksiribonükleaz; DNaz).

10 Daha başka bir yapılanmada, polipeptid (örneğin, antikor), bir "reseptöre" (örneğin streptavidin), tümör ön hedeflemede kullanım için konjüğe edilebilmekte olup, burada, antikor-reseptör konjüगतı bireye uygulanır ve ardından bir temizleme ajanı kullanılarak bağlanmayan konjüгат dolaşımdan uzaklaştırılır ve daha sonra bir sitotoksik ajana (örneğin bir radyonükleotid) konjüğe olan bir "ligand" (örneğin avidin) 15 uygulanır.

Bazı uygulamalarda, polipeptid, bir ön ilacı (örneğin bir peptidil kemoterapötik ajan) bir aktif anti-kanser ilacına dönüştüren bir ön ilaç aktifleştirici enzime konjüğe edilebilir. İmmünokonjüगतın enzim bileşeni, bir ön ilaç 20 üzerinde, bunu daha aktif, sitotoksik biçimine dönüştürecek şekilde etki gösterebilme yeteneğine sahip olan herhangi bir enzimi içerir.

Kullanışlı olan enzimlerin arasında, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, fosfat içeren ön ilaçların serbest ilaçlara 25 dönüştürülmesinde kullanışlı olan alkalın fosfataz; sülfat içeren ön ilaçların serbest ilaçlara dönüştürülmesinde kullanışlı olan arilsülfataz; toksik olmayan 5-florositozinin anti-kanser ilacı olan 5-florourasile dönüştürülmesinde kullanışlı olan sitozin deaminaz; peptit içeren ön ilaçların 30 serbest ilaçlara dönüştürülmesinde kullanışlı olan proteazlar, örneğin serratia proteaz, termolisın, subtilisin, karboksipeptidazlar ve katepsinler (örneğin katepsin B ve L); D-amino asit ornatıkları içeren ön ilaçların dönüştürülmesinde kullanışlı olan D-alanilkarboksipeptidazlar; glikozile edilmiş 35 ön ilaçların serbest ilaçlara dönüştürülmesinde kullanışlı

olan karbohidrat kesim enzimleri, örneğin β -galaktosidaz ve nöraminidaz; β -laktamlarla türetilen ilaçların serbest ilaçlara dönüştürülmesinde kullanışlı olan β -laktamaz; ve amin azotlarında fenoksiasetil veya fenilasetil gruplarıyla
5 türetilen ilaçların serbest ilaçlara dönüştürülmesinde kullanışlı olan sırasıyla penisilin V amidaz veya penisilin G amidaz gibi penisilin amidazlar bulunur. Alternatif olarak, öncül ilaçların serbest aktif ilaçlara dönüştürülmesinde ayrıca ilgili alanda "abzimler" olarak da bilinen enzimatik
10 aktiviteye sahip antikorlar kullanılabilir.

(iv) Diğer

Poliipeptidin başka bir tip kovalent modifikasyonu, polipeptidin, çeşitli proteinsiz polimerlerden birine, örneğin, polietilen glikol, polipropilen glikol, polioksialkilenler
15 veya polietilen glikol ve polipropilen glikol kopolimerlerinden birine bağlanmasını içerir. Polipeptit ayrıca, örneğin koaservasyon teknikleriyle veya interfasiyal polimerizasyonla hazırlanan mikrokapsüller, örneğin sırasıyla hidroksimetilselüloz veya jelatin mikrokapsüller ve poli-
20 (metilmetasilat) mikrokapsüller içinde, kolloidal ilaç dağıtım sistemleri (örneğin lipozomlar, albümin mikrokürecekler, mikroemülsiyonlar, nanopartiküller ve nanokapsüller) veya makroemülsiyonlar içinde kısıtlanabilir. Bu tür teknikler, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. baskı, Gennaro, A.R.,
25 Ed., (1990) belgesinde açıklanmaktadır.

IV. Formülasyonlarda ve Metotlarda Kullanılmaya Yönelik Polipeptitlerin Elde Edilmesi

Burada tarif edilen, analiz yöntemlerinde kullanılan polipeptitler, teknikte iyi bilinen metotlar, örneğin
30 rekombinasyon yöntemleri kullanılarak elde edilebilir. Aşağıdaki bölümler bu metotlarla ilgili olarak kılavuzluk sağlamaktadır.

(A) Polinükleotitler

Burada birbirlerinin yerine kullanılan, "polinükleotid" veya "nükleik asit" terimleri, nükleotidlerin herhangi bir uzunluktaki polimerleri anlamına gelir ve DNA ve RNA'yı kapsar. Polipeptitleri kodlayan polinükleotitler herhangi bir kaynaktan, örneğin bununla sınırlı olmamak kaydıyla, polipeptit mRNA'sına sahip olduğu ve bunu saptanabilir bir düzeyde ifade ettiği düşünülen dokudan hazırlanan bir cDNA kütüphanesinden elde edilebilir. Buna göre, polipeptit kodlayan polinükleotitler, insan dokusundan hazırlanan bir cDNA kütüphanesinden rahatlıkla elde edilebilir. Polipeptit kodlayan gen ayrıca bir genomik kütüphaneden veya bilinen sentetik prosedürlerle (örneğin, otomatik nükleik asit sentezi) elde edilebilir.

Örneğin, polinükleotit bir immünoglobülin molekül zincirinin tamamını, örneğin bir hafif zincir veya bir ağır zinciri kodlayabilir. Bir tam ağır zincir, bir ağır zincir değişken bölgesinin (V_H) yanı sıra bir ağır zincir sabit bölgesini de (C_H) içerir, bu bölge tipik olarak üç sabit domen: C_{H1} , C_{H2} ve C_{H3} ; ve bir "menteşe" bölgesi içerir. Bazı durumlarda bir sabit bölgenin bulunması istenir.

Polinükleotit tarafından kodlanabilen diğer polipeptitler arasında antijen bağlayıcı antikor fragmanları, örneğin tek domenli antikorlar ("dAb'ler"), Fv, scFv, Fab' ve $F(ab')_2$ ve "minikorlar" (minibody) bulunur. Minikorlar (tipik olarak), C_{H1} ve C_k veya C_L domeni çıkarılmış olan iki değerlikli antikor fragmanlarıdır. Minikorlar konvansiyonel antikorlardan küçük olduklarından dolayı, klinik/tanılayıcı kullanımda daha iyi doku penetrasyonu sağlamaları gerekir; ancak iki değerlikli olduklarından, dAb'ler gibi tek değerlikli antikor fragmanlarından daha yüksek bağlanma afinitesine sahip olmaları gerekir. Buna göre, aksi bağlamda açıkça belirtilmediği sürece, "antikor" terimi, burada kullanıldığı şekliyle, tam antikor moleküllerinin yanı sıra yukarıda belirtilen türdeki antijen bağlayıcı antikor fragmanlarını da kapsar. Tercihen, kodlanan polipeptit içinde bulunan her bir

çerçeve bölge, karşılık gelen insan akseptör çerçevesine göre en az bir amino asit ornatımı içerir. Bu nedenle, örneğin, çerçeve bölgeler, akseptör çerçeve bölgelere kıyasla toplam olarak üç, dört, beş, altı, yedi, sekiz, dokuz, on, on bir, on iki, on üç, on dört veya on beş amino asit ornatımı içerebilir.

VI. Örnek uygulamalar

1. Çok sayıda bileşimi analiz etmek için bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu tanımlanmasına yönelik bir yöntem olup, burada her bir bileşim, bir veya daha fazla kontaminantlı bir polipeptid içerir, yöntem şunları kapsar: a) iki veya daha fazla bileşimin polipeptitlerinin amino asit bileşimine dayalı olarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi ve b) pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının nötr veya nötre yakın pH'de a) adımının çizimlerinin ikinci türevi belirlenerek tespit edilmesi; burada optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulunun, bir veya daha fazla bileşimin polipeptidleri için ortak bir bükülme noktasına yakın bir pH'tır.

2. Uygulama 1'in yöntemi olup, burada bükülme noktasındaki net yük pozitifse, bir katyon değişim malzemesi, iyon değişim kromatografisi için kullanılır.

3 Uygulama 2'nin yöntemi olup, burada katyon değişimi kromatografisi malzemesi, bir sülfonatlı kromatografi malzemesi veya bir karboksilatlı kromatografi malzemesidir.

4. Uygulama 1'in yöntemi olup, burada bükülme noktasındaki net yük negatifse, bir anyon değişim malzemesi, kromatografi için kullanılır.

5. Uygulama 4'ün yöntemi olup, burada, anyon değişimi kromatografisi malzemesi, bir dördüncül amin kromatografi malzemesi veya bir üçüncül amin kromatografi malzemesidir.

6. Uygulama 1'in yöntemi olup, burada bir karma kipli kromatografi malzemesi, kromatografi için kullanılır.

7. Uygulama 6'nın yöntemi olup, burada karma kipli iyon değişim malzemesi, bir sıralı olarak doldurulmuş sülfonatlı

kromatografi malzemesi veya karboksilatlı kromatografi malzemesi ve bir dördüncül amin kromatografi malzemesi veya üçüncül amin kromatografi malzemesi karışımıdır.

8. Uygulamalar 1-7'nin herhangi birinin yöntemi olup, ayrıca
5 şunları kapsar: c) iki veya daha fazla bileşimin polipeptidleri için sıcaklıktaki (dIP/dT) bir değişimle pH eğrisine karşı net yükün pH değişim noktasındaki değişimin belirlenmesi, d) kromatografide kullanmak için bir tampon seçilmesi, burada sıcaklıktaki değişikliklerle tamponun asit
10 ayrışma sabitinde bir değişiklik ($dpKa/dT$), polipeptidlerin dIP/dT 'si ile aslen aynıdır.

9. Uygulama 8'in yöntemi olup, burada tampon, pH bükülme noktasında etkili bir tampon kapasitesi sağlar.

10. Uygulamalar 1-9'un herhangi birinin yöntemi olup, burada
15 bir veya daha fazla bileşimin polipeptidlerinin dIP/dT 'si, yaklaşık -0,02 pH birimdir.

11. Uygulamalar 1-10'in herhangi birinin yöntemi olup, burada sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 70 °C arasındadır.

12. Uygulamalar 1-11'in herhangi birinin yöntemi olup, burada
20 sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 50 °C arasındadır.

13. Uygulamalar 8-12'nin herhangi birinin yöntemi olup, burada $dpKa/dT = dIP/dT \pm \%50$ 'dir.

14. Uygulamalar 8-13'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada
25 d) adımında seçilen tampondaki polipeptidin net yükü, 30 °C üzerinde 0,5'den az değişir.

15. Uygulamalar 8-14'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada d) adımında seçilen tampon, yaklaşık 5 mM ila yaklaşık 250 mM arasındaki bir konsantrasyondaki bir kromatografide kullanılır.

16. Uygulamalar 1-15'in herhangi birinin yöntemi olup, burada
30 tampon bileşimleri ayrıca bir tuz içerir.

17. Uygulama 16'nın yöntemi olup, burada tuz, NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, veya Na_2SO_4 'tür.

18. Uygulama 16 veya 17'nin yöntemi olup, burada tuzun yoğunluğu, yaklaşık 1 mM ila yaklaşık 1M arasındadır.

19. Uygulamalar 1-18'in herhangi birinin yöntemi olup, burada polipeptid, bir antikor veya immünoadezin veya bunun fragmanıdır.
20. Uygulamalar 1-19'un herhangi birinin yöntemi olup, burada polipeptid, bir monoklonal antikor veya bunun fragmanıdır.
21. Uygulama 19 veya 20'in yöntemi olup, burada antikor bir insan antikorudur.
22. Uygulama 19 veya 20'in yöntemi olup, burada antikor bir hümanize antikorudur.
23. Uygulama 19 veya 20'in yöntemi olup, burada antikor bir kimerik antikorudur.
24. Uygulamalar 19-23'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada antikor, bir antikor fragmanıdır.
25. Uygulamalar 1-14'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir varyantıdır.
26. Uygulamalar 1-25'in herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir bozunma ürünüdür.
27. Uygulamalar 1-26'nın herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir yük varyantıdır.
28. Bir veya daha fazla kontaminantlı bir polipeptid içeren bir bileşimi analiz etmek için bir optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu tanımlanmasına yönelik yöntem olup, şunları kapsar: a) polipeptidin amino asit bileşimine dayalı olarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi ve b) pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının nötr veya nötre yakın pH'de a) adımının çizimlerinin ikinci türevi belirlenerek tespit edilmesi; burada optimal iyon değişim kromatografisi ayırma koşulu, bir veya polipeptid için bükülme noktasına yakın bir pH'dir.
29. Uygulama 28'in yöntemi olup, burada bükülme noktasındaki net yük pozitifse, bir katyon değişim malzemesi, iyon değişim kromatografisi için kullanılır.

30. Uygulama 29'un yöntemi olup, burada katyon değişimi kromatografisi malzemesi, bir sülfonatlı kromatografi malzemesi veya bir karboksilatlı kromatografi malzemesidir.
31. Uygulama 28'in yöntemi olup, burada bükülme noktasındaki net yük negatifse, bir anyon değişim malzemesi, kromatografi için kullanılır.
32. Uygulama 31'in yöntemi olup, burada, anyon değişimi kromatografisi malzemesi, bir dördüncül amin kromatografi malzemesi veya bir üçüncül amin kromatografi malzemesidir.
33. Uygulama 28'in yöntemi olup, burada bir karma kipli kromatografi malzemesi, kromatografi için kullanılır.
34. Uygulama 33'ün yöntemi olup, burada karma kipli iyon değişim malzemesi, bir sıralı olarak doldurulmuş sülfonatlı kromatografi malzemesi veya karboksilatlı kromatografi malzemesi ve bir dördüncül amin kromatografi malzemesi veya üçüncül amin kromatografi malzemesi karışımıdır.
35. Uygulamalar 28-34'ün herhangi birinin yöntemi olup, ayrıca şunları kapsar: c) polipeptid için sıcaklıktaki (dIP/dT) bir değişimle pH eğrisine karşı net yükün pH değişim noktasındaki değişimin belirlenmesi, d) kromatografide kullanmak için bir tampon seçilmesi, burada sıcaklıktaki değişiklikle tamponun asit ayrışma sabitinde bir değişiklik ($dpKa/dT$), polipeptidin dIP/dT 'si ile aslen aynıdır.
36. Uygulama 35'in yöntemi olup, burada tampon, pH bükülme noktasında etkili bir tampon kapasitesi sağlar.
37. Uygulamalar 28-36'un herhangi birinin yöntemi olup, burada bir veya daha fazla bileşimin polipeptidlerinin dIP/dT 'si, yaklaşık -0,02 pH birimdir.
38. Uygulamalar 28-37'un herhangi birinin yöntemi olup, burada sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 70 °C arasındadır.
39. Uygulamalar 28-38'un herhangi birinin yöntemi olup, burada sıcaklıktaki değişim, 20 °C ila 50 °C arasındadır.
40. Uygulamalar 28-39'un herhangi birinin yöntemi olup, burada $dIP/dT = dpKa/dT \pm \%50$ 'dir.

41. Uygulamalar 28-40'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada d) adımımda seçilen tampondaki polipeptidin net yükü, 30 °C üzerinde 0,5'den az değişir.
42. Uygulamalar 28-41'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada d) adımımda seçilen tampon, yaklaşık 5 mM ila yaklaşık 50 mM arasındaki bir konsantrasyondaki bir kromatografide kullanılır.
43. Uygulamalar 28-42'nin herhangi birinin yöntemi olup, burada tampon bileşimi ayrıca bir tuz içerir.
44. Uygulama 43'ün yöntemi olup, burada tuz, NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ veya Na_2SO_4 'tür.
45. Uygulama 43 veya 44'nin yöntemi olup, burada tuzun yoğunluğu, yaklaşık 10 mM ila yaklaşık 1M arasındadır.
46. Uygulamalar 28-45'in herhangi birinin yöntemi olup, burada polipeptid, bir antikor veya immünoadezin veya bunun fragmanıdır.
47. Uygulamalar 28-46'un herhangi birinin yöntemi olup, burada polipeptid, bir monoklonal antikor veya bunun fragmanıdır.
48. Uygulama 46 veya 47'in yöntemi olup, burada antikor bir insan antikorudur.
49. Uygulama 46 veya 47'in yöntemi olup, burada antikor bir hümanize antikorudur.
50. Uygulama 46 veya 47'in yöntemi olup, burada antikor bir kimerik antikorudur.
51. Uygulamalar 38-50'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada antikor, bir antikor fragmanıdır.
52. Uygulamalar 28-51'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir varyantıdır.
53. Uygulamalar 28-52'in herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir bozunma ürünüdür.
54. Uygulamalar 28-53'nin herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir yük varyantıdır.
55. Polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bir bileşimi analiz etmeye yönelik polipeptidleri

kontaminantlardan etkili bir şekilde ayıran bir yöntem olup, yöntem şunları kapsar: a) her biri bir hedef polipeptid ve uygulama 1'in yöntemine göre bir veya daha fazla kontaminant içeren çok sayıda bileşim için optimal pH ve sıcaklık iyon değişimi ayırma koşullarının belirlenmesi, b) polipeptid ve bileşimdeki bir veya daha fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponu uygulamalar 8-15'in herhangi birinin yöntemiyle tespit edilen bir tampondur; c) polipeptid ve iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir veya daha fazla kontaminant bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponu, tampon ve bir tuz içerir, burada bir gradyandaki tuz konsantrasyonu zamanla artar, burada polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant gradyanla ayrılır; ve d) polipeptidin ve bir veya daha fazla kontaminantın saptanması.

56. Polipeptidi kontaminantlardan etkili şekilde ayıran bir polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminant içeren bir bileşimi analiz etmek için bir yöntem olup, yöntem şunları kapsar: a) polipeptid ve bir veya daha fazla kontaminantın bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponu bir tampon içerir ve burada kromatografinin pH ve sıcaklığı çok sayıda hedef polipeptid için optimize edilmiştir i) iki veya daha fazla hedef polipeptidin polipeptidinin amino asit bileşimi baz alınarak seçilen bir sıcaklıktaki bir pH eğrisine karşı net yük eğrisinin çizilmesi, ve ii) i) adımının çizimlerinin ikinci türevini belirleyerek pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktasının tespit edilmesi; burada optimal iyon değişim kromatografisi koşulu, iki veya daha fazla hedef polipeptid için ortak bir bükülme noktasındaki bir pH'dir; b) polipeptid ve iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir veya daha fazla kontaminantın bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponu, tampon ve bir tuz içerir, burada polipeptid ve bir veya daha

fazla kontaminant gradyanla ayrılır; ve c) polipeptidin ve bir veya daha fazla kontaminantın tespit edilmesi.

57. Uygulama 56'nın yöntemi olup, burada seçilen sıcaklık, ortam sıcaklığıdır.

5 58. Uygulama 56 veya 57'nin yöntemi olup, burada tampon, şunlarla tespit edilir: a) iki veya daha fazla hedef polipeptid için sıcaklıktaki bir değişimle (dIP/dT) pH eğrisine karşı net yük eğrisinin bükülme noktası pH'sindeki değişimin tespit edilmesi, b) sıcaklıktaki değişiklik ile asit
10 ayrışma sabiti tamponundaki bir değişikliğin ($dpKa/dT$), ortak bükülme noktalı bir veya daha fazla polipeptidin dIP/dT 'si ile aslen aynı olduğu bir tamponun seçilmesi.

59. Uygulama 58'in yöntemi olup, burada tampon, pH bükülme noktasında etkili bir tampon kapasitesi sağlar.

15 60. Uygulamalar 55-59'un herhangi birinin yöntemi olup, burada tampon konsantrasyonu yaklaşık 5 mM ila yaklaşık 20 mM arasındadır.

61. Uygulamalar 55-60'ın herhangi birinin yöntemi olup, burada tamponun pH'si yaklaşık 20 °C ila yaklaşık 70 °C'lik
20 bir sıcaklık aralığında yaklaşık 6,5 ila yaklaşık 8,5 arasında değişir.

62. Uygulamalar 55-62'nin herhangi birinin yöntemi olup, burada tamponun pH'si yaklaşık 20 °C ila yaklaşık 50 °C'lik
25 bir sıcaklık aralığında yaklaşık 6,5 ila yaklaşık 8,5 arasında değişir.

63. Uygulamalar 55-62'nin herhangi birinin yöntemi olup, burada tamponun ve bükülme noktasındaki polipeptidin pH'si, yaklaşık 22 °C'de yaklaşık 7.8, yaklaşık 37 °C'de yaklaşık 7.5 veya yaklaşık 50 °C'de yaklaşık 7.2'dir.

30 64. Uygulamalar 55-63'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada tuz gradyanı, lineer bir gradyandır.

65. Uygulamalar 55-64'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada tuz gradyanı, bir basamaklı gradyandır.

66. Uygulamalar 55-65'in herhangi birinin yöntemi olup, burada tuz gradyanı, bir NaCl gradyanı, bir KCl gradyanı, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ veya bir Na_2SO_4 gradyanıdır.
- 5 67. Uygulamalar 55-66'nın herhangi birinin yöntemi olup, burada gradyandaki tuz konsantrasyonu, yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 1M'ye çıkar.
68. Uygulama 67'nin yöntemi olup, burada tuz konsantrasyonu yaklaşık 100 dakikada yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 100 mM'ye çıkar.
- 10 69. Uygulama 67'nin yöntemi olup, burada tuz konsantrasyonu yaklaşık 40 dakikada yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 80 mM'ye çıkar.
70. Uygulamalar 55-69'in herhangi birinin uygulamasının yöntemi olup, burada polipeptid, bir antikor veya immünoadezin veya bunun fragmanıdır.
- 15 71. Uygulamalar 55-70'un herhangi birinin yöntemi olup, burada polipeptid, bir monoklonal antikor veya bunun fragmanıdır.
72. Uygulama 70 veya 71'in yöntemi olup, burada antikor bir insan antikorudur.
- 20 73. Uygulama 70 veya 71'in yöntemi olup, burada antikor bir hümanize antikorudur.
74. Uygulama 70 veya 71'in yöntemi olup, burada antikor bir kimerik antikorudur.
75. Uygulamalar 70-74'ün herhangi birinin yöntemi olup, 25 burada antikor, bir antikor fragmanıdır.
76. Uygulamalar 55-75'in herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir varyantıdır.
77. Uygulamalar 55-76'nın herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir bozunma ürünüdür.
- 30 78. Uygulamalar 55-77'nin herhangi birinin yöntemi olup, burada kontaminant, polipeptidin bir yük varyantıdır.
79. Uygulamalar 55-78'in herhangi birinin yöntemi olup, özelliği; burada kromatografi malzemesi, bir katyon değişimi kromatografisi malzemesidir.

80. Uygulama 79'nin yöntemi olup, burada katyon değişimi kromatografisi malzemesi, bir sülfonatlı kromatografi malzemesi veya bir karboksilatlı kromatografi malzemesidir.

81. Çok sayıda polipeptid bileşiminin analiz edilmesi için bir yöntem olup, burada her bir polipeptid bileşimi bir polipeptid ve polipeptidin bir veya daha fazla yük varyantını içerir, burada yöntem polipeptidi yük varyantlarından etkili bir şekilde ayırır; her bir polipeptid bileşimi için yöntem şunları kapsar: a) polipeptid ve bir veya daha fazla yük varyantının bir iyon değişimi kromatografisi malzemesine yaklaşık 1 mL/dakikalık bir akış hızında bir yükleme tamponu kullanılarak bağlanması, burada yükleme tamponunun yaklaşık pH 7.6'da yaklaşık 40 °C'de 10 mM HEPES tamponu içermesi; b) polipeptid ve yük varyantları kontaminantlarının iyon değişimi kromatografisi malzemesinden bir elüsyon tamponunun bir gradyanı kullanılarak elüte edilmesi, burada elüsyon tamponu yaklaşık pH 7.6'da yaklaşık 10 mM HEPES tamponu ve bir NaCl içerir, gradyandaki burada NaCl konsantrasyonu yaklaşık 0 mM'den yaklaşık 80 mM'ye yaklaşık 40 dakika içerisinde çıkar, burada polipeptid ve yük varyantları gradyanla ayrılır; ve c) polipeptid ve bir veya daha fazla yük varyantının saptanması.

82. Uygulama 81'in yöntemi olup, burada çok sayıdaki polipeptid bileşimi farklı polipeptidleri içerir.

83. Uygulama 81 veya 82'nin yöntemi olup, burada çok sayıdaki polipeptid bileşimi farklı pIs'lere sahip polipeptidler içerir.

84. Uygulamalar 81-83'ün herhangi birinin yöntemi olup, burada polipeptid bileşimleri, antikör bileşimleridir.

Bu spesifikasyonda açıklanan özelliklerin tümü herhangi bir kombinasyonda birleştirilebilir. Bu spesifikasyonda açıklanan her özellik, aynı, eşdeğer veya benzeri bir amaca hizmet eden alternatif bir özellik ile değiştirilebilir. Dolayısıyla, aksi açıkça belirtilmediği sürece, açıklanan her özellik, sadece eşdeğer veya benzer özelliklere sahip bir jenerik seri örneğidir.

Buluşun diğer ayrıntıları aşağıdaki sınırlandırıcı olmayan örneklerle birlikte verilmektedir.

ÖRNEKLER

Aşağıda verilen örnekler yalnızca buluşu açıklama amacıyla verilmiştir ve bu nedenle buluşu herhangi bir şekilde sınırladığı yönünde yorumlanmamalıdır. Aşağıdaki örnekler ve ayrıntılı açıklama sınırlayıcı olarak değil, örnekleyici olarak verilmiştir.

Örnekler için Malzemeler ve Yöntemler

- 10 Aksi belirtilmediği sürece örnekler için aşağıdaki materyal ve yöntemler kullanılmıştır.

Malzemeler

- 15 Tüm mAb'ler, kararlı Çin Hamster Yumurtalık (CHO) hücre sekansları veya Escherichia coli hücreleri kullanılarak üretilmiştir.

- MabPac SCS-10 ve Propac WCX-10 kolonları, ThermoFisher'dan satın alınmıştır. AntiBodix kolonları, Sepax'tan satın alınmıştır. YMC kolonları, YMC'den satın alınmıştır. Trisma (Tris), Mallinckrodt Baker Inc. veya Sigma'dan (St. Eouis, MO) elde edilmiş ve HEPES, ACES, Trizma bazı ve CAPS, Sigma'dan elde edilmiştir. Sodyum klorür, sodyum hidroksit (10 N) ve hidroklorik asit (12 N), Mallinckrodt Baker Inc'ten temin edilmiştir. Fosforik asit (%85) EMD Millipore'dan temin edilmiştir.

- 25 *HPLC Kurulumu*

- 30 Katyon değişimi kromatografisi deneyleri, öncelikle bir Waters 2796 BioAlliance sıvı kromatografi cihazı, Agilent 1200SL HPLC sistemi, veya bir UltiMate 3000 Quaternary Rapid Separation LC (Thermo Scientific Dionex) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Alet, düşük basınçlı bir dörtlü degrade pompası veya bir ikili pompa, sıcaklık kontrol özelliğine sahip bir otomatik örnekleyici, hassas sıcaklık kontrolü için bir termal kolon bölmesi ve bir dual dalga boylu diyot dizisi UV detektörü içermiştir. Alet kontrolü, veri toplama ve veri

analizi Dionex Chromeleon yazılımı, versiyon 6,8 ile gerçekleştirilmiştir.

Örnek 1. Çoklu ürün analitik iyon değişim kromatografisinin optimizasyonu.

5 Yük varyantları gibi kontaminantların tespit edilmesi için yüksek çözünürlüklü ve sağlam bir çoklu ürünlü IEC geliştirmek için, koşullar mAb'lerin yük dengesinde olacağı şekilde tasarlanmıştır. Net yük durumu (z) vs. pH grafiği çizilerek, mAb ürünü için yük dengesi belirlenmiştir. Bir mAb'nin dengede
10 olduğu durum, denklemin 2'nci türevi, z'nin pH değerine eşit olarak 0'a ayarlanmasıyla çözülmüştür.

Belirli bir pH'ta bir mAb'nin net yükü, yan zincirlerinden dolayı bir proteinin pH-bağımlı özelliklerinin tanımlanmasında önemli bir rol oynayan mAb'deki altı amino asit içeriğine
15 dayanarak belirlenmiştir. Altı amino asit, asparagin, glutamik asit, histidin, tirozin, lizin ve arginindir. Altı amino asidin asit ayrışma sabitleri (pKa, $-\log_{10}K_a$ olarak tanımlanmış) net yük durumunu (z) hesaplamak için kullanılmıştır. Örneğin, MAb1, 10 histidin kalıntısına
20 sahiptir. Şekil 2, pH'ın bir fonksiyonu olarak histidinin protonasyonunu gösterir. Histidinin pKa değeri 6.02'nin altındaki pH değerlerinde histidin protonlanır ve pozitif yük taşır (Şekil 2A). 6,02'nin üzerindeki pH değerlerindeki histidin deprotona edilir ve bir yük taşımaz. Denklem 1'i
25 kullanarak, belirli bir pH'taki histidin için belirli bir şarj durumunun olasılığı belirlenmiştir. Şekil 2B, pH 6.5'te ve pH 7.5'teki mAb1'de protonsuzlaştırılmış histidinin olası dağılımını göstermektedir. pH 6.5'te mAb1'in 8 deprotonlanmış histidin kalıntısı medyanına sahipken, pH 7.5'te neredeyse tüm
30 histidin kalıntıları protonsuzlaştırılmıştır. Şekil 2C, her biri iki histidin kalıntısına sahip dört polipeptid molekülünün bir örneğini göstermektedir. pKa'da (pH 6.02), His kalıntılarının %50'si protonlanmış ve %50'si protonsuzlaştırılmıştır. Bu dört moleküldeki histidin
35 kalıntılarının yük durumu, pKa'da bir binom dağılımıdır:

birisi her iki histidini protonlanmış; ikisi bir histidini protonlanmış ve diğeri protonsuzlaştırılmış; ve birisi her iki histidini protonsuzlaştırılmış.

Belirli bir pH için en bol yük durumunun olasılığı, altı amino asidin her biri için belirlenmiş ve belirli bir pH'ta mAb1 yükünün ağırlıklandırılmış olasılığı, antikorda mevcut olan bu altı amino asidin her birinin kalıntı sayısına dayanarak belirlenmiştir (Şekil 3). Yük frekansının dağılımı, rastgele bir değişkendeki belirsizliğin bir ölçütü olan Shannon entrofisi ile de belirlenebilir (Denklem 3). mAb1'de mevcut olan bu altı amino asidin her birinin kalıntı sayılarına dayanarak (Tablo 3), mAb1 için verilen pH değerinde Shannon entrofisi Şekil 4'te çizilmiştir. Shannon entropisi ne kadar düşükse, yük dağılımı o kadar homojen olur.

Tablo 3. mAb1'de seçilen amino asit kalıntılarının sayısı

pH	lizin	histidin	aspartat	glutamat	tirozin	arginin
No.	90	28	52	64	66	32
kalıntı						

Bu verilerden, pH'nin bir fonksiyonu olarak mAb1'in net yükünün dağılımı çizilmiş (Şekil 5) ve bükülme noktası 37 °C'de pH 7.5 olarak belirlenmiştir (Şekil 6, Şekil 5'in üstten görünümüdür). Bunun, Şekil 5'te en yüksek ve en keskin tepeler olarak gösterilen en homojen yük durumuna sahip olan pH olduğuna dikkat ediniz. En homojen yük durumu da, IEC ayırmasındaki en keskin pike yol açacaktır.

Yukarıda tarif edilen yöntem kullanılarak, 7.6 ila 9.4 arasında değişen pI'lere sahip birkaç mAb için bükülme noktaları belirlenmiştir (Şekil 7). Şaşırtıcı bir şekilde, hemen hemen tüm mAb'ler için bükülme noktası 37 °C'de pH 7,5 olmuştur. IP'yi hedeflemek IEC'nin pH dayanıklılığını geliştirebilir. Şekil 7'de gösterilen şekilde, pH 7 ve pH 8 arasındaki tüm antikorlar için net yük çok az değişir.

mAb'ler için bükülme noktaları 22 °C, 37 °C ve 50 °C olarak belirlenmiştir. Şekil 8'de gösterilen şekilde, bükülme noktalarının sıcaklığa bağlı olmasına rağmen, test edilen tüm

antikorlar için bükülme noktaları verilen bir sıcaklıkta aynı olmuştur.

mAb2 için bükülme noktası, 22 °C ila 50 °C arasındaki sıcaklıklar için belirlenmiştir. Şekil 9'da görüldüğü gibi, bükülme noktası pH'si sıcaklıktaki artış ile azalırken, net yük sabit kalır. Bu yüzden, kromatografiyi bükülme noktası için optimize etmek ayrıca, sıcaklık dalgalanmasına karşı IEX yöntemi dayanıklılığı sağlar. dIP/dT terimi, sıcaklıktaki bir değişim ile birlikte bir molekülün IP'sindeki değişimi temsil eder. Bu sonuçlardan, sıcaklık etkisinin en aza indirilmesi ve test sağlamlığının arttırılması için dIP/dT'ye (başka bir deyişle, $dIP/dT \approx dpKa/dT$) yaklaşan sıcaklığın bir fonksiyonu olarak tamponun asit ayrışma sabitindeki değişimin seçildiği optimal bir tampon seçilebilir.

Bükülme noktası pH'si ve sıcaklık arasındaki ilişki çizilmiş ve doğrusal regresyonun eğimi, dIP/dT değerleri, farklı pI değerine sahip çok sayıdaki mAb için hesaplanmıştır (Şekil 10 ve Tablo 4). Bu altı mAb için dIP/dT değerlerinin esasen aynı olduğu bulunmuştur (-0,0177 ila -0,0183). Bu şekilde, yaklaşık -0,018'lik bir dpKa/dT değerine sahip bir tampon, Şekil 10'da sunulan mAb'lerin tümü için IEC analizi ve dolayısıyla çok ürünlü bir IEC için optimal olacaktır.

Tablo 4. Bükülme noktaları (pH)

Sıcaklık °C	MAB27	MAB1	MAB2	MAB4	MAB5	MAB6	MAB8
25	7,69	7,73	7,72	7,72	7,75	7,72	7,72
30	7,60	7,64	7,63	7,62	7,66	7,62	7,62
35	7,50	7,54	7,54	7,53	7,56	7,53	7,53
37	7,47	7,51	7,50	7,49	7,53	7,49	7,49
40	7,42	7,45	7,45	7,44	7,47	7,44	7,44
45	7,33	7,37	7,36	7,35	7,39	7,35	7,35
50	7,25	7,28	7,27	7,26	7,30	7,27	7,27
dIP/dT	- 0,0177	- 0,018	- 0,018	- 0,018	- 0,018	- 0,018	- 0,018

				3			
--	--	--	--	---	--	--	--

Çok sayıdaki tampon madde için sıcaklığın (dpKa/dT) bir fonksiyonu olarak pKa'daki değişime ilişkin yayınlanan değerler aşağıdaki gibidir:

- 5 Fosfat: -0,0028
 HEPES: -0,014
 ACES: -0,02
 Tris: -0,028
 Bisin: -0,018
 Trisin: -0,021
 10 TAPS: -0,02
 CHES: -0,018

Bkz. Benyon, RJ & Easterby, JS, Buffer Solutions The Basics, IRE Press, 1996.

- Şekil 11, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak fosfat tamponu, HEPES tamponu, ACES tamponu ve Tris tamponu içindeki mAb2'nin bükülme noktasındaki net yükün bir grafiğini göstermektedir. ACES tamponu veya HEPES tamponu içindeki mAb2'nin net yükünün grafikleri yaklaşık 30 °C boyunca 0,5'ten daha az değişen düz bir şekildedir. Öte yandan, Tris ve fosfat için grafikler o kadar düz değildir, bu, sıcaklıkta bir değişiklik ile net yükte daha fazla değişimi belirtmektedir. ACES veya HEPES'in çoklu ürünlü IEC analizi için optimal tamponlar olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Örnek 2. Bir çoklu ürün IEC protokolünün geliştirilmesi.

- 25 Çoklu ürünlü bir IEC protokolü, bükülme noktasının ve ACES ve HEPES için dpKa/dT değeri ve çok sayıdaki mAb için belirlenen dIP/dT değerlerinin bağıntısı açısından geliştirilmiştir. 19 mAb test edilmiştir. mAb örnekleri, A tamponu ile 1 mg/mL'ye seyreltilmiş ve 5±3 °C'de otomatik örnekleyicide saklanmıştır.
- 30 MabPac SCX-10, 4 × 250 mm kolonu, 37±1 °C'deki sıcaklık ayarı ile kolon kompartmanına yerleştirilmiştir. Her bir kromatografik çalıştırma için, 10 µL protein (20 µg) enjekte edilmiştir. Tampon A, pH 7.5 37 °C'de 5 mM ACES'tir. Tampon B, tampon A içindeki 180 mM NaCl'dir. Gradyan, tampon B'nin

tampon A'da 100 dakika içinde 1 mM/dk'da karıştırıldığı 0-100 mM NaCl'dir. Akış hızı, 0,8 mL/dk olmuştur. Protein, 280 nm'de absorbands yoluyla tespit edilmiştir. Şekil 12'de gösterilen şekilde, çok ürünlü IEC, geniş bir mAb ürünü yelpazesi için iyi bir çözünürlük sağlamıştır.

Örnek 3. Çoklu ürünlü IEC'nin pH dayanıklılığı

Çoklu ürünlü IEC'nin pH dayanıklılığı, gradyanın 1,5 mM NaCl/dk olması haricinde Örnek 2'de tarif edilen yöntem kullanılarak ve üç farklı pH değeri, pH 7.3, pH 7.5 ve pH 7.7 için incelenmiştir. mAb4, bu çalışma için sınırlayıcı olmayan örnek antikorlar olarak kullanılmıştır.

Şekil 13'te gösterilen şekilde, test edilen tüm pH değerlerinde, antikor ana tepe noktası ve bunun yük değişkenleri arasında iyi çözünürlük gözlenmiştir. Pik alanlarının kantifikasyonu, pH'a göreli olarak analizde herhangi anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Çoklu ürünlü IEC'nin pH dayanıklılığı

						çözünürlük ^a	
pH	% asidik	% Ana Pik	% Bazik 1	% Bazik 2	Toplam Bazik	Ana/BV1	BV1/BV2
7,7	8,4	52,1	21,1	18,4	39,5	2,3	2,2
7,5	8,4	53,3	21,0	18,3	39,3	2,3	2,3
7,3	8,6	52,4	21,3	17,7	39,0	3,0	2,7

^açözünürlük Denklem 4 ile tanımlanmıştır.

$$R = \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{1/2(w_1 + w_2)}$$

Denklem 4

çözünürlük R ise

t_{r1} ve t_{r2} , iki yakın bitişik pikin tutulma süreleridir

w_1 ve w_2 , iki yakın bitişik pikin pik genişlikleridir

Örnek 4. Sıcaklık dayanıklılığı

Çoklu ürünlü IEC'nin sıcaklık dayanıklılığı, gradyanın 1,5 mM NaCl/dk olması haricinde ve üç farklı 32 °C, 37 °C, ve 42 °C sıcaklıklarında Örnek 2'de tarif edilen yöntem kullanılarak incelenmiştir. mAb2, mAb6 ve mAb 10 bu çalışma için sınırlayıcı olmayan örnek antikorlar olarak kullanılmıştır.

Şekil 14'te gösterilen şekilde, antikorlar ve bunların yük varyantları arasındaki iyi çözünürlük, antikorların her biri için test edilen tüm sıcaklıklarda görülmüştür. Her antikor için her sıcaklıkta neredeyse aynı kromatogram görülmüştür.

- 5 Her bir deneyde, mAb'lar 19, 7 ve 8, 10 mM HEPES tamponunda sıcaklık dayanıklılığı açısından test edilmiştir. Şekil 15'te görülen şekilde, antikorlar ve bunların yük varyantları arasındaki iyi çözünürlük, antikorların her biri için test edilen tüm sıcaklıklarda görülmüştür. Pik alanlarının kantifikasyonu, sıcaklığa nispeten analizde herhangi anlamlı bir değişiklik göstermemiştir.

Tablo 6. Çok ürünlü IEC'nin sıcaklık dayanımı

mAb	Sıcaklık	% Asidik	% Analitik Pik	% Bazik	Çözünürlük Asidik	Çözünürlük Bazik
mAb19	42 °C	16,46	75,62	7,92	1,51	3,20
	37 °C	16,69	74,65	8,56	1,53	3,26
	32 °C	15,97	76,17	7,86	1,62	3,30
mAb7	42 °C	18,95	67,30	13,75	1,31	na
	37 °C	19,80	67,28	12,92	1,36	na
	32 °C	18,53	68,80	12,66	1,45	na
mAb8	42 °C	22,20	68,78	9,03	2,21	1,72
	37 °C	22,44	67,67	9,89	2,25	1,45
	32 °C	22,60	67,25	10,15	2,33	1,35

Örnek 5. Çok ürünlü IEC'nin ürüne özgü IEC ile karşılaştırılması.

- 15 Çok ürünlü IEC, mAb8, mAb25 ve mAb26 için geliştirilmiş ürüne özgü IEC yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. mAb8, mAb28 ve mAb26'nın IEC'si, gradyanın 1,5mM NaCl/dk [Genentech-lütfen teyit ediniz] olması dışında Örnek 2'de tarif edilen çoklu ürünlü IEC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ürüne özel yöntemler için tampon ve sıcaklık farklı olmuştur. mAb8 için, bu, 30 °C'de 20 mM MES pH 6.5'tir; mAb25 için, bu, 42 °C'de 20 mM HEPES pH 7.6'dır; ve mAb26 için bu, 40 °C'de 20

mM ACES pH 7.1'dir. Şekil 16'da görülebileceği gibi, çoklu ürünlü IEC (sol paneller), ürüne özgü IEC yöntemleriyle (sağ paneller) benzer şekilde veya bunlardan daha iyi çözünürlükte gerçekleştirilmiştir.

5 Örnek 6. Çoklu ürünlü IEC'nin farklı kolonlarla kullanımı

Çoklu ürünlü IEC, kromatografi kolonu seçimi için kullanılmıştır. mAb8 testi, gradyanın 1,5 mM NaCl/dk olması haricinde Örnek 2'de tarif edilen yöntemler kullanılarak dört farklı katyon değişimi kolonunda gerçekleştirilmiştir. Test edilen kolonlar, ProPac WCX-10, 4 × 250, 10 µm; YMC, 4,6 × 100, 5 µm; Antibodix NP5, 4,6 × 250, 5 µm; ve MabPac SCX-10, 4 × 250, 10 µm (Örnek 2'de kullanılan) olmuştur. Şekil 17'de görülebileceği gibi, dört sütunun tamamı yeterli çözünürlükle sonuçlanmıştır. Pik zirvelerinin kantifikasyonu ve asit pik ile ana pik arasındaki temel tepe noktaları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. mAb8 için kolon taraması

Kolon	% Asidik	% Ana Pik	% Bazik 1	Çözünürlük Asidik	Çözünürlük Bazik
ProPac WCX-10	19,80	66,98	13,22	2,06	1,42
YMC	25,21	64,86	9,93	1,78	0,93
AntiBodix NP5	23,23	66,10	10,67	0,99	0,22
MabPac SCX-10	14,80	73,38	11,83	2,81	2,54

Örnek 7. Ölçeklenebilirlik

Farklı boyutlardaki katyon değişim kromatografisi kolonlarının kullanımı, çoklu ürünlü IEC'de kullanım için değerlendirilmiştir. Kolon uzunluğunun kısalması çalıştırma sürelerinin daha kısa olmasına neden olur. mAb8, üç farklı boyuttaki ProPac WCX-10 kolonunda Örnek 2'de tarif edilen çoklu ürünlü IEC yöntemi kullanılarak kromatografilenmiştir. Kolonlar farklı boyutlarda olduğu için, kromatografi çalışmaları farklı zaman periyotları için olmuştur. Kolon

boyutları ve ilgili çalışma süreleri aşağıdaki şekilde olmuştur: 4 × 250 mm 63 dakika süreyle, 4 × 100 mm 19 dakika süreyle, ve 4 × 50 mm 15 dakika süreyle. Sonuçlar, Şekil 18'de sunulmuştur. Her ne kadar bazı çözünürlükler daha kısa 5 sütunlarla kaybedilmiş olsa da, yüksek verimli bir uygulama için daha kısa sütun ile tutarlı niceliksel sonuçlarla yeterli ayırma elde edilir. Pik alanlarının kantifikasyonu tutarlı olmuş ve Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Çok ürünlü IEC'nin ölçeklenebilirliği

Kolon Boyutu	Çalışma Süresi	% Asidik	% Ana Pik	% Bazık 1	Çözünürlük Asidik	Çözünürlük Bazık
4 × 250	63 dk	22,44	67,67	9,89	2,25	1,45
4 × 100	19 dk	24,72	65,85	9,42	1,66	0,85
4 × 50	15 dk	23,22	67,03	9,75	1,51	0,65

10 Örnek 8. Testin Sağlamlığı

Bir test prosedürünün doğrulanması, yöntemin uygun şekilde sağlam olmasını gerektirir. Sağlamlığı değerlendirmek için bir deneyler tasarımı (DoE) yaklaşımı, etkileşimli etkiler de dahil olmak üzere, deney koşullarındaki küçük varyasyonların etkilerini kapsamlı bir şekilde değerlendirir. Her bir deneyin 15 spesifik çok değişkenli koşulları, etkileşim potansiyeli olan faktörleri birleştirmek için seçilmiştir. Sürekli olarak değiştirilemeyen ancak etkilerinin olduğu bilinen faktörler, yani sütunlar (örneğin lottan lota değişkenlik, yaş) ve 20 enstrümanlar (örneğin, iki model tipi) tek faktörlü bir yöntemle incelenmiştir. Etkiler, hedef koşullardaki yanıt değişkenliği ile faktöriyel tasarıma göre değişen koşullardaki yanıtların değişkenliğine karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Deneysel Tasarım

25 Aşağıdakiler, Yöntem Kontrolü yaklaşımı için rekombinant monoklonal antikor proteinlerinin yük heterojenliğini izlemek için kullanılan İyon Değişim koşullarını tarif etmektedir. Bu çalışmanın amacı, altı faktörlü Plackett-Burman Deney Tasarımı

5 kullanılarak test sağlamlığının ölçülmesi olmuştur (Tablolar 9 ve 10). İncelenen faktörler, çözücü pH'si, son tuz konsantrasyonu, kolon sıcaklığı, akış hızı, enjeksiyon hacmi ve tampon molalitesi olmuştur. Bu çalışma için yanıt değişkenleri, nispi yüzde ana tepe noktası, Asidik ve Bazik varyantlarını içermiştir. Toplam 21 çalışma gerçekleştirilmiştir, faktör koşullarında 12 ve hedefte 9 çalıştırma yapılmıştır.

Tablo 13

Değişken Parametreler							
Enjeksiyo n#	Örüntü	pH	Tampon Molarite si (mM)	Enjeksiy on Hacmi (µL)	Sıcakl ık (C°)	Akış Hızı (mL/dk)	Gradyan sonlandır ma NaCl (mM)
1	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
2	(+--- +-)	7,6 5	4,7	22	37	1,53	85
3	(+- +++-)	7,6 5	4,7	28	43	1,53	85
4	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
5	(--+- +)	7,3 5	4,7	28	37	1,47	95
6	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
7	(++++ -)	7,6 5	5,3	28	37	1,47	85
8	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
9	(-++++ -)	7,3 5	5,3	28	43	1,47	85
10	(-+- +-)	7,3 5	5,3	22	37	1,47	85

11	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
12	(-+- +++)	7,3 5	5,3	22	43	1,53	95
13	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
14	(++--- +)	7,6 5	5,3	22	37	1,47	95
15	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
16	(+---+- +)	7,6 5	4,7	22	43	1,47	95
17	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
18	(--+- ++)	7,3 5	4,7	28	37	1,53	95
19	(----+- -)	7,3 5	4,7	22	43	1,47	85
20	Hedef	7,5 0	5,0	25	40	1,50	90
21	(+++++ +)	7,6 5	5,3	28	43	1,53	95

Tablo 10

Sonuçlar			
Örüntü	Asidik (%)	%Ana	%Bazik
Hedef	16,72	58,38	24,89
(+----+-)	16,37	57,79	25,84
(+-+++-)	16,44	57,84	25,72
Hedef	16,54	58,34	25,12
(--+---+)	16,22	59,20	24,58
Hedef	16,58	58,44	24,98
(+++---)	16 60	58,58	24,81
Hedef	16,57	58,86	24,57

(-+++-)	16,29	59,37	24,33
(-+---)	16,12	59,36	24,52
Hedef	16,34	58,45	25,20
(-++++)	15,97	58,82	25,21
Hedef	16,70	58,16	25,14
(-++---)	16,62	57,94	25,44
Hedef	16,63	58,79	24,58
(+---++)	16,34	58,71	24,95
Hedef	16,54	59,05	24,41
(---++++)	16,29	59,47	24,24
(----++)	16,21	59,32	24,48
Hedef	16,46	58,32	25,22
(++++++)	16,40	58,64	24,96

Tablo 11. Sağlamlık Özet Tablosu

Çalışmalar	Koşullar	Sonuçlar
Çok değişkenli parametreler: Çözücüler A & B pH, Tampon Molaritesi (mM), Kolon Sıcaklığı (°C), Akış Hızı (mL/dk) Enjeksiyon Hacmi (µL), Tuz Kons. (mM)	Değerlendirme için çok değişkenli tasarım Çözücüler A&B pH, 7.5 ± 0.15 Tampon Molalitesi 5 ± 0,3 mM Kolon Sıcaklığı 40° ± 3°C Akış Hızı 1,50 ± 0,03 mL/dk Enjeksiyon Hacmi 25 ± 3 µg Tuz Kons. 90 ± 3 mM	Anlamlı etki yok. Sırasıyla ana pik, asidik ve bazik bölgelerin en yüksek pik alanları için tüm IEC parametrelerinde %1,2, %0,9 ve %1,8 RSD değerleri.
Aletten Alete ve Kolon Lot Değişkenliği	2 alet (1 HPLC & 1 UPLC), 2 farklı reçine lotu kolonu, tek analizci	Anlamlı etki yok. Sırasıyla ana pik, asidik ve bazik bölgelerin yüzde pik alanları için iki alet

		ve beş kartuştan %0,9, %1,0 ve %2,3 RSD değerleri.
--	--	--

İstatistiksel Analiz

Hedef yanıt değerlerinin örneği, tüm değişken faktörler hedef koşullarda olduğunda ortaya çıkan değişkenliği gösterir. Faktöriyel yanıt değerlerinin örneği, çoklu faktörler kombinasyon halinde değiştiğinde ortaya çıkan değişkenliği gösterir.

Tablo 12

Hedef Şartlar; (n=9)				Faktöriyel Şartlar; (n=11)		
	% Asidik	% Ana pik	%Bazik	Asidik (%)	% Ana pik	%Bazik
Ortalama	16,5	58,5	24,9	16,3	58,6	24,8
SD	0,1	0,3	0,3	0,2	0,6	0,5
%RSD	%0,70	0,50%	1,23%	1,13%	1,06%	2,16%

Ortalama, standart sapma (SD) ve rölatif standart sapma (RSD), tüm hedef ve DoE faktöriyel yanıt değerleri için hesaplanmıştır. Her ne kadar hedef koşullar ve faktöriyel faktörler arasında küçük farklılıklar görülse de, izoformların SD'leri ve RSD'leri benzersiz derecede düşüktür. Sonuçlar Şekiller 19-21'de gösterilmiştir.

Tipik olarak bir IEC validasyonu için kabul edilebilir %RSD limitleri: Ana Pik için < %5, Asidik ve Temel varyantlar için < %10 olmuştur.

Tüm faktöriyel koşullar, hedef koşulların sonuçlarından hesaplanan 95/99 Tolerans Aralığı içindeki %Ana Pik ve %Temel için sonuçlar üretir.

İki faktöriyel koşulu #10 (-+---) ve #12 (-+---), hedef koşullardan hesaplanan düşük 95/99 TI gereksiniminin altındaki %Asidik varyant değerlerini üretmiştir. Diğer tüm faktöriyel koşullar aralık içinde değerler üretmiştir.

95/99 TI hedef koşulları dışındaki değerler üreten koşullar, testteki yüksek hassasiyet düzeyinin ve DoE çalışmasında

sınırlı kontrolsüz değişkenliğin (enstrümanlar & kolon) bir sonucudur.

IEC için normal 95/99 TI, Ana pik, Asidik ve Temel varyantlar için %3-5 aralığında olabilir.

5 Malzemeler ve Yöntemler

Platform Metodu Kontrolü (PMC) yaklaşımını kullanarak klinik ürünlere yönelik protein veya antikor ilaç maddesinin, ilaç ürününün veya toksikoloji materyalinin yüklü varyantlarını kantifiye etmek. Platform Yöntem Kontrolü yaklaşımı, bu çok ürünli katyon değişim kromatografisi yönteminde sistem uygunluğunun belirlenmesi için yöntem kontrolü olarak temsili bir antikor kullanır. Bu çok ürünli test prosedürü, pozitif bir net yüke sahip protein moleküllerine uygulanabilir (yaklaşık olarak $pI > 7.2$).

15 Ekipman ve Malzeme

1.1 HPLC sistemi: Tunable UV (TUV) ile Sular UPLC H-Sınıfı Bio; Waters 2487 dedektörü ile Waters Alliance 2695 ve Waters 2489 UV/Vis dedektörü veya eşdeğeri ile Waters Alliance e2695.

20 1.2 Hat içi UV dedektörü 280 nm'de izleme kapasitesine sahiptir.

1.3 HPLC, sıcaklığı ± 2 °C ayar noktasında tutabilen bir kolon bölmesi içermelidir.

25 1.4 Pik alanı entegrasyonu kabiliyetine sahip elektronik entegratör veya bilgisayar sistemi.

1.52-8 °C'ye soğutma kabiliyetine sahip oto örnekleyici.

1.6 Kolon: ThermoFisher MabPacR SCX-10, 10µm, 4 250 mm (Thermo, ürün no. 074625).

1.7 Sıcaklık kompensasyonlu pH metre.

30 1.8 37 ± 2 °C'de ısıtma kabiliyetine sahip su banyosu.

1.9 Termometreler 1 °C bölümlü olarak kalibre edilmiş ve su banyolarına kısmi daldırma ile kullanım için belirtilmiştir.
Ayırıcılar

35 NOT: Tarifler, nominal miktarlardaki ayıraç içindir ve test gereksinimlerine göre orantılı olarak ayarlanabilir.

2.1HPLC analizi için uygun saf su (Super-Q veya eşdeğer)

2.2 Çözücü A: 5mM HEPES Tamponu, pH 7.5 $\pm$ 0.1

HEPES Serbest Asit, ayıraç sınıfı (FW 238.3, Corning CellGro; Ürün No. 61-034-RO), 1,87 g

5 HEPES Sodyum Tuzu, ayıraç sınıfı (FW 260.3, SigmaAldrich; Ürün No. H3784), 1.87 g

Saf su QS ila 3 L

Sayılan kimyasalları, yaklaşık 2900 mL saf su ile kademeli bir silindirde birleştiriniz. Çözünene kadar karıştırınız. QS ila 10 3 L ile saf su ve pH'ı ölçünüz. pH'nin ortam sıcaklığında. 7.5 $\pm$ 0.1 olduğunu teyit ediniz. pH'nin belirtilen aralık dışında olması halinde, atınız ve preparasyonu tekrarlayınız. Bir 0,2- μ m'lik membran içerisinden filtreleyiniz.

2.3 Çözücü B: Çözücü A içinde 100mM Sodyum Klorür

15 Sodyum Klorür (FW 58,44 J. T. Baker Kat. No. 3624-01 veya eşdeğer), 5,844 g Çözücü A (Adım 2,2) qs ila 1 L Bir mezürdeki sodyum klorürü, yaklaşık 450 mL A Çözücüsü ile birleştiriniz ve çözünene kadar karıştırınız. Çözücü A ile QS ila 1 L ve bir 0,2- m'lik membrandan filtre ediniz.

20 2.4 Çözücü C: Çözücü A içinde 1M Sodyum Klorür

Sodyum Klorür (FW 58,44 J. T. Baker Kat. No. 3624-01), 29,22 g

Çözücü A (Adım 2,2) qs ila 500 mL

Bir mezürdeki sodyum klorürü, yaklaşık 450 mL A Çözücüsü ile 25 birleştiriniz ve çözünene kadar karıştırınız. Çözücü A ile QS ila 500 mL ve bir 0.2- m'lik membrandan filtre ediniz.

2.5 Kolon Depolama Çözeltisi: Çözücü B, pH 7.5 $\pm$ 0.1 içinde %0,05 Sodyum Azid, DİKKAT: Sodyum azit, oldukça toksik ve mutageniktir. Tozu solumaktan kaçınınız ve cilt ile teması 30 önleyiniz (cilt ile kolayca emilir).

Sodyum Azid (FW 65,01,EM Science 0066884R veya eşdeğer), 2,25 g; Çözücü B (Adım 2,2), qs ila 500 mL

Sodyum azidi, yaklaşık 450 mL Solvent B ile mezür içerisinde birleştiriniz ve çözünene kadar karıştırınız. Çözücü B ile

solüsyonu 500 mL'ye tamamlayınız ve 0,22 m'lik bir membrandan süzünüz.

2.6 Kolon ve sistem temizleme çözeltisi: 0,1N sodyum hidroksit (JT Baker 5636-02), aşağıdaki adım başına

5 hazırlayınız:

1N NaOH 100µL

Saf su 900 L

Sayılan kimyasalları birleştiriniz ve iyice karıştırınız.

2.7 Örnek ve Referans Standart formülasyon tamponu

10 2.8 %10 Polisorbat 20 Stoğu (a/h)

Polisorbat 20 (Polisorbat™ 20, Sigma Kat. P7949 veya eşdeğeri) 10 g, Saf Su, qs ila 100 mL

15 Polisorbat 20'yi doğrudan darası alınmış bir mezür içinde tartınız. Sürfaktan ile silindirin boynunun temas etmesinden kaçınınız. Dikkatli bir şekilde qs ila 100mL saf su ekleyiniz, kabarcık oluşumundan kaçınınız. Manyetik bir karıştırma çubuğunu yavaşça silindire indiriniz. Tüm yüzey aktif madde çözülene kadar çözeltiyi 15-20 dakika karıştırınız.

2.9 Yöntem Kontrol formülasyon tamponu

20 MAb8 Formülasyon Tamponu: 20 mM Histidin HCl, 120 mM sükroz, %0,02 polisorbat 20, pH 6.0 ±0,3

L-Histidin HCl, monohidrat (FW 209,6) 2,31 g

L-Histidin, serbest baz (FW 155,2) 1,40 g

Sükroz (FW 342,3) 41,08 g

25 Polisorbat 20 0,20 g

veya %10 Polisorbat 20 (a/h) stok çözeltisi 2,0 mL

Saf su qs ila 1,0 L

30 Listelenen kimyasalları yaklaşık 800 mL saf su ile birleştiriniz ve çözünene kadar karıştırınız. pH'nin 6.0 ± 0.3 olduğunu teyit ediniz. pH'nin belirtilen aralık dışında olması halinde, atınız ve preparasyonu tekrarlayınız. Çözeltiyi saf su ile 1,0 L'ye qs ediniz. Bir ? 0,45-?m membranından filtreleyiniz.

35 2.105 mg/mL Karboksipeptidaz B, DFP ile işlenmiş (Roche 103233) veya eşdeğeri, 150 U/mg'nin yakın etkinlikte

2.111 mg/mL CpB

5 mg/mL Karboksipeptidaz B, DFP ile işlenmiş 20 µL

Saf su 80 L

Doğru şekilde 5 mg/mL Karboksipeptidaz B'yi saf suya ilave
5 ediniz. 5 mg/mL'den başka satın alınan Karboksipeptidaz B
konsantrasyonları için, 1 mg/mL'lik bir son konsantrasyonun
sağlanması için hacimlerde ayarlamalar yapılabilir. Taze
hazırlayınız.

Yöntem Kontrolü, Örnek, Referans ve Formülasyon Tamponu Boş
10 Preparasyon

3.1 Yöntem Kontrolü (MAb8), Nominal konsantrasyon: 50
mg/mL

Yöntem Kontrolünü, Çözücü A ile (Adım 2.2) yaklaşık 2,0
mg/mL'lik bir nihai konsantrasyona kadar seyreltiniz (örneğin,
15 50 mg/mL Yöntem Kontrolü için, 40 µL örnek ve 960 µL Çözücü A
ile birleştiriniz).

3.2 Yöntem kontrolü boş

Adım 3.1'deki aynı seyreltim şemasını kullanarak Yöntem
Kontrolü formülasyon tamponunu Çözücü A ile seyreltiniz.

3.3 Örnek ve referans standart preparasyonu
20 Örnek(ler)i ve referans standardı Çözücü A ile 2 mg/mL'ye
seyreltiniz.

3.4 Örnek ve referans standart boş preparasyonu

3.4.1 Adım 3.4 ile aynı dilüsyon şemasını kullanarak
25 ürün için formülasyon tamponunu seyreltiniz.

3.5 Veri sayfası üzerine seyreltimleri kaydediniz.

3.6 CpB Sindirimiyle Örnek Hazırlama CpB sindirim
gereksinimleri için Ürüne Özgü Bilgi ve Talimatları
inceleyiniz.

3.6.1 Seyreltilmiş yöntem kontrolü, örnek(ler),
30 referans standardı ve formülasyon tamponu boşuna, bir 1 mg/mL
CpB (step 2.12) %1 (a/a) ilavesi yapınız (örneğin, 20 L 1
mg/mL CpB'yi 1000 L 2.0 mg/mL örneğe ilave ediniz).

3.6.2 Yavaşça vorteksleyiniz ve CpB ile işlenmiş
35 yöntem kontrolü, numune(ler), referans standardı ve

formülasyon tamponu boşuna 20 ± 2 dakika süreyle 37 ± 2 °C'de enkübe ediniz.

3.6.3Veri sayfası üzerine preparasyonları kaydediniz.

5 3.7 Seyreltilmiş Yöntem Kontrolü, Referans Standardı, numune(ler) ve formülasyon tamponu boşlarını analiz için uygun şişelere aktarınız.

3.8 HPLC analizi, numune hazırlanmasından sonraki 48 saat içinde tamamlanmalıdır. Numuneler, analizlerden önce 2-8 °C'de saklanmalıdır.

10 Kromatografik Şartlar

4.1 Her iki Waters' HPLC aletleri için ortak kromatografik koşullar:

4.1.1Akış hızı: 1,5 mL/dk

4.1.2Otomatik örnekleyici sıcaklığı: 5 ± 3°C

15 4.1.3Kolon sıcaklığı: 40 ± 2°C

4.1.4UV saptama dalgaboyu: 280 nm

4.1.5Enjeksiyon hacmi: 25 L (~50 g)

4.2 Water's Acquity H-sınıfı UPLC ve çoklu dalga boyu veya diyot dizi dedektörleri için cihaz ayarı

20 4.2.1Sıfır offset analog çıkışı: %5

4.2.2Sönümlleme analog çıkışı: 500 mAU

4.2.3Yıkama ayarları: İğne yıkaması ile enjeksiyon (%10 IPA)

Pre-Enjekte 10s

25 Post-Enjekte 20s

4.2.4Çizme ve dağıtım hızı: 100µL/dk

4.2.5İvme 2,0 mL / dk / 0,02 dk (100 mL/dk/dk)

4.2.6Dedektör ayarları

4.2.6.1 Önekleme Oranı: 1 pt/saniye

30 4.2.6.2 Filtre: Hamming

4.2.6.3 Zaman Sabiti 1,0

4.2.6.4 Oran Minimumu Minimum Oran 0,00
Maksimum Oran 2,00

4.2.6.5 Oto Sıfır Kanal A: (Zaman 0 ve Zaman 50)

35

4.2.6.6 Duyarlılık: 2,000 AUFS

4.3 Waters 2487 Dedektörü için Waters Alliance (e)2695 HPLC için Alet ayarı

4.3.1Strok hacmi: 100 µL

5 4.3.2İğne Yıkama Süresi: Genişletilmiş (%10 IP A)

4.3.3Solvent gazı giderme: "on" modunu aç

4.3.4İvme 10,0 mL / dk / 0,1 dk (100 mL/dk/dk)

4.3.5Çizme ve dağıtım hızı: Yavaş (50µL dak)

4.3.6Dedektör ayarları

10 4.3.6.1 Önekleme Oranı: 1 pt/saniye

4.3.6.2 Filtre: Hamming

4.3.6.3 Zaman Sabiti 1,0

4.3.6.4 Oran Minimum 0,1000

4.3.6.5 Zaman 0 ve Zaman 50'de Oto Sıfır

15 Kanal A

4.3.6.6 Duyarlılık: 2,000 AU

4.4 Gradyan:

Tablo 13

Süre (dk)	% A	%B	%C	Akış Hızı (mL/dk)
0,0	100	0,0	0,0	1,5
3,0	100	0,0	0,0	1,5
37,0	10,0	90,0	0,0	1,5
37,1	0,0	0,0	100	1,5
40,0	0,0	0,0	100	1,5
40,1	100	0,0	0,0	1,5
50,0	100	0,0	0,0	1,5

Alet Hazırlama

20 5.1 HPLC kullanımı için uygun usulleri takip ediniz

5.2 İğne yıkama hattına %10 IP A dahil olmak üzere, borulara ~20mL uygun çözücü basınız.

Kolon temizleme ve hazırlama

25 6.1 Aşağıdaki izokratik program kullanılarak sistem ve kolon yıkaması yapınız. 100µL 0,1N NaOH enjekte ediniz.

Tablo 14

Süre (dk)	Akış (mL/dk)	% Çözücü B	% Çözücü B
0	1,5	50	50
3	1,5	50	50

6.2 Adım 6.1'i en az beş (5) kez tekrarlayın.

6.3 Adım 6.1'de izokratik programı kullanarak, 100uL Solvent A'ya tek bir enjeksiyon yapın.

6.4 Adım 4.4'teki gradyan programının başlangıç koşullarında kolonu (%100 çözücü, 1,5 mL/dk'da) ~20 dakika veya sabit bir taban çizgisi gözlemlenene kadar dengeleyin.

Enjeksiyon Protokolü

7.1 Tavlama: En az 2 enjeksiyon için tutarlı kromatogramlar gözlenene kadar CpB sindirimi olmadan Yöntem Kontrolünü enjekte ediniz. Asidik bölgenin, ana tepe noktasının ve temel bölgenin çözünürlüğü, tipik kromatogramlarla görsel inceleme yoluyla tutarlı olmalıdır.

7.2 CpB sindirimsiz Platform Yöntem Kontrolü (tek enjeksiyon)

7.3 Yöntem Kontrolü için formülasyon tamponu boş

7.4 Referans Standardı* (tek enjeksiyon)

7.5 Örnek(ler)* (çift enjeksiyon)

7.6 Referans Standardı* (tek enjeksiyon)

7.7 Referans Standart(lar) için formülasyon tamponu boşluk(lar)ı * (tek enjeksiyon)

7.8 CpB sindirimsiz Platform Yöntem Kontrolü (tek enjeksiyon)

* CpB'li veya CpB'siz, ürün onaylanmış ise.

NOTLAR: 1) Eğer formülasyon tamponları Referans Standart ve numune için farklıysa, Referans Standart ve örnek için ayrı boşları enjekte ediniz.

2) Yöntem Kontrolü arasında 15'ten fazla enjeksiyon (Referans Standartları ve ilgili ürün formülasyonu ara boşlukları dahil) gerekiyorsa, her bir 15 enjeksiyonun arasına Yöntem Kontrolü enjeksiyonları koyunuz. Test veri sayfasının sistem uygunluk bölümünde, rapor edilen örnek(ler)i

destekleyen sadece Yöntem Kontrolü enjeksiyonlarını raporlayınız.

3) Referans Standardı bir örnek olarak kabul edilir ve test seansının sistem uygunluğunu değerlendirmek için kullanılmaz.

Kolon Kapatma ve Depolama

Kolonu, en az 30 mL Kolon Saklama Çözeltisi ile yıkayarak muhafaza ediniz (Adım 2.4).

Sistem Uygunluğu

10 NOT: Yöntem Kontrolü için, Yöntem Kontrol profillerini, Yöntem Kontrol formülasyon tamponu ile kaplayarak entegrasyon uç noktalarını belirleyiniz. Örtüşen profilleri genişletiniz ve boşluğu Yöntem Kontrol profilleriyle karşılaştırarak entegrasyonun uç noktalarını belirleyiniz.

15 9.1 Proteine atfedilen tüm pikleri entegre ediniz. Boşluktaki karşılık gelen pik, PMC'deki tepe noktasının < %1'i olmadığı sürece, Yöntem Kontrolü formülasyon tamponu boş kromatogramlarında mevcut olan herhangi bir piki dahil etmeyiniz.

20 9.2 Birbiriyle ve tipik kromatografik profillerle bloklama Yöntem Kontrolü enjeksiyonlarının kromatogram profillerinin tutarlılığını görsel olarak doğrulayınız. Tipik kromatogramlardaki tüm isimlendirilmiş pikler mevcut olmalıdır. NOT: Adlandırılmış tepe noktalarının profilleri, kolon ve enstrüman değişkenliği nedeniyle örnek profillerden tepe şeklinde biraz farklı olabilir.

25 9.3 Her bloklama Yöntem Kontrolü enjeksiyonu için ana tepe noktası, asidik bölge ve temel bölge yüzdesini hesaplayınız.

30

35

9.4 Sistem uygunluğu Aralığı

Tablo 15. CpB ile işlenmemiş Yöntem Kontrolü için kabul edilebilir sistem uygunluğu aralığı

	Asidik Bölge	Ana Pik	Bazik Bölge
Kabul edilebilir % Pik Alan Aralığı	15.5 ve 17.7	55.5 ve 61.4	21.3 ve 28.6

9.5 Sistem uygunluk veri sayfasındaki kayıt sonuçları.

5 Veri Analizi

10.1 Her iki numune ve Referans Standart kromatogramlarındaki pikleri tanımlamak için profilleri görsel olarak karşılaştırın.

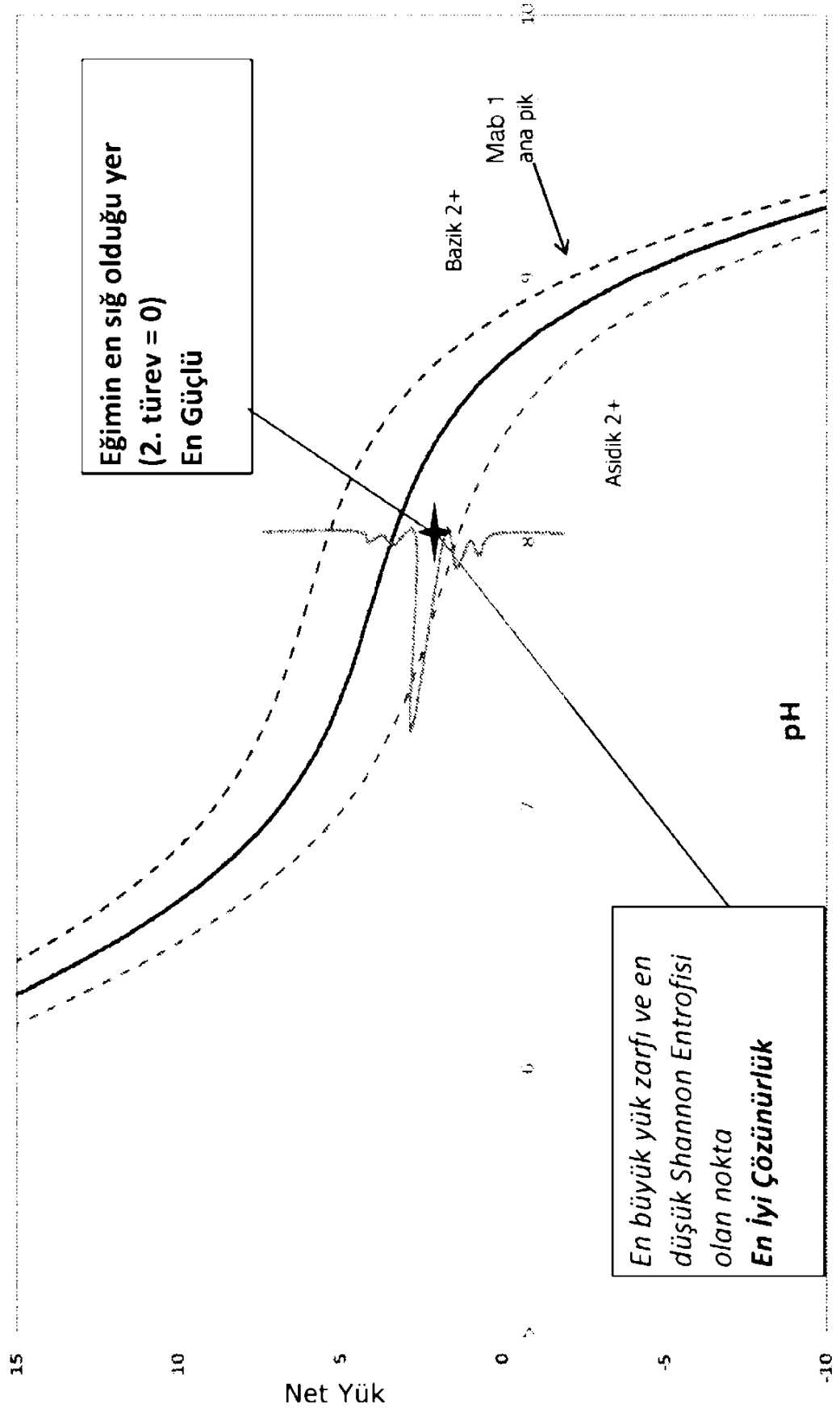
10.2 Proteine atfedilen tüm pikleri entegre ediniz.

10 Boşluktaki karşılık gelen pik, PMC'deki tepe noktasının < %1'i olmadığı sürece, ürün formülasyon tamponu boş kromatogramlarında mevcut olan herhangi bir piki dahil etmeyiniz.

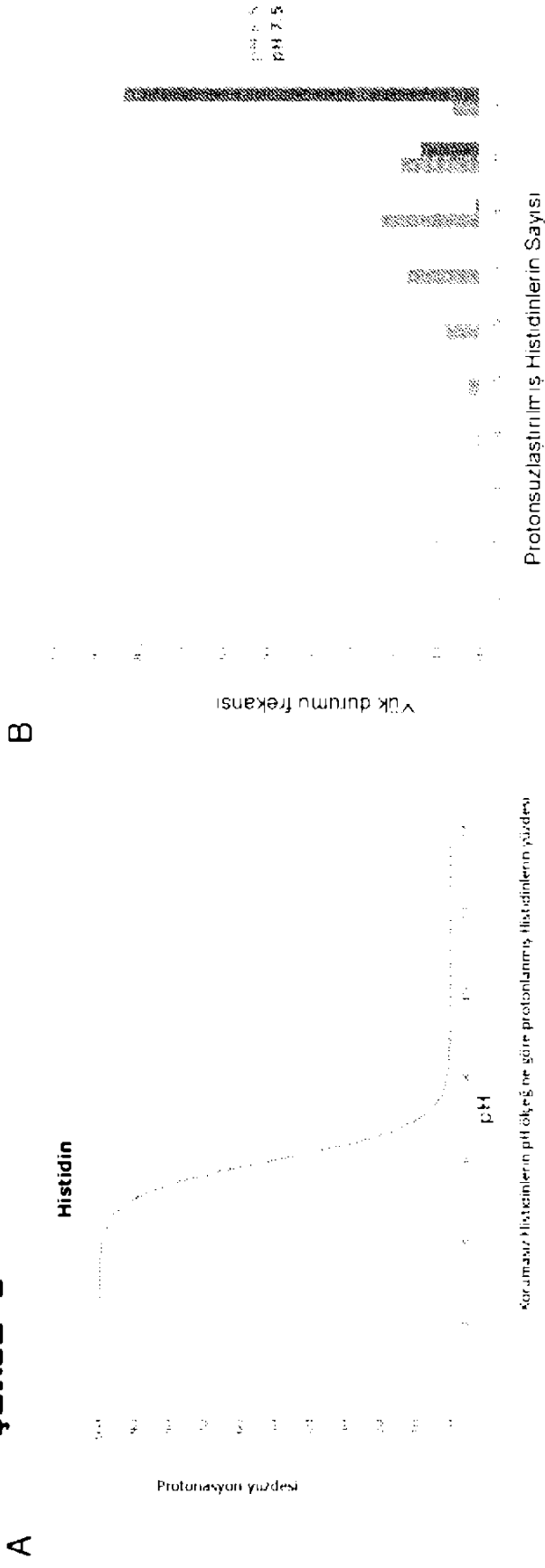
NOT: Entegrasyon uç noktalarını belirlemek için, numune(ler)i ve Referans Standart profillerini ürün formülasyonu arabelleği boşluğu ile örtüştürünüz. Örtüştürülen profilleri genişletiniz ve ürün formülasyon tamponu boşunu örnek(ler)le ve Referans Standart profillerle karşılaştırarak entegrasyonun uç noktalarını tespit ediniz.

20 10.3 Ana pik, asidik bölge ve temel bölgenin en yüksek pik alanını hesaplamak için her bir örneğin ve Referans Standart enjeksiyonunu analiz ediniz.

ŞEKİL 1

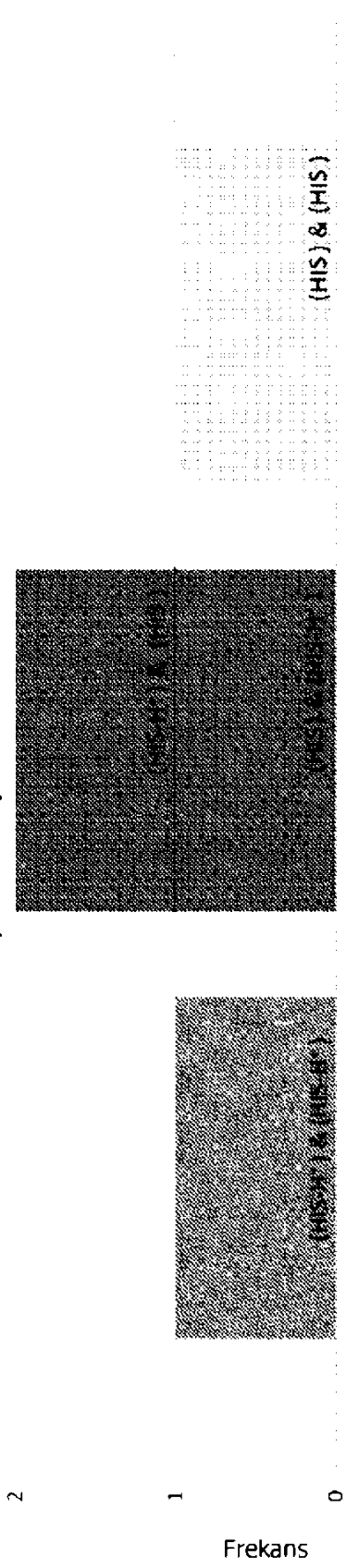


ŞEKİL 2

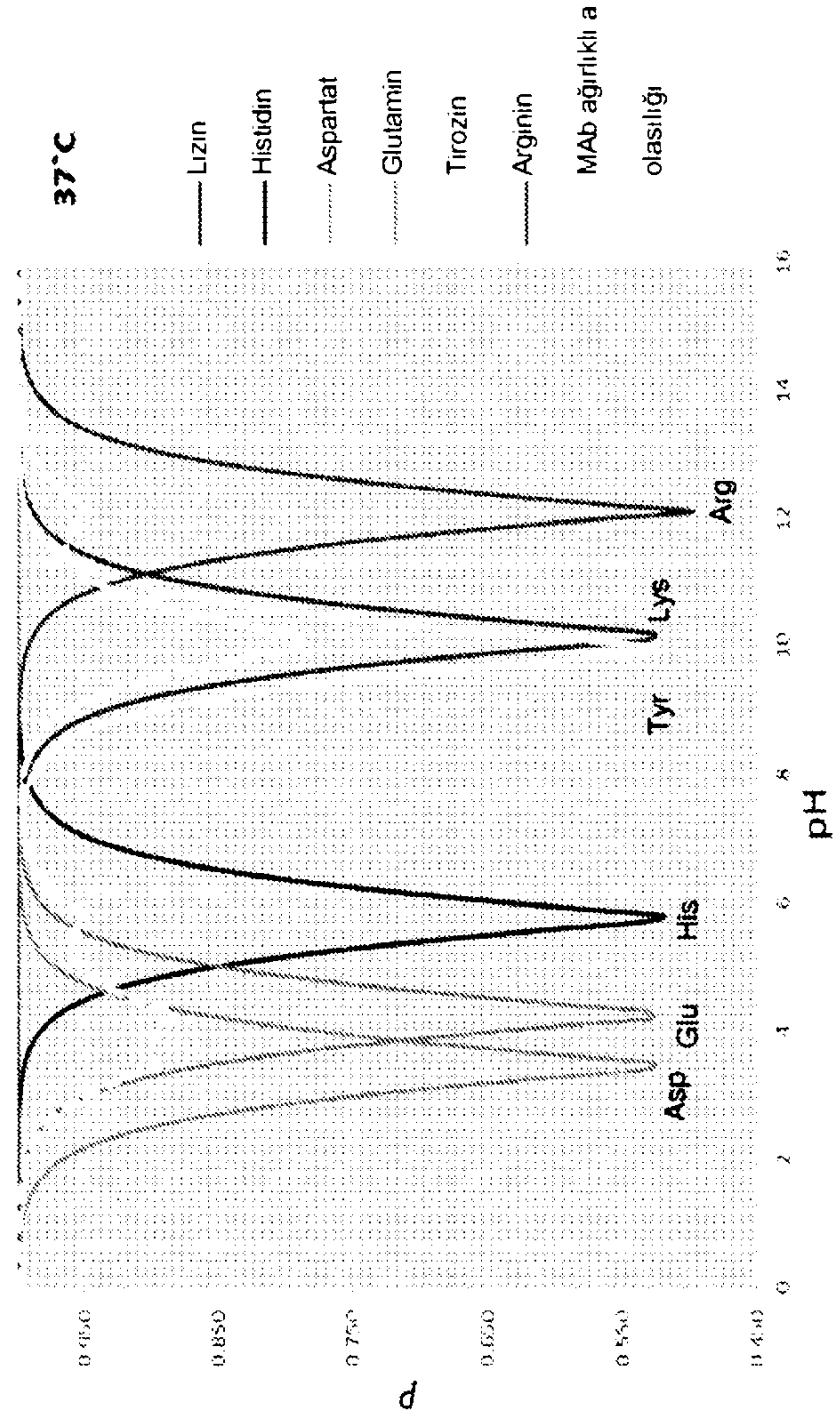


C

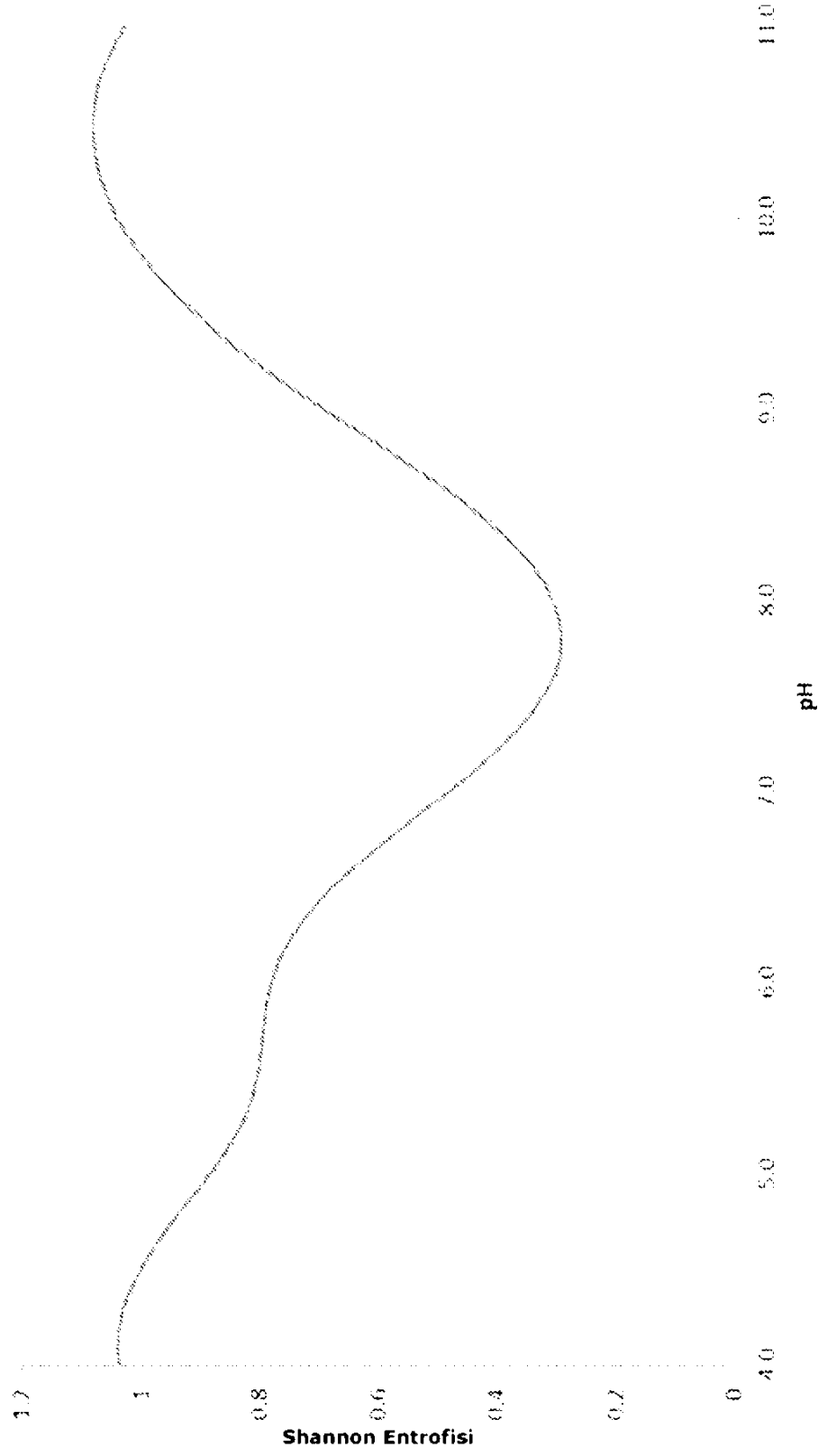
pH 6.0'da 4 Çift Histidin



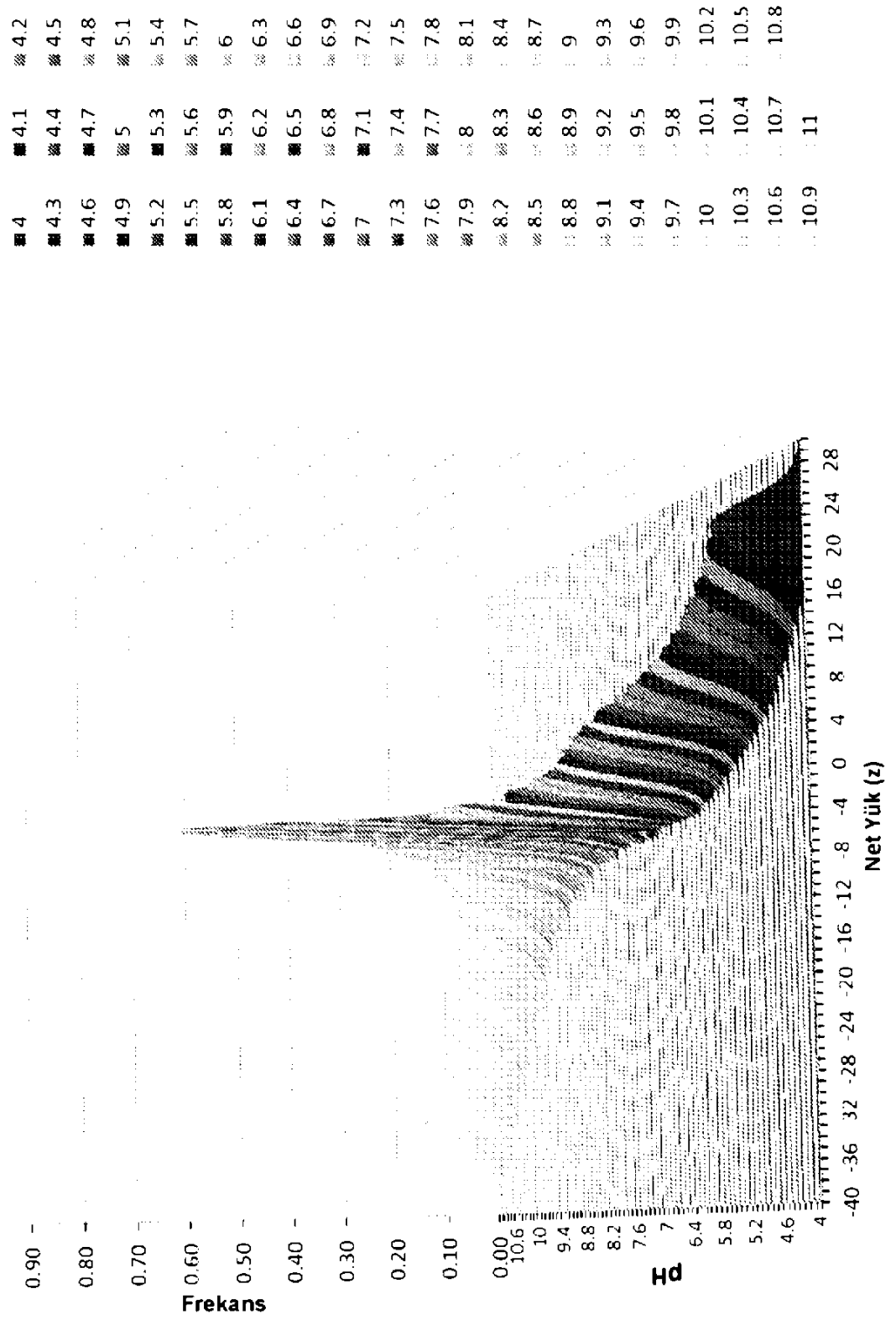
ŞEKİL 3



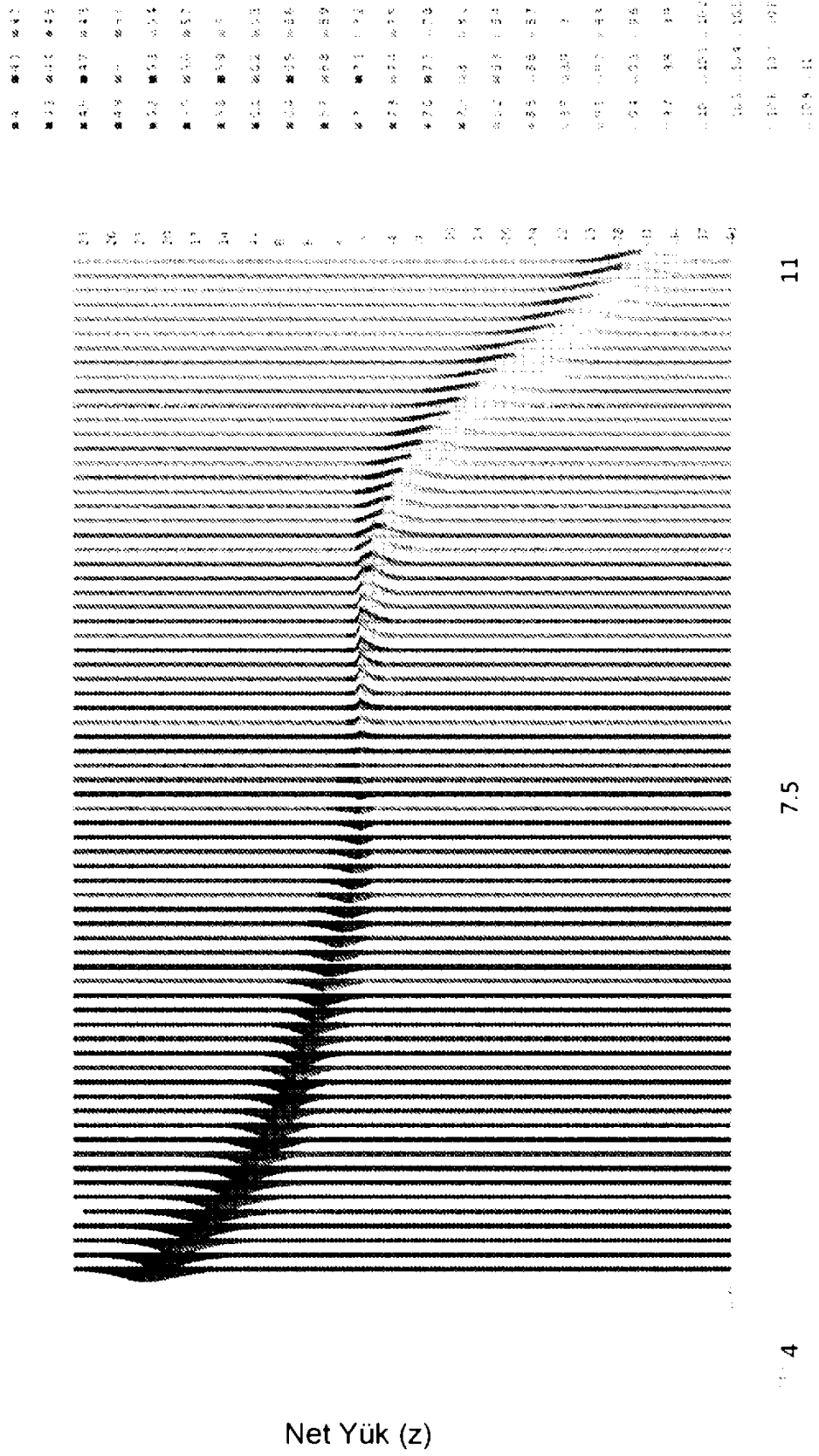
ŞEKİL 4



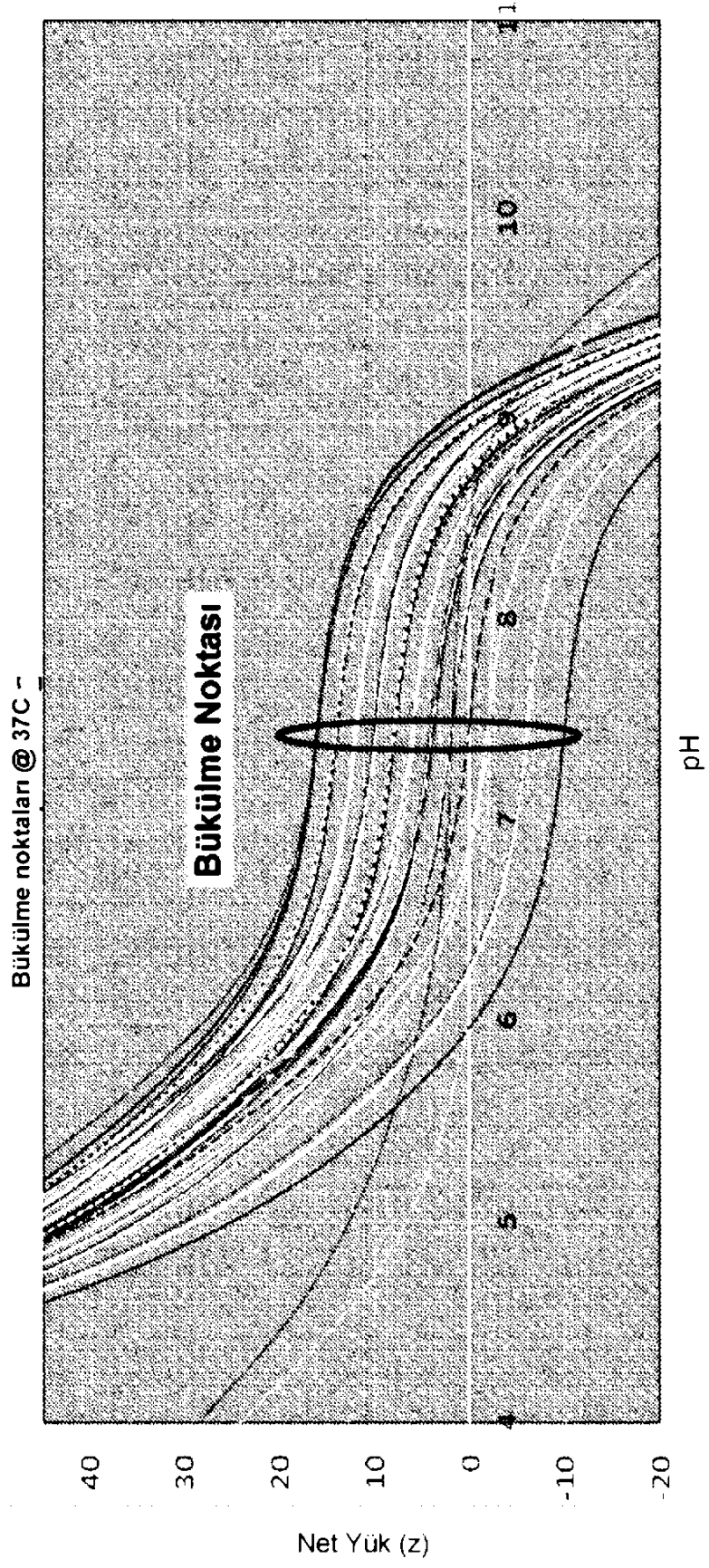
ŞEKİL 5



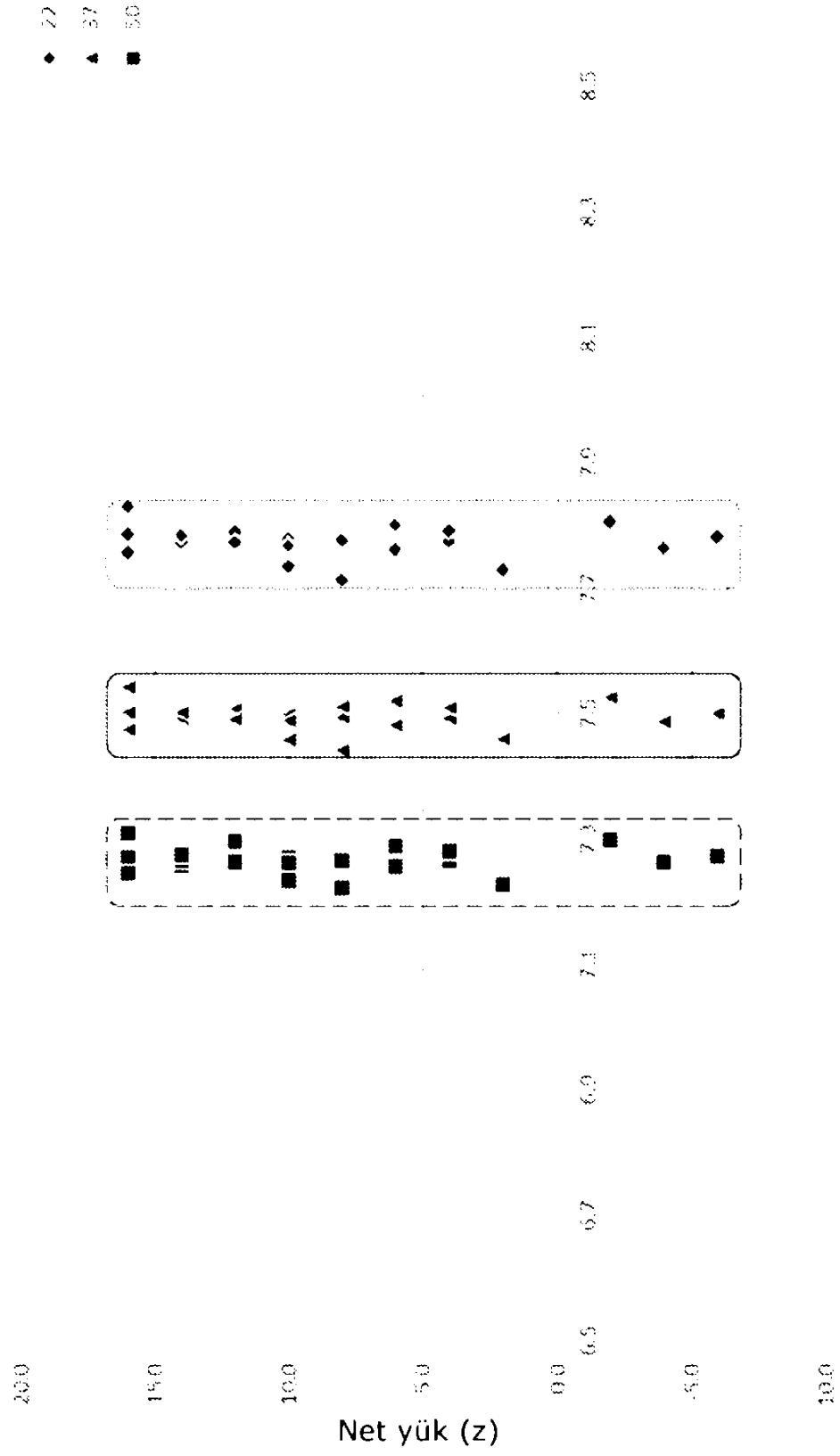
ŞEKİL 6



ŞEKİL 7

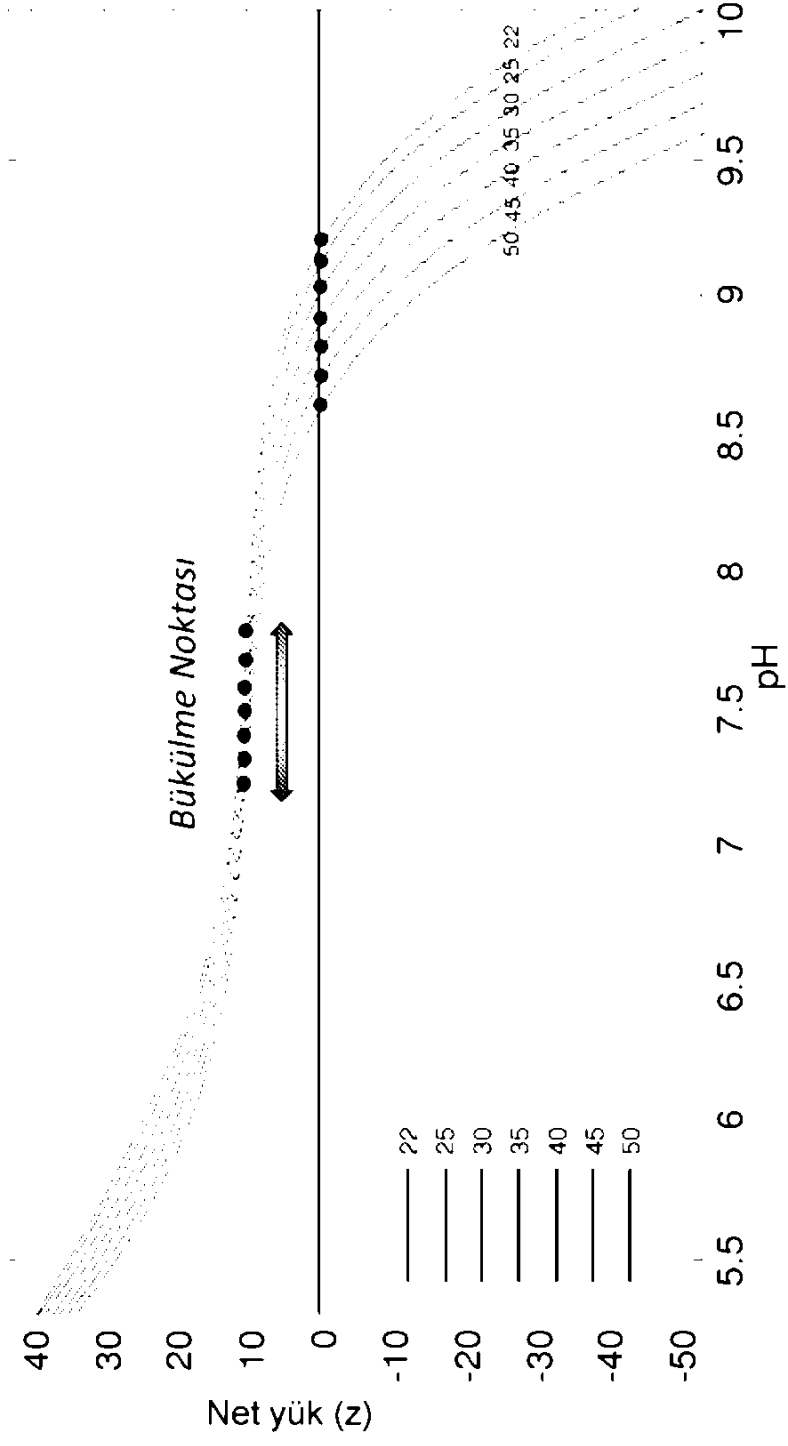


ŞEKİL 8

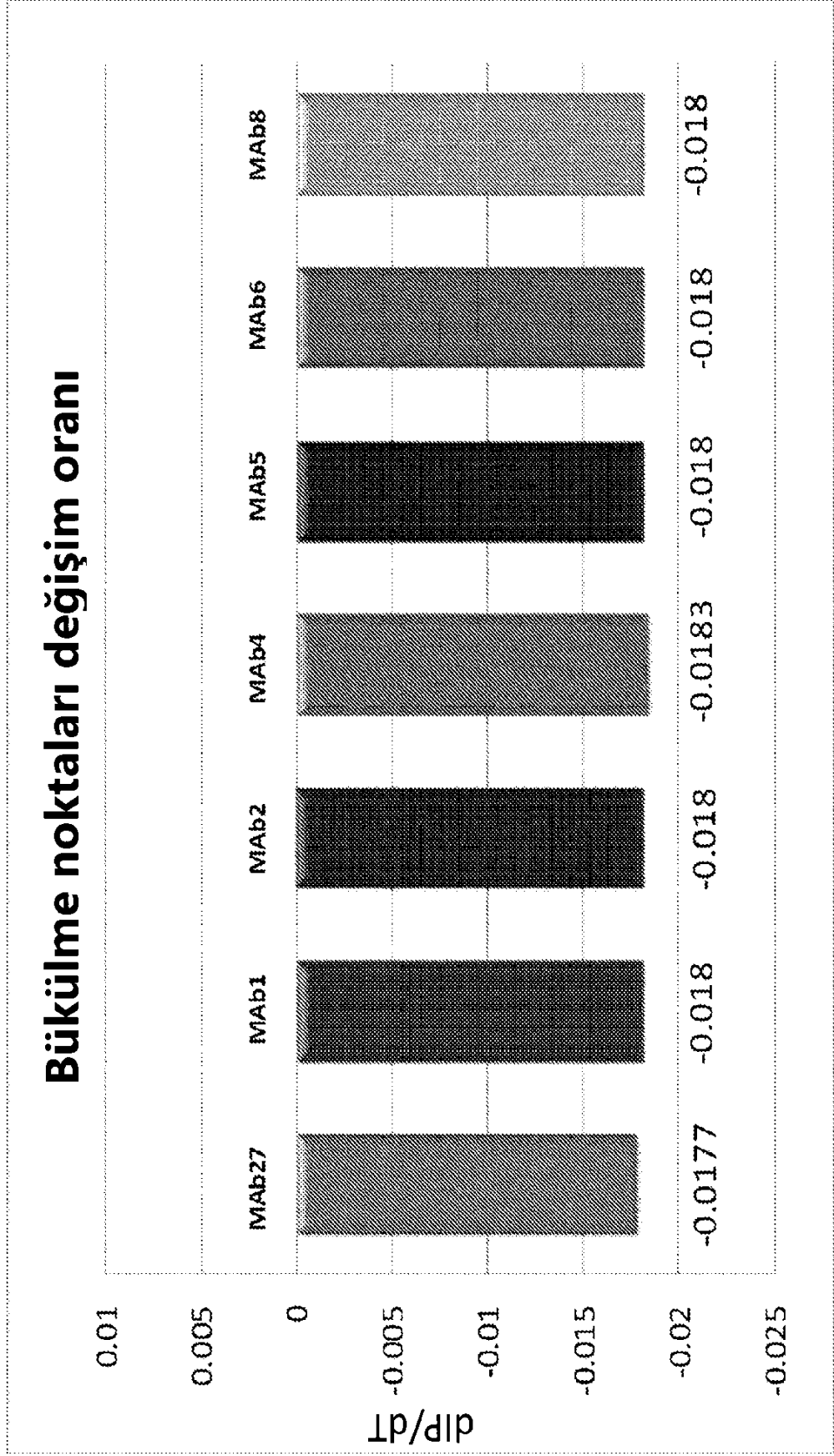


ŞEKİL 9

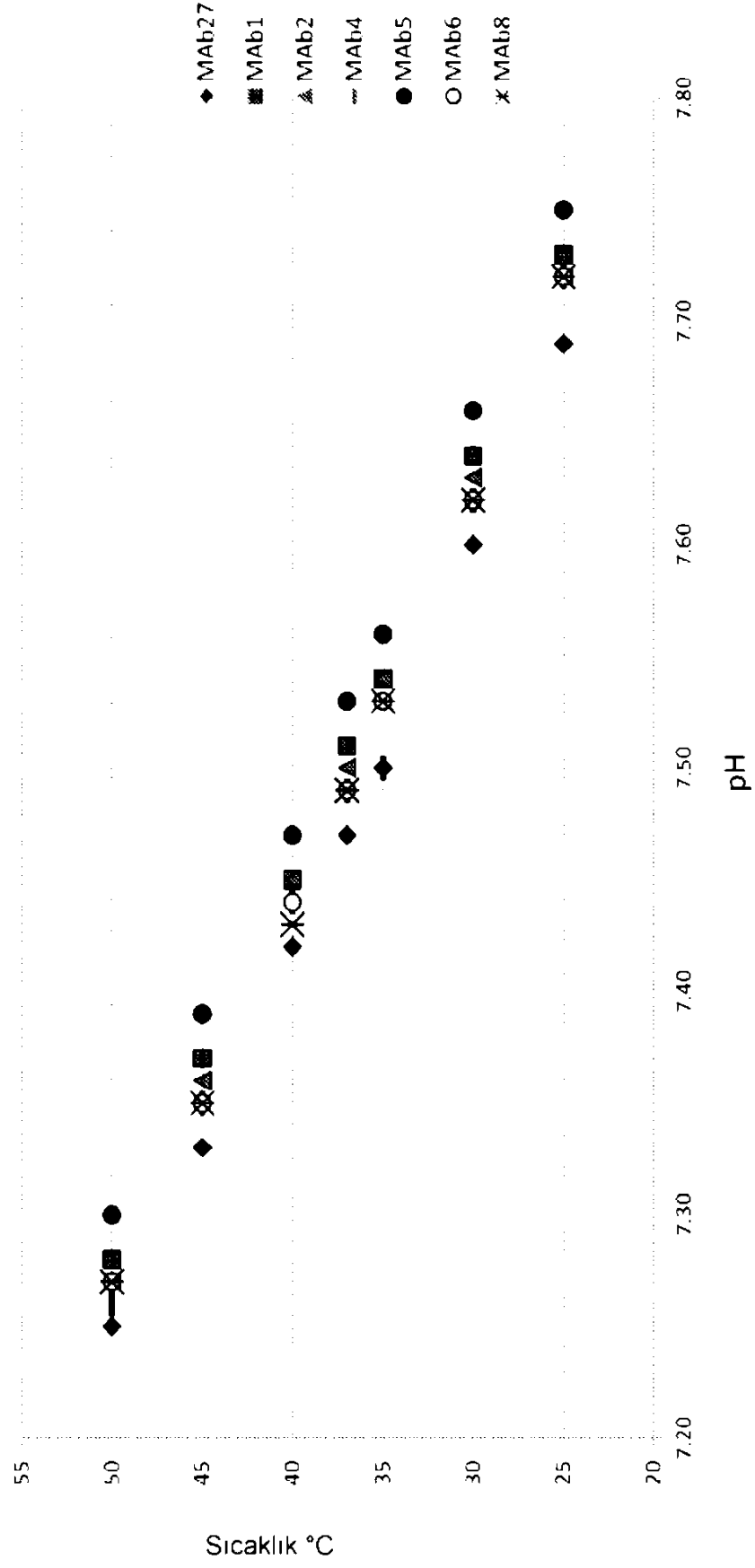
Net yük vs. MAb2 için pH (22 - 50°C)



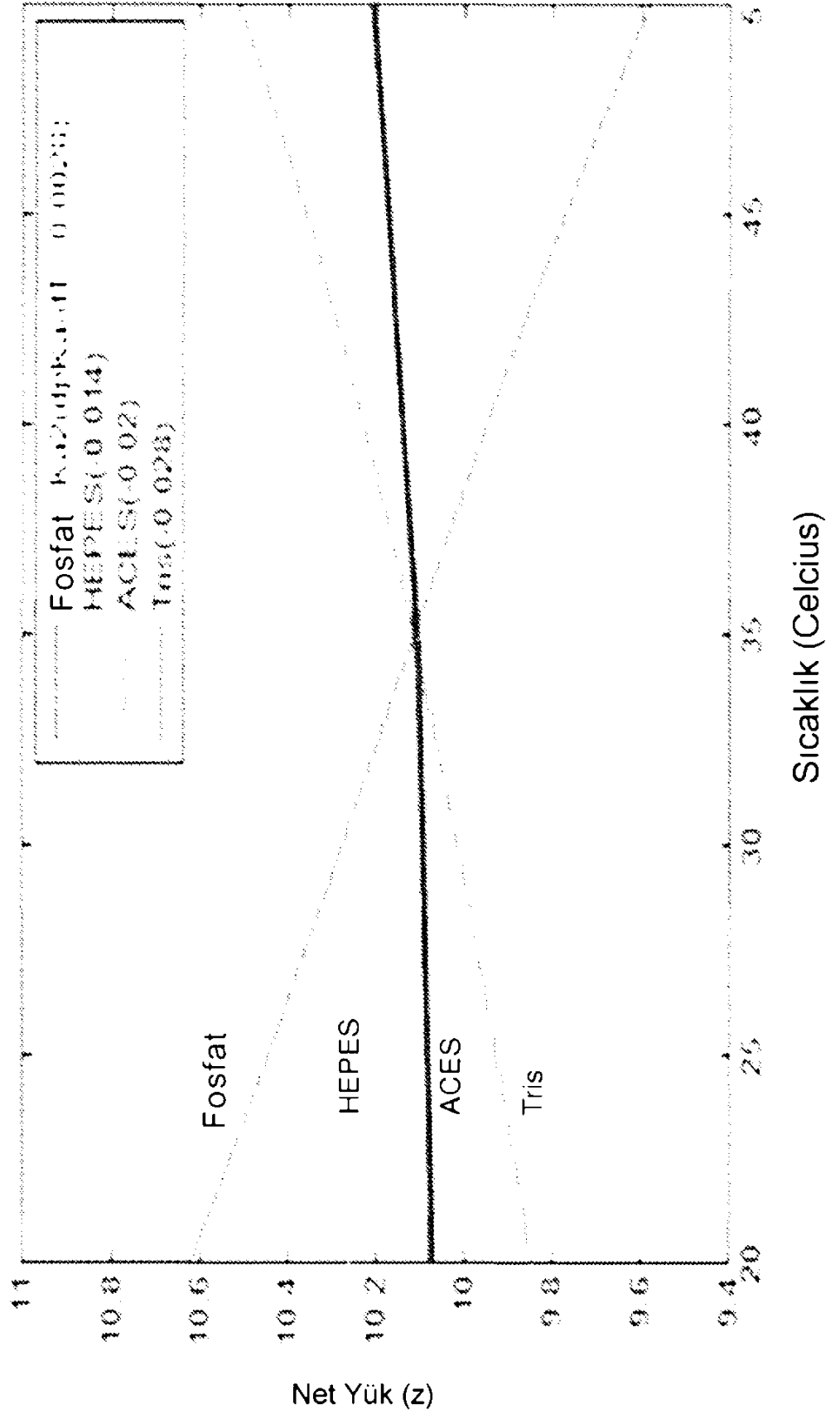
ŞEKİL 10A



ŞEKİL 10B



ŞEKİL 11



ŞEKİL 12

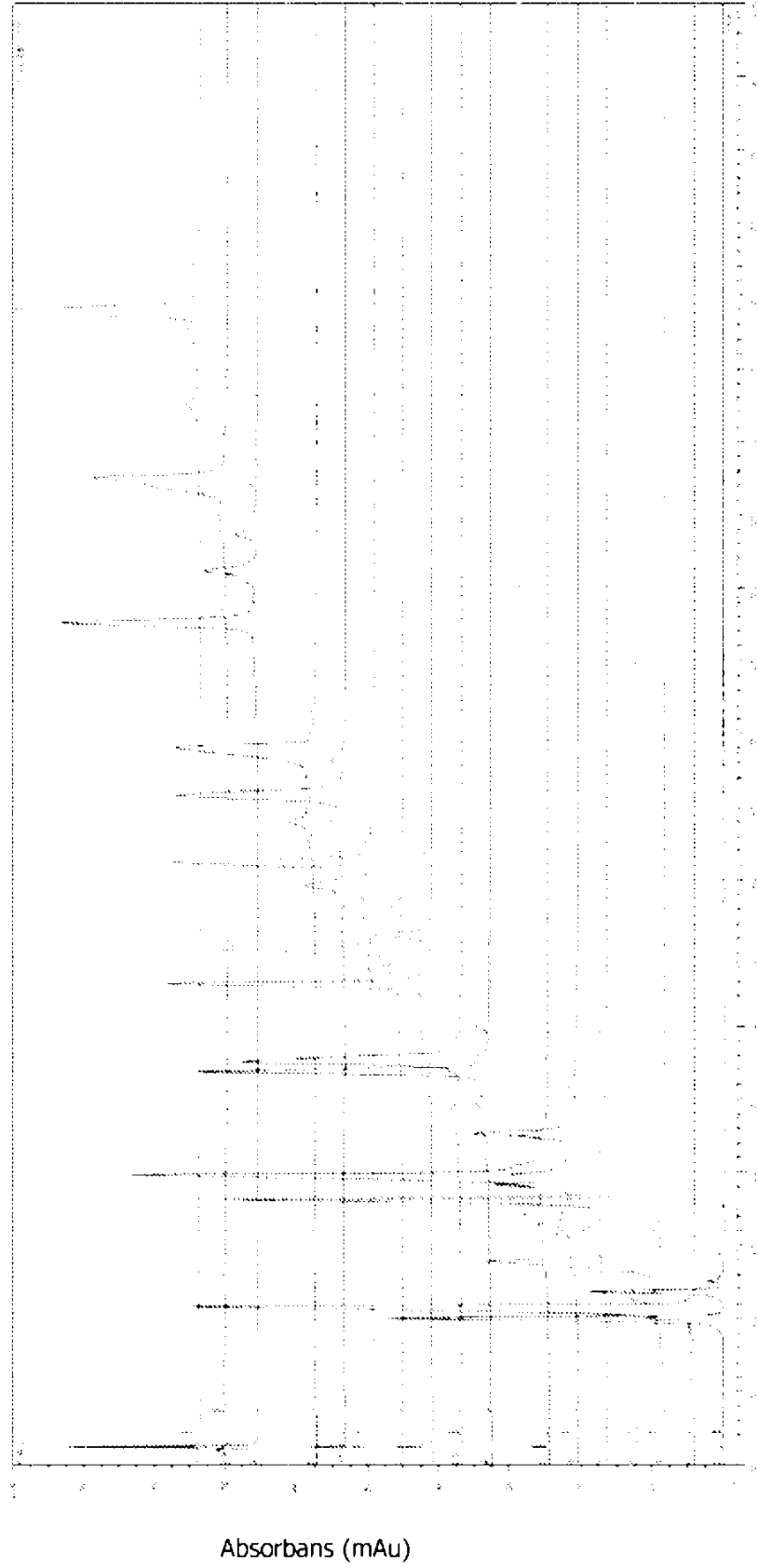
MabPac SCX-10 (4x250mm)

Tampon A: 5 mM ACES pH 7.5 @ 37C

Tampon B: A içinde 180 mM NaCl

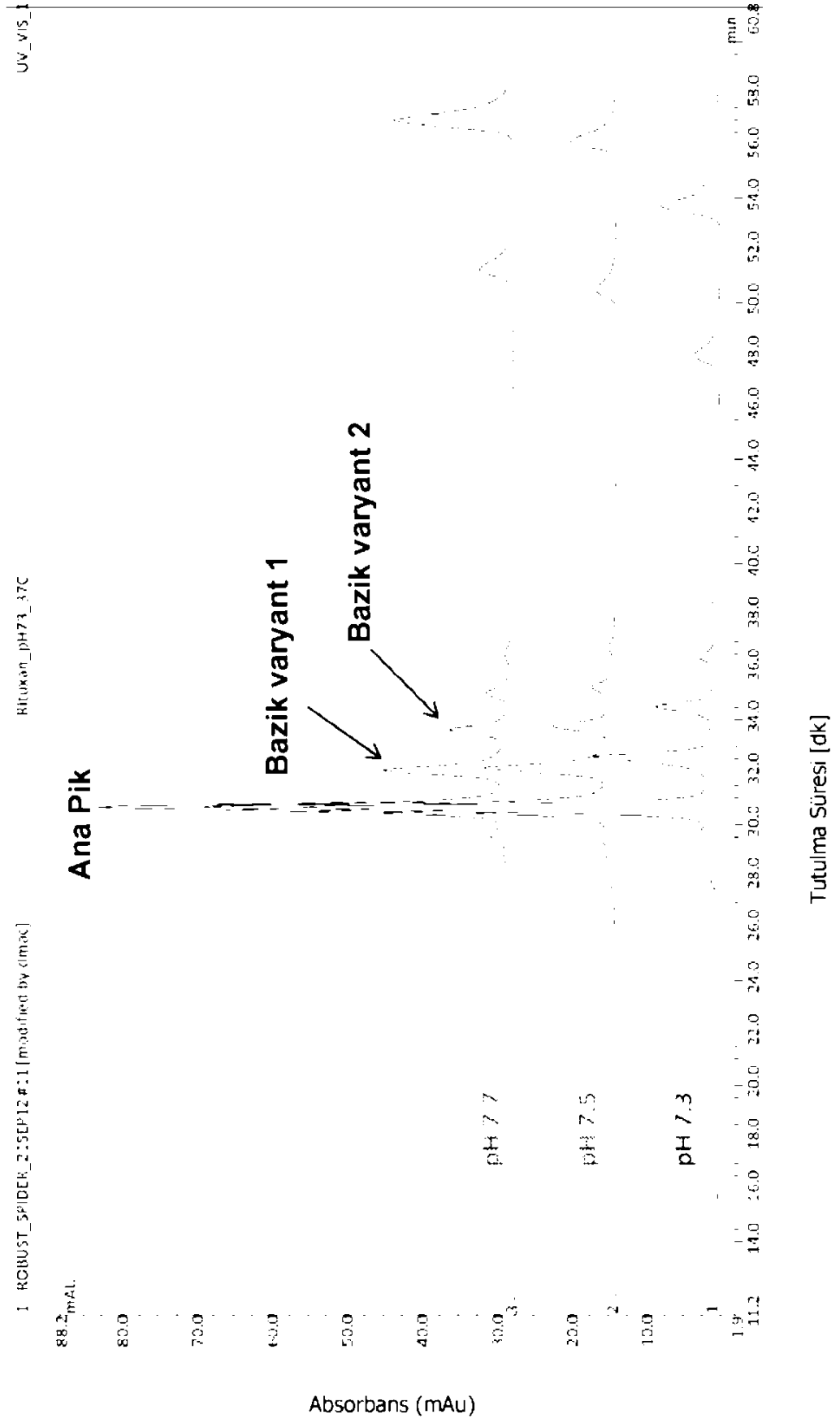
Gradyan: 0-100mM 100 dakikada; dakikada 1mM 37

C; 0,8 mL/dk

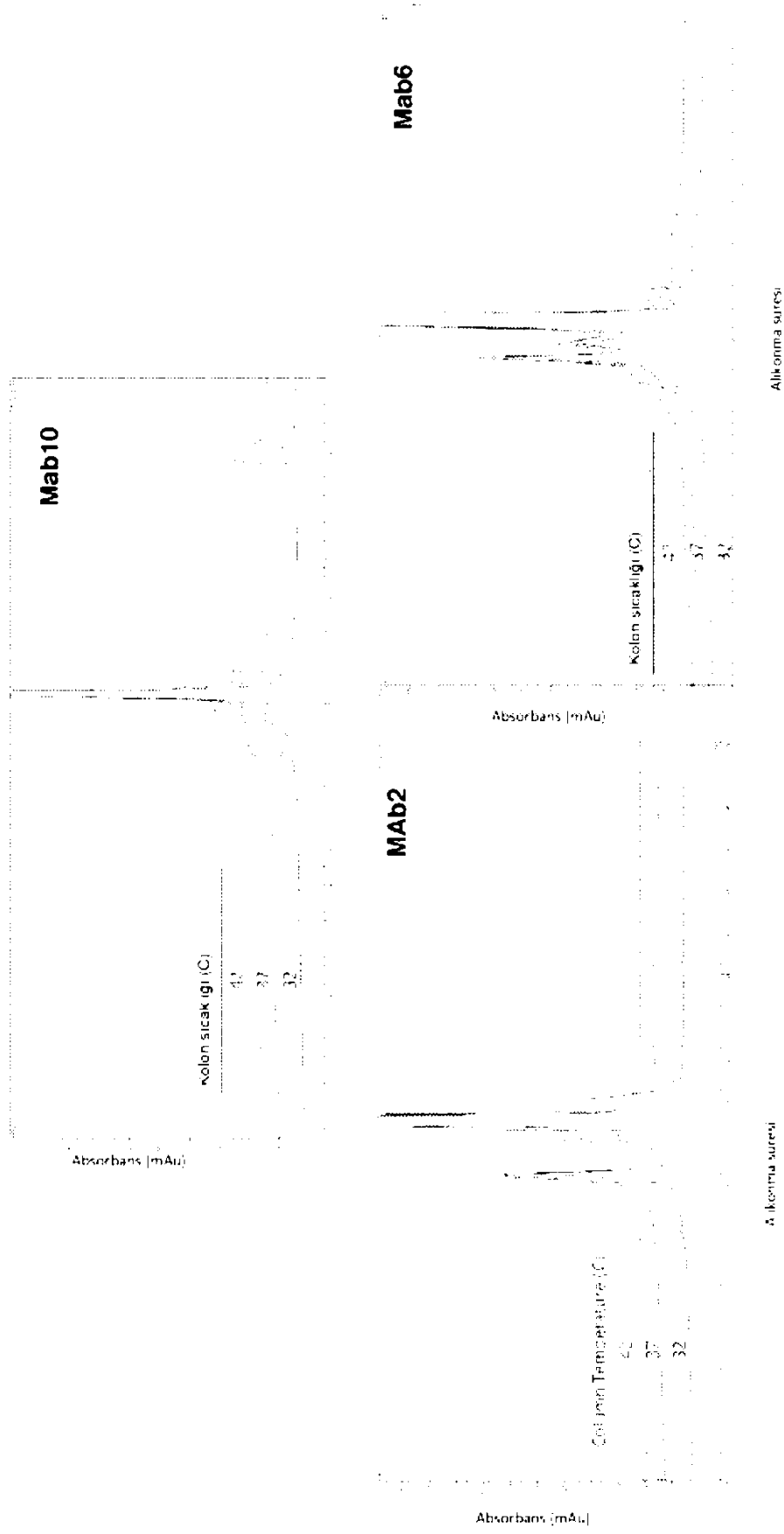


Tutulma Süresi [dk]

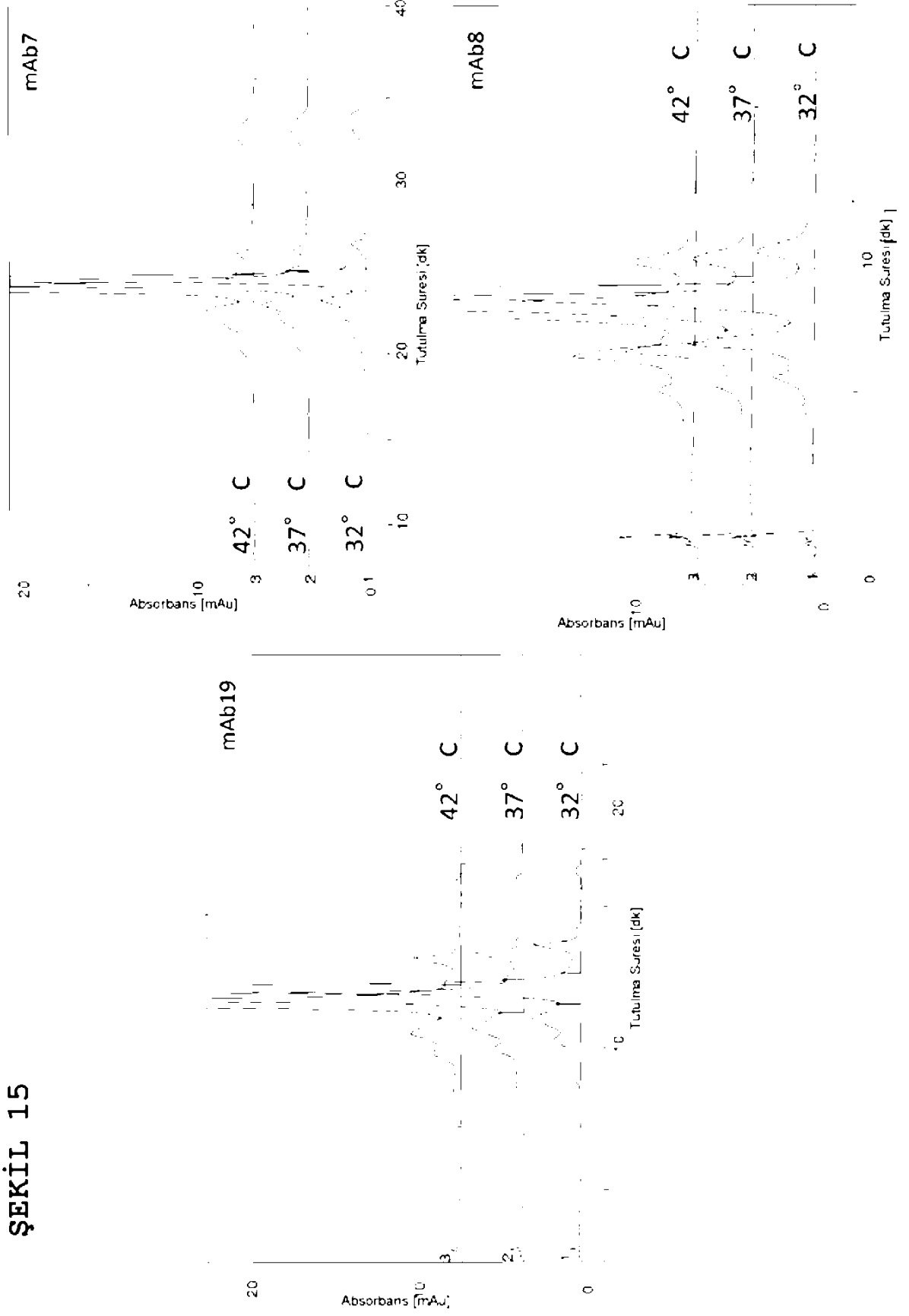
ŞEKİL 13



ŞEKİL 14

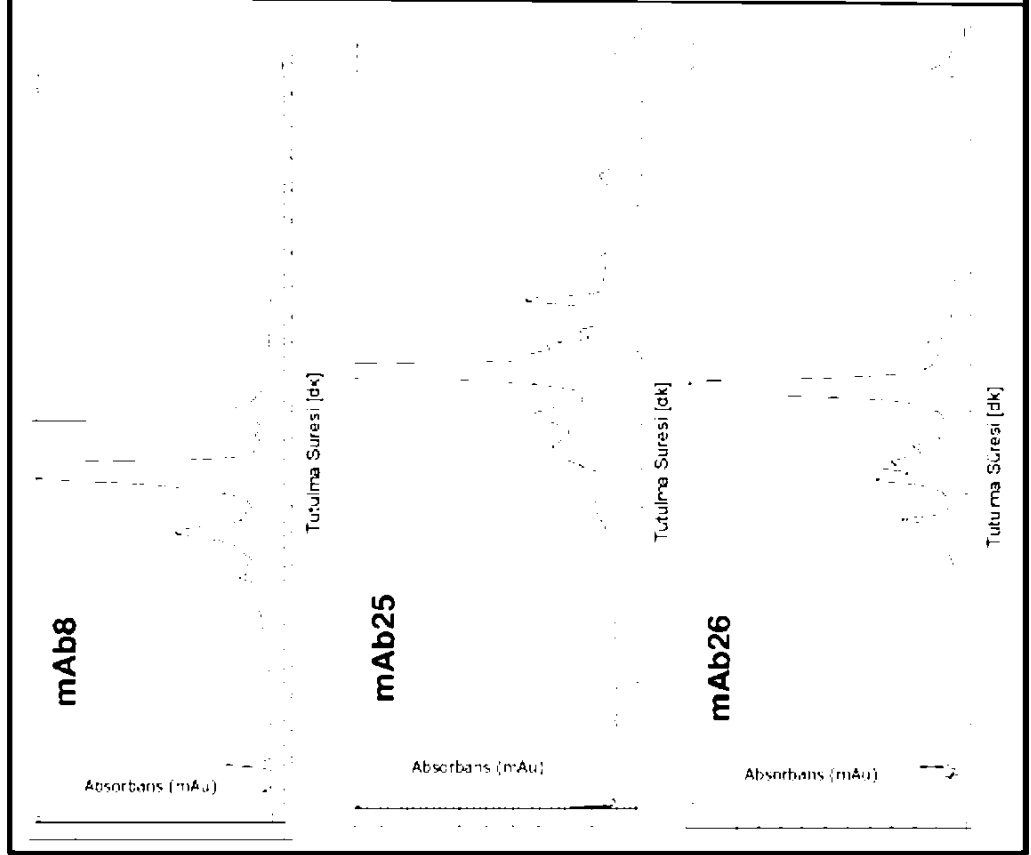


ŞEKİL 15

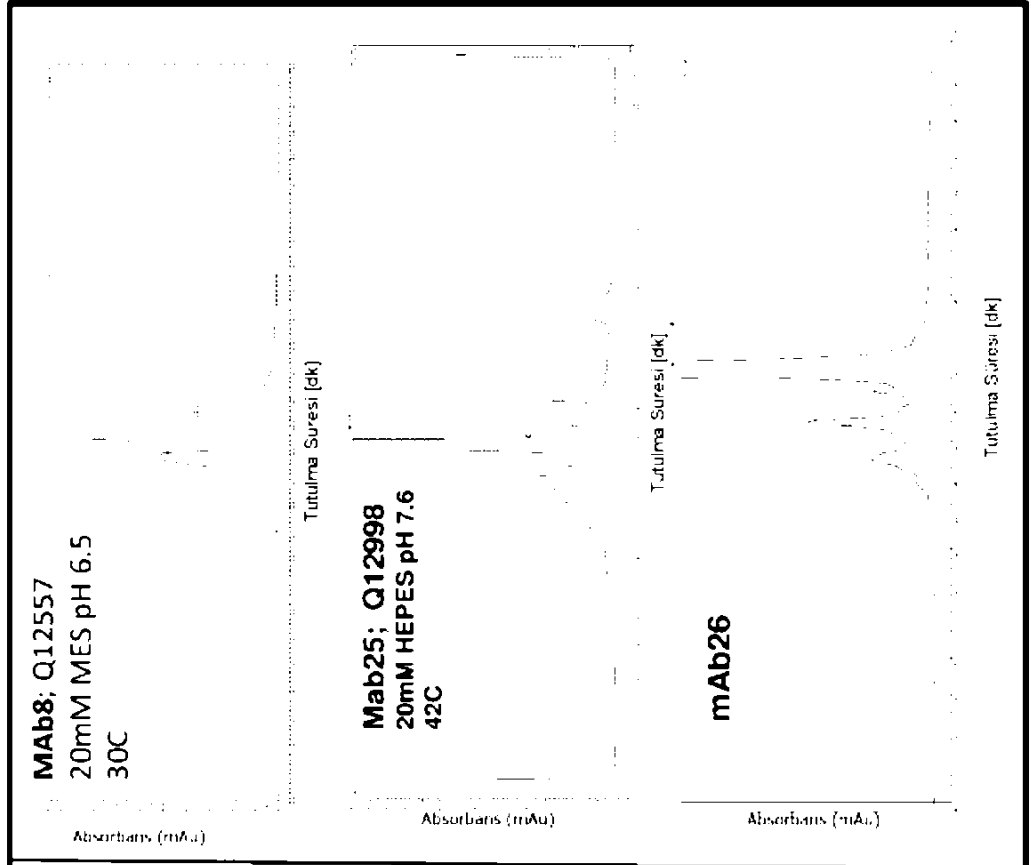


ŞEKİL 16

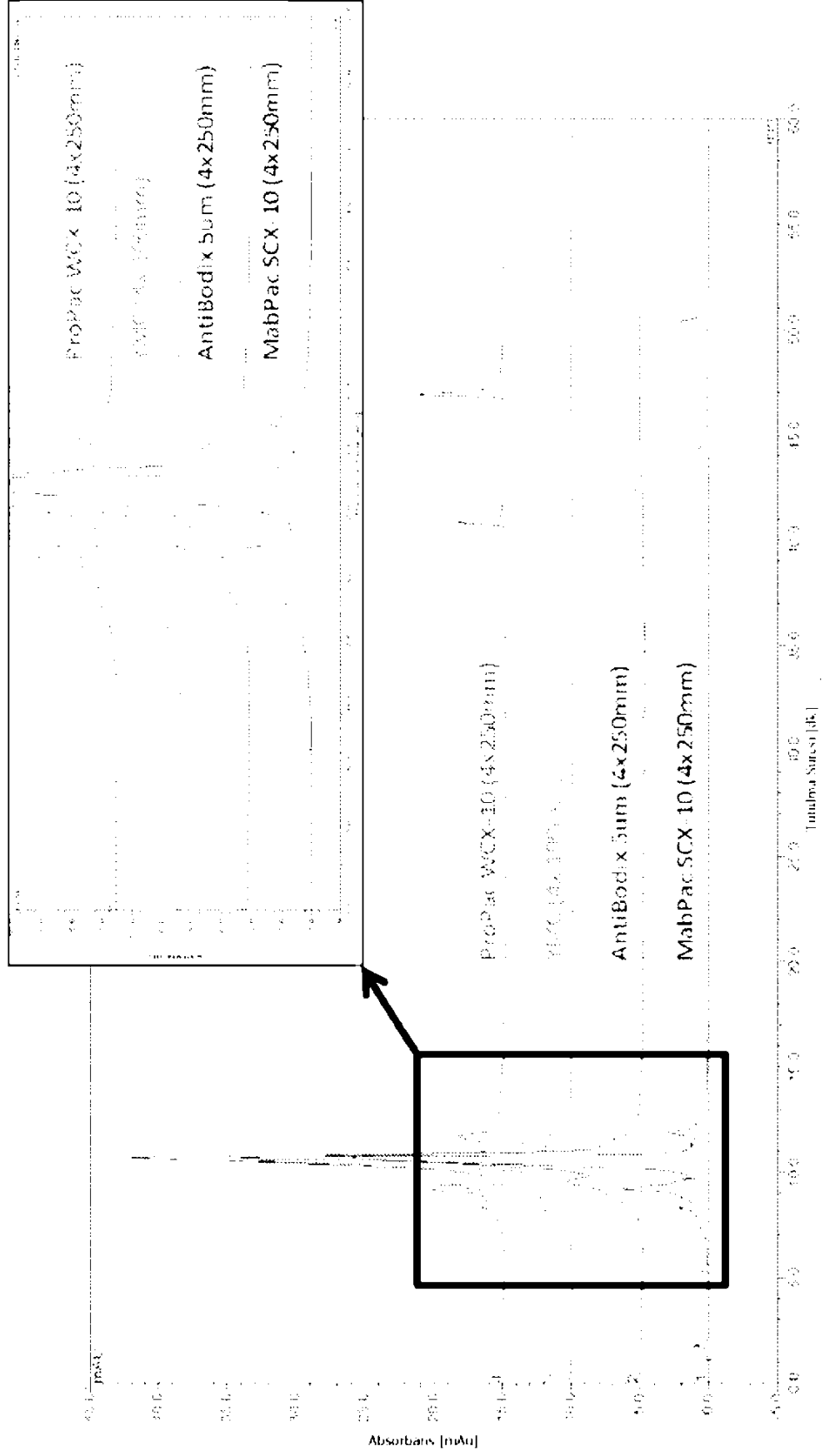
Multi ürün



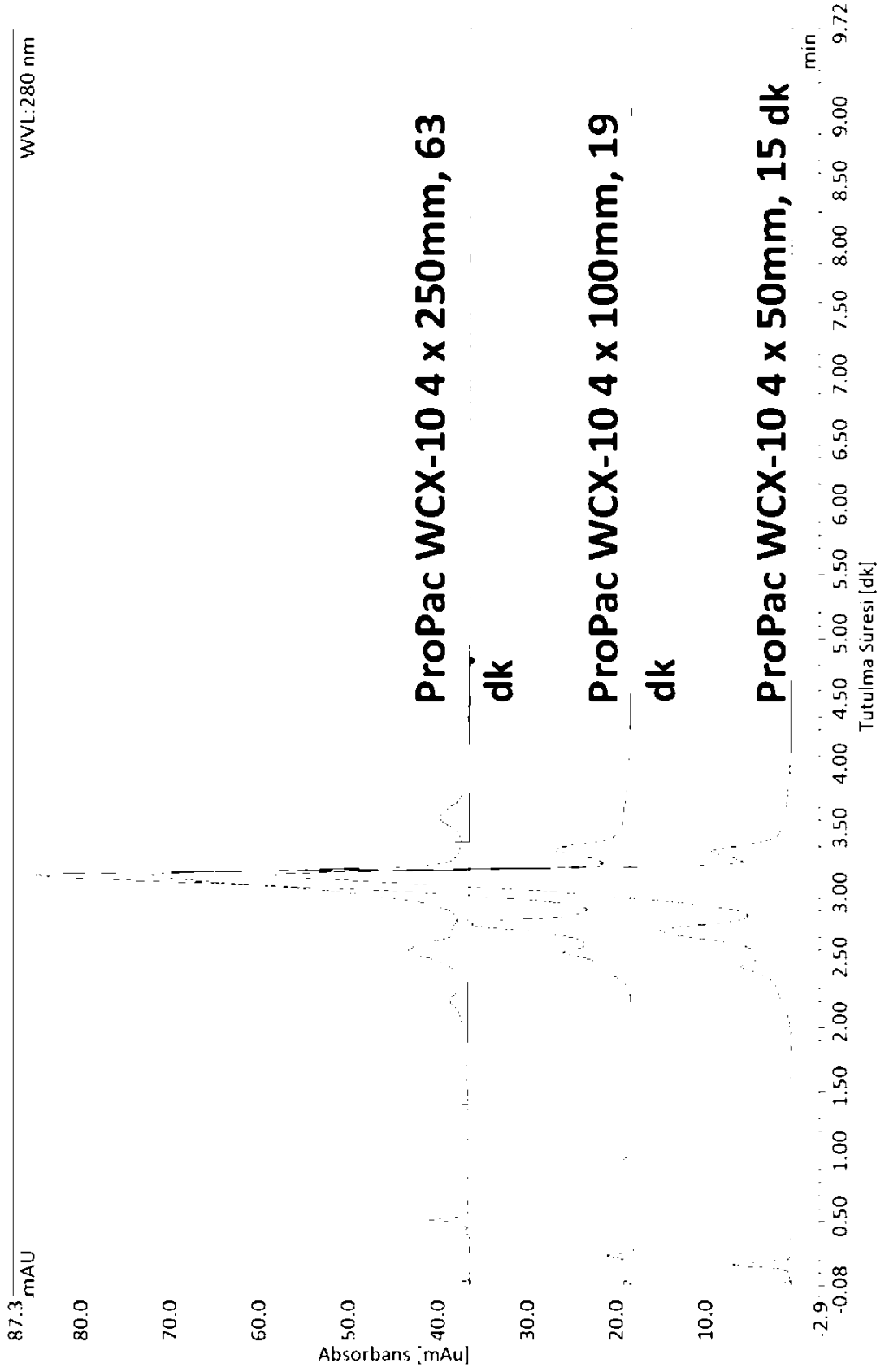
Ürüne özgü yöntem



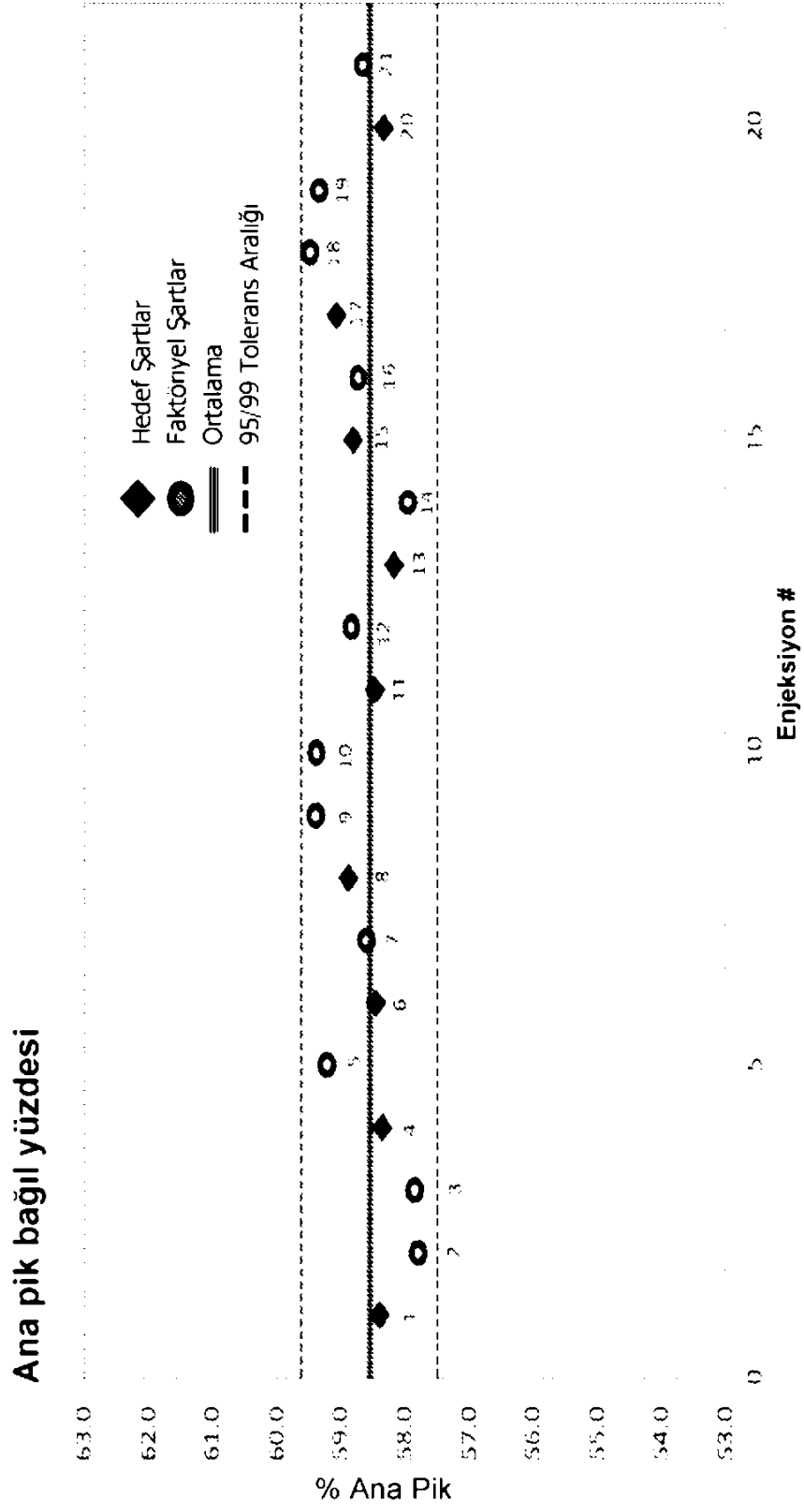
ŞEKİL 17



ŞEKİL 18

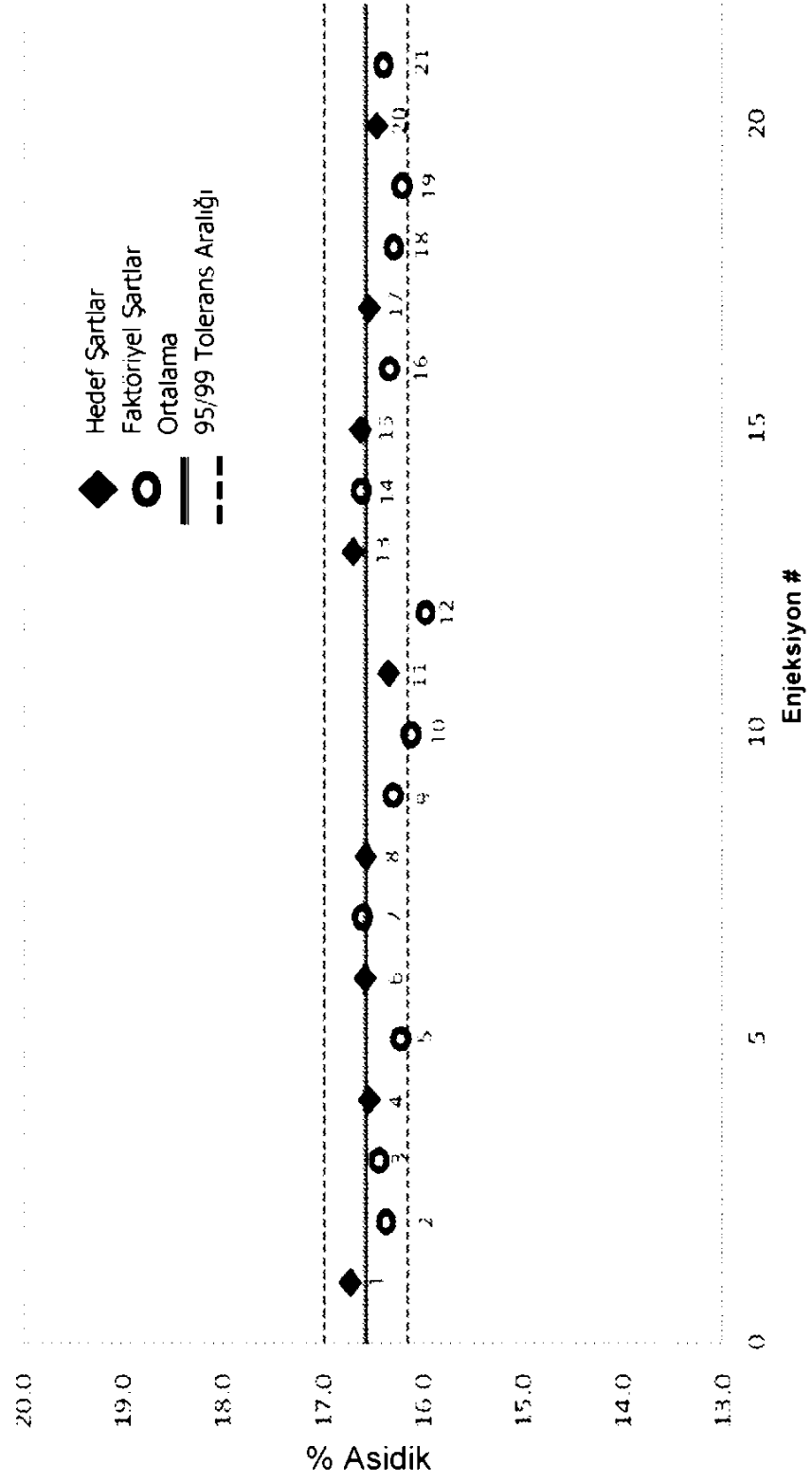


ŞEKİL 19



ŞEKİL 20

Asidik varyantlar bağıl yüzdesi



ŞEKİL 21

Bazık varyantlar bağıl yüzdesi

