

ÖZET

İMMÜNOGLOBULİNLERİN HAZIRLANMASI İÇİN YÖNTEM

- 5 Mevcut buluş, bir polieter veya glikol polimerinin varlığında %96'dan büyük veya ona eşit bir saflığa sahip bir immüno globulin başlangıç çözeltisine dayanan bir immüno globulin çözeltisinin hazırlanması için bir yöntemle ilgili olup ayırt edici özelliği şu adımları ihtiva etmesidir: a) başlangıç çözeltisine kaprilik asit veya bunun tuzlarının eklenmesi; b) a) adımında elde edilen çözeltinin pH'ının ayarlanması; c) b) adımında elde edilen çözeltinin zarflı virüslerin
- 10 inaktivasyonu için gerekli süre kadar ve sıcaklıkta inkübe edilmesi; d) c) adımında elde edilen çözelti üzerinde ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının gerçekleştirilmesi.

İSTEMLER

1. Bir polietere veya glikol polimeri valığında %96'dan büyük veya buna eşit bir saflığa sahip olacak şekilde immünoglobulin başlangıç çözeltisine dayanan bir immünoglobulin çözeltisi hazırlamaya yönelik yöntem olup, **ayrıt edici özelliği** aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir:
 - a) 9 mM ile 15 mM arasındaki bir konsantrasyonda başlangıç çözeltisine kaprilik asit veya bunun tuzlarının eklenmesi;
 - b) a) adımımda elde edilen çözeltinin pH'ının 5.0 ile 5.2 arasındaki bir pH değerine ayarlanması;
 - c) b) adımımda elde edilen çözeltinin zarflı virüslerin inaktivasyonu için gerekli süre kadar ve sıcaklıkta inkübe edilmesi; ve
 - d) c) adımımda elde edilen çözelti üzerinde bir ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının gerçekleştirilmesi.
2. İstem 1'e göre sunulan yöntem olup, **ayrıt edici özelliği** söz konusu yöntemin ayrıca d) adımımda elde edilen immünoglobulin çözeltisinin nihai formülasyonu adımımda ihtiva etmesidir.
3. İstem 1 ve 2'ye göre sunulan yöntem olup, **ayrıt edici özelliği** immünoglobulin başlangıç çözeltisinin, Cohn veya Cohn-Oncley yöntemine göre elde edilen fraksiyon I+II+III, fraksiyon II+III veya fraksiyon II'den veya Kistler-Nitschmann yöntemine veya bunun %96'dan büyük veya eşit bir IgG saflığı elde etmek için ilave olarak saflaştırılmış olan varyasyonlarına göre elde edilen A veya I+A veya GG çöktürülmesinden elde edilmesidir.
4. İstem 3'e göre sunulan yöntem olup, **ayrıt edici özelliği** immünoglobulin başlangıç çözeltisinin Cohn yöntemine veya bunun varyasyonlarına göre elde edilen, daha sonra PEG ile çöktürme ve anyonik kromatografi yoluyla saflaştırılan fraksiyon II+III'ten elde edilmesidir.
5. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayrıt edici özelliği** immünoglobulin başlangıç çözeltisinin 1 ila 10 mg/ml arasında bir immünoglobulin konsantrasyonuna sahip olmasıdır.
6. İstem 5'e göre sunulan yöntem olup, **özelliği** immünoglobulin başlangıç çözeltisinin 3 ila 7 mg/ml arasında bir immünoglobulin konsantrasyonuna sahip olmasıdır.

7. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** polieter veya glikol polimerinin polietilen glikol (PEG), polipropilen glikol (PPG) veya bunların kombinasyonlarından seçilmiş olmasıdır.
- 5 8. İstem 7'ye göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** başlangıç çözeltisindeki PEG konsantrasyonunun %2 ila %6 (a/h) arasında olmasıdır.
9. İstem 7'ye göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** başlangıç çözeltisindeki PEG konsantrasyonunun %3 ila %5 (a/h) arasında olmasıdır.
- 10 10. İstem 7 ila 9'a göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** PEG'in 4000 Da nominal moleküler ağırlığa sahip PEG olmasıdır.
11. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** b) 15 adımında elde edilen çözeltinin pH 5.1'e ayarlanmasıdır.
12. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** c) 20 adımında çözeltinin en az 10 dakika boyunca 2°C ila 37°C arasındaki bir sıcaklıkta inkübe edilmesidir.
13. İstem 12'ye göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** c) 25 adımında çözeltinin 2 saat boyunca 20°C ila 30°C arasındaki bir sıcaklıkta inkübe edilmesidir.
14. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** 25 immüoglobulin başlangıç çözeltisinin toplam proteinlere göre %1'den (a/h) az veya eşit bir albumin içeriğine sahip olmasıdır.
15. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** 30 immüoglobulin başlangıç çözeltisinin insan plazmasından elde edilmesidir.
16. İstem 1 ila 15'e göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** immüoglobulin başlangıç 35 çözeltisinin immüoglobulinlerinin genetik rekombinasyon teknikleriyle, kimyasal sentez teknikleriyle veya transgenik protein üretim teknikleriyle, veya hücre kültürleri içinde elde edilmesidir.
17. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** ultrafiltrasyon/diyafiltrasyona ait d) adımının 100 kDa'lık bir membran kullanılarak gerçekleştirilmesidir.

18. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** ultrafiltrasyon/diyafiltrasyona ait d) adımının iki aşamada gerçekleştirilmesidir:
- kaprilatın çoğunu azaltmak veya ortadan kaldırmak için pH'ın 5.0 ile 6.0 arasında bir değere ayarlandığı bir birinci aşama;
 - 5 – polietar veya glikol polimerinin çoğunu azaltmak veya elimine etmek için pH'ın 5.0'ten küçük veya buna eşit bir değere ayarlandığı bir ikinci aşama.
19. İstem 18'e göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** ultrafiltrasyon/diyafiltrasyona ait d) adımının ikinci aşamasında pH'ın 4.0 ile 5.0 arasında bir değere ayarlanmasıdır.
- 10
20. İstem 2'ye sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** nihai formülasyon adımında, bir veya daha fazla amino asit, bir veya daha fazla karbonhidrat veya poliol, veya bunların kombinasyonlarından seçilen ekspiyanlar ve/veya stabilizatörlerin eklenmesidir.
- 15
21. Önceki istemlerden herhangi birine göre sunulan yöntem olup, **ayırt edici özelliği** immünoğlobulinlerin nihai konsantrasyonunun intravenöz, intramüsküler veya subkütan kullanımına uygun bir konsantrasyona ayarlanmasıdır.
- 20

Tarifname

İMMÜNOGLOBULİNLERİN HAZIRLANMASI İÇİN YÖNTEM

5 **Buluşun İlgili Olduğu Alan**

Mevcut buluş, immüno globulinlerin hazırlanması için yeni bir yöntem ile ilgilidir. Elde edilen immüno globulin kompozisyonu, örneğin parenteral uygulama için uygundur.

Tekniğin Bilinen Durumu

10 İmmüno globulinler, omurgalıların kanında ve diğer vücut sıvılarında çözünür formda bulunabilen glikoproteinlerdir ve bağışıklık sistemi tarafından bakteriler, virüsler veya parazitler gibi yabancı cisimleri tanımlamak ve nötralize etmek için kullanılır. İmmüno globulinler hastalıkların teşhisi, terapötik tedaviler ve doğum öncesi tedavi gibi çeşitli tıbbi uygulamalara sahiptir. İmmüno globulinlerin en yaygın terapötik uygulamaları, üç genel patoloji grubuna ayrılabilir:

15 primer immün yetmezlikler (humoral immün yetmezlik), sekonder immün yetmezlikler veya edinilmiş immün yetmezlikler (örneğin, virüs enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde) ve otoimmün immün yetmezlikler (antikorların gelişimi).

İmmüno globulinler, diğerlerinin yanı sıra intramüsküler, intravenöz ve subkütan yollar gibi çeşitli yollarla uygulanabilir. Bunlardan, intravenöz yolun kullanılması tercih edilir, çünkü çok sayıda avantaj, özellikle de daha yüksek terapötik etkinlik sunar.

20

İmmüno globulinler, insan plazmasından genellikle Cohn fraksiyon yöntemine (Cohn EJ. ve diğ., J Am Chem Soc, 1946, 62, 459-475), Cohn-Oncley yöntemine (Oncley JL. ve diğ., J Am Chem Soc, 1949, 71, 541-550) veya soğuk etanol fraksiyonuna dayanan diğer eşdeğer yöntemlere, örneğin Kistler-Nitschmann yöntemine (Kistler P, Nitschmann H, 1962, 7, 414-424) dayanan prosedürler kullanılarak saflaştırılır. Bu nedenle, yukarıdaki yöntemlerden herhangi biriyle elde edilen immüno globulinler bakımından zengin fraksiyonlar (fraksiyon II+III, veya fraksiyon II veya çökelti A veya gamma globulin GG çökeltisi gibi) kullanılmaktadır. İmmüno globulinleri daha

30 ayrıntılı bir şekilde saflaştırmak (IgG) ve uygulama için, tercihen intravenöz uygulama için, tolere edilebilir hale getirmek için modifikasyonlar sunulmuştur. Söz konusu modifikasyonlar, örneğin agregatların ve diğer safsızlıkların giderilmesi ve ayrıca ürünün güvenliğinin sağlanması için sunulmuştur. Ancak, immüno globulinlerin hazırlanmasına yönelik prosedüre çoklu adımların eklenmesi, prosedürün verimini azaltır ve üretim maliyetlerini artırır. Özellikle intravenöz

35 uygulamaya yönelik immüno globulin ürünlerine artan talep, bunların endüstriyel ölçekte üretim sürecinde verime kritik bir boyut kazandırmıştır.

5 Tekniğin bilinen durumunda açıklanan yöntemlerden, intravenöz yolla tolere edilebilen immünoglobulin kompozisyonlarının elde edilmesine yönelik prosedürler, aşağıdaki adımları kullananları içerir: polietilen glikol (PEG) ile çöktürme, iyon değişim kromatografisi, viral inaktivasyon kapasitesine sahip fiziksel/kimyasal yöntemler veya immünoglobulin moleküllerinin enzimlerle işleme tabi tutulması ve kısmi kimyasal modifikasyonu.

10 Bu nedenle, patojenik biyolojik ajanları elimine etme yeteneği olan sağlam adımlar tatbik ederek ürünün güvenliğini sağlamak gereklidir. Genel olarak kullanılan yöntem, lipit zarfa sahip virüsleri etkisiz hale getirmek için bir çözücü/deterjan kullanılmasını içerir; çünkü bu, proteinlerin biyolojik aktivitesini ciddi şekilde azaltmaz. Ancak, çözücü/deterjan karışımlarının toksisitesi göz önüne alındığında, bu reaktif nihai ürün elde edilmeden önce kapsamlı bir şekilde elimine edilmelidir ve bu, proses için gereken süreyi arttırır ve verimi azaltır. Adı geçen çözücünün/deterjanın elimine edilmesi için tarif edilen prosedürler basit değildir ve genellikle kromatografi adsorpsiyon tekniklerinin doğrudan hidrofobik etkileşimle veya dolaylı olarak 15 immünoglobulinin iyon-değişimli reçinelerde yakalanması ve tutulmayan çözücünün/deterjanın ayrılması yoluyla kullanılmasını gerektirir. Her durumda, süreçler masraflı ve zahmetlidir, önemli miktarda protein kaybını içerir.

20 Bununla birlikte, virüsleri etkisiz hale getirme kabiliyetine sahip daha basit ve daha etkili alternatif tedaviler, teknikte bilinmektedir. Örneğin, kaprilik yağ asidi (aynı zamanda oktanoik asit olarak da bilinir) veya bunların tuzları kullanılmıştır.

25 US/4446134 sayılı patent dokümanında, sodyum kaprilat amino asitler ve ısıl işlem ile kombinasyon halinde faktör VIII'in hazırlanmasına yönelik bir yöntemde viral inaktivasyon prosedürü olarak kullanılmaktadır. Her ne kadar lipit membranları parçalayabilen virüsidal ajanın ayrışmamış kaprilik asit olduğu düşünülse de, adı geçen ajanı kullanan prosedür, bir asidin bir çözücüsünü ve iyonize formunu ikincinin, yani kaprilatın adıyla ifade etmek konusundaki biyokimyasal kurala uygun olarak genellikle kaprilat tarafından inaktivasyon olarak bilinir.

30 Kaprilik asit ayrıca immünoglobulinlerin saflaştırılması için bir çöktürme ajanı olarak da kullanılmıştır (Steinbuch, M. ve diğ., Arch. Biochem. Biophys., 1969, 134(2), 279-284). İmmünoglobulinlerin saflığı ve verim, esas olarak eklenen kaprilik asit konsantrasyonuna ve pH'a bağlıdır. Steinbuch, M. ve diğ. ayrıca, aralarında çöktürmenin eliminasyonunun gerçekleştirildiği iki farklı aşamada etkili bir miktarda kaprilat eklenmesinin avantajlı olduğunu belirtmektedir. Bu 35 prosedüre, immünoglobulin-olmayan proteinlerin çöktürme dağılımı sayesinde, hem zarflı hem de zarfsız virüsleri elimine etme yeteneği sağlayacaktır.

Tekniğin bilinen durumunda ayrıca, immüoglobulinlerin saflaştırılması için kaprilat ile çöktürmeyi iyon-değişim kromatografisinin izlediği kombinasyonunun açıklamaları bulunmaktadır (Steinbuch, M. ve diğ., yukarıya bakınız).

5 EP/0893450 sayılı Avrupa Patenti, IgG'nin saflaştırılması için II+III fraksiyonu (daha önce bahsedilen Cohn yöntemine dayanan prosedürlerle elde edilmiş) kullanan, çift çöktürme adımında 15-25 mM konsantrasyonda kaprilat ekleme adımlarından sonra seri olarak iki anyonik değişim kolonu içeren ve kaprilatın her iki etkisini birleştiren bir yöntem açıklamaktadır: immüoglobulin-olmayan proteinlerin çöktürme ile azaltılması ve inkübasyon yoluyla viral inaktivasyon kapasitesi. Takip eden anyonik değişim adımları diğer safsızlıkları (IgM, IgA, albümin ve diğerleri) ortadan kaldırmanın yanı sıra, kaprilatı elimine etmek için kullanılır ve bu nedenle, nispeten büyük miktarlarda anyonik reçineler kullanılarak çift adsorpsiyon gerekir.

15 W0 2005/082937 sayılı PCT patent başvurusu da, immüoglobulin içeren ve immüoglobulin ihtiva eden çözelti veya kompozisyona kaprilat ve/veya heptanoat eklenmesi ve sonrasında söz konusu çözeltinin bir kolon içerisinde anyonik değişim reçinesi ile uygulanması adımlarını ihtiva eden bir kompozisyonun hazırlanmasına yönelik bir yöntem açıklamaktadır.

20 W0 2005/073252 sayılı PCT patent başvurusunda, kaprilat kullanılarak immüoglobulinlerin hazırlanması için bir yöntem açıklanmaktadır. Ancak, başlangıç maddesinde bir polieter veya glikol polimerinin varlığından bahsedilmemektedir ve bu yöntemde ham immüoglobulin içine ilave edilmektedir.

25 Bununla birlikte mevcut buluş sahipleri, önceki teknikte tarif edildiği gibi viral inaktivasyon kapasitesiyle işlem sağlamak için uygun bir konsantrasyonda ve pH'ta (örneğin, pH 5.0-5.2) kaprilat kullanımının seyreltme ve/veya pH değişimi ile kısmen geri dönüşü olmayan yüksek moleküler ağırlıklı protein agregatlarının oluşumuna neden olduğunu fark etmişlerdir. Ayrıca, bu agregatlar filtrasyon ile sadece kısmen ayrılabilir ve bu nedenle, örneğin kromatografi veya çöktürme yoluyla, belirli bir sonraki ayrılma aşamasını gerektirir. Bu agregatların ayrılması, 30 önemli miktarda protein kaybına ve endüstriyel immüoglobulin üretim prosesi veriminde bir azalmaya neden olur.

Ek olarak mevcut buluş sahipleri, kaprilat ile işleme tabi tutulma sırasında oluşan agregatların varlığının, çok düşük seviyelerde olsa bile, optimum işlem koşulları altında bir ultrafiltrasyon 35 membranı kullanan bir ayırma aşamasının doğrudan uygulanmasıyla kaprilatın doğru şekilde ortadan kaldırılmasını engellediğini fark etmişlerdir. Bu agregatlar, kolloidlerin (bulanıklık) veya sıvı formdaki kararsızlığın varlığından dolayı immüoglobulin çözeltisinin terapötik konsantrasyonlarda (örneğin, %5 ve %20 arasında) hazırlanmasını engeller veya önler, böylece

immünoglobulinlerin hazırlanmasına yönelik yöntemin nanofiltrasyon ve sterilize edici filtrasyon gibi sonraki adımlarını engeller veya önler.

5 Yukarıdakilerin bir sonucu olarak, mevcut buluş sahipleri immünoglobulin çözeltilerinin hazırlanması için, şaşırtıcı bir şekilde, tekniğin bilinen durumunda açıklanandan daha düşük bir kaprilat konsantrasyonunda viral inaktivasyon kapasitesine sahip bir kaprilat işlemi içeren ve başlangıç çözeltilisinin uygun bir şekilde saflaştırılmış ve seyreltilmiş olduğu ve en az bir polieter veya glikol polimeri varlığında agregatların ortaya çıkmasını inhibe eden, önleyen, engelleyen veya teşvik etmeyen bir yöntem geliştirmişlerdir.

10 Ek olarak, mevcut buluş sahipleri, mevcut buluşa göre olan yöntemde en az bir polieter ya da glikol polimerinin varlığının, zarflı virüsleri etkisizleştirme kapasitesi bakımından kaprilatın aktivitesi ve etkinliğini engellemediğini keşfetmişlerdir.

15 İlave bir yönüyle, mevcut buluş sahipleri immünoglobulinlerin elde edilmesi için ilk kez, optimum koşullar altında inaktivasyon kapasitesine sahip işlemi dahil etmesinin yanı sıra, ultrafiltrasyon tekniğinin kullanılmasıyla kaprilat ve polieter veya glikol polimeri reaktiflerinin (daha önce söz konusu işlem sırasında mevcut olan) ortadan kaldırılması veya azaltılması olasılığını kapsayan bir yöntem tarif etmektedir. Bu ultrafiltrasyon aşaması, nihai üründe immünoglobulin protein
20 agregatları üretmeden ürünün, örneğin intravenöz, intramüsküler veya subkütan yoldan uygulanması için tolere edilebilir seviyelerde saflaştırılmasını ve konsantre edilmesini mümkün kılar. Bu, kaprilat ile işlemden sonra örneğin kromatografi gibi ilave ayırma adımları sunulması ihtiyacını ortadan kaldırır. Ayrıca, ultrafiltrasyondan sonra kalan polieter veya glikol polimeri ve kaprilat seviyeleri, doğru bir şekilde formüle edildiklerinde sıvı formda muhafaza edilmeleri
25 sırasında destabilize olmayan $20 \pm 2\%$ 'ye kadar immünoglobulin, örneğin IgG, konsantrasyonları elde etmeyi mümkün kılar.

Mevcut buluşa göre olan yöntemin basitleştirmesi göz önüne alındığında, bu, tekniğin biline
30 durumunda tarif edilen önceki yöntemlerle karşılaştırıldığında, ürünün güvenliği veya saflığından ödün vermeden, verimi önemli ölçüde arttırmayı ve üretim maliyetlerini büyük ölçüde azaltmayı mümkün kılar.

Bu nedenle, ilk yönüyle mevcut buluş, bir immünoglobulin çözeltilisinin hazırlanması için, kaprilik asit veya bunun tuzlarının en az bir polieter veya glikol polimerinin varlığında saflaştırılmış
35 immünoglobulin çözeltilisine eklenmesini ve söz konusu reaktiflerin ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon yoluyla sonraki ortadan kaldırılması veya azaltılmasını ihtiva eden bir yöntem ile ilgilidir.

Daha ileri bir yönüyle mevcut buluş, protein üretim süreçlerinde viral inaktivasyon için kullanılan kaprilik asit veya bunun tuzlarının ve/veya polietir veya glkol polimeri seviyelerinin ortadan kaldırılması veya azaltılması için tek bir ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon aşamasının uygulanması ile ilgilidir.

5 Bu nedenle mevcut buluş, bir immünoglobulin çözeltisinin hazırlanması için bir polietir veya glkol polimerinin varlığında %96'dan büyük veya eşit bir saflığa sahip bir immünoglobulin başlangıç çözeltisine dayanan, aşağıdaki adımları ihtiva eden bir yöntem açıklamaktadır:

a) başlangıç çözeltisine kaprilik asit veya bunun tuzlarının eklenmesi;

10 b) a) adımımda elde edilen çözeltinin pH'ının ayarlanması;

c) b) adımımda elde edilen çözeltinin zarflı virüslerin inaktivasyonu için gerekli olan süre boyunca ve sıcaklıkta inkübe edilmesi; ve

d) c) adımımda elde edilen çözelti üzerinde bir ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon aşamasının gerçekleştirilmesi.

15 Mevcut buluşa göre olan yöntem ayrıca d) adımımda elde edilen çözeltinin nihai formülasyonu adımımda da ihtiva edebilir.

Mevcut buluşa göre olan yöntemde, immünoglobulin başlangıç çözeltisi, Cohn veya Cohn-Oncley yöntemine göre elde edilen fraksiyon I+II+III, fraksiyon II+III veya fraksiyon II'den veya Kistler-Nitschmann yöntemine veya bunun %96'dan büyük veya eşit bir IgG saflığı elde etmek için ilave olarak saflaştırılmış olan varyasyonlarına göre elde edilen A veya I+A veya GG çökteltisinden türetilir. Tercihen, immünoglobulin başlangıç çözeltisi Cohn yöntemine veya bunun varyasyonlarına göre elde edilen, daha sonra EP 1225180 B1 dokümanında tarif edildiği gibi PEG ile çöktürme ve anyonik kromatografi ile saflaştırılan II+III fraksiyonundan türetilir. Mevcut patente göre, yukarıdaki fraksiyonların herhangi biri PEG kullanılarak bir çöktürme işlemine tabi tutulabilir, ardından çökteltiyi ortadan kaldırmak için filtrasyon ve iyonik değişim kolonu (örneğin, DEAE Sepharose ile bir kolon) kullanılarak ilave bir saflaştırma aşaması izleyebilir. Tüm bu durumlarda, immünoglobulin başlangıç çözeltisi insan plazmasından elde edilir.

30 En çok tercih edilen yapılanmada, immünoglobulin başlangıç çözeltisi, Cohn yöntemine dayalı prosedürlerle elde edilen ve mevcut buluşun çöktürücü olmayan koşullarında kaprilat ile işleme maruz kalmaya yeterli seviyede saflaştırma, yani toplam proteinlere göre tercihen %1'den (a/h) az veya eşit albumin miktarı ile selüloz asetat içerisinde elektroforez ile belirlenen %96'dan (a/h) büyük veya eşit IgG saflık değeri, elde etmek için tekniğin bilinen durumunda tarif edilen yöntemlerden herhangi biriyle ilave olarak saflaştırılan II+III fraksiyonundan türetilir. Dolayısıyla söz konusu immünoglobulin başlangıç çözeltisi, kaprilat ile işleme tabi tutulmadan önce ve sonra,

amaçlandığı terapötik uygulama yolu için yeterince saflaştırılır, böylece mevcut buluşun viral inaktivasyon kapasitesine sahip aşamasından sonra ilave bir saflaştırma gerekmez.

5 Mevcut buluşa göre olan yöntemin başlangıç çözeltisinin immüno globulinleri ayrıca genetik rekombinasyon teknikleriyle, örneğin hücre kültürlerinde ekspresyon yoluyla; kimyasal sentez teknikleriyle; veya transgenik protein üretim teknikleriyle elde edilebilir.

10 En çok tercih edilen yapılanmada, mevcut buluşa göre olan yöntemde bahsedilen immüno globulinler, IgG'lerdir. Söz konusu IgG'lerin monoklonal veya poliklonal olma ihtimali kapsamaktadır. En çok tercih edilen yapılanmada, IgG'ler poliklonaldır.

15 Mevcut buluşun polieterlerinin veya glikol polimerlerinin poliglikoller olarak da bilinen alkan polieterleri veya polialkan oksitleri olabileceği ve örneğin, daha çok polietilen glikol (PEG) veya polipropilen glikol (PPG) olarak bilinen etil veya etilen ve propil veya propilen türevlerini veya bunların eşdeğerlerini ifade edebileceği düşünülmektedir. Ek olarak, söz konusu reaktifler immüno globulinlerle, stabiliteyi veya çözünürlüklerini tehlikeye atmamaları ve büyüklüklerinden dolayı, ultrafiltrasyon teknikleriyle uygun bir şekilde elimine edilmeleri veya düşük toksisiteyi nedeniyle immüno globulinlerin terapötik kullanımıyla geçimli olmaları anlamlarında uyumlu olmalıdırlar.

20 Tercih edilen bir yapılanmada, polieter veya glikol polimeri, polietilen glikol (PEG), polipropilen glikol (PPG) veya bunların kombinasyonlarından seçilir. Tercihen, polieter veya glikol polimeri PEG'dir, daha çok tercihen 3350 Da ila 4000 Da arasında bir nominal moleküler ağırlığa sahip bir PEG'dir ve en çok tercihen 4000 Da nominal moleküler ağırlığa sahip bir PEG'dir.

25 Yukarıda sözü edilen polieter veya glikol polimerinin immüno globulin başlangıç çözeltisi içindeki miktarı tercihen %2 ila %6 (a/h) ve daha çok tercihen %3 ila %5 (a/h) arasındadır.

30 İmmüno globulin başlangıç çözeltisi içerisindeki söz konusu polieter veya glikol polimerinin konsantrasyonunun ayarlanmasının gerekli olabileceği düşünülmektedir. Söz konusu polieter veya glikol polimerinin söz konusu ayarlanması, saflaştırılmış başlangıç immüno globulin çözeltisinin seyreltilmesi ve/veya aynısının eklenmesi yoluyla gerçekleştirilebilir.

35 İmmüno globulin başlangıç çözeltisinin kompozisyonuna göre, mevcut buluşa göre olan yöntemin a) adımıdan önce, örneğin, aşağıdaki gibi bir dizi saflaştırma veya konsantrasyon ayarlama adımının gerçekleştirilmesi düşünülmektedir:

- immüoglobulin konsantrasyonunun 1 ila 10 mg/ml, daha tercihen 3 ila 7 mg/ml olarak ayarlanması. Bu ayarlama, tekniğin bilinen durumunda bilinen prosedürlerin herhangi biri ile, örneğin proteinin belirlenmiş aralığa (örneğin, 280 nm'de E(%1) = 13.8 - 14.0 UA toplam proteine göre optik yoğunluk yoluyla, Biuret yöntemiyle, Bradford yöntemiyle veya spesifik olarak immüonefometri ile belirlenir) kadar duruma göre seyreltilmesi veya konsantre edilmesiyle gerçekleştirilebilir. Bu nedenle, tercih edilen bir yapılanmada, immüoglobulin başlangıç çözeltisi, tercihen 1 ila 10 mg/ml arasında ve daha fazla tercihen 3 ila 7 mg/ml arasında bir immüoglobulin konsantrasyonuna sahiptir; ve/veya
- immüoglobulin çözeltisinin toplam proteinlere göre tercihen en az %96 IgG'ye ulaşması gereken saflığının ayarlanması. Bu saflaştırma, örneğin PEG ile çöktürme ve filtrasyon ve sonraki anyonik değişim kromatografisi (DEAE Sepharose) gibi teknikte uzman bir kişi tarafından tam olarak bilinen tekniklerle gerçekleştirilebilir.

Mevcut buluşa göre olan yöntemin a) adımında, kaprilik asit veya bunun tuzları, tercihen 9 mM ve 15 mM arasında bir nihai konsantrasyon elde etmek için, ayısının örneğin 1.5M ila 2.5M arasında konsantre edilmiş çözeltisi kullanılarak eklenir.

Tercih edilen bir yapılanmada, b) adımında, elde edilen çözelti, 5.0 ve 5.2 arasında bir pH'a, daha tercihen 5.1'e ayarlanmaktadır.

Tercih edilen bir yapılanmada, c) adımında, elde edilen çözelti en az 10 dakika, daha tercihen 1 ila 2 saat arasında ve daha da tercihen 2 saat inkübe edilir. Ek olarak, söz konusu inkübasyonun gerçekleştirildiği sıcaklık 2°C ila 37°C arasında, daha tercihen 20°C ila 30°C arasındadır.

Tercih edilen bir yapılanmada, mevcut buluşa göre olan yöntemin d) adımından önce, söz konusu c) adımında elde edilen çözeltideki yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin veya agregatların miktarı %0.2'ye eşit veya daha azdır ve daha tercihen %0.1'den daha azdır. İmmüoglobulinlerin polimerleri veya moleküler agregatlarının toplam proteinlere göre bu yüzdesi, 280 nm'deki optik yoğunluk değerine göre dışlama HPLC jel kolonu ile belirlenir. İmmüoglobulin polimerleri veya moleküler agregatlarının söz konusu yüzdesi, örneğin Avrupa Farmakopesi'nin intravenöz gamaglobulin üzerine monografisinde açıklanan analiz yöntemi kullanılarak ölçülebilir.

Tercihen, immüoglobulin çözeltisi ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun d) adımının gerçekleştirilmesinden önce derinlik filtreleri kullanılarak arıtılır.

Adım d)'ye göre, tercihen, mevcut buluşa göre olan yöntemdeki ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun hacmin azaltılmasıyla ilk diyafiltrasyon ve konsantrasyon aşamalarına, ardından sabit hacimde diyafiltrasyon uygulamasına sahip olduğu düşünülmektedir.

- Ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon, tercihen eşzamanlı diyaliz ve konsantrasyon yöntemiyle sırasıyla ürünün hacmi düşürülerek ve diyafiltrasyon yapılarak endüstriyel ölçekte gerçekleştirilebilir, böylece protein konsantrasyonunun optimum olduğu ve tercihen 30 mg/ml'ye eşit veya daha küçük olduğu göz önüne alındığında reaktiflerin tüketimi biraz daha düşüktür ve işlem daha verimli olur. Her halükarda, teknikte uzman bir kişi, bu ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımını gerçekleştirirken en uygun ve pratik yolunu kolaylıkla belirleyebilir, tekniğin bilinen durumunda bilinen çeşitli işletim prosedürleri arasından seçim yapabilir (örneğin, seyreltme/konsantrasyon veya diyafiltrasyon/konsantrasyon, sabit hacimde diyafiltrasyon veya yukarıdakilerin modifikasyonları ve kombinasyonları).
- 10 Mevcut buluşa göre olan yöntemin d) adımında kullanılan ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon membranı tercihen polisülfon, rejenere selüloz veya örneğin Biomax® (Millipore, ABD), Omega® (Pall, ABD), Kvik-flow® (General Electric, ABD) markaları altında pazarlanan membranlar gibi muadillerinden oluşur. Bununla birlikte, membran için seçilen moleküler ağırlık kesimi çeşitli
- 15 faktörlere, örneğin tercih edilen üreticiye bağlı olarak değişebilir. Teknikte uzman bir kişi, örneğin işlem görecektir çözelti içerisindeki kaprilat ve polietilen veya gliserol polimerinin konsantrasyonuna bağlı olarak her bir vakanın ihtiyaçlarına göre ayarlanacak olan tercih edilen membranı kolayca belirleyebilir.
- 20 Tercihen, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun d) adımı, 100kDa'ya eşit veya daha az, daha tercihen 100 kDa'ya eşit moleküler ağırlık kesimine sahip bir membran vasıtasıyla gerçekleştirilir.
- En çok tercih edilen yapılanmada, d) aşamasının ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonu iki aşamada gerçekleştirilir:
- 25 kaprilatın çoğunu azaltmak veya ortadan kaldırmak için pH'ın 5.0 ile 6.0 arasında ayarlandığı bir birinci aşama ve pH'ın polietilen veya gliserol polimerinin çoğunu azaltmak veya elimine etmek için 5.0'in altında, tercihen 4.0 ile 5.0 arasında bir pH'a ayarlandığı bir ikinci aşama.
- Tercih edilen bir yapılanmada, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının birinci aşamasında diyafiltrasyon, örneğin asetik asit gibi karboksilik asidin alkalik tuzlarını ihtiva eden bir diyafiltrasyon ortamı kullanılarak yaklaşık olarak 5 mM'den daha büyük veya buna eşit bir konsantrasyonda gerçekleştirilir. En çok tercih edilen yapılanmada, söz konusu diyafiltrasyon, yukarıda belirtilen pH'a, yani 5.0 ile 6.0 arasına, ayarlanmış 5 mM'den daha büyük veya buna eşit bir konsantrasyonda sodyum asetat çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilir.
- 35 Ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun d) adımının birinci aşamasında gerçekleştirilecek olan diyafiltrasyon hacimlerinin sayısı, teknikte uzman bir kişi tarafından başlangıçta kullanılan kaprilat miktarına ve kabul edilebilir nihai miktara göre kolaylıkla belirlenebilir. Tercihen, en az

- 5 üç diyafiltrasyon ortamı hacmi kullanılır, söz konusu diyafiltrasyon ortamı tercihen daha önce belirtildiği gibi, pH 5.0-6.0'da 5 mM'lik bir sodyum asetat çözeltisidir. Tercihen, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun bu birinci aşamasında, başlangıçtaki kaprilatın yaklaşık %90'ı veya daha fazlası elimine edilir, böylece bu birinci aşamada kaprilat konsantrasyonu yaklaşık 1 mM veya daha azına düşürülür.
- Ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun d) adımının ikinci aşamasında immünoglobulin çözeltisi, tercihen sabit hacimde, diyafiltre edilir.
- 10 Tercihen, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun bahsedilen ikinci aşamasındaki diyafiltrasyon, asetat, fosfat veya eşdeğerleri, veya amino asitler ve/veya polioller, örneğin glisin ve/veya sorbitol tarafından oluşturulan alkali metal tuzlarını içeren bir tamponlanmış çözelti kullanılarak daha önce belirtilen pH değerinde gerçekleştirilir.
- 15 Diyafiltrasyonun birinci aşamasında olduğu gibi, ikinci aşamada, mevcut buluşa göre olan yöntemde kullanılan polieter veya glikol polimerini uygun şekilde azaltmak için kullanılan diyaliz hacimlerinin sayısı, teknikte bir kişi tarafından polieterin veya glikol polimerinin gerekli azaltılmasını veya yok edilmesini dikkate alarak kolayca belirlenebilir. Tercih edilen bir yapılanmada, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun d) adımının ikinci aşamasının diyafiltrasyonunda
- 20 değiştirilecek olan tampon miktarı altı hacme eşit veya daha fazladır. En çok tercih edilen yapılanmada, söz konusu ikinci aşamada değişim, polieter veya glikol polimerinde söz konusu polieter veya glikol polimerinin ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun d) adımına geçmeden önceki başlangıç miktarının 100 katına eşit veya ondan daha fazla bir azalma elde etmek için gerekli olan tampon hacimleri sayısına göre gerçekleştirilir.
- 25 Kaprilat ve polieter veya glikol polimeri ultrafiltrasyon/diyafiltrasyonun d) adımında azaltıldıktan sonra, daha önce belirtilen nihai formülasyon adımında, çözelti nihai formülasyonu elde etmek için ürünü konsantre etmek üzere gerekli ekşiyanlar ve/veya stabilizatörler eklenerek istenen nihai kompozisyona ayarlanabilir. Nihai formülasyondan sonra
- 30 gerçekleştirilecek ekşiyanların ve/veya stabilizatörlerin eklenmesi, doğrudan adı geçen ekşiyanların ve/veya stabilizatörlerin katı halde veya konsantre bir çözeltide eklenmesiyle veya daha da tercihen, nihai ürünün uygun kompozisyonunu sağlamak için bir formülasyon çözeltisinin gerekli sayıda değişim hacmini kullanan diyafiltrasyon vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.
- 35 Başka bir yapılanmada, ekşiyanların ve/veya stabilizatörlerin eklenmesi, d) adımının ikinci aşamasında kullanılan sodyum asetat diyaliz tampon çözeltisinin tamamen veya kısmen ekşiyanları ve/veya stabilizatörleri ihtiva eden, tercihen 4.0 ve 5.0 arasındaki aynı pH değerine

ayarlanmış, böylece nihai konsantrasyondan sonra immünoglobulinin formüle edilmiş olduğu bir çözelti ile değiştirilmesi ile gerçekleştirilebilir.

5 Teknikte uzman bir kişi, arzu edilen bir stabiliteye ulaşmak için hangi tip ekspiyanların ve/veya stabilizatörlerin eklenmesi gerektiğini bilir. Örneğin, söz konusu ekspiyanların ve/veya stabilizatörlerin bir veya daha fazla amino asit, örneğin glisin, tercihen 0,2 ila 0,3 M arasında bir konsantrasyonda; bir veya daha fazla karbonhidrat veya poliol, örneğin sorbitol; veya bunların kombinasyonları olabileceği öngörülmektedir.

10 Son olarak, immünoglobulinlerin, tercihen IgG'lerin nihai konsantrasyonu, teknikte uzman bir kişi tarafından bilinecek ve örneğin %5 ila %22 (a/h) arasında olabilen intravenöz, intramüsküler veya subkütan kullanımına uygun bir konsantrasyona ayarlanır. Söz konusu konsantrasyon, teknikte bilinen herhangi bir prosedürle, örneğin ultrafiltrasyonla konsantrasyon ile gerçekleştirilir. İmmünoglobulin konsantrasyonunun ultrafiltrasyondan etkilenmesi durumunda, 15 söz konusu konsantrasyonun önceki diyafiltrasyondaki aynı membran kullanılarak gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir. Açıkça, belirtilen üç diyafiltrasyonun yanı sıra konsantrasyon da farklı membranlar kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Mevcut buluşa göre olan yöntem ayrıca, ürünün güvenlik marjını arttırmak için bir nanofiltrasyon 20 adımı sunma olasılığını da kapsamaktadır. Ürünün ticari olarak temin edilebilir filtrelerle (örneğin, Asahi-Kasei tarafından yapılan Planova® ve Bioex®, Pall tarafından yapılan DV® ve SV4®, Sartorius tarafından yapılan Virosart®, Millipore tarafından yapılan Vpro®) nanofiltre edilebildiği, gözenek boyutları 20 nm veya daha az ve 50 nm'ye kadar, tercihen 20 nm veya daha az gözenek boyutuna sahip veya hatta 15 nm'lik nanofiltrelerin kullanıldığı prosedürde birçok 25 aşama vardır. Bir nanofiltrasyon adımının gerçekleştirilebildiği ara adımlar, örneğin, immünoglobulin başlangıç çözeltisinde; veya ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımından sonra kaprilat ile işleme tabi tutulan maddede (kaprilat ve polieter veya glikol polimeri azaldıktan sonra); veya immünoglobulin çözeltisini, tercihen IgG'leri (nihai ürün) konsantre ve formüle ettikten sonraki maddededir. Teknikte uzman bir kişi, diğer şeylerin yanı sıra, membranın 30 gözenek büyüklüğüne, prosedürün süresine göre gereken filtreleme alanına, nanofiltrelenecek ürünün hacmine ve protein geri kazanımına bağlı olarak en iyi seçeneği seçecektir.

Mevcut buluşa göre yöntem ile elde edilen nihai ürün, izohemaglutininlerin içeriği ile ilgili Avrupa Farmakope kriterlerine tam olarak uymaktadır. Bununla birlikte, mevcut buluşa göre olan yöntem 35 ayrıca, indirgenmelerini maksimuma çıkarmak için anti-A ve/veya anti-B kan antikorlarının seçici ve spesifik bir yakalanması adımını dahil etme seçeneğini de kapsar. Bu adım tercihen, tekniğin biline durumunda tarif edildiği gibi biyospesifik afinite reçineleri kullanılarak gerçekleştirilir.

Örneğin, trisakaritler tarafından oluşturulan ligandlara sahip biyospesifik afinite reçineleri kullanılarak, izohemaglutininlerin seviyesinde önemli bir azalma elde edilebilir (Spalter ve diğ., Blood, 1999, 93, 4418-4424). Bu ilave yakalama, isteğe bağlı olarak, teknikte uzman kişinin takdiriyle, mevcut buluşa ait yöntemin herhangi bir aşamasında dahil edilebilir veya mevcut buluşa ait yöntem gerçekleştirilmeden önce veya sonra yapılabilir.

Bu nedenle, mevcut buluşa göre olan bir immünoglobulin çözeltisinin hazırlanmasına yönelik yönteme ilişkin olarak, en çok tercih edilen yapılanmada, IgG'lerin %96'sına eşit veya bundan daha büyük bir saflığa sahip olan bir immünoglobulin başlangıç çözeltisi kullanılır. Bu çözelti, tercihen 1 mg/ml ila 10 mg/ml arasında ve tercihen 3 mg/ml ila 7 mg/ml arasında, %4 ± 1 (a/h) konsantrasyonuna kadar PEG içeren (önceki adımlardaki ekleme ile) veya eklenen bir IgG konsantrasyonuna ayarlanır. Çözeltinin pH'ı daha sonra asetik asit ile 5.0 ila 5.2 arasında bir değere ayarlanır ve sodyum kaprilat eklenir (örneğin, söz konusu sodyum kaprilatın konsantre bir çözeltisi kullanılarak). Tercih edilen yapılanmada, konsantre kaprilat çözeltisi, IgG'nin saflaştırılmış çözeltisine yavaşça ve çalkalanarak ilave edilir. Ürünü 9 ila 15 mM nihai kaprilat konsantrasyonuna getirmek için hesaplanan tüm kaprilatı ilave ettikten sonra, nihai pH, gerekirse, 5.0 ve 5.2 arasında bir değere ayarlanır, ve çözelti tercihen 2-37°C arasında bir sıcaklıkta, ve daha çok tercihen 25 ± 5 ° C sıcaklıkta, en az 10 dakika ve tercihen 1 ila 2 saat boyunca inkübe edilir.

Aritma daha sonra derinlik filtreleri (örneğin, Cuno 90LA, 50LA, Seitz EK, EK-1, EKS veya eşdeğerleri) kullanılarak gerçekleştirilir.

Bu şekilde elde edilen çözelti daha sonra polisülfon ihtiva eden membranlar, örneğin tercihen istiflelenebilir bir kaset formundaki Millipore tarafından yapılan Biomax® veya Pall'dan Omega®, tarafından oluşturulan bir ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon cihazı vasıtasıyla işleme tabi tutulur. Çözelti her bir ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon ünitesinden, tercihen yaklaşık 100-500 L/sa arasında bir hacimde ve 5 ± 3°C'lik bir sıcaklıkta tekrar dolaştırılır. Giriş ve çıkış basınçları arasındaki basınç düşüşü (atmosferik basınç) tercihen 1 ila 3 bar arasındadır. Daha sonra, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının birinci diyafiltrasyon aşaması, tercihen 5mM'e eşit veya daha büyük bir konsantrasyonda ve 5.0 ila 6.0 arasında bir pH'ta bir sodyum asetat çözeltisi ile oluşturulan tercihen en az üç tampon hacmi değişimi uygulanarak, kaprilatı ortadan kaldırmak için başlatılır. Tercihen, eklenen veya tüketilen her bir tampon hacmi ile, ürün çözeltisinin hacmi, son ekleme hariç, başlangıç hacminin yarısına düşürülür.

Diyafiltrasyonun ilk aşamasından sonra (seyreltme ve konsantrasyon veya eşdeğeri ile) elde edilen çözeltinin pH'ı, örneğin asetik asit kullanılarak 4.0 ile 5.0 arasına ayarlanır. Daha sonra sabit hacimde diyafiltrasyon, tercihen, 5 mM'ye eşit veya daha büyük bir konsantrasyonda ve 4.0

ile 5.0 arasında bir pH'taki sodyum asetat tarafından oluşturulan bir tampon çözeltinin altı veya daha fazla hacmi kullanılarak başlatılır.

5 Sodyum asetat ile oluşturulan yukarıda belirtilen diyaliz tampon çözeltisi isteğe bağlı olarak tamamen veya kısmen, tercihen 4.0 ve 5.0 arasındaki aynı pH değerine ayarlanmış, böylece nihai konsantrasyondan sonra immünooglobulinin formüle edilmiş olduğu bir amino asit çözeltisi, örneğin 0.2-0.3 M konsantrasyonda, isteğe bağlı olarak karbonhidratlar ve polioller, örneğin sorbitol ile birleştirilen glisin çözeltisi ile değiştirilebilir.

10 Yukarıda bahsedilen diyaliz çözeltilerinin tercihen en az altı hacmini (daha tercihen altı ila on hacmini) 4.0 ila 5.0 arasında bir pH'ta uyguladıktan sonra, eğer henüz durum bu değilse, ürün ekspiyan/lar ve/veya stabilizatör/lerin, örneğin glisin veya diğer amino asitlerin, karbonhidratların, örneğin sorbitolün veya bunların bir kombinasyonunun, hazırlanan çözeltiliye katı halde veya söz konusu ekspiyan/lar ve/veya stabilizatör/lerin konsantre bir çözeltisi
15 formunda doğrudan eklenmesiyle formüle edilebilir. Daha sonra, hacim azaltma ile elde edilen IgG çözeltisi, intravenöz, intramüsküler veya subkütan kullanım için uygun IgG konsantrasyonunu elde etmek üzere konsantre edilir.

20 Ekspiyan/lar ve/veya stabilizatör/lerin konsantrasyonuna ve pH'a göre uygun şekilde ayarlanan söz konusu konsantre çözelti, 0.2 µm gözenek boyutuna sahip filtreler kullanılarak mutlak filtreleme ile uygulanır ve isteğe bağlı olarak nanofiltrelenir. Son olarak, IgG'lerin çözeltisi enjekte edilebilir preparasyonlarda, ampullerde, flakonlarda, şişelerde veya daha sonra hava geçirmez bir biçimde kapatılan diğer cam kaplarda aseptik olarak dozlanır. Başka bir seçenek, örneğin torbalar veya şişeler gibi uyumlu sert veya esnek plastik kaplarda dozlamadır.

25 Dozlanmış ürün, en az 2 yıla kadar korunması için 2 ila 30°C arasındaki bir sıcaklıkta depoya konulmadan önce karantina ve görsel incelemeyi geçer.

30 Mevcut buluş şimdi çeşitli yapılanma örneklerinden hareketle daha ayrıntılı olarak tarif edilecektir. Bununla birlikte, bu örneklerin mevcut buluşun kapsamını sınırlandırması amaçlanmamakta, yalnızca açıklamanın örneklenmesi amaçlanmaktadır.

ÖRNEKLER

35 Örnek 1. Mevcut buluşa göre plazmadan, virüslere karşı güvenli, agregat içermeyen ve endüstriyel uygulama için yeterli bir verim ile bir immünooglobulin çözeltisi elde etmek için yöntem.

Başlangıç maddesi, Avrupa Patenti EP 1225180 B1'de tarif edilen yöntemle elde edilen, çoğunluk protein bileşeni olarak IgG'leri içeren, 16 litrelik bir immünooglobulin çözeltisi idi. Özet olarak, söz konusu çözelti, gammaglobulinin Cohn yöntemi kullanılarak fraksiyon II+III'den çıkarılması ile

- elde edildi. Gammaglobulinin fraksiyon II+III'den bu ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için, söz konusu fraksiyon daha önce etanol kullanılarak insan plazmasının fraksiyonlanması ile izole edilmiştir. Daha sonra bir karbonhidrat varlığında süspansiyon halinde tutuldu ve beraberindeki çoğunluk proteinlerinin miktarı, PEG-4000 ile çöktürme yoluyla azaltıldı. Son olarak, fraksiyonun nihai saflaştırılması, bir iyon-değişim reçinesi kolonunda (DEAE Sepharose) adsorpsiyonla gerçekleştirildi. Bu şekilde elde edilen kolon akıntısı (reçinede adsorbe edilmeyen fraksiyon, yani DEAE), selüloz asetatında (ACE) %98 ± 2'lik immünoglobulin elektroforetik saflığına, 6.0 pH'a, 2.6 Nephelometrik Bulanıklık Ünitesi (NTU) değerinde bulanıklığa ve yaklaşık 5 mg/ml'lik bir IgG konsantrasyonuna sahipti.
- 10 Elde edilen çözelti, asetik asit ilave edilerek 5.1'lik bir pH'a ve 2 ila 8°C arasındaki bir sıcaklığa ayarlandı. Bu immünoglobulin çözeltisi daha sonra konsantre bir sodyum kaprilat çözeltisi ilave edilerek 13 mM'lik nihai bir konsantrasyona getirildi.
- 15 Kaprilat ile immünoglobulin çözeltisi 25°C'ye ısıtıldı ve yavaş çalkalama altında bu sıcaklıkta 2 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon prosedürü sırasında, pH 5.10 ± 0.05'te tutuldu. Elde edilen çözeltinin bulanıklığı, 17.3 NTU idi.
- 20 Kaprilat ile işleme tabi tutulan çözelti, bir derinlik filtresi (CUNO®, Ultrafilter, Danimarka) kullanılarak daha sonraki arıtma için yaklaşık 8°C sıcaklığa soğutuldu. Yaklaşık 20 mg filtrelenmiş sıvı, yaklaşık 4 mg/ml IgG konsantrasyonu ve 3 NTU'dan düşük bir bulanıklık ile, söz konusu arıtmadan (durulama dahil) elde edildi.
- 25 Yukarıda belirtilen arıtılmış çözelti, nominal molekül ağırlığı 100kDa (Biomax®, Millipore, ABD) olan membranlar kullanılarak ultrafiltrasyon yoluyla diyaliz edildi. Ultrafiltrasyon iki farklılaşmış aşamada gerçekleştirildi: birinci aşamada, pH değeri 5.1 olan madde, pH'ı 5.1'e ayarlanmış 5 mM'lik bir asetat çözeltisi kullanılarak diyafiltrasyon ve yaklaşık olarak 30UA'ya konsantrasyon yoluyla üç aşamalı ardışık diyaliz ve konsantrasyona tabi tutuldu. İkinci aşamada, yeterli protein, kaprilat ve PEG konsantrasyonuna sahip olan çözelti, pH 4.5 ± 0.1'e getirildi ve daha sonra diyaliz
- 30 pH 4.5'teki sekiz hacim 5mM asetat çözeltisi kullanılarak başlatıldı. Daha sonra, ürün pH 4.2'de yaklaşık 20 litre 200 mM glisin çözeltisi kullanılarak diyaliz yoluyla formüle edildi ve %10'luk (a/h) bir konsantrasyonla IgG çözeltisi elde etmek amacıyla aynı ultrafiltrasyon ünitesinde 140.5 UA değerine konsantre edildi.
- 35 Son olarak, söz konusu çözelti, bir derinlik filtresi (CUNO®, Ultrafilter, Danimarka) ve gözenek boyutu 0.22 µm olan mutlak filtreler veya membranlar (CVGL®, Millipore, ABD; veya DFL®, PALL, ABD) kullanılarak filtre edildi.

Tablo 1, yukarıda tarif edilen yöntemle göre olan başlangıç maddesinin, çoklu ara ürünlerin ve nihai ürünün karakterizasyonunu göstermektedir. Söz konusu tabloda yer alan sonuçlara göre, bulanıklığın nefelometri ile ölçüldüğü belirtilmelidir; immünoglobulinlerin tespit edilen toplam proteinlere göre polimer veya moleküler agregat yüzdesi, 280 nm'deki optik yoğunluk değerine göre HPLC jel kolonunun dışlamasıyla belirlendi; kaprilat konsantrasyonu, kolorimetrik substratın miktarının ölçülmesi yoluyla bir enzimatik yöntem kullanılarak belirlendi; PEG konsantrasyonu, bir kırılma endeksi detektörü kullanılarak bir HPLC filtrasyon jel kolonu vasıtasıyla belirlendi; ve prosesin geri kazanım yüzdesi, nefelometri ile ölçülen IgG konsantrasyonuna göre hesaplandı.

10 Bu örneğin sonuçları, yukarıda belirtilen saflaştırılmış çözeltinin kaprilat ile işleme tabi tutulmasının, herhangi bir immünoglobulin agregatı veya diğer çökelti oluşumunu indüklemediğini, ürünün moleküler dağılımını değiştirmeden koruduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, kaprilat ile işlemde sonra, agregatları ve/veya çökeltileri elimine etmek için hiçbir saflaştırma adımı gerekli değildir. Bu gerçek, üretim sürecini büyük ölçüde kolaylaştırmış ve maddenin ultrafiltrasyon membranına doğrudan uygulanmasına izin vermiştir.

Tablo 1. Örnek 1'e ait yöntemdeki başlangıç maddesi, çoklu ara ürünler ve nihai ürün için elde edilen sonuçlar.

Örnek	IgG Konsantrasyonu (mg/ml)	Bulanıklık (NTU)	Agregatlar (Polimer/Dimer) (%)	Kaprilat Konsantrasyonu (mM)	PEG Konsantrasyonu (mg/ml)	Geri Kazanım (%)
Başlangıç maddesi (iyon değişim kolonu akıntısı, pH 5.1'e ayarlı)	4.6	2.6	<0.1/3.0	0	38.4	100
Kaprilat ile işleme tabi tutulmuş madde	4.3	17.3	<0.1/3.0	12.1	38.2	97.8
Aritılmış madde	3.7	2.2	<0.1/2.8	11.1	38.0	95.2
Nihai ürün	99.1	3.5	<0.1/2.7	0.1	0.1	89.4

20 Böylece, müteakip ultrafiltrasyon işlemi tatmin edici bir şekilde imalat işleminin kimyasal reaktiflerinin (yani PEG ve kaprilat) etkili bir şekilde azaltılması ve ayrıca aritılmış immünoglobulin çözeltisinin sonraki formülasyonunun ve konsantrasyonunun terapötik kullanımı için uygun kompozisyonun elde edilmesine izin verilmesi hedeflerine ulaşmıştır.

25 Tablo 1'de görülebileceği gibi, bu durumda elde edilen protein geri kazanımı, başlangıç akıntısından %10 konsantre ürüne kadar, %89.4 idi ve bu işlemin endüstriyel bir ölçekte uygulanabilirliğini göstermektedir. Bu geri kazanım, tekniğin bilinen durumuna göre olan ve PCT 30 W02005/073252 sayılı patent başvurusunda tarif edilen (%70 geri kazanım, başlangıçtaki 6.8

g/l'ye kıyasla 4.8 g/l'lik bir verime dayanarak) geleneksel yöntemlerle elde edilen değerden daha büyüktü.

Örnek 2. İmmünoglobulin başlangıç çözeltisinin saflığının kaprilat ile işlemdeki etkisi.

5 Bu örnekte, immünoglobulin başlangıç çözeltisinin saflığının ve eşlik eden proteinlerin mevcut buluşun yöntemine tabi tutulan başlangıç maddesindeki varlığının etkisinin bir değerlendirmesi yapılmıştır.

10 İki bağımsız deney test grubu oluşturuldu:

- A grubunda, başlangıç maddesi, 98 ± 2 IgG, yani Örnek 1'de tarif edilen başlangıç maddesi, elektroforetik saflığa (ACE) sahip DEAE Sepharose kolon akıntısı idi.
- B grubunda, %4 PEG Filtrate olarak adlandırılan başlangıç maddesi, DEAE Sepharosa kromatografisinden önceki adıma kadar Örnek 1'de tarif edilenle aynı işlemle elde edildi.

15 Böylece, B maddesi, II+III fraksiyonunun ekstraksiyon süspansiyonunun PEG ile çöktürülmesinden sonra elde edildi ve yaklaşık %90 IgG'lik bir elektroforetik saflığa (ACE) sahipti.

Her iki başlangıç maddesi (A grubu ve B grubu), yaklaşık% 4'lük bir eşdeğer PEG içeriğine sahip, 20 13 mM'lik bir konsantrasyonda ve 5.0 ve 5.2 arasındaki bir pH'ta kaprilat ile işleme tabi tutuldu ve Örnek 1'de belirtildiği gibi saflaştırıldı.

Tablo 2, her iki test grubunda (sırasıyla A ve B) kullanılan başlangıç maddesinin ve ayrıca kaprilat ile işlemden sonraki adımlarda üretilen maddenin temel özelliklerini göstermektedir.

25

Tablo 2. Örnek 2'de açıklanan A ve B grupları için bu buluşun yönteminin çoklu aşamalarında elde edilen bulanıklık ve toplanma yüzdesi sonuçları.

Başlangıç Maddesi (grup)	Saflık (%)	Albumin miktarı (mg Alb/g IgG)	Kaprilat ile işlemden önceki çözelti			Kaprilatın eklenmesinden sonraki çözelti		İnkübasyon sonrası çözelti (25 °C'de 2 saat)	
			O.D. 280 nm (UA)	Bulanıklık (NTU)	Agregatlar, polimer (%)	Bulanıklık (NTU)	Agregatlar, polimer (%)	Bulanıklık (NTU)	Agregatlar, polimer (%)
Kolon akıntısı (A)	97.9 ± 1.5	<0.4	6.7	2.9	<0.1	15.1	<0.1	17	<0.1
PEG ile işlemden sonraki filtrat (B)	90.2 ± 2.9	36	8.3	8	1.9	517	0.9	591	1.0

Tablo 2'de elde edilen ve toplanan sonuçlar, düşük saflıktaki bir maddeye (yaklaşık olarak %90 IgG, bakınız grup B), inaktivasyon için etkin bir konsantrasyonda (13 mM) kaprilat ilavesinin, çözeltinin bileşenlerinin çökmesine ve bulanıklıkta şiddetli bir artışa (500 NTU'dan yüksek) neden olduğunu göstermiştir. Böylece, çözelti için moleküler dağılım sonuçları, eşlik eden yüksek bir moleküler ağırlığa sahip proteinlerin bir kısmının çökmesini göstermiştir.

Daha önce tarif edilen miktarlardaki ve koşullar altındaki (13 mM kaprilat, 5.0 ile 5.2 arasında pH) kaprilatın düşük saflıkta bir maddeye ilavesinin, yüksek molekül ağırlıklı proteinleri ve çökmüş agregatları ayırmak için ilave ayırma ve saflaştırma adımlarının dahil edilmesini gerektiren çökmüş bir süspansiyona yol açmıştır. Bu nedenle, kaprilat ile işleme tabi tutulmuş A grubuna ait ürünün moleküler kompozisyonu, yani %1'i aşan agregat miktarına sahip moleküler kompozisyonu, PEG ile çöktürme, kromatografi veya eşdeğer yöntemlerin adımları gibi ilave saflaştırma veya ayırma adımları dahil edilmediği sürece, bu ürünün saflaştırılmış bir nihai ürün haline işlenmesinin uygulanabilir olmadığını göstermektedir. Son olarak, bu gerçek, kaprilatın çöktürücü olmayan koşullar altında viral inaktivasyon kapasitesine sahip bir madde olarak kullanımının, sadece yeterli saflıkta bir maddeye eklendiğinde uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

Örnek 3. Başlangıç maddesi kompozisyonunun agregat oluşumu üzerine etkisi.

Bu deneyin amacı, kaprilat ile işlemin uygulandığı immüno globulin başlangıç çözeltisinin kompozisyonunun etkisini değerlendirmektir.

Eşdeğer saflıkta ($97.9 \pm \%1.5$), ancak farklı kompozisyonlarda maddelerden başlayarak, A ve B olmak üzere iki bağımsız deney test grubu oluşturulmuştur.

Grup A'da, başlangıç maddesi, 5 ± 2 mg/ml protein konsantrasyonu ve $\%4 \pm 1$ 'lik bir PEG-4000 konsantrasyonu ile kolon akıntısı idi (Örnek 1'de açıklanan başlangıç yöntemine göre elde edilmiş).

B grubunda, Konsantre ve Diyalize Akıntı olarak adlandırılan başlangıç maddesi, A grubu için belirtilen aynı kolon akıntısı idi, fakat konsantre edildikten ve diyaliz edildikten sonraki haliydi. Bu nedenle, DEAE kolon akıntısı (yukarıda Örnek 1'de belirtilen ve mevcut örneğin A grubuna karşılık gelen), PEG içeriğinin yaklaşık 6 kat düşürülmesi ve proteinin yaklaşık %4'lük bir değere, yani 40 mg/ml'ye konsantre edilmesi için ultrafiltrasyon yoluyla ilave bir diyaliz ve konsantrasyon adımına tabi tutuldu.

Her iki deney grubunda (A ve B) elde edilen madde, 13 mM konsantrasyonunda ve 5.0 ile 5.2 arasında bir pH'taki kaprilat ile işleme tabi tutuldu ve %10'luk bir IgG konsantrasyonuna sahip bir ürün elde etmek için Örnek 1'de tarif edilen koşullar altında ultrafiltre edildi.

- 5 Tablo 3, yukarıda belirtilen deney grupları A ve B'de işlenen maddenin temel özelliklerini ve ayrıca her deney grubu için kaprilat ile işlemi takip eden adımda ve diyafiltre ve konsantre edilmiş nihai üründe elde edilen maddenin özelliklerini göstermektedir.

Tablo 3. Mevcut buluşa ait yöntemin, Örnek 3'ün A ve B gruplarındaki çoklu adımları için elde edilen sonuçlar.

Başlangıç maddesi (grup)	Başlangıç maddesi			Nominal kaprilat (mM)	Kaprilatın eklenmesinden sonraki çözelti		Konsantre edilmiş nihai ürün	
	IgG (mg/ml)	PEG (mg/ml)	Safılık (%)		Bulnıklık (NTU)	Agregatlar, polimer (%)	Kaprilat (mM)	Agregatlar, polimer (%)
Kolon akıntısı (A)	5 ± 2	40 ± 10	97.9 ± 1.5	13	7.0	<0.1	<0.1	<0.1
					9.8	<0.1	0.1	<0.1
					11.9	<0.1	0.1	<0.1
Konsantre ve diyaliz edilmiş akıntı (B)	~ 40	~ 6	98 ± 2	13	11.9	0.5	0.3	0.3
					13.4	0.4	0.5	0.5
					10.0	0.3	0.5	0.4

Tablo 3'te görülebileceği gibi sonuçlar, belirtilen şartlarda kaprilatla işlemin, saflaştırılmış bir immünooglobulin çözeltisi üzerinde, 5 ± 2 mg/ml konsantrasyonunda ve 40 ± 10 mg/ml (% 4 ± 1) PEG konsantrasyonunun varlığında (A grubu, kolon akıntısı), immünooglobulin çözeltisinde herhangi bir değişiklik veya agregasyona neden olmadığını, kaprilat ilavesi sırasında ve sonrasında ürünün moleküler dağılımını değiştirmeden koruduğunu, agregatların %0.1'den az olan saptanamayan oranı ile ortaya koydu.

Bununla birlikte, kaprilatla işlem için bu aynı koşullar, düşük PEG içeriğine sahip bir maddeye (<%1) (grup B) uygulandığında, kaprilatın eklenmesinden sonra immünooglobulin agregatlarında önemli bir artış gözlemlendi. Ayrıca, bu agregat içeriğinin kullanılan koşullar altında ultrafiltrasyon yoluyla ortadan kaldırılması mümkün değildi ve nihai üründe karşılaştırılabilir polimer seviyeleri ölçüldü.

Deney grubu A ve B'de kullanılan başlangıç maddeleri arasındaki fark gösteren temel özelliklerin protein konsantrasyonu ve PEG konsantrasyonu olduğu göz önüne alındığında, bu parametrelerin her birinin kaprilat ile sonraki işlem üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla ilave bir test gerçekleştirildi.

Bu deneyde, başlangıç noktası dört farklı deney grubuna: B1, B2, B3 ve B4 gruplarına ayrılan tek bir dizi Konsantre ve Diyalize Akıntı (önceki B grubunun başlangıç maddesi) idi.

B1 grubunun maddesi yaklaşık %4'lük bir protein konsantrasyonunda ve yaklaşık %0.6'lık bir PEG konsantrasyonunda işlendi.

B2 grubunun maddesi, yaklaşık %4'lük aynı protein konsantrasyonunda işlendi, ancak PEG içeriği 4 ± 1 (a/a) değerine yeniden ayarlandı.

B3 ve B4 gruplarında, madde 0.5 ± 0.2 proteine seyreltildi. PEG içeriği ile ilgili olarak, B3 grubunda bu, yaklaşık %0.6 (a/a) konsantrasyonuna getirilirken, B4 grubunda PEG içeriği 4 ± 1 (a/a) olarak yeniden ayarlandı.

Dört deney grubunda elde edilen elde edilen madde, pH 5.10 ± 0.05 'e ve kaprilat konsantrasyonu 15 mM'ye getirildi ve daha sonra 2 saat 25°C 'de inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4'te gösterilmektedir.

35

Tablo 4. Örnek 3'teki B1, B2, B3 ve B4 grupları için başlangıç maddesi için ve kaprilat ile inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar.

Deney grubu	Başlangıç Maddesi				25°C'de 2 saat 15 mM kaprilat ile işleme tabi tutulan çözelti
	IgG (mg/ml)	PEG (mg/ml)	Bulanıklık (NTU)	Agregatlar, polimer (%)	Agregatlar, polimer (%)
B1	~ 40	~ 6	1.6	<0.1	0.5
B2	~ 40	40 ± 6	2.5	<0.1	0.3
B3	5 ± 2	~ 6	1.3	<0.1	0.5
B4	5 ± 2	40 ± 6	1.3	<0.1	<0.1

5 Tablo 4'te gösterilen sonuçlar, belirlenmiş koşullar altında kaprilat ile işlem sırasında, yeterli bir protein dilüsyonuyla kombinasyon halinde bir PEG koruyucu etkisinin gözlemlendiğini göstermektedir. Başlangıç maddesi yaklaşık 5±2 mg/ml protein ve %4'lük bir PEG konsantrasyonundayken, kaprilat (<%0.1) ile işlemden sonra saptanamayan agregat değerlerinin elde edilmesi dikkat çekicidir.

Örnek 4. pH'in, kaprilat ile işleme tabi tutulmuş immünoglobulin çözeltisinin çözünürlüğü üzerindeki etkisi.

15 PEG'in immünoglobulin çözeltilerinde ortadan kaldırılmasının yanı sıra, söz konusu immünoglobulinlerin intravenöz kullanımları için uygun konsantrasyonlara konsantre edilmesinin, tercihen 4.5 civarında pH değerlerinde gerçekleşmesi gerektiği bilinmektedir.

20 Ayrıca, kaprilik asidin, pKa'sının (4.89) altındaki pH değerlerinde çözünmezliği göz önüne alındığında, mevcut deneyde pH'in kaprilat ile işleme tabi tutulan immünoglobulin çözeltisinin çözünürlüğü üzerindeki etkisi, ultrafiltrasyonunun başlangıcı için uygun bir pH değeri oluşturmak amacıyla değerlendirildi.

25 Bu amaçla, Örnek 1'de detaylandırılan başlangıç yöntemine göre elde edilen bir dizi kolon akıntısı, 13 mM kaprilat ile işleme tabi tutulmuş ve arıtılmış immünoglobulin çözeltisi elde etmek için işlendi.

Ultrafiltrasyon adımından önce maddesi oluşturan bu ara madde, kaprilat ile işlem pH'ından (5.1) 4.5 civarında pH değerlerine getirilmesi için asetik asit ilavesiyle asitlendirildi. Daha sonra,

çözeltinin görünümü ve çözünürlüğü, değerlendirilen pH değerlerinin her biri için değerlendirildi ve koloidal partiküllerin oluşumu, bulanıklığın nefelometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi.

5 Tablo 5, değerlendirilen pH değerlerinin her biri için elde edilen görünüm ve bulanıklık sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 5. Örnek 4'te analiz edilen farklı pH değerleri için elde edilen bulanıklık ve görsel görünüm sonuçları.

pH	Bulanıklık (NTU)	Görsel görünüm
5.1	5.6	Şeffaf
5.0	10.0	Şeffaf, küçük kristaller
4.8	32.5	Beyaz, çökmüş kristaller
4.6	53.0	Beyaz, çökmüş kristaller
4.4	57.1	Beyaz, çökmüş kristaller

10 Tablo 5'te görüldüğü gibi elde edilen sonuçlar, 13 mM kaprilat ile işleme tabi tutulmuş immünoglobulin çözeltisinin pH 5.0'ın altındaki bir pH'a asitleştirildiği zaman, bulanıklıkta belirgin bir artışla birlikte beyazımsı bir çökmenin ortaya çıktığını göstermiştir. Bu etki büyük olasılıkla koloidal formda çözünmeyen kaprilat asit oluşumundan kaynaklanmıştır, bu da
15 ultrafiltrasyon işlemine 5.0'ın altındaki pH değerlerinde başlanmasını uygulanamaz kılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, saflaştırılmış çözelti viral inaktivasyon için etkin konsantrasyon aralığında (9-15 mM kaprilat arasında) ve daha önce tarif edilen koşullar altında kaprilat ile bir işleme tabi
20 tutulduğunda, iyonize edilmiş ve çözünür formdaki kaprilat konsantrasyonunu arttırmak ve dolayısıyla ultrafiltrasyon membranı boyunca geçirgenliğini kolaylaştırmak amacıyla, sonraki ultrafiltrasyon adımına viral inaktivasyon işleminin pH'ına, yani 5.1'e eşit veya ondan daha büyük bir pH'ta başlamanın tercih edilebilir olduğunu kanıtlamıştır.

25 Örnek 5. Diyaliz çözeltisindeki asetat miktarını, kaprilatın ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon yoluyla azaltılması üzerindeki etkisi.

Ürünün diyalizi için kullanılan tampon çözeltide farklı konsantrasyonlardaki asetat varlığında bir dizi bağımsız ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon işlemi gerçekleştirildi.

30 Kullanılan Konsantre ve Diyalize Akıntısı olarak adlandırılan başlangıç maddesi, Örnek 3'teki B grubu ile aynıydı. %98±2 IgG saflığı, yaklaşık 40 mg/ml protein konsantrasyonu ve yaklaşık %0.6'lık PEG içeriğine sahip olan söz konusu başlangıç maddesi, kaprilat ile işleme tabi

tutulduktan sonra, yaklaşık 100 kDa'lık nominal moleküler ağırlık kesimine sahip membranlar kullanılarak ultrafiltrasyon/diyafiltrasyona tabi tutuldu.

5 Uygulanan ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımı, yaklaşık %4 (a/h) IgG'ye kadar bir birinci konsantrasyon aşamasını, sekiz hacim diyaliz çözeltisi kullanılan bir ikinci diyaliz aşamasını ve son olarak IgG'ler'in yaklaşık %9-10 (a/h) değerine kadar konsantrasyonunu ihtiva eder.

10 Ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon testlerinden ilki, enjeksiyon için su kullanılarak gerçekleştirilirken, sonraki testler, artan konsantrasyonlarda asetata, daha spesifik olarak sırasıyla 2, 5, 20 veya 50 mM asetata ve tüm durumlarda 5.0 ila 5.5 arasına ayarlanmış bir pH'a sahip tampon çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 6. Diyaliz tamponunda farklı asetat konsantrasyonları kullanılarak ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımı için elde edilen sonuçlar.

Diyaliz tamponunda buluna asetat konsantrasyonu (mM)	Kaprilatın nominal eklenmesi (mM)	Diyaliz edilmiş ürün	
		Diyalize üründeki kaprilat (mM) ⁽¹⁾	Kaprilatın geçirgenliği ⁽²⁾
0	20	2.3	13.2
2	13	0.6	19.3
5	13	<0.2	32.8
20	13	<0.2	43.3
50	13	0.2	45.3

(1) 8 diyaliz hacmi ile diyaliz işleminden sonra belirlenen değerler
(2) Aşağıdaki formül aracılığıyla hesaplanan geçirgenlik:
Diyaliz Hacimlerinin Sayısı = $\ln(C_f/C_o)/(R-1)$; C_f , söz konusu diyaliz hacimlerinin sayısı ile diyalizden sonraki konsantrasyon, C_o diyalizden önceki konsantrasyon ve R tutulma katsayısıdır.

15 Tablo 6'nın sonuçları, yaklaşık 100 kDa'lık bir moleküler ağırlık kesimine sahip membranların kullanıldığı, asetat içeren bir tampon çözeltinin 8 diyaliz hacminin 5.0 ve 5.5 arasında bir pH'ta ve asetatın 5 mM civarında ve en az 50 mM minimum konsantrasyonunda uygulandığı ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon prosedürünün, kaprilatın nihai konsantre üründe uygun seviyelere

20 verimli bir şekilde azaltılması hedefine tatmin edici bir şekilde ulaştığını göstermektedir.

Buna karşılık, diyaliz için kullanılan çözelti enjeksiyon için su veya 2 mM asetat seviyesine sahip bir tampon çözelti olduğunda, kaprilat filtrat içinde etkin bir şekilde elimine edilmemiştir.

Bu, daha önce tarif edilen koşullar altında, yaklaşık 100 kDa'lık bir moleküler ağırlık kesimine sahip bir membranın kullanıldığı ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon yönteminin, söz konusu reaktifin uygun seviyelerinin nihai konsantre üründe tespit edilmesi sebebiyle, önceki işlemde elde edilen kaprilatın azaltılmasında etkili olduğunu kanıtlar.

5 Örnek 6. Tek bir ultrafiltrasyon adımı vasıtasıyla kimyasal reaktiflerin (PEG ve kaprilat) eşzamanlı eliminasyonu.

10 Bir dizi IgG, kaprilat ile inaktif hale getirilmiş ve arıtılmış bir çözelti elde etmek için Örnek 1'de açıklanan yöntemle işlendi. Yaklaşık %0.5'lik bir protein konsantrasyonuna ve 5.1'lik bir pH'a sahip olan söz konusu çözelti, Biomax® tipindeki (Millipore, ABD) 100 kDa'lık moleküler ağırlık kesimine sahip polisülfon membranların oluşturduğu bir ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon ekipmanı kullanılarak işlendi. Ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon, Örnek 5'te tarif edildiği gibi iki farklı aşamada gerçekleştirildi:

- 15 – pH 5.1, 5.6 veya 5.8'de gerçekleştirilen birinci aşamada, madde, pH 5.1, 5.6 veya 5.8'e ayarlanmış üç hacimden az olmayan 5 mM asetat tampon çözeltisi ile diyafiltrasyon ve proteinin yaklaşık %2'lik bir değere konsantre edilmesi yoluyla sıralı diyaliz ve konsantrasyon aşamalarına tabi tutuldu.
- 20 – İkinci aşamada, kaprilat içeriği yaklaşık onda birine düşürüldüğünde, çözelti pH 4.5 ± 0.1 veya 5.1'e getirildi. Ardından ürün diyalize başlamak için yeterli bir protein ve PEG konsantrasyonuna getirildi ve diyaliz, pH 4.5 veya 5,1'te sekiz hacim 5 mM asetat tampon çözeltisi ile başlatıldı.

25 Son olarak, ürün 200 mM konsantrasyonunda ve 4.2 pH'ta altı hacim glisin çözeltisi ile diyaliz yoluyla formüle edildi ve %10 IgG çözeltisi elde etmek için konsantre edildi.

Tablo 7, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon aşamalarının her birinin başlangıcında ve farklı pH değerlerinde elde edilen PEG ve kaprilatın geçiş yüzdesini göstermektedir:

30 Tablo 7. PEG ve kaprilatın ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının iki aşamasında analiz edilen farklı pH değerlerinde geçişi.

Aşama (kaprilat konsantrasyonu)	pH	PEG geçişi (%)	Kaprilat geçişi (%)
Aşama I'in başlangıcı (13 mM)	5.1	17	74
	5.6	15	98
	5.8	15	100
Aşama II'in başlangıcı (1 mM)	5.1	40	100
	4.5	82	97

Tablo 7'nin sonuçları, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının başlangıcında, Aşama I'de, kaprilatın pH 5.1 ve pH 5.8 arasında çok yüksek geçiş değerleri gösterdiğini göstermektedir. Bu değerler, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının bahsedilen Aşama I'i sırasında kaprilatın çok yüksek derecede azalmasıyla sonuçlandı (başlangıç miktarına göre 10 kattan daha fazla bir kaprilat azalması elde edildi). Aksine, PEG geçişi söz konusu Aşama I'de çok düşüktü (<%20) ve toplam eliminasyonu kaprilat varlığında pH>5'de pratik olarak uygulanabilir değildi.

Öte yandan, Aşama II'de, Tablo 7'de görülebileceği gibi, PEG geçişi pH 4.5'te %82 değeri ile çok yüksekti. Ek olarak, bu Aşama II sırasında kaprilatın da, aşamanın başlangıcında geçişin pratik olarak %100 olmasını sağlayan ≤ 1 mM'lik bir kalıntı seviyede olduğu göz önüne alındığında, azaldığı bulunmuştur.

Tablo 8, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının her bir aşamasındaki ve nihai formülasyon adımıdaki protein, PEG ve kaprilat konsantrasyonundaki evrimi detaylandırmaktadır.

Tablo 8. Viral inaktivasyon adımından sonraki çözeltideki, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının Aşama I ve II'sindeki, pH 4.2'deki formülasyondaki ve nihai çözeltideki PEG ve kaprilat miktarı (konsantrasyon ve optik yoğunluk ile ölçülen miktar).

Aşama/Adım	PEG (mg/ml)	PEG (O.D. 280 nm)	Kaprilat (mM)	Kaprilat (O.D. 280 nm)
İnaktive edilmiş ve arıtılmış çözelti	38	6.9	12	2.2
Ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının Aşama I'inin sonundaki çözelti	45	1.8	0.9	0.04
Ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının Aşama II'sinin sonundaki çözelti	0.7	0.02	0.1	0.003
pH 4.2'deki formüle edilmiş çözelti	0.1	0.003	<0.1	<0.003
Nihai konsantre çözelti	0.1	0.001	<0.1	<0.001

Her adımda ve aşamada kaydedilen PEG ve kaprilat değerlerine göre ve her adımdaki protein konsantrasyonu göz önüne alındığında, PEG indirgeme faktörü, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının Aşama I'inde (pH 5.1'de) 4 ve ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının Aşama II'sinde (pH 4.5'te) 90 idi, böylece yaklaşık 350 kat bir toplam indirgeme faktörü (Aşama I ve Aşama II) verdi (ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının sonunda elde edilen 0.02'lik bir absorbansla karşılaştırıldığında başlangıçtaki 6.9'luk bir absorbans).

Kaprilat durumunda, indirgeme faktörü ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının Aşama I'inde (pH 5.1'de) 55 ve ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının Aşama II'sinde (pH 4.5'te) 13 idi ve böylece

yaklaşık 700 kat bir toplam indirgeme faktörü (Aşama I ve Aşama II) verdi (ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının sonunda elde edilen 0.003'lük bir absorbanla karşılaştırıldığında başlangıçtaki 2.2'lik bir absorban).

- 5 Sonuçlar, viral inaktivasyon kapasitesine sahip reaktifin (kaprilik asit veya kaprilat) ve çöktürme reaktifinin (PEG), yaklaşık 100 kDa'lık bir moleküler ağırlık kesimine sahip bir membranın kullanıldığı tek bir ultrafiltrasyon adımıyla, ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon adımının her bir aşamasında uygulanacak fiziksel ve kimyasal koşulların seçilmesiyle (diğerlerinin yanı sıra pH, protein konsantrasyonu, diyaliz hacimlerinin sayısı, diyaliz tamponu) ve her iki reaktifin
- 10 intravenöz kullanıma uygun kalan konsantrasyonları ile birlikte %10'a konsantre edilmiş bir IgG nihai ürününün ortaya çıkmasıyla, etkili bir şekilde azaltılabileceğini gösterdi.

Örnek 7. PEG varlığında kaprilat ile viral inaktivasyon kapasitesinin değerlendirilmesi.

- 15 Kaprilik asit veya kaprilatın PEG varlığında bir lipit zarfa sahip virüsleri elimine etme veya etkisiz hale getirme kapasitesini değerlendirmek üzere başlangıç maddesi olarak kolon akıntısı veya diyaliz ve konsantre edilmiş akıntı (sırasıyla Örnek 1 ve 3'e göre elde edilen) alarak çeşitli bağımsız deneyler yapıldı.

- 20 Her iki madde de %98±2 immünoglobulin saflığına ve 5 ila 10 mg/ml protein konsantrasyonuna sahipken, PEG içerikleri sırasıyla 40 mg/ml ve 1.5 mg/ml olarak farklılık göstermiştir.

- Viral inaktivasyon testleri, Flaviviridae familyasının 40-60 nm'lik, bir lipit zarfa ve fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı ortalama bir dirence sahip Sığır Viral İshal virüsü (BVDV) kullanılarak
- 25 gerçekleştirildi.

- Her bir testte, karşılık gelen başlangıç maddesi, virüsle %0,5'e eşit veya daha küçük bir değere aşıldı ve 15°C veya 25°C'lik bir sıcaklıkta iki saat süreyle 9 mM veya 13 mM kaprilat konsantrasyonları uygulanarak viral inaktivasyon işlemine tabi tutuldu.

- 30 Üretilen farklı örneklerdeki BVDV'nin viral yükünün ölçümü, MBDK hücre çizgisi kullanılarak TCID50 testi (%50 Doku Kültürü Enfeksiyöz Doz) vasıtasıyla gerçekleştirildi. Viral inaktivasyon aşamasının viral indirgeme faktörü (RF), inoküle edilmiş başlangıç maddesinde tespit edilen viral yükün oranının, işlem sonunda elde edilen örnekte tespit edilen virüs miktarının log10'daki
- 35 ifadesine bölünmesi olarak belirlenmiştir.

Tablo 9, her bir testin başlangıç maddesinin ve elde edilen RF'nin özelliklerini göstermektedir.

Tablo 9. PEG varlığında veya yokluğunda, viral inokülüm ile kaprilat işlemi testlerinde gözlemlenen viral inaktivasyon sonuçları.

Deney grubu	Başlangıç Maddesi		İşlem sıcaklığı	Kaprilat konsantrasyonu (mM)	Viral indirgeme faktörü (RF)
	IgG (mg/ml)	PEG (mg/ml)	°C		
Diyaliz ve konsantre edilmiş akıntı	10	1.5	25	9	≥ 4.19
					≥ 4.36
	13			≥ 3.95	
				≥ 4.13	
Kolon akıntısı	5	40	25	9	≥ 4.62
					≥ 5.10
	13			≥ 4.71	
				≥ 4.57	
	15			13	≥ 4.32
					≥ 4.27

5 Tüm testlerde elde edilen viral indirgeme sonuçları (bakınız Tablo 9), farklı sıcaklıklarda (15 ve 25°C) işlemden sonra minimum 9 mM kaprilat konsantrasyonu için bile, her iki başlangıç maddesinde BVDV'nin inaktivasyonu için yüksek bir kapasite göstermektedir. Ayrıca bu testler, analiz edilen PEG konsantrasyonlarının her birinde, değerlendirilen her iki madde ile eşdeğer sonuçların elde edilmesi göz önüne alındığında, kaprilatın viral inaktivasyon kapasitesinde PEG 10 tarafından bir etkileşimin gözlenmediğini göstermiştir.

Örnek 8. Mevcut buluşa ait üretim yöntemine göre elde edilen intravenöz immüoglobulin çözeltilisinin karakterizasyonu.

15 Mevcut buluşa ait yöntemle elde edilen %10 (a/h) proteine sahip immüoglobulin çözeltilisinin biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini ortaya koymak amaçlanmaktadır.

20 Yaklaşık 200 litre plazma ölçeğinde kaprilatlı etkisizleştirilmiş virüs çözeltilisini elde etmek için iki dizi DEAE kolonu akıntısı Örnek 1'de açıklanan yöntemle göre işleme tabi tutuldu.

25 Söz konusu kaprilatlı çözelti, arıdıktan sonra, temel işlem kalıntılarının (PEG ve kaprilat) ortadan kaldırılmasını sağlamak amacıyla Örnek 6'da tarif edildiği gibi farklı aşamalarda ultrafiltrasyon yoluyla diyaliz ve konsantre edildi. Daha sonra, yaklaşık %2.5'lik bir protein konsantrasyonundaki söz konusu saflaştırılmış çözelti, pH 4.5 ± 0.1'e ayarlanmış, %1 sorbitol ve

240 mM glisinden oluşan yaklaşık 6 hacim bir tampon çözeltisi için sabit hacimde diyaliz ile formüle edildi. Son olarak, söz konusu çözelti ultrafiltrasyon ile konsantre edildi ve %10 (a/h) proteine eşdeğer olan 140 ± 5 UA (280 nm) optik yoğunluğa ayarlandı ve 5.25 ± 0.25 'lik bir nihai pH'a ayarlandı.

5

Sorbitol ve glisin ile stabilize edilen ve sterilizasyon dereceli membranlar ($0.22 \mu\text{m}$) kullanılarak arıtılmış ve filtrelenen elde edilmiş ürün (IGIV %10 (a/h)) intravenöz uygulama için bir immüno globulin çözeltisinin kalitesi, değiştirilemezliği ve stabilitesinin en uygun analitik parametreleri belirlenerek klorobütil tıplarla cam şişelerde dozajlandı. İki dizi için elde edilen

10

ortalama analitik değerler ve Avrupa Farmakopesi'nin spesifikasyon değerleri Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10. İntravenöz immüno globulin çözeltisinin %10'daki (a/h) karakterizasyonu.

PARAMETRE	BULUŞA AİT YÖNTEMLE ELDE EDİLEN ÜRÜN	SPESİFİKASYONLAR (Avr. Fr.)
pH	5.25	4.0-7.4
Ozmolalite (mOsm/kg)	306	≥ 240
Sodyum (mM)	< 3.2	d.b.
Bulanıklık (NTU)	4.4	d.b.
Moleküler Dağılım (%)		
Polimer	< 0.1	< 3.0 Mon.+Dim. > 90
Dimer	7.6	
Monomer	92.5	
Fraksiyonlar	< 0.3	
IgG alt sınıfları (%)		
IgG ₁	66.7	plazmaya eşdeğer
IgG ₂	27.6	
IgG ₃	3	
IgG ₄	2.7	
Fc fragmanının bütünlüğü	93	
Saflık profili:		≥ 95
Ig saflık (ACE) (%)	99.6	
IgM (mg/ml)	< 0.002	
NAPTT (Dil. 1/10) (s)	308	
Aktif faktör XI (ng/ml)	Tespit edilmedi	
TGT FXI (nM trombin)	< 53	

İzoaglutinin titresi Anti-A Anti-B	Aglutinasyon 1:16 Aglutinasyon 1:16	Aglutinasyon \leq 1:64
Proteolitik aktivite PKA (Ul/ml) ACA (CH ₅₀ /mg)	< 2 0.6 \pm 0.07	< 35 \leq 1
Avr. Fr.: Avrupa Farmakopesi; d.b.: data belirtilmedi; TGT FXI: Trombin Jenerasyon Testi (Faktör IX'daki plazma noksanının kullanılmasıyla); NAPTT PKA: Prekallikrein Aktivatörü; ACA: Anti-Tamamlayıcı Aktivite.		

- 5 Yukarıdaki sonuçlar, mevcut buluşa ait saflaştırma işleminin sonucu olarak elde edilen ürünün, diğerlerini yanı sıra polimer yokluğu, PKA veya ACA aktivitesi gibi istenmeyen biyolojik aktivite gibi parametreler bakımından esasen değişmemiş olduğunu, IgG alt sınıflarının proporsiyonu ve Fc fragman bütünlüğü gibi bazı işlevsellik özelliklerini plazmaya göre koruduğunu, ve aynı anda mükemmel bir saflık profili (düşük anti-A/anti-B izohemaglutinin titresi, IgM konsantrasyonu, prokoagulan aktivitesi, vb.) gösterdiğini pekiştirmektedir.
- 10 Mevcut buluşa ait, %10 IGIV (a/h) elde etmeye yönelik, nihai formülasyonun yanı sıra PEG varlığında kaprilat ile viral inaktivasyon adımını ve tamamen ayrılmasını kapsayan genel yöntemin, IGIV %10 (a/h) protein çözeltisi olarak formüle ve konsantre edilmiş nihai ürüne tamamen uygulanabilir ve ölçeklendirilebilir olduğu ve Avrupa Farmakopesi'nde ortaya konan değerlere tam olarak uyan bir nihai ürün verdiği sonucuna varılmıştır.
- 15 Ürünün ticari olarak uygulanabilirliği için elzem olan stabilite çalışmaları, sorbitol (% 5'e kadar), glisin (izotoniye kadar) veya her ikisinin bir kombinasyonuna sahip 4.2 ve 6.0 arasındaki pH aralığındaki formülasyonların, %10 (a/h) intravenöz immüoglobulin çözeltilerini ortam sıcaklığında (25°C-30°C) iki yıl boyunca stabilite etmek için uygun olduğunu gösterdi.
- 20 Örnek 9. Kaprilat ile işlemin, alternatif yöntemlerle elde edilen IgG bakımından zengin bir fraksiyona uygulanabilirliği.
- 25 Alternatif saflaştırma yöntemleri kullanılarak elde edilen diğer işlem ara maddeleri kullanılarak, mevcut buluşta açıklanan koşullar altında kaprilat ile uygulamanın geçerliliği hakkında bir değerlendirme yapılmıştır.

Başlangıç maddesi olarak, Cohn-Onclay etanol fraksiyonundan, Fraksiyon II Süspansiyonu olarak isimlendirilen IgG bakımından zengin bir plazma ara maddesi kullanılarak iki bağımsız deney gerçekleştirildi.

5 Bu ara bileşik, Fraksiyon II + III'e kadar mevcut buluşta tarif edilen ile aynı plazma fraksiyonlama yöntemiyle elde edildi. İşlem daha sonra, fraksiyon II+III'ün ekstraksiyon süspansiyonunun alkolik yeniden çöktürülmesi ile devam etti, ardından fraksiyon III'ün ayrılması, en sonunda %96'dan daha saf bir saflıkta fraksiyon II elde edilmesi izledi. Söz konusu fraksiyonun (II) süspansiyonu, bentonit ile saflaştırıldıktan ve alkol içeriğini ortadan kaldırmak için suyla diyaliz edildikten sonra, bu deneyler için başlangıç maddesi olarak görev yaptı.

10 Gerçekleştirilen iki deneyde, iki plazma dizisinden türetilen madde, PEG içeriğine göre iki farklı gruba (A ve B) ayrıldı. B grubunda, başlangıç maddesi konsantre bir PEG-4000 çözeltisi ilave edilerek 40 mg/ml'lik nominal PEG konsantrasyonuna getirildi.

15 Daha sonra, her iki gruptan (A y B) türetilmiş her iki madde de yaklaşık 5 mg/ml'lik bir protein konsantrasyonuna seyreltildi, pH 5.1 değerine ayarlandı ve buluşa ait yöntemde tarif edildiği gibi 13 mM'lik nominal bir konsantrasyona ve 5.0 ve 5.2 arasında bir pH'a ulaşana kadar kaprilat ile işleme tabi tutuldu.

20 Tablo 11, her iki test grubunda (sırasıyla A ve B) kullanılan başlangıç maddesinin ve ayrıca kaprilat ile işleminden sonra elde edilen maddesinin temel özelliklerini göstermektedir.

Tablo 11. A ve B gruplarında kullanılan başlangıç maddesinin ve aynı zamanda elde edilen nihai ürünün temel özellikleri. İmmüoglobulin başlangıç çözeltisinin saflığı %99.6 ± 0.6'dır (n=5 dizi)

Deney grubu	Kaprilat ile işlemden önceki çözelti				Kaprilat ile işleme tabi tutulan çözelti (25°C'de 2 saat)			
	PEG (mg/ml) (1)	O.D. 280 nm (UA)	Bulanıklık (NTU)	Agregatlar, polimer (%)	O.D. 280 nm (UA)	Bulanıklık (NTU)	Agregatlar, polimer (%)	Kaprilat (mg/ml) (1)
A	< 0.01	6.9	3.3	< 0.1	7.0	10.1	0.5	11.2
	< 0.01	6.9	3.0	< 0.1	7.1	16.5	1.2	11.2
B	34.1	7.1	2.5	< 0.1	7.2	14.5	0.1	11.9
	33.6	6.9	3.0	< 0.1	7.2	14.4	< 0.1	12.4

(1) PEG ve kaprilat değerleri, analitik determinasyon yoluyla elde edilen değere karşılık gelir.

25

Sonuçlar, farklı yöntemler ile yeterince saflaştırılmış bir immünoglobulin zltisi kullanılarak belirtilen koşullar altında kaprilat ile inaktivasyon işleminin uygulanabilirliğini göstermektedir, endüklenmiş bir immünoglobulin agregatı veya başka geri dönüşümsüz kelti oluşumu bulunmamaktadır, bu da takip eden saflaştırma işlemini büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır.

- 5 Sonuçlar, proteinin yeterli bir şekilde seyreltilmesi ve yeterli bir saflık derecesi ile kombinasyon halinde, PEG'nin immünoglobulin polimerlerinin üretimi üzerindeki koruyucu etkisinin açık olduğunu göstermektedir.

- 10 Bu deneysel örnek, kaprilatın sadece çöktürücü olmayan koşullar ve/veya agregasyonu destekleyici koşullar altında, yeterli saflığa sahip bir maddeye eklendiğinde ve PEG konsantrasyonu ve proteine ilişkin belirli koşullarla uyumlu olduğunda viral inaktivasyon kapasitesine sahip bir reaktif olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.