

ÖZET

MODİFİKASYONA BAĞLI AKTİVİTE TAHLİLLERİ

- 5 Bir modifikasyon içeren rekombinant polipeptitlerin mevcudiyetinin ve/veya aktivitesinin ölçülmesine yönelik yöntemler, sistemler ve kitler burada açıklanmaktadır.

İSTEMLER

1. Bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem aşağıdaki adımları içermektedir:

5

yakalama ajanının modifikasyona seçici şekilde bağlanmasına olanak veren koşullar altında modifikasyonu seçici şekilde bağlayan bir yakalama ajanına sahip modifikasyonu içeren rekombinant polipeptiti kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir polipeptit-ajan kompleksinin oluşturulması burada rekombinant polipeptit ile ilişkilendirilen modifikasyon, PEGilasyon, HESilasyon, nişastalama veya polisilylasyonun en az birinden seçilmektedir ve burada yakalama ajanı bir modifikasyon-tanına antikorudur;

10

numuneden polipeptit-ajan kompleksinin saflaştırılması ve

15

rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin ve/veya bir polipeptit aktivitesinin tahlil edilmesi, burada rekombinant polipeptit ve/veya polipeptit aktivitesinin tespit edilmesi, modifikasyonu içeren rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin göstergesidir.

2. İstem 1'e göre yöntem olup, burada numune, modifiaksiyona sahip olmayan bir polipeptiti ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan bir polipeptiti kapsamaktadır tercihe bağlı olarak

20

burada rekombinant polipeptit, bir büyüme faktörü, bir sitokin, bir büyüme düzenleyici ajan, bir hormon, bir antikor, bir enzim, bir enzim inhibitörü, bir proteaz, bir proteaz inhibitörü, bir esteraz, bir transferaz, bir oksidoredüktaz, bir hidrolaz, bir asparajinaz, bir adenozin deaminaz, bir nörotoksin, bir karaciğer proteini, bir pankreatik protein, bir kas proteini, bir beyin proteini, bir akciğer proteini veya bir kan proteindir;

25

tercihe bağlı olarak burada esteraz bir bütirilkolinesteraz veya bir asetilkolinesterazdır tercihe bağlı olarak burada sitokin bir kemokin, bir lenfokin, bir tümör nekroz faktörü, bir hematopietik faktördür;

30

tercihe bağlı olarak burada büyüme düzenleyici ajan bir interlökin veya bir interferondur tercihe bağlı olarak burada kan proteini bir eritropoiez-stimülasyon ajanı bir proteaz, bir proteaz inhibitörü veya bir koagülasyon faktörüdür; tercihe bağlı olarak burada eritropoiez-stimülasyon ajanı bir eritropoietin veya bir darbepoetindir; tercihe bağlı olarak

35

burada proteaz tripsin, Kimotripsin, elastaz, pepsin veya ADAMTS13'tür; tercihe bağlı olarak burada proteaz inhibitörü, α 1-antitripsin, α 1-antikimotripsin, C1-inhibitörü, veya α 2-antiplazmin, antitrombindir;

tercihe bağı olarak burada koagülasyon faktörü bir Faktör II, bir Faktör IIa, bir Faktör VII, bir Faktör VIIa, bir Faktör VIII, bir Faktör VIIIa, bir Faktör IX, bir Faktör IXa, bir Faktör X, veya bir Faktör Xa'dır

tercihe bağı olarak burada kan proteini ADAMTS-13, α 1-antiplazmin, α 2-antiplazmin, antitrombin, antitrombin III, kanser prokoagülanı eritropoietin, Faktör II, Faktör IIa, Faktör V, Faktör Va, Faktör VI, Faktör VIa, Faktör VII, Faktör VIIa, Faktör VIII, Faktör VIIIa, Faktör IX, Faktör IXa, Faktör X, Faktör Xa, Faktör XI, Faktör XIa, Faktör XII, Faktör XIIa, Faktör XIII, Faktör XIIIa, fibronektin, fibrinojen (Faktör I), heparin kofaktör II, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK), intramusküler immünoglobulin, intravenöz immünoglobulin, plazmin, plazminojen, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI1), plazminojen aktivatör inhibitörü-2 (PAI2), prekallikrein, prostasiklin, protein C, aktif protein C (APC), protein S, protein Z, protein Z ile ilgili proteaz inhibitörü, trombomodulin, doku faktörü (Faktör III), Doku Faktörü yolak inhibitörü (TFPI), doku plazminojen aktivatörü (t-PA), ürokinaz, ve Von Willebrand Faktörüdür.

3. İstemler 1 ila 2'den herhangi birine göre yöntem olup, burada numune, rekombinant polipeptitin saflaştırılmış bir preparasyonunu, rekombinant polipeptitin kısmen saflaştırılmış bir preparasyonunu, rekombinant polipeptitin saflaştırılmamış bir preparasyonunu, rekombinant polipeptitin formüle edilmiş bir preparasyonunu; rekombinant polipeptitin bir ham özütünü, rekombinant polipeptitin bir fraksiyonlu özütünü, rekombinant polipeptiti kapsayan bir hücre lizatı veya bir biyolojik numuneyi kapsamaktadır

tercihe bağı olarak burada biyolojik numune, hücreler, bir doku numunesi, bir kan numunesi, bir vücut sıvısı numunesi veya bir bireyden doğrudan alınan bir organ numunesini içermektedir;

tercihe bağı olarak burada vücut sıvısıdır, tükürük, meni, dışkı, salya, safra, serebral sıvı, nazal sürüntü, ürogenital sürüntü, nazal aspirat, veya omurilik sıvısıdır

tercihe bağı olarak burada biyolojik numune, bir bireyden doğrudan alınan bir numuneden elde edilen bir preparasyondur;

tercihe bağı olarak burada bireyden doğrudan alınan numuneden elde edilen preparasyon, bir kan numunesinin bir plazma fraksiyonu, bir kan numunesinin bir serum fraksiyonu veya bir saflaştırma prosesine ait bir eluattır

4. Numunenin, rekombinant polipeptitin tespit edilebilirliğinin artırılması için veya rekombinant polipeptitin aktivitesinin artırılması için işlem gördüğü; tercihe bağı olarak işlemin, lisizleme, seyrelti, saflaştırma, özütleme, filtreleme, damıtma, ayırma,

konsantrasyon, karışın bileşenlerin inaktivasyonu, tepkenlerin ilave edilmesi veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içerdiği, İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre yöntem.

5. Yakalama ajanının, modifikasyonu içeren bir polipeptit için $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, veya $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla olan bir birleşme hızı sabitine sahip olduğu; tercihe bağlanarak yakalama ajanının, modifikasyonu içeren bir polipeptit için, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, veya $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 'den az olan bir ayrılma hızı sabitine sahip olduğu; tercihe bağlanarak yakalama ajanının, modifikasyonu içeren bir polipeptit için, 0.500 nM'den az, 0.450 nM'den az, 0.400 nM'den az, 0.350 nM'den az, 0.300 nM'den az, 0.250 nM'den az, 0.200 nM'den az, 0.150 nM'den az, 0.100 nM'den az, veya 0.050 nM'den az olan bir denge ayrılma sabitine sahip olduğu; tercihe bağlanarak yakalama ajanının, modifikasyona sahip olmayan bir polipeptit veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan bir polipeptit için, $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, veya $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az olan bir birleşme hızı sabitine sahip olduğu; tercihe bağlanarak bu tür bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hızı sabitine (K_a) ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hızı sabitine (K_a) göre, yakalama ajanının, bir modifikasyon içeren rekombinant polipeptit için, $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, veya $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla olan bir birleşme hızı sabitine (K_a) sahip olduğu; tercihe bağlanarak, yakalama ajanının, bir modifikasyon içeren rekombinant polipeptit için, bu tür bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hızı sabitinden (K_a) ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hızı sabitinden (K_a), en az 2 kat fazla, en az 3 kat fazla, en az 4 kat fazla, en az 5 kat fazla, en az 6 kat fazla, en az 7 kat fazla, en az 8 kat fazla, en az 9 kat fazla, en az 10 kat fazla, en az 100 kat fazla, en az 1,000 kat fazla veya en az 10,000 kat fazla olan bir birleşme hızı sabitine (K_a) sahip olduğu; tercihe bağlanarak bu tür bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite göre ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip bir rekombinant polipeptite göre yakalama ajanının, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit için en az 2:1, en az 3:1, en az 4:1, en az 5:1, en az 6:1, en az 7:1, en az 8:1, en az 9:1, en az 10:1, en az 15:1, en az 20:1, en az 25:1, en az 30:1, en az 35:1, veya en az 40: 1 olan bir bağlama özgülüğü oranına sahip olduğu; tercihe bağlanarak yakalama ajanının çok değerlikli bir yakalama ajanı olduğu, İstemler 1 ila 4'ten

herhangi birine göre yöntem.

6. Yakalama ajanları, bir modifikasyon içeren rekombinant polipeptiti, aynı olan ancak modifikasyona sahip olmayan bir polipeptitten ayırttığı; tercihe bağlanarak yakalama ajanları, bir modifikasyon içeren rekombinant polipeptiti, aynı olan ancak aynı modifikasyonun farklı bir örüntüsüne veya derecesine sahip olan polipeptitten ayırttığı, İstemler 1 ila 5'ten herhangi birine göre yöntem.

7. Modifikasyon tanıma antikorumun, bir anti-karbonhidrat antikoru, bir anti-asetil antikoru, bir anti-alkil antikoru, bir anti-metil antikoru, bir anti-amit antikoru, bir anti-karboksil antikoru, bir anti-glikozil antikoru, bir anti-polisiyalik asit antikoru, bir anti-hidroksil antikoru, bir anti-polisakkarit antikoru, bir anti-niştasta antikoru, bir anti-hidroksil-etil niştasta (HES) antikoru, bir anti-şeker antikoru veya bir anti-polietilen glikol (PEG) antikoru olduğu, İstemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre yöntem.

8. İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre yöntem olup, burada modifikasyonu içeren rekombinant polipeptit veya modifikasyonu içeren rekombinant koagülasyon faktörü, bir PEGile Faktör II, bir PEGile Faktör IIa, bir polisilyalillenmiş Faktör II, bir polisilyalillenmiş Faktörü IIa, bir HESile Faktör II, bir HESile Faktör IIa, bir niştastalanmış Faktör II veya bir niştastalanmış Faktör IIa'dır veya burada modifikasyonu içeren rekombinant polipeptit veya modifikasyonu içeren rekombinant koagülasyon faktörü, bir PEGile Faktör VII, bir PEGile Faktör VIIa, bir polisilyalillenmiş Faktör VII, bir polisilyalillenmiş Faktör VIIa, bir HESile Faktör VII, bir HESile Faktör VIIa, bir niştastalanmış Faktör VII, veya bir niştastalanmış Faktör VIIa'dır veya burada modifikasyonu içeren rekombinant polipeptit veya modifikasyonu içeren rekombinant koagülasyon faktörü, bir PEGile Faktör VIII, bir PEGile Faktör VIIIa, bir polisilyalillenmiş Faktör VIII, bir polisilyalillenmiş Faktör VIIIa, bir HESile Faktör VIII, bir HESile Faktör VIIIa, bir niştastalanmış Faktör VIII, veya bir niştastalanmış Faktör VIIIa'dır veya burada modifikasyonu içeren rekombinant polipeptit veya modifikasyonu içeren rekombinant koagülasyon faktörü, bir PEGile Faktör IX, bir PEGile Faktör IXa, bir polisilyalillenmiş Faktör IX, bir polisilyalillenmiş Faktör IXa, bir HESile Faktör IX, bir HESile Faktörü IXa, bir niştastalanmış Faktör IX, veya bir niştastalanmış Faktör IXa'dır

9. Yakalama ajanları bir katı desteğe tutturulduğu; tercihe bağlanarak katı desteğin, çok kuyucuklu bir plaka, bir film, bir tüp, bir tabaka, bir sütun veya bir mikropartikül olduğu,

İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre yöntem.

10. Aşağıdakileri mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem:

- 5 (i) Bir PEGile rekombinant Faktör VII, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PEG antikorunun PEGile rekombinant Faktör VII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PEG antikoruna sahip PEGile rekombinant Faktör VII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VII ve/veya Faktör VII aktivitesinin tespit edilmesi, PEGile rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin göstergesidir, burada PEGile rekombinant Faktör VII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır
- 10 (ii) bir polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PSA antikorunun polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PSA antikoruna sahip polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VII ve/veya Faktör VII aktivitesinin tespit edilmesi, polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin göstergesidir, burada polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır
- 15 (iii) bir HESile rekombinant Faktör VII, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun HESile rekombinant Faktör VII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip HESile rekombinant Faktör VII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VII ve/veya Faktör VII aktivitesinin tespit edilmesi, HESile rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin göstergesidir, burada HESile rekombinant Faktör VII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır
- 20 (iv) bir nişastalanmış rekombinant Faktör VII, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun nişastalanmış rekombinant Faktör VII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip nişastalanmış rekombinant
- 25
- 30
- 35

Faktör VII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VII ve/veya Faktör VII aktivitesinin tespit edilmesi, nişastalanmış rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin göstergesidir, burada nişastalanmış rekombinant Faktör VII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

(v) bir PEG ile rekombinant Faktörü VIII, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PEG antikorunun PEG ile rekombinant Faktör VIII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PEG antikoruna sahip PEG ile rekombinant Faktör VIII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VIII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VIII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VIII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VIII ve/veya Faktör VIII aktivitesinin tespit edilmesi, PEG ile rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin göstergesidir, burada PEG ile rekombinant Faktör VIII, bir Faktör VIII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

(vi) bir polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PSA antikorunun polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PSA antikoruna sahip polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VIII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VIII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VIII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VIII ve/veya Faktör VIII aktivitesinin tespit edilmesi, polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin göstergesidir, burada polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII, bir Faktör VIII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

(vii) bir HES ile rekombinant Faktör VIII, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun HES ile rekombinant Faktör VIII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip HES ile rekombinant Faktör VIII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VIII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VIII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VIII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VIII ve/veya Faktör VIII aktivitesinin tespit edilmesi, HES ile rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin göstergesidir, burada HES ile rekombinant Faktör VIII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

(viii) bir nişastalanmış rekombinant Faktör VIII, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun nişastalanmış rekombinant Faktör VIII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip nişastalanmış rekombinant Faktör VIII'yi kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VIII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VIII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VIII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VIII ve/veya Faktör VIII aktivitesinin tespit edilmesi, nişastalanmış rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin göstergesidir, burada nişastalanmış rekombinant Faktör VIII, bir Faktör VIII ve/veya bir Faktör VIIIa'dır

(ix) bir PEGile rekombinant Faktörü IX, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PEG antikorunun PEGile rekombinant Faktör IX'e seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PEG antikoruna sahip PEGile rekombinant Faktör IX'i kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör IX-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör IX-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör IX aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör IX ve/veya Faktör IX aktivitesinin tespit edilmesi, PEGile rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin göstergesidir, burada PEGile rekombinant Faktör IX, bir Faktör IX ve/veya bir Faktör IXa'dır

(x) bir polisyalillenmiş rekombinant Faktörü IX, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PSA antikorunun polisyalillenmiş rekombinant Faktör IX'e seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PSA antikoruna sahip polisyalillenmiş rekombinant Faktör IX'i kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör IX-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör IX-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör IX aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör IX ve/veya Faktör IX aktivitesinin tespit edilmesi, polisyalillenmiş rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin göstergesidir, burada polisyalillenmiş rekombinant Faktör IX, bir Faktör IX ve/veya bir Faktör IXa'dır

(xi) bir HESile rekombinant Faktörü IX, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun HESile rekombinant Faktör IX'e seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip HESile rekombinant Faktör IX'i kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör IX-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör IX-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör IX aktivitesinin tahlil

edilmesi, burada Faktör IX ve/veya Faktör IX aktivitesinin tespit edilmesi, HESile rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin göstergesidir, burada HESile rekombinant Faktör IX, bir Faktör IX ve/veya bir Faktör IXa'dır

(xii) bir nişastalanmış rekombinant Faktörü IX, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun nişastalanmış rekombinant Faktör IX'e seçici şekilde bağlanması olanak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip nişastalanmış rekombinant Faktör IX'i kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör IX-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör IX-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör IX aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör IX ve/veya Faktör IX aktivitesinin tespit edilmesi, nişastalanmış rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin göstergesidir, burada nişastalanmış rekombinant Faktör IX, bir Faktör IX ve/veya bir Faktör IXa'dır

11. Tahlil adını, bir niteliksel tahlil veya bir niceliksel tahlil kullanılarak gerçekleştirildiği, tercihe bağlı olarak tahlil adını, bir in vitro tahlil, bir hücre bazlı tahlil veya bir in vivo tahlil kullanılarak gerçekleştirildiği, İstemler 1 ila 10'dan herhangi birine göre yöntem.

12. İstemler 1 ila 11'den herhangi birine göre yöntem olup, burada tahlil adını spesifik olmayan bir polipeptit tahlili veya spesifik olan bir polipeptit tahlili kullanılarak gerçekleştirilmektedir; tercihe bağlı olarak burada spesifik olmayan polipeptit tahlili bir UV absorpsiyon tahlili, bir biyüre tahlili veya bir Bradford tahlilidir; tercihe bağlı olarak burada spesifik olan polipeptit tahlili bir kromojenik tahlil, bir kolorimetrik tahlil, bir kronometrik tahlil, bir kemiluminesans tahlili, bir elektrokemiluminesans tahlili, bir biyoluminesans tahlili, bir florojenik tahlil, bir rezonans enerji aktarım tahlili, bir düzlemsel polarizasyon tahlili, bir akış sitometrisi tahlili, bir immün bazlı tahlil veya bir aktivite tahlilidir; tercihe bağlı olarak burada aktivite tahlili bir enzimatik aktivite tahlili, bir inhibitör aktivitesi tahlili, bir koagülasyon aktivitesi tahlili veya bir polimerizasyon aktivitesi tahlilidir.

13. Yakalama ajanını seçici şekilde bağlanması, nötr ila alkalın arası bir pH'ta meydana geldiği, İstemler 1 ila 12'den herhangi birine göre yöntem.

14. Rekombinant polipeptitin bir terapötik polipeptit olduğu; tercihe bağlı olarak terapötik polipeptitin, Faktör IX (FIX), Faktör VIII (FVIII), Faktör VIIa (FVIIa), Von Willebrand Faktörü (VWF), Faktör V (FV), Faktör X (FX), Faktör XI (FXI), Faktör XII (FXII), trombin

(FN), protein C, protein S, tPA, PAI-1, doku faktörü (TF), ADAMTS 13 proteaz, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, koloni stimülasyon faktörü-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, granülosit koloni stimülasyon faktörü (G-CSF), EPO, interferon- α (IFN- α), konsensus interferon, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoietin (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, anjiyopoietin-benzeri polipeptit 1 (ANGPTL1), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 2 (ANGPTL2), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 3 (ANGPTL3), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 4 (ANGPTL4), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 5 (ANGPTL5), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 6 (ANGPTL6), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 7 (ANGPTL7), vitronektin, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyojenin, aktivin A, aktivin B, aktivin C, kemik morfojenik protein-1, kemik morfojenik protein-2, kemik morfojenik protein-3, kemik morfojenik protein-4, kemik morfojenik protein-5, kemik morfojenik protein-6, kemik morfojenik protein-7, kemik morfojenik protein-8, kemik morfojenik protein-9, kemik morfojenik protein-10, kemik morfojenik protein-11, kemik morfojenik protein-12, kemik morfojenik protein-13, kemik morfojenik protein-14, kemik morfojenik protein-15, kemik morfojenik protein reseptörü IA, kemik morfojenik protein reseptörü IB, kemik morfojenik protein reseptörü II, beyin türevli nörotrofik faktör, kardiyotrofin-1, siliyer nötrofik faktör, siliyer nötrofik faktör reseptörü, kripto, kriptik, sitokin-indüklü nötrofil kemotaktik faktör 1, sitokin indüklü nötrofil, kemotaktik faktör 2 α , sitokin indüklü nötrofik kemotaktik faktör 2 β , β -endotelial hücre büyüme faktörü, endotelin 1, epidermal büyüme faktörü, epijen, epiregulin, epitelyal türevli nötrofil atraktan \square fibroblast büyüme faktörü 4, fibroblast büyüme faktörü 5, fibroblast büyüme faktörü 6, fibroblast büyüme faktörü 7, fibroblast büyüme faktörü 8, fibroblast büyüme faktörü 8b, fibroblast büyüme faktörü 8c, fibroblast büyüme faktörü 9, fibroblast büyüme faktörü 10, fibroblast büyüme faktörü 11, fibroblast büyüme faktörü 12, fibroblast büyüme faktörü 13, fibroblast büyüme faktörü 16, fibroblast büyüme faktörü 17, fibroblast büyüme faktörü 19, fibroblast büyüme faktörü 20, fibroblast büyüme faktörü 21, fibroblast büyüme faktörü asidik, fibroblast büyüme faktörü bazik, gliyal hücre hatt \square türevli nötrofik faktör reseptörü α 1, gliyal hücre hatt \square türevli nötrofik faktör reseptörü α 2, büyümeyle ilgili protein, büyümeyle ilgili protein a, büyümeyle ilgili protein β , büyümeyle ilgili protein γ , heparin bağlama epidermal büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü reseptörü, hepatoma türevli büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü I, insülin-benzeri büyüme faktörü reseptörü, insülin-benzeri büyüme faktörü II, insülin-benzeri büyüme faktörü bağlama proteini, keratinosit büyüme faktörü, lösemi inhibisyon faktörü, lösemi inhibisyon faktörü

reseptörü α , sinir büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü reseptörü, nöropoietin, nörotrofin-3, nörotrofin-4, onkostatin M (OSM), plasenta büyüme faktörü, plasenta büyüme faktörü 2, platelet türevli endotelyal hücre büyüme faktörü, platelet türevli büyüme faktörü, platelet türevli büyüme faktörü A zinciri, platelet türevli büyüme faktörü AA, platelet türevli büyüme faktörü AB, platelet türevli büyüme faktörü B zinciri, platelet türevli büyüme faktörü BB, platelet türevli büyüme faktörü reseptörü α , platelet türevli büyüme faktörü reseptörü β , ön-B hücresi büyüme stimülasyon faktörü, kök hücre faktörü (SCF), kök hücre faktörü reseptörü, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, dönüştürücü büyüme faktörü α , dönüştürücü büyüme faktörü β , dönüştürücü büyüme faktörü β 1, dönüştürücü büyüme faktörü β 1.2, dönüştürücü büyüme faktörü β 2, dönüştürücü büyüme faktörü β 3, dönüştürücü büyüme faktörü β 5, latent dönüştürücü büyüme faktörü β 1, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama proteini I, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama proteini II, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama proteini III, timik stromal lenfopoietin (TSLP), tümör nekroz faktörü reseptörü tip I, tümör nekroz faktörü reseptörü tip II, ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü, fosfolipaz-aktivasyon proteini (PUP), insülin, lektin risin, prolaktin, koryonik gonadotropin, folikül-stimülasyon hormonu, tiroid-stimülasyon hormonu, doku plazminojen aktivatörü, IgG, IgE, IgM, IgA, ve IgD, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, DNAz, fetuin, lüteinleyici hormon, östrojen, insülin, albümin, lipoproteinler, fetoprotein, transferrin, trombopoietin, ürokinaz, integrin, trombin, leptin, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanersept), veya bunların biyolojik olarak aktif bir fragmenti, türevi veya varyantını bulduğu, İstemler 1 ila 13'ten herhangi birine göre yöntem.

15. Modifikasyonun, HESilasyon, nişastalama veya polisiyalilasyonun en az birinden seçildiği, İstemler 1 ila 14'ten herhangi birine göre yöntem.

16. Aşağıdakilere göre bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntemin uygulanması için bir kitin kullanılması

(i) İstemler 1 ila 14'ten herhangi biri, kit aşağıdakileri içermektedir;

(a) yakalama ajanının modifikasyona seçici şekilde bağlanması olanak veren koşullar altında modifikasyona seçici şekilde bağlanan bir veya daha fazla yakalama ajanı burada rekombinant polipeptit ile ilişkilendirilen modifikasyon, HESilasyon, HESilasyon, nişastalama veya polisiyalilasyonun en az birinden seçilmektedir ve

burada yakalama ajanı bir modifikasyon-tanıma antikorudur; ve

(b) bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin ve/veya aktivitesinin tespit edilmesi için gerekli olan bir veya daha fazla tepken; veya

5 (ii) istem 15, kit aşağıdakileri içermektedir:

(a') yakalama ajanını modifikasyona seçici şekilde bağlanmasına olanak veren koşullar altında modifikasyona seçici şekilde bağlanan bir veya daha fazla yakalama ajanı burada rekombinant polipeptit ile ilişkilendirilen modifikasyon, HESilasyon, nişastalama veya polisilyalasyonun en az birinden seçilmektedir ve burada yakalama ajanı bir modifikasyon-tanıma antikorudur; ve

10

(b') bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin ve/veya aktivitesinin tespit edilmesi için gerekli olan bir veya daha fazla tepken.

15

TARİFNAME

MODİFİKASYONA BAĞLI AKTİVİTE TAHLİLLERİ

5 RÜÇHAN HAKKI TALEBİ

Teknik Alan

10 Modifikasyona bağlı aktivite tahlillerini olanaklı olan yöntemler, sistemler ve kitler burada açıklanmaktadır

Buluşun Arka Planı

15 Birçok hastalık veya rahatsızlık, vücuttaki belirli bir polipeptitin yetersiz seviyelerinden veya bu polipeptitin kusurlu versiyonlarından üretiminden kaynaklanmaktadır. Genetik mühendisliği ve moleküler biyolojinin ortaya çıkmasıyla, replasman polipeptit tedavisi vasıtasıyla bu tür hastalıklar ve rahatsızlıkların tedavi edilmesi artık mümkündür. Örneğin, rekombinant olarak üretilen bir polipeptitin uygulanması, endojen polipeptitin düşük seviyelerine takviye sağlanması vasıtasıyla veya vücut tarafından üretilen kusurlu polipeptit için ikame gerçekleştirilmesi vasıtasıyla bir hastalığı veya rahatsızlığı tedavi edebilmektedir.

25 Etkili bir rekombinant polipeptit terapisinin tasarlanması bakımından kritik olarak bir faktör, vücuda uygulandığında polipeptitin dolaşım salar yaşamının artmasıdır. Bir polipeptitin vücutta aktif olarak kaldığı sürenin uzunluğu, örneğin polipeptitin yaşamını artıran çok çeşitli işlevsel gruplar kullanılarak polipeptitlerin modifiye edilmesiyle uzatılabilmektedir. Bu tür modifikasyonlar, polipeptiti proteolitik bozunmaya karşı korumaktadır, stabilitesini artırmaktadır, bunun bir başka molekül ile etkileşimini geliştirmekte veya kolaylaştırmaktadır, antijenisitesini azaltmaktadır ve/veya vücuttan klirens hızını azaltmaktadır. Uygulanan bir rekombinant polipeptitin dolaşım salar yaşamının uzatılması bakımından faydalı olan örnek 30 modifikasyonlar, bunlarla sınırlanmamak üzere, PEGilasyon, polisiyalilasyon, HESilasyon, Silasyon ve sitrullinasyonu kapsamaktadır.

35 Hastalıklar veya rahatsızlıklara yönelik geline rekombinant polipeptit terapisinin önemli bir yönü, modifikasyonun ve/veya bir bireye uygulanmasından ardından polipeptit aktivitesinin ölçülebilmesidir. Ancak bu yeti, genellikle, rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin veya

aktivitesinin tespit edilmesi için kullanılan tahlillerin özgüllüğüne ve doğruluğuna müdahale eden endojen polipeptitin mevcudiyeti tarafından engellenmektedir. Dolayısıyla, bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin ve/veya aktivitesinin belirlenmesine yönelik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır

5

Önceki Teknik

WO 2009/086262 numaralı patent dokümanı plazma proteini ve rekombinant protein temelinde aynı olduğunda, protein glikozilasyonundaki farka dayanarak bir numunedeki plazma türevli proteinin ve rekombinant proteinin tespit edilmesi ve niceliğinin belirlenmesine yönelik yöntemler ile ilgilidir.

Koseoglu M.H. ve ark. referans oksidatif fosforilasyonun inhibisyonuna yan olarak glukoz taşımaaya dair stimülasyon mekanizması ile ilgilidir (Koseoglu ve ark. (2009) Molecular and Cellular Biochemistry, Cilt 194, NR. 1-2, syf 109-116).

Su Y.C. ve ark. referans ikinci jenerasyon anti-poli(etilen glikol) monoklonal antikolar vasıtasıyla PEG ile bileşiklerin hassas şekilde niceliğinin belirlenmesi ile ilgilidir (Su Y.C. ve ark. (2010) Bioconjugate Chem. 21, 1264-1270).

20

KISA AÇIKLAMA

Modifikasyona bağlı aktivite tahlilleri (MDAA'lar) olarak adlandırılan yöntemler, sistemler ve kitler burada açıklanmaktadır MDAA'lar, endojen polipeptitlerin mevcudiyetinde bile, modifikasyonu içeren polipeptitler, aynı veya benzer polipeptitlerin modifiye edilmemiş versiyonları veya farklı bir modifikasyon örüntüsü veya derecesi içeren polipeptitler ile seçici şekilde ilişkilenen, modifikasyon tanımlı bir yakalama ajanından faydalanmaktadır Yakalanan polipeptitin mevcudiyeti ve aktivitesi, modifikasyonu içeren polipeptitlerin mevcudiyetinin tespit edilmesinin bir yolu olarak ölçülebilmektedir.

30

Mevcut tarifnamenin yönleri, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik yöntemleri açıklamaktadır Yöntemler; yakalama ajanı modifiyasyona seçici şekilde bağlanmasında olanak veren koşullar altında modifikasyonu seçici şekilde bağlayan bir yakalama ajanı ile modifikasyonu içeren rekombinant polipeptiti kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir polipeptit-ajan

35

kompleksinin oluşturulması numuneden polipeptit-ajan kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin tahlil edilmesine yönelik adımlar içermektedir, burada rekombinant polipeptitin tespit edilmesi, modifikasyonu içeren rekombinant polipeptitin mevcudiyetini göstermektedir. Alternatif veya eş zamanlı olarak, yöntemler bir polipeptit aktivitesini de tahlil edebilmektedir, burada polipeptit aktivitesinin tespit edilmesi, modifikasyonu içeren rekombinant polipeptitin mevcudiyetini göstermektedir. Bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit, bir PEG ile, polisilyalillenmiş, HES ile veya sillenmiş rekombinant polipeptit olabilmektedir. Bir yakalama ajanı bir antikör, bir aptamer, bir sentetik peptit, bir bağlama molekülü ve bir nükleik asit olabilmektedir.

10 Mevcut tarifnamenin diğer yönleri, bir modifikasyon içeren bir rekombinant koagülasyon faktörünün mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik yöntemleri açıklamaktadır. Yöntemler; yakalama ajanının modifiaksiyona seçici şekilde bağlanması olarak verilen koşullar altında modifikasyonu seçici şekilde bağlayan bir yakalama ajanı ile modifikasyonu içeren rekombinant koagülasyon faktörünü kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir faktör-ajan kompleksinin oluşturulması numuneden faktör-ajan kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant koagülasyon faktörünün mevcudiyetinin tahlil edilmesine yönelik adımlar içermektedir, burada rekombinant koagülasyon faktörünün tespit edilmesi, modifikasyonu içeren rekombinant koagülasyon faktörünün mevcudiyetini göstermektedir. Alternatif veya eş zamanlı olarak, yöntemler bir koagülasyon faktörü aktivitesini de tahlil edebilmektedir, burada koagülasyon faktörü aktivitesinin tespit edilmesi, modifikasyonu içeren rekombinant koagülasyon faktörünün mevcudiyetini göstermektedir. Bir modifikasyon içeren bir koagülasyon faktörü, bir PEG ile rekombinant Faktör VII, bir polisilyalillenmiş rekombinant Faktör VII, bir HES ile Faktör VII, bir sillenmiş rekombinant Faktör VII, bir PEG ile rekombinant Faktör VIII, bir polisilyalillenmiş rekombinant Faktör VIII, bir HES ile Faktör VIII, bir sillenmiş rekombinant Faktör VIII, bir PEG ile rekombinant Faktör IX, bir polisilyalillenmiş rekombinant Faktör IX, bir HES ile Faktör IX ve/veya bir sillenmiş rekombinant Faktör IX olabilmektedir.

30 Mevcut tarifnamenin diğer yönleri, burada açıklanan yöntemlerin uygulanması için faydalı olan bir veya daha fazla bileşeni ve yöntemlerin gerçekleştirilmesine yönelik talimatları içeren kitleri açıklamaktadır. Bir kit, burada açıklanan bir modifikasyonu içeren bir rekombinant polipeptitin bir aktivitesinin ve/veya mevcudiyetinin tespit edilmesi için gereken, burada açıklanan bir veya daha fazla yakalama ajanı bir veya daha fazla katıfaz desteğini ve/veya 35 bir veya daha fazla tepkeni içerebilmektedir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

5 Şekil 1, PEGile FVIII preparasyonu ve bir insan referans plazma preparasyonu kullanılarak elde edilen PEGile rekombinant FVIII için bir MDAA'nın konsantrasyon-yanıt eğrilerine ait bir grafiğin göstermektedir.

10 Şekil 2, farklı kompleksitelere sahip (tampona karşı plazma) numune matrislerinde PEGile rekombinant FVIII için bir MDAA'nın doz-yanıt eğrilerine ait bir grafiği göstermektedir.

15 Şekil 3, PEGile rekombinant FVIII için bir MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini sergileyen iyileştirilmiş tahlil standartlarının uyumunu ve ortalama kalibrasyon eğrisinin bir grafiğini göstermektedir. Hata çubukları ortalamaların tek bir standart sapmasını belirtmektedir.

Şekil 4, PEG 5000 ile rekabet kullanılarak PEGile rekombinant FVIII için bir MDAA'nın spesifikliğini sergileyen bir grafiği göstermektedir.

20 Şekil 5, anti-PEG antikoru ile rekabet kullanılarak PEGile rekombinant FVIII için bir MDAA'nın spesifikliğini sergileyen bir grafiği göstermektedir.

Şekil 6, PEGile rekombinant FVIII için bir MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini sergileyen seyreltilmiş doğrusallığı bir grafiğini göstermektedir.

25 Şekil 7, 78 ila 2.4 mIU/mL arasındaki bir FVIII aktivite aralığındaki polisyalillenmiş FVIII preparasyonu kullanılarak polisyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın konsantrasyon-yanıt eğrisinin ve modifiye edilmemiş FVIII içeren insan plazmasının kayıplı yanıtına bir grafiğidir.

30 Şekil 8, tampon içerisinde belirlenene göre farklı hayvan türlerine ait plazmaya spayklanan polisyalillenmiş rekombinant FVIII kullanılarak polisyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın konsantrasyon-yanıt eğrilerinin bir grafiğini göstermektedir.

35

Şekil 9, polisyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın performansını ve duyarlılığını sergileyen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin bir grafiğini göstermektedir.

5 Şekil 10, polisyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini sergileyen ortalama kalibrasyon eğrisinin bir grafiğini göstermektedir.

Şekil 11, iyileştirilen konsantrasyonların, tüm aralık üzerinden nominal olanların $\pm\%$ 10'luk bir aralıkta olduğunu sergileyen, iyileştirilmiş konsantrasyonların nominal olanlarla olan uyumuna dair bir grafiği göstermektedir.

10

Şekil 12, normal endojen FVIII seviyelerine sahip sıçanlara uygulanan polisyalillenmiş rekombinant FVIII'e yönelik bir MDAA ile elde edilen farmakokinetik profilin bir grafiğini göstermektedir.

15

Şekil 13, polisyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini sergileyen ortalama kalibrasyon eğrisinin bir grafiğini göstermektedir. Hata çubuğu, ortalamaların tek bir standart sapmasını vermektedir.

20

Şekil 14, polisyalik asit ile bir rekabet kullanılarak polisyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın özgüllüğünü sergileyen bir grafiği göstermektedir.

Şekil 15, polisyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın hassasiyetini sergileyen bir grafiği göstermektedir. Vurgulanan alan, elde edilen ortalamanın 2-SD aralığında vermektedir.

25

Şekil 16, polisyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini sergileyen hayvan plazması numunelerindeki doz-yanıt eğrilerinin bir grafiğini göstermektedir.

30

Şekil 17, PEGile FIX preparasyonu ve bir insan referans plazma preparasyonu kullanılarak elde edilen PEGile rekombinant FIX için bir MDAA'nın konsantrasyon-yanıt eğrilerine ait bir grafiği göstermektedir.

35

Şekil 18, bir koagülasyon tahlil formatı kullanarak, PEGile rekombinant FVIII için bir MDAA'nın bir grafiğini göstermektedir.

Şekil 19, bir koagülasyon tahlil formatı kullanarak, polisiyalillenmiş rekombinant FVIII için bir MDAA'nın bir grafiğini göstermektedir.

5 **AYRINTILI AÇIKLAMA**

Hemofili veya diğer rahatsızlıklar için tedavi bileşikleri geliştirilmesinin önemli bir yönü, doğal tedavi ortamına uygulanmasını ve/veya modifikasyonunun ardından tedavi bileşiğinin aktivitesinin ölçülebilmesidir. Ancak bu yeti sıkıca, aktivite tahlilinin test sonuçlarına ait özgüllük ve doğruluğa müdahale eden tedavi ortamındaki benzer bileşiklerin mevcudiyeti ile engellenmektedir.

Örneğin tedavi edilen bireyin genomundan üretilen, doğal olarak meydana gelen veya endojen polipeptitler de dahil olmak üzere, aynı veya benzer polipeptitlerin modifiye edilmemiş versiyonlarının mevcudiyetinde rekombinant polipeptitlerin ayrılmasını ve tespit edilmesini olanaklı kılan, modifikasyona bağlı aktivite tahlilleri (MDAA'lar) olarak adlandırılan sistemler ve yöntemler burada açıklanmaktadır. Standart olmayan bir örnek olarak, hemofili tedavilerinin geliştirilmesinde, uygulamadan sonra bir PEG ile rekombinant Faktör VIII bileşiğinin aktivitesinin ölçülmesi gerekebilmektedir. Bileşik Faktör VIII'ü yetersiz insanlara uygulanmadan önce, genellikle, Faktör VIII'ü yetersiz olabilen veya olmayan laboratuvar hayvanlarına uygulanmaktadır. Mevcut buluşun MDAA'lar olmadan, uygulamadan sonra ölçülen mevcudiyetin veya aktivitenin, uygulanan PEG ile rekombinant Faktör VIII'den veya doğal olarak meydana gelen Faktör VIII'den kaynaklı olup olmadığını belirlenmesi mümkün olmayabilmektedir. Burada açıklanan MDAA'lar bu ayrıntıyı yapmasını mümkün kılmaktadır.

Belirli yapılandırılmalarda, mevcut buluşun MDAA'ları kat kat bir desteğe bağlanan bir yakalama ajanı içermektedir. Bir test numunesi kat kat destek ile inkübe edilebilmektedir, burada modifiye edilen bileşik, immobilize yakalama ajanı tarafından seçici şekilde bağlanmaktadır. Belirli yapılandırılmalardaki endojen, modifiyesiz bileşikler de dahil olmak üzere diğer tüm bileşikler, yakalama ile giderilebilmektedir. Yakalanan modifiye bileşik üzerinde bir aktivite tahlili gerçekleştirilebilmektedir.

Burada açıklanan MDAA'ların adları şunlardan birini veya daha fazlasını içerebilmektedir: bir antikorun bir kat kat desteğe bağlanması, kat kat desteğin yüzeyi üzerinde bir numunenin

inkübe edilmesi; katıdesteğin yıkanması ve katıdestek üzerinde bir kromojenik tahlilin yürütülmesi. Belirli bir yapılandırılmada, yöntemler yalnızca inkübe etme adımlarıyla yıkama adımları ve/veya kromojenik tahlil adımları kapsamaktadır. Bağlama adımları nötr ila hafif oranda alkalın pH'ta bir antikorun bir plakaya bağlanmasıyla kapsamabilmektedir.

5

Mevcut tarifnamenin yönleri, bir rekombinant polipeptiti açıklamaktadır. Bir rekombinant polipeptit, moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak sentezlenmektedir. Bir modifikasyon içeren, rekombinant şekilde eksprese edilen herhangi bir polipeptit, burada açıklanan yöntemlerde tespit edilebilmektedir. "Polipeptit", "peptit" ve "protein" terimleri, amino asit kalıntıları bir polimerine işaret etmek için birbirinin yerine kullanılmaktadır. Terimler, bir veya daha fazla amino asit kalıntısını, doğal olarak meydana gelen ilgili bir amino asidin bir yapay kimyasal taklitçisi olduğu amino asit polimerlerinin yanı sıra, modifiye kalıntıları içeren, doğal olarak meydana gelen amino asit polimerlerine ve doğal olarak meydana gelmeyen amino asit polimerleri için geçerlidir.

10

15

Tipik olarak, bir rekombinant polipeptit, kültürleme için uygun olan hücrenin içerisine verilen rekombinant polinükleotitten eksprese edilmektedir. Yaygın olarak, rekombinant polinükleotit, eksprese edilecek polinükleotiti kodlayan bir açığı okuma çerçevesinin yanı sıra DNA replikasyonu, polinükleotit ekspresyonu, antibiyotik direnç, genomik entegrasyon ve diğer özelliklere dahil edilen özel regülatör kodlama sekansları kapsayan bir ekspresyon vektörü içermektedir. Örneğin, prokaryot ekspresyon vektörleri tipik olarak, bir replikasyonun kaynağını, uygun bir başlatıcı ve/veya artı elementleri ve ayrıca ribozom bağlama, poliadenilasyon, transkripsiyonel terminasyon için gereken bölgelerin yanı sıra 5' yan transkripsiyonsuz sekans ve diğer transkripsiyonsuz genetik elemanları içermektedir. Örnek prokaryotik vektörler, örneğin bir bakteriyofaj T7 başlatıcısı gibi başlatıcıları kullanan pET ve pRSET'i kapsamaktadır.

20

25

30

35

Ökaryotik ekspresyon vektörleri tipik olarak bir replikasyonun kaynağını, uygun bir başlatıcı ve/veya artı elementleri ve ayrıca, gerekli ribozom bağlama, poliadenilasyon, uç birleştirme, transkripsiyonel terminasyon için gerekli bölgelerin yanı sıra 5' yan transkripsiyonsuz sekansları ve transkripsiyonsuz diğer genetik elemanları içermektedir. Örnek maya vektörleri, örneğin AOX1, AUG1, GAP, ve GAL1 gibi başlatıcıları kullanan pAO, pMET, pPIC, pPICZ, ve pYES'i kapsamaktadır. Örnek böcek vektörleri örneğin PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64 ve polh gibi başlatıcıları kullanan pAc5, pBAC, pIB, pMIB, pMT'yi kapsamaktadır. Örnek memeli vektörleri, örneğin beta-kazein, beta-laktoglobulin, peynir altı

suyu asit başlatıcı HSV timidin kinaz, erken ve geç simian virüsü 40 (SV40), retrovirüsten LTR'ler ve fare metallothionein-1 gibi başlatıcı kullanan pBPV, pCMV, pCMVTNT, pDNA, pDisplay, pMSG, pOG44, pQBI25, pRc/RSV, pSECTag, pSECTag2, pSG, pSV2cat, pSVK3, pSVL, pUCIG-MET, pVAX1, pWLneo, ve pXT1'i kapsamaktadır. Seçilebilen işaretçiler, Ampisillin, Kloramfenikol transferaz, Kanamisin, Neomisin ve Tetrasiklini kapsamaktadır. Uygun ekspresyon vektörleri teknikte bilinmektedir ve piyasada mevcuttur.

Böceklerden elde edilen böcek hücreleri ve hücre hatları örneğin *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* ve *Manduca sexta*'dan hücreleri kapsamaktadır. Böcek hücre hatları sınırlanmayan örnekleri High-Five, K_C, Schneider'in Drozofila hattı 2 (S2), SF9, ve SF21 hücre hatları kapsamaktadır. Memeli hücreleri ve memeli hücrelerinden elde edilen hücre hatları örneğin fare, sıçan, hamster, domuz, sığırtı, at, primat ve insana ait hücreleri kapsamaktadır. Memeli hücre hatları sınırlanmayan örnekleri 1A3, 3T3, 6E6, 10T1/2, APRT, BALB/3T3, BE (2)-C, BHK, BT, C6, C127, CHO, CHP3, COS-1, COS-7, CPAE, ESK-4, FB2, GH1, GH3, HeLa, HEK-293, HepG2, HL-60, IMR-32, L2, LLC-PK1, L-M, MCF-7, NB4, NBL-6, NCTC, Neuro 2A, NIE-115, NG108-15, NIH3T3, PC12, PK15, SBAC, SH-SY5Y, SK-Hep, SK-N-DZ, SK-N-F1, SK-N-SH, ST, SW-13, ve VV-1 hücre hatları kapsamaktadır. Hücre hatları American Type Culture Collection, European Collection of Cell Cultures ve/veya the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures isimli kurumlardan elde edilebilmektedir.

Çeşitli prokaryot ve/veya ökaryotik ekspresyon sistemleri, burada açıklanan bir proteinin rekombinant şekilde eksprese edilmesi için kullanılabilmektedir. Ekspresyon sistemleri, bunlarla sınırlanmamak üzere, indüklenebilir ekspresyon, indüklenemeyen ekspresyon, yapısal ekspresyon, dokuya özgü ekspresyon, hücreye özgü ekspresyon, viral-aracı ekspresyon, stabil-entegre ekspresyon ve geçici ekspresyonu kapsayan çeşitli özelliklerden herhangi birini kapsayabilmektedir. Bu tür ekspresyon sistemlerinin meydana getirilişi ve kullanımı teknikte bilinmektedir.

Burada açıklanan bir rekombinant polipeptit tipik olarak bir terapötik polipeptittir. Terapötik bir polipeptitin sınırlanmayan örnekleri, Faktör IX (FIX), Faktör VIII (FVIII), Faktör VIIa (FVIIa), Von Willebrand Faktörü (VWF), Faktör V (FV), Faktör X (FX), Faktör XI (FXI), Faktör XII (FXII), trombin (FII), protein C, protein S, tPA, PAI-1, doku faktörü (TF), ADAMTS 13 proteaz, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, koloni stimülasyon faktörü-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, granülosit koloni stimülasyon faktörü (G-CSF), EPO, interferon-a

(IFN-a), konsensus interferon, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoietin (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, anjiyopoietin-benzeri polipeptit 1 (ANGPTL1), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 2 (ANGPTL2), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 3 (ANGPTL3), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 4 (ANGPTL4), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 5 (ANGPTL5), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 6 (ANGPTL6), anjiyopoietin-benzeri polipeptit 7 (ANGPTL7), vitronektin, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), anjiyojenin, aktivin A, aktivin B, aktivin C, kemik morfojenik protein-1, kemik morfojenik protein-2, kemik morfojenik protein-3, kemik morfojenik protein-4, kemik morfojenik protein-5, kemik morfojenik protein-6, kemik morfojenik protein-7, kemik morfojenik protein-8, kemik morfojenik protein-9, kemik morfojenik protein-10, kemik morfojenik protein-11, kemik morfojenik protein-12, kemik morfojenik protein-13, kemik morfojenik protein-14, kemik morfojenik protein-15, kemik morfojenik protein reseptörü IA, kemik morfojenik protein reseptörü IB, kemik morfojenik protein reseptörü II, beyin türevli nörotrofik faktör, kardiyotrofin-1, siliyer nötrofik faktör, siliyer nötrofik faktör reseptörü, kripto, kriptik, sitokin-indüklü nötrofil kemotaktik faktör 1, sitokin indüklü nötrofil, kemotaktik faktör 2 α , sitokin indüklü nötrofik kemotaktik faktör 2 β , β -endotelyal hücre büyüme faktörü, endotelin 1, epidermal büyüme faktörü, epijen, epiregulin, epitelyal türevli nötrofil atraktan□fibroblast büyüme faktörü 4, fibroblast büyüme faktörü 5, fibroblast büyüme faktörü 6, fibroblast büyüme faktörü 7, fibroblast büyüme faktörü 8, fibroblast büyüme faktörü 8b, fibroblast büyüme faktörü 8c, fibroblast büyüme faktörü 9, fibroblast büyüme faktörü 10, fibroblast büyüme faktörü 11, fibroblast büyüme faktörü 12, fibroblast büyüme faktörü 13, fibroblast büyüme faktörü 16, fibroblast büyüme faktörü 17, fibroblast büyüme faktörü 19, fibroblast büyüme faktörü 20, fibroblast büyüme faktörü 21, fibroblast büyüme faktörü asidik, fibroblast büyüme faktörü bazik, gliyal hücre hatt□türevli nötrofik faktör reseptörü a1, gliyal hücre hatt□türevli nötrofik faktör reseptörü a2, büyümeyle ilgili protein, büyümeyle ilgili protein a, büyümeyle ilgili protein β , büyümeyle ilgili protein γ , heparin bağlama epidermal büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü reseptörü, hepatoma türevli büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü I, insülin-benzeri büyüme faktörü recseptörü, insülin-benzeri büyüme faktörü II, insülin-benzeri büyüme faktörü bağlama proteini, keratinosit büyüme faktörü, lösemi inhibisyon faktörü, lösemi inhibisyon faktörü reseptörü α , sinir büyüme faktörü sinir büyüme faktörü reseptörü, nöropoietin, nörotrofin-3, nörotrofin-4, onkostatin M (OSM), plasenta büyüme faktörü, plasenta büyüme faktörü 2, platelet türevli endotelyal hücre büyüme faktörü, platelet türevli büyüme faktörü, platelet türevli büyüme faktörü A zinciri, platelet türevli büyüme faktörü AA, platelet türevli büyüme

faktörü AB, platelet türevli büyüme faktörü B zinciri, platelet türevli büyüme faktörü BB, platelet türevli büyüme faktörü reseptörü α , platelet türevli büyüme faktörü reseptörü β , ön-B hücresi büyüme stimülasyon faktörü, kök hücre faktörü (SCF), kök hücre faktörü reseptörü, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, dönüştürücü büyüme faktörü .alfa., dönüştürücü büyüme faktörü β , dönüştürücü büyüme faktörü β 1, dönüştürücü büyüme faktörü β 1.2, dönüştürücü büyüme faktörü β 2, dönüştürücü büyüme faktörü β 3, dönüştürücü büyüme faktörü β 5, latent dönüştürücü büyüme faktörü β 1, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama proteini I, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama proteini II, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama proteini III, timik stromal lenfopoyetin (TSLP), tümör nekroz faktörü reseptörü tip I, tümör nekroz faktörü reseptörü tip II, ürokinnaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü, fosfolipaz-aktivasyon proteini (PUP), insülin, lektin risin, prolaktin, koriyonik gonadotropin, folikül-stimülasyon hormonu, tiroid-stimülasyon hormonu, doku plazminojen aktövatörü, IgG, IgE, IgM, IgA, ve IgD, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, DNAz, fetuin, lüteinleyici hormon, östrojen, insülin, albümin, lipoproteinler, fetoprotein, transferrin, trombopoyetin, ürokinaz, integrin, trombin, leptin, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanersept), veya bunlar biyolojik olarak aktif bir fragmenti, türevi veya varyantı kapsamaktadır Diğer terapötik polipeptitler, referans olarak buraya dahil edilen, Siekmann, ve ark., Nucleophilic Catalysts for Oxime Linkage, US 2012/0035344 referansında Tablo 1’inde açıklanmaktadır

Burada açıklanan bir rekombinant polipeptit, bunlarla sınırlanmaksızın, bir büyüme faktörü, bir sitokin, bir bağışıklık düzenleyici ajan, bir hormon, bir antikor, bir enzim, bir enzim inhibitörü, bir proteaz, bir proteaz inhibitörü, bir esteraz, bir transferaz, bir oksidoredüktaz, bir hidrolaz, bir asparajinaz, bir adenozin deaminaz, bir nörotoksin, bir karaciğer proteini, bir pankreatik protein, bir kas proteini, bir beyin proteini, bir akciğer proteini ve bir kan proteinini kapsamaktadır

Bu buluşun yönlerinde, bir esteraz, sınırlanmaksızın, bir bütirilkolinesteraz veya bir asetilkolinesterazı kapsayabilmektedir.

Bu buluşun yönlerinde, bir sitokin, sınırlanmaksızın, bir kemokin, bir lenfokin, bir tümör nekroz faktörü, bir hematopoyetik faktör, örneğin bir granülosit koloni stimülasyon faktörü ve bir granülosit makrofaj koloni stimülasyon faktörünü kapsayabilmektedir.

Bu buluşun yönlerinde, bir bağışıklık düzenleyici ajan, sınırlanmaksızın, bir interlökin ve bir interferonu kapsayabilmektedir.

Bu yapılandırılan yönlerinde, bir kan proteini, sınırlanmış bir eritropoietin, bir eritropoietin, bir ertropoyetin ve bir farbeoetini kapsayan bir eritropoez-stimülasyon ajanı olabilmektedir.

5

Bu buluşun yönlerinde, bir kan proteini, sınırlanmış, ADAMTS-13, α 1-antiplazmin, α 2-antiplazmin, antitrombin, antitrombin III, kanser prokoagülan, ertropoietin, Faktör II, Faktör IIa, Faktör V, Faktör Va, Faktör VI, Faktör VIa, Faktör VII, Faktör VIIa, Faktör VIII, Faktör VIIa, Faktör IX, Faktör IXa, Faktör X, Faktör Xa, Faktör XI, Faktör XIa, Faktör XII, Faktör XIIa, Faktör XIII, Faktör XIIIa, fibronektin, fibrinojen (Faktör I), heparin kofaktör II, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK), intramüsküler immünoglobulin, intravenöz immünoglobulin, plazmin, plazminojen, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI1), plazminojen aktivatör inhibitörü-2 (PAI2), prekallikrein, prostasiklin, protein C, aktif protein C (APC), protein S, protein Z, protein Z ile ilgili proteaz inhibitörü, trombomodulin, doku faktörü (Faktör III), Doku Faktörü yolak inhibitörü (TFPI), doku plazminojen aktivatörü (t-PA), ürokinaz, ve Von Willebrand Faktörünü kapsayabilmektedir.

Bu yapılandırılan yönlerinde, bir kan proteini, hem aktif hem de inaktif formları kapsayan bir kan koagülasyon proteini olabilmektedir. Bir kan koagülasyon faktörü, iç, dış ve ortak koagülasyon yollarındaki bileşenleri içeren kan koagülasyon yollarındaki faktörlerine işaret etmektedir. Terim, bir numune içerisinde endojen bileşenler olarak bulunan (örneğin kan numunesine özgü olan) veya egzogen faktörler olarak ilave edilen faktörleri kapsamaktadır Fosfolipid(ler), ayrıca, koagülasyonun aktivasyonu için iç, dış veya ortak yollardan herhangi birinin kullanıldığı bir yöntemde eklendiğinde, koagülasyon faktörleri olarak dahil edilebilmektedir. Bu yapılandırılan yönlerinde, bir kan proteini, sınırlanmış Faktör II, Faktör VII, Faktör VIII, Faktör IX ve Faktör X'i kapsayan bir kan koagülasyon faktörü olabilmektedir.

Bu yapılandırılan yönlerinde, bir kan proteini, sınırlanmış α 1-antitripsin, α 1-antikimotripsin, C1-inhibitörü, ve α 2-antiplazmin, antitrombini kapsayan bir proteaz inhibitörü olabilmektedir.

Bu yapılandırılan yönlerinde, bir kan proteini, sınırlanmış tripsin, kimotripsin, elastaz, pepsin ve ADAMTS13'ü kapsayan bir proteaz olabilmektedir.

35

Mevcut tarifnamenin yönleri bir modifikasyonu açıklamaktadır. Burada açıklanan bir modifikasyon, burada açıklanan bir rekombinant polipeptit ile ilişkilendirilen bir modifikasyondur. Bir yakalama ajanının seçici şekilde bağlanabildiği bir bağlama bölgesine veya kimyasal olarak sahip herhangi bir modifikasyon, burada açıklanan yöntemlerde kullanılabilmektedir. Bu şekilde, doğal olarak meydana gelen bir yakalama ajanının mevcut olduğu veya bir yakalama ajanının hazırlanabildiği herhangi bir modifikasyon, burada açıklanan yöntemlerde kullanılabilmektedir. Burada açıklanan bir modifikasyon, burada açıklanan rekombinant polipeptitin ekspresyonu sırasında veya bundan sonra meydana gelen bir modifikasyonu kapsamaktadır.

10

Bir yapılandırılmada, bir modifikasyon bir post-translasyonel modifikasyon olabilmektedir. Bir post-translasyonel modifikasyon, tipik olarak bir biyokimyasal işlevsel grubun, polipeptitin bir amino asidine tutturulmasıyla, bir polipeptitin bir kimyasal modifikasyonudur. Burada açıklanan bir rekombinant polipeptit, teknikte uzman kişileri tarafından anlaşılacağı üzere, yakalanacak olan polipeptitin belirli bir modifikasyonuna dayanarak bu biyokimyasal işlevsel gruplardan herhangi birine polipeptitin bağlanmasıyla modifiye edilebilmektedir.

15

Bir modifikasyonun örnekleri, bunlarla sınırlanmaksızın, bir asetat grubu, bir fosfat grubu, bir lipid grubu, veya bir karbonhidrat grubu, bir miristat grubu, bir palmitat grubu, bir izoprenoid grubu, örneğin bir farnesol grubu ve geranilgeraniol grubu, bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) grubu, bir lipote grubu, bir flavin grubu, bir hem C grubu, bir 4'-fosfopanteteinil grubu, bir retiniliden grubu, bir diftamid grubu, bir etanolamin fosfogliserol grubu, bir hipusin grubu, bir asetil grubu, bir formil grubu, bir alkil grubu, bir metil grubu, bir amid grubu, bir amino asit, bir bütül grubu, bir karboksil grubu, bir glikozil grubu, bir polisilyalilik asit (PSA) grubu, bir hidroksil grubu, bir malonil grubu, bir iyodin grubu, bir fosfat grubu, bir adenilil grubu, bir süksinil grubu, bir sülfat grubu, bir selenyum grubu, bir karbohidrat grubu, bir nişasta grubu, bir hidroksil-etil nişasta (HES) grubu, bir polisakkarit grubu, bir şeker grubu, bir polietilen glikol (PEG) grubu, bir ubikitin grubu, bir pullulan grubu, bir kitosan grubu, bir hiyalüronik asit grubu, bir kondroitin sülfat grubu, bir dermatan sülfat grubu, bir dekstran grubu, bir karboksi-metil dekstran grubu, bir polialkilen oksit (PAO) grubu, bir polialkilen glikol (PAG) grubu, bir polipropilen glikol (PPG) grubu, bir polioksazolin grubu, bir poliakriloilmorfolin grubu, bir polivinil alkol (PVA) grubu, bir polikarboksilat grubu, bir polivinilpirrolidon (PVP) grubu, bir polifosfazen grubu, bir polioksazolin grubu, bir polietilen-ko-maleik asit anhidrit grubu, bir polistiren-ko-maleik asit anhidrit grubu, bir poli(1-hidroksimetiletilen hidroksimetilformal) (PHF) grubu, ve bir 2-metakriloloksi-2'-

20

30

35

etiltrimetilamonyum-fosfat (MPC) grubunu kapsamaktadır

5 Polipeptitin bir amino asidine bir biyokimyasal işlevsel grubun tutturulmasına yönelik olarak bilinen prosesler, bunlarla sınırlanmamaksızın, miristoilasyon, palmitoilasyon, izoprenilasyon (prenilasyon), glipiasyon, lipoilasyon, flavinilasyon, fosfopanteteinilasyon, retinilidenilasyon, diftamidilasyon, etanolamin fosfoglicerilasyon, hipusinilasyon, asilasyon, asetilasyon, formilasyon, alkilasyon, amidasyon, arginilasyon, poliglutamilasyon, poliglisilasyon, bütirilasyon, gammakarboksilasyon, glikozilasyon, polisialilasyon, malonilasyon, hidroksilasyon, iyodinasyon, nükleosilasyon, oksidasyon, fosforoesterfikasyon, fosforamidasyon, fosforilasyon, adenililasyon, propiyonilasyon, piroglutamat, S-
10 glutatyonilasyon, S-nitrosilasyon, süksinilasyon, sülfasyon, selenoilasyon, glikasyon, biyotinilasyon, asilasyon, PEGilasyon, HESilasyon, Silasyon (Nişastalama), sitrullinasyon, deamidasyon, eliminilasyon, karbamilasyon, deiminasyon, pupilasyon, neddilasyon, ubikitinasyon, SUMOilasyon, ve ISGilasyonu kapsamaktadır

15

Mevcut tarifnamenin yönleri, kısmen, burada açıklanan bir rekombinant polipeptiti içeren bir numuneyi içermektedir. Bir numune, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin mevcudiyeti veya aktivitesi için test edilecek olan herhangi bir malzeme olabilmektedir. Burada açıklanan bir yöntemle göre çeşitli numuneler tahlil edilebilmekte olup, bunlar, sınırlanmamaksızın, burada açıklanan saflaştırılmış, kısmen saflaştırılmış veya saflaştırılmamış bir rekombinant polipeptit; formüle edilmiş bir rekombinant polipeptit ürünü; 20 örneğin bakteri, maya, böcek veya memeli kaynaklardan ham, fraksiyonlara ayrılmış veya kısmen saflaştırılmış veya saflaştırılmış hücre lizatları ve hücre, doku veya organ numunelerini kapsamaktadır. Bir numune, bunlarla sınırlanmamaksızın, böcekler veya memeliler, örneğin insan, kuş, domuz, at, sığır, faregıl, kedi, sığan, köpek veya koyun da dahil olmak üzere herhangi bir süje bireyden alınabilmektedir.

25

Bu buluşun bir yönünde, bir numune, burada açıklanan bir rekombinant polipeptiti kapsayan veya potansiyel olarak kapsayan bir biyolojik numune olabilmektedir. Bir biyolojik numune, bir bireyden doğrudan alınan herhangi bir hücre veya organ numunesini kapsayabilmektedir. 30 Biyolojik bir numune, ayrıca, bunlarla sınırlanmamaksızın, kan, idrar, tükürük, meni, dışkı, salya, safra, serebral sıvı, nazal sürüntü, ürogenital sürüntü, nazal aspirat, omurilik sıvısı ve benzeri de dahil bir bireyden doğrudan alınan herhangi bir vücut sıvısı numunesi olabilmektedir. Biyolojik bir numune ayrıca, bunlarla sınırlanmamaksızın, bir kan numunesinin bir plazma 35 fraksiyonu, bir kan numunesinin bir serum fraksiyonu veya bir saflaştırma prosesine ait bir

eluat da dahil olmak üzere bir bireyden doğrudan alınan bir numuneden elde edilen herhangi bir preparasyonu kapsayabilmektedir. Bir kan numunesi, örneğin bir tam kan numunesi, bir kan plazma numunesi veya bir kan serum numunesi gibi, kandan elde edilen veya alınan herhangi bir numuneye işaret etmektedir.

5

Bir numune, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin tespit edilebilirliğinin veya bunun numune içerisindeki aktivitesinin geliştirilmesi için işlenebilmektedir. Bu tür işlemler, örneğin numunenin viskozitesini azaltmaktadır veya numuneden bir bileşen fraksiyonunu saflaştırmaktadır. İşlem yöntemleri lizisleme, seyreltme, saflaştırma, özütleme, filtreleme, damlatma, ayırma, konsantre etme, karışan bileşenlerin inaktivasyonu ve tepkenlerin eklenmesini kapayabilmektedir. İlâveten, burada açıklanan bir rekombinant polipeptiti içerdiğinden şüphelenilen bir katı malzeme, sıvı bir ortam oluşturulması için veya rekombinant polipeptitin salınması için modifiye edildiğinde bir test numunesi olarak kullanılabilir. Testten önce biyolojik numunelerin seçilmesi ve ön işleme teknikte iyi bilinmektedir ve burada açıklanmasına gerek yoktur.

Bir özütlemeyi kapsayan işlemlerde, belirli yapılandırılmalarda bir özütleme tamponu, tamponlu bir çözelti içerisinde yaklaşık 0.75 ila yaklaşık 1.125M tuz içerebilmektedir, ancak bu sınırlanmayan bir aralıkta ve 0.75M'nin altındaki ve/veya 1.25M'nin üzerindeki diğer molariteler de kullanılabilir. Bir yapılandırılmada, tamponlu çözelti içerisindeki bir tuz yaklaşık 0.75M, 1M, 1.1M veya 1.125M'dir. Diğer yapılandırılmalarda, bir zwitteriyonik ajan (örneğin Zwittergent 3/12), bir veya daha fazla modifiye bileşiğin özütlenmesini artırmak için sağlanabilmektedir. Örneğin bir zwitteriyon ajanı bir özütleme tamponu içerisinde yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %1.5 değerinde bulundurulmaktadır. Diğer yapılandırılmalarda ise bir Zwittergent ajanı yaklaşık %0.1, %0.15, %0.175, %0.2, %0.225, %0.25, %0.275, %0.3, %0.325, %0.350, %0.375, %0.4, %0.425, %0.450, %0.475, %0.5, %0.525, %0.550, %0.575, %0.6, %0.7, %0.75, %1.0, %1.1, %1.2, %1.3, %1.4, %1.5, %1.6, %1.7, %1.8, %1.9 veya %2.0'lik bir konsantrasyonda Zwitteriyonik ajan örnekleri, Zwittergent 3/12; Good tamponlarda tamponlama ajanları olarak kullanılan fizyolojik pH'taki çoğu amino asitler: amino-sülfonik asit bazı MES, MOPS, HEPES, PIPES veya CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonio]-1-propansülfonat); amino-karboksilik asit (amino asit) bazı glisin, bunun türevleri bisin ve trisin, ve alanin; CHAPSO (3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonyum]-2-hidroksi-1-propansülfonat); CAPSO (3-sikloheksilamino)-2-Hidroksi-1-Propansülfonik Asit); doğal ürünler, örneğin alkaloidler psilosibin ve liserjik asit; betainler; Kinoa zwitterionlar; ilaçlar, örneğin Feksofenadin (Allegra) ve Segaloridin; 2-(N

Morfolino)etansülfonik asit, (3-[N-Morfolino])propnesülfonik asit, 2-[(2-Amino-2-oksoetil)amino]-etansülfonik asit, piperazin-N,N'-bis(2-etansülfonik asit), 3-(N-Morfolino)-2-hidroksipropansülfonik asit, N,N-Bis(2-hidroksietil)-2-aminoetansülfonik asit, 3-(N-Morfolino)propansülfonik asit, N-(2-Hidroksietil) piperazin-N'-(2-etansülfonik asit), N-Tris(hidroksimetil)metil-2 aminoetansülfonik asit, 3-[N,N-Bis(2-hidroksietil)amino]-2-hidroksipropansülfonik asit, 3-[N-Tris(hidroksimetil)-metilamino]-2-hidroksipropansülfonik asit, N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-(2-hidroksipropansülfonik asit), piperazin-N,N'-bis(2-hidroksipropansülfonik asit), N-(2-Hidroksietil)piperazin-N'-(3-propansülfonik asit), N-Tris(hidroksimetil)metil-3-aminopropansülfonik asit, 3-[(1,1-Dimetil-2-hidroksietil)amino]-2-hidroksi-propansülfonik asit, 2-(N-Sikloheksilamino)etansülfonik asit, 3-(sikloheksilamino)-2-hidroksi-1-propansülfonik asit, 2-Amino-2-metil-1-propanol, 3-(sikloheksilamino)-1-propansülfonik asit veya bunların karışımlarını kapsamaktadır. Seçilen zwitteriyon ajanlar ve/veya kir sökücüler, belirli bir tahlilde ölçülen bileşimin modifiye edilmesi için kullanılan belirli entiteyi (örneğin PEG, HES, ve benzeri) içermemelidir.

15

Mevcut tarifnamenin yönleri bir yakalama ajanı olarak kullanılmaktadır. Bir yakalama ajanı veya modifikasyon tanıyan bir yakalama ajanı burada açıklanan bir modifikasyon üzerinde mevcut olan bir kısma seçici bir şekilde veya büyük oranda seçici bir şekilde (yani sınırlı çapraz-reaktivite ile) bağlanabilen veya burada açıklanan bir modifikasyon ile ilişkili olabilen herhangi bir moleküle işaret etmektedir. Burada kullanılan üzere, "seçici şekilde" terimi, özgün bir etkiye veya tesire sahip olma veya yalnızca bir şekilde veya yalnızca bir şey ile reaksiyon gösterme anlamına gelmektedir. Burada kullanılan üzere, "seçici bir şekilde bağlamak" terimi, bir yakalama ajanına referansla kullanılan da, antikorun hedef olmayan epitoplara ile büyük oranda çapraz reaksiyona girmeyeceği şekilde, yakalama akanın belirtilen hedef epitopa ayırtıcı şekilde bağlanmasını işaret etmektedir. Burada açıklanan bir rekombinant polipeptit üzerinde mevcut olan bir modifikasyona seçici bir şekilde bağlanabilen herhangi bir yakalama ajanı burada açıklanan yöntemlerde kullanılabilir. Bir yakalama ajanı genel olarak tek bir özgüllüğe sahiptir, ancak burada açıklanan iki veya daha fazla rekombinant polipeptit için çoklu özgüllüklere sahip yakalama ajanları kullanılabilir. Bir yakalama ajanının sınırlı olmayan örnekleri bir antikor, bir aptamer, bir sentetik peptit, bir bağlama molekülü ve bir nükleik asidi kapsamaktadır.

20

Bir yakalama ajanının seçici şekilde bağlanması, örneğin bağlama afinitesi, bağlama özgüllüğü ve bağlama aktivitesi gibi bağlama özelliklerini kapsamaktadır. Bağlama afinitesi, bir yakalama ajanının kendi bağlama bölgesinde veya kısmında bulunduğu sürenin

35

uzunluğuna işaret etmektedir ve bir yakalama ajanının kendi bağlama bđlgesini veya kısmını bağladığı güç olarak görülebilir. Bağlama afinitesi, dengede K_d/K_a oranı olarak tanımlanan, bir yakalama ajanının denge ayrışım sabiti (KD) olarak açıklanabilmektedir. Burada K_a , bir yakalama ajanının birleşme hızı sabitidir ve k_d ise bir yakalama ajanının ayrışma hızı sabitidir.

5 Bağlama afinitesi hem ayrışma hem de ilişki tarafından belirlenmektedir ve yalnızca yüksek ilişki veya düşük ayrışma yüksek afinite sağlamamaktadır. Birleşme hızı sabiti (K_a) veya açılma hızı sabiti (K_{on}) birim zaman başına bağlama olaylarının sayısını veya bir yakalama ajanının ve bunun bağlama bölgesi veya kısmının, kendi ajan-kisim kompleksine tersinir şekilde birleşme eğilimini ölçmektedir. Birleşim hızı sabiti, $M^{-1} s^{-1}$ olarak ifade edilmektedir ve şu şekilde

10 sembolize edilmektedir: $[CA] \times [BS] \times K_{on}$. Birleşim hızı sabiti büyüdükçe, bir yakalama ajanı kendi bağlama bölgesine veya kısmına daha hızlı bağlanmaktadır veya bir yakalama ajanı ve bunun bağlama bölgesi veya kısmı arasındaki bağlama afinitesi yükselmektedir. Ayrışma hızı sabiti (K_d) veya kapalı sabiti (K_{off}) birim zaman başına ayrışma olaylarının sayısını veya ajan-kisim kompleksinin, kendi bileşen moleküllerine, yani yakalama ajanı ve kendi bağlama

15 bölgesi veya kısmına tersinir şekilde ayrılmasına (ayrışmasına) yönelik eğilimi ölçmektedir. Ayrışma hızı sabiti, s^{-1} olarak ifade edilmektedir ve şu şekilde sembolize edilmektedir: $[CA + BS] \times K_{off}$. Ayrışma hızı sabiti küçüldükçe, bir yakalama ajanı kendi bağlama bölgesine veya kısmına daha sık bir şekilde bağlanmaktadır veya bir yakalama ajanı ve bunun bağlama bölgesi veya kısmı arasındaki bağlama afinitesi yükselmektedir. Denge ayrışma sabiti (KD),

20 yeni ajan-kisim komplekslerinin oluştuğu hızın, ajan-kisim komplekslerinin dengede ayrıştığı hızla eşit olmasını ölçmektedir. Denge ayrışma sabiti M olarak ifade edilmektedir, ve $K_{off}/K_{on} = [CA] \times [BS] / [CA + BS]$ olarak tanımlanmaktadır burada $[CA]$, bir yakalama ajanının molar konsantrasyonudur, $[BS]$, bağlama bölgesi veya kısmının molar konsantrasyonudur ve $[CA + BS]$, ajan-kisim kompleksinin molar konsantrasyonudur, burada

25 tüm konsantrasyonlar, sistem dengedeyken bu bileşenlere aittir. Denge ayrışma hızı sabiti küçüldükçe, bir yakalama ajanı kendi bağlama bölgesine veya kısmına daha sık bir şekilde bağlanmaktadır veya bir yakalama ajanı ve bunun bağlama bölgesi veya kısmı arasındaki bağlama afinitesi yükselmektedir.

30 Bir yapılandırılmada, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, örneğin $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 'den az veya $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 'den az olan bir birleşme hızı sabitine sahip olabilmektedir. Bir başka yapılandırılmada, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, örneğin $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 'den fazla veya $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 'den fazla olan bir birleşme hızı

35 sabitine sahip olabilmektedir. Diğer yönlerde, burada açıklanan bir yakalama ajanının

bağlama afinitesi, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ila $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ila $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ila $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, veya $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ila $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ arasında bir birleşme hızı sabitine sahip olabilmektedir.

- 5 Bir başka yapılandırılabilir durumda, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, veya $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 'den az olan bir ayrışma hızı sabitine sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılabilir diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, örneğin $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $7.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, veya $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den daha az olan bir ayrışma hızı sabitine sahip olabilmektedir.
- 10 Bir başka yapılandırılabilir durumda, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, örneğin $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, veya $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla olan bir ayrışma hızı sabitine sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılabilir diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, örneğin $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla,
- 15 $3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $7.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, veya $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den daha fazla olan bir ayrışma hızı sabitine sahip olabilmektedir.

- Bir başka yapılandırılabilir durumda, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, 0.500 nM 'den daha az olan bir denge ayrışma sabitine sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılabilir yönlerinde, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, örneğin 0.500 nM 'den az, 0.450 nM 'den az, 0.400 nM 'den az, 0.350 nM 'den az, 0.300 nM 'den az, 0.250 nM 'den az, 0.200 nM 'den az, 0.150 nM 'den az, 0.100 nM 'den az, veya 0.050 nM 'den az olan bir denge ayrışma sabitine sahip olabilmektedir. Bir başka yapılandırılabilir durumda, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, 0.500 nM 'den daha fazla olan bir denge ayrışma sabitine sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılabilir yönlerinde, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, örneğin 0.500 nM 'den fazla, 0.450 nM 'den fazla, 0.400 nM 'den fazla, 0.350 nM 'den fazla, 0.300 nM 'den fazla, 0.250 nM 'den fazla, 0.200 nM 'den fazla, 0.150 nM 'den fazla, 0.100 nM 'den fazla, veya 0.050 nM 'den fazla olan bir denge ayrışma sabitine sahip olabilmektedir.
- 20
- 25
- 30

- Bir başka yapılandırılabilir durumda, burada açıklanan bir yakalama ajanının bağlama afinitesi, bir modifikasyona sahip olmayan bir polipeptit veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip bir polipeptit için, örneğin $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, veya $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az olan bir ayrışma hızı sabitine sahip olabilmektedir.
- 35

sabitine sahip olabilmektedir. Bir diğerk yaplāndırnada, burada aēkılanan bir yakalama ajanının baēlama afinitesi, bir modifikasyona sahip olmayan bir polipeptit veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip bir polipeptit için, örneēin en fazla $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en fazla $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en fazla $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en fazla $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, veya en fazla $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olan bir ayrışma hızı sabitine sahip olabilmektedir.

Baēlama özgülüēü, bir yakalama ajanının, baēlama bölgesini veya kapsamı içeren bir molekül ve baēlama bölgesi veya kapsamı içermeyen bir molekül arasında ayrım yapma yetisidir. Baēlama özgülüēünü ölçmenin bir yolu, baēlama bölgesi veya kapsamı içermeyen bir moleküle yönelik bir yakalama ajanının Kon birleşme hızı ile baēlama bölgesi veya kapsamı içeren bir moleküle yönelik bir yakalama ajanının Kon birleşme hızının karşılaştırılmasıdır. Örneēin, bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite göre bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptite yönelik bir yakalama ajanının birleşme hızı sabitinin (K_a) karşılaştırılmasıdır. Bu yaplāndırnanın yönlerinde, farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip bir rekombinant polipeptite veya bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite yönelik birleşme hızı sabitine (K_a) kıyasla, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptite seçici şekilde baēlanan bir yakalama ajanı bu tür bir modifikasyon içermeyen bir rekombinant polipeptit için, örneēin $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az veya $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az olan bir birleşme hızı sabitine (K_a) sahiptir. Bu yaplāndırnanın diğerk yönlerinde, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptite seçici şekilde baēlanan bir yakalama ajanı bu tür bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptit için, örneēin en fazla $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en fazla $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en fazla $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en fazla $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ veya en fazla $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olan bir birleşme hızı sabitine (K_a) sahiptir. Bu yaplāndırnanın başka yönlerinde, bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hızı sabitine (K_a) ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hızı sabitine (K_a) göre, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptite seçici şekilde baēlanan bir yakalama ajanı bir modifikasyon içeren rekombinant polipeptit için, $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla veya $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla olan bir birleşme hızı sabitine (K_a) sahiptir.

Bu yaplāndırnanın diğerk yönlerinde, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptite seçici şekilde baēlanan bir yakalama ajanı bu tür bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptit için, örneēin en az 2 kat veya daha fazla, en az 3 kat veya daha fazla,

en az 4 kat veya daha fazla, en az 5 kat veya daha fazla, en az 6 kat veya daha fazla, en az 7 kat veya daha fazla, en az 8 kat veya daha fazla veya en az 9 kat veya daha fazla olan bir birleşme hız sabitine (K_a) sahiptir. Bu yapılandırmanın diğer yönlerinde, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptite seçici şekilde bağlanan bir yakalama ajanı bu tür bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptit için, örneğin en az 10 kat veya daha fazla, en az 100 kat veya daha fazla, en az 1,000 kat veya daha fazla veya en az 10,000 kat veya daha fazla olan bir birleşme hız sabitine (K_a) sahiptir. Bu yapılandırmanın başka yönlerinde, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptite seçici şekilde bağlanan bir yakalama ajanı bu tür bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptit için, örneğin en fazla 1 kat veya daha fazla, en fazla 2 kat veya daha fazla, en fazla 3 kat veya daha fazla, en fazla 4 kat veya daha fazla, en fazla 5 kat veya daha fazla, en fazla 6 kat veya daha fazla, en fazla 7 kat veya daha fazla, en fazla 8 kat veya daha fazla veya en fazla 9 kat veya daha fazla olan bir birleşme hız sabitine (K_a) sahiptir. Bu yapılandırmanın başka yönlerinde, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptite seçici şekilde bağlanan bir yakalama ajanı bu tür bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptit için, örneğin en fazla 10 kat veya daha fazla, en fazla 100 kat veya daha fazla, en fazla 1,000 kat veya daha fazla veya en fazla 10,000 kat veya daha fazla olan bir birleşme hız sabitine (K_a) sahiptir.

Bir yakalama ajanının bağlama özgülüğü, ayrıca, bir modifikasyon içermeyen bir rekombinant polipeptite göre bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptitin bir bağlama özgülüğü oranı olarak da karakterize edilebilmektedir. Bu yapılandırmanın yönlerinde, bir yakalama ajanı bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite göre bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit için, örneğin en az 2:1, en az 3:1, en az 4:1, en az 5:1, en az 6:1, en az 7:1, en az 8:1, en az 9:1, en az 10:1, en az 15:1, en az 20:1, en az 25:1, en az 30:1, en az 35:1, veya en az 40:1 olan bir bağlama özgülüğü oranına sahiptir. Bu yapılandırmanın diğer yönlerinde, bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite göre bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit için, örneğin en az 2:1, en az 3:1, en az 4:1, en az 5:1, en az 6:1, en az 7:1, en az 8:1, en az 9:1, en az 10:1, en az 15:1, en az 20:1, en az 25:1, en az 30:1, en az 35:1, veya en az 40:1 olan bir bağlama özgülüğü oranına sahiptir. Bu yapılandırmanın başka yönlerinde, bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite göre bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit için, örneğin en az 2:1, en az 3:1, en az 4:1, en az 5:1, en az 6:1, en az 7:1, en az 8:1, en az 9:1, en az 10:1, en az 15:1, en az 20:1, en az 25:1, en az 30:1, en az 35:1, veya en az 40:1 olan bir bağlama özgülüğü oranına sahiptir.

Aynı zamanda işlevsel afinite olarak bilinen bağlama afinitesi, çok değerlikli bir ajan ve bunun bağlama bölgesi veya kısmı arasındaki işlevsel bağlama gücünün genel toplamına işaret etmektedir. Bir yakalama ajanı birden fazla bağlama bölgesine sahip olabilmektedir ve çoğu modifikasyon, birden fazla bağlama bölgesi veya kısmı içermektedir. Bir yakalama ajanının bağlama aviditesi, bireysel yakalama ajanı bağlama alanlarının bağlama afinitelerine bağlı olarak, bir yakalama ajanının tamamen ayrışması için tüm ajan-kişim interaksyonlarının eş zamanlı olarak gerçekleşmesi gerektiğinden dolayı bağlama aviditesi, bağlama afinitesinden daha fazladır. Bir yakalama ajanının, bu yakalama ajanına yönelik tüm bağlama alanlarına veya kısımlarına veya bunlardan herhangi birine seçici şekilde bağlanabildiği öngörülmektedir.

Tipik olarak, yakalama ajanı burada açıklanan bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptiti, modifikasyon içermeyen veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan polipeptitten ayırt edilebilmektedir. Modifiye edilmemiş bir polipeptitin yanısıra bir modifikasyon içermeyen bir polipeptit, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitte mevcut olan modifikasyonu içermeyen bir polipeptite işaret etmektedir. Modifiye edilmemiş bir polipeptit bir numunede mevcut olabilmektedir, ancak polipeptit yakalama için gereken modifikasyona sahip olmadığından dolayı burada açıklanan bir yakalama ajanına seçici şekilde bağlanmayacaktır. Modifiye edilmemiş bir polipeptitin sağlayılmayan bir örneği, numunenin doğrudan alındığı veya elde edildiği bireye ait genomdan eksprese edilen, doğal olarak meydana gelen veya endojen bir polipeptittir. Modifiye edilmemiş bir polipeptitin sağlayılmayan bir başka örneği, bir prokaryotik ekspresyon sisteminden eksprese edilen bir rekombinant polipeptittir.

Farklı bir modifikasyon örüntüsü veya derecesi içeren bir polipeptit, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitte mevcut olan modifikasyona sahip olan, ancak bu modifikasyonun, burada açıklanan yöntemlerin iki polipeptit tipini ayırt etmesini sağlayan bir örüntüde veya derecede olduğu bir polipeptite işaret etmektedir. Örneğin, farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip bir polipeptit bir numunede mevcut olabilmektedir, ancak polipeptit, yakalama için gereken modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olmadığı için burada açıklanan bir yakalama ajanına seçici şekilde bağlanmayacaktır. Farklı bir modifikasyon örüntüsü veya derecesine sahip bir polipeptitin sağlayılmayan bir örneği, numunenin doğrudan alındığı veya elde edildiği bireye ait genomdan eksprese edilen, doğal olarak meydana gelen veya endojen bir polipeptittir. Farklı bir modifikasyon örüntüsü veya derecesine sahip bir polipeptitin sağlayılmayan bir başka örneği, bir prokaryotik

- ekspresyon sisteminden eksprese edilen bir rekombinant polipeptittir. Farklı bir modifikasyon örüntüsü veya derecesine sahip bir polipeptitin sınırlanmayan bir diğer örneği, burada açılan bir rekombinant polipeptitin eksprese edilmesi için kullanılan bir hücre kültürü hattındaki hücrelerinden farklı olan bir hücre kültürü hattına ait hücrelerden eksprese edilen bir rekombinant polipeptittir. Farklı bir modifikasyon örüntüsü veya derecesine sahip bir polipeptitin sınırlanmayan bir diğer örneği ise, burada açılan bir rekombinant polipeptitin eksprese edilmesi için kullanılan üretim prosesinden farklı olan bir üretim prosesi kullanılarak eksprese edilen bir rekombinant polipeptittir.
- 10 Bir yapılandırılmada bir yakalama ajanı bir antikordur. Bir antikor, bir antijene spesifik olarak bağlanan belirli bir antijene yanıt olarak meydana getirilen bir immün sistemi tarafından üretilen bir moleküle işaret etmektedir ve hem doğal olarak meydana gelen antikorlar hem de doğal olarak meydana gelmeyen antikorları kapsamaktadır. Bir antikor, bir poliklonal antikor, bir monoklonal antikor, bir dimer, bir multimer, bir monospesifik antikor, bir bispesifik antikor, örneğin disülfür stabilize Fv fragmentleri, scFv tandemleri [(scFv)₂ fragmentleri], bir multispesifik antikor, bir çok değerlikli antikor, bir insanlaştırılmış antikor, bir geliştirilmiş antikori bir kimerik antikor, iki işlevli bir antikor, bir Ig reseptörü gibi bir hücre ile ilişkilendirilmiş antikor, bir lineer antikor, bir diabody, bir tribody, bir tetrabody, bir minibody veya fragment istenen aktiviteyi sergilediği sürece bunların herhangi bir türevi veya analogu ve bunların tek zincirli türevleri olabilmektedir. Bir antikor, V_H ve V_L alanlarının yanı sıra bir hafif zincir sabit alanı (C_L) ve C_{H1}, C_{H2} ve C_{H3} ağır zincir sabit alanları içeren tam uzunluktaki bir immünoglobulin veya örneğin bir Fab fragmenti, bir F(ab')₂ fragmenti, bir Fc fragmenti, bir Fd fragmenti, bir Fv fragmenti, bir tek zincirli Fv (scFv) gibi tam uzunluktaki bir immünoglobulin molekülünün immünolojik olarak aktif bir fragmenti olabilmektedir.
- 20 Bir antikor herhangi bir omurgalı türünden (örneğin insan, keçi, at, eşek, faregiller, sıçan, tavşan veya tavuk) elde edilebilmektedir ve herhangi bir tipte (örneğin IgG, IgE, IgM, IgD, ve IgA), sınıfla (örneğin IgA, IgD, IgE, IgG, ve IgM) veya alt sınıfla (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 ve IgA2) olabilmektedir.
- 30 Burada açılan yöntemlerin uygulanmasında faydalı olan antikorlar piyasada mevcuttur veya teknikte iyi bilinene yöntemlere göre meydana getirilebilmektedir. Örneğin, monoklonal antikorlar hibridom yöntemi ile meydana getirilebilmektedir. Antikor fragmentleri, intakt antikorların proteolitik sindirimi vasıtasıyla meydana getirilebilmektedir veya doğrudan rekombinant konak hücreler ile üretilebilmektedir. Örneğin, Fab' fragmentleri, doğrudan E.coli'den geri kazanılabilmektedir ve F(ab')₂ fragmentlerinin oluşturulması için kimyasal
- 35

olarak birleştirilebilmektedir. Bir başka yapılandırmada, F(ab')₂, F(ab')₂ molekülünün birleşiminin kolaylaştırılması için lösin fermuarı GCN4 kullanılarak oluşturulabilmektedir. Bir başka bakış açısına göre, Fv, Fab veya F(ab')₂ fragmentleri, doğrudan rekombinant konak hücre kültürüne izole edilebilmektedir. Antikor fragmentlerinin üretimine yönelik diğer teknikler, teknikte orta derecede uzman kişiler tarafından bilinmektedir.

Burada açıklanan yöntemler için uygun olan bir antikorun örnekleri, bunlarla sınırlanmaksızın, bir anti-asetat antikor, bir anti-fosfat antikor, bir anti-lipid antikor, veya bir anti-karbohidrat antikor, bir anti-miristat antikor, bir anti-palmitat antikor, bir anti-izoprenoid antikor, örneğin bir anti-farnesol antikor ve geranilgeraniyol antikor, bir anti-glikozilfosfatidilinositol (GPI) antikor, bir anti-lipoat antikor, bir anti-flavin antikor, bir anti-hem C antikor, bir anti-4'-fosfopanteteinil antikor, bir anti-retiniliden antikor, bir anti-difthamit antikor, bir anti-etanolamin fosfogliserol antikor, bir anti-hipusin antikor, bir anti-asetil antikor, bir anti-formil antikor, bir anti-alkil antikor, bir anti-metil antikor, bir anti-amit antikor, bir anti-amino asit antikor, bir anti-bütil antikor, bir anti-karboksil antikor, bir anti-glikozil antikor, bir anti-polisilyal asit antikor, bir anti-hidroksil antikor, bir anti-malonil antikor, bir anti-iyodin antikor, bir anti-fosfat antikor, bir anti-adenilil antikor, bir anti-süksinil antikor, bir anti-sülfat antikor, bir anti-selenyum antikor, bir anti-karbohidrat antikor, bir anti-polisakkarit antikor, bir anti-niştasta (anti-S) antikor, bir anti-hidroksil-etil niştasta (HES) antikor, bir anti-şeker antikor, bir anti-polietilen glikol (PEG) antikor, bir anti-ubikitin antikor, bir anti-pullulan antikor, bir anti-kitosan antikor, bir anti-hyalüronik asit antikor, bir anti-kondroitin sülfat antikor, bir anti-dermatan sülfat antikor, bir anti-dekstran antikor, bir anti-karboksimetil-dekstran antikor, bir anti-polialkilen oksit (PAO) antikor, bir anti-polialkilen glikol (PAG) antikor, bir anti-polipropilen glikol (PPG) antikor, bir anti-polioksazolin antikor, bir anti-poliakrilolmorfolin antikor, bir anti-polivinil alkol (PVA) antikor, bir anti-polikarboksilat antikor, bir anti-polivinilpirrolidon (PVP) antikor, bir anti-polifosfazen antikor, bir anti-polioksazolin antikor, bir anti-polietilen-ko-maleik asit anhidrit antikor, bir anti-polistiren-ko-maleik asit anhidrit antikor, bir anti-poli(1-hidroksimetiletilen hidroksimetilformal) (PHF) antikor, ve bir anti-2-meakriloksi-2'-etiltrimetilamonyum-fosfat (MPC) antikorunu kapsamaktadır.

Burada açıklanan bir yakalama ajanı yakalama ajanı için bir destek olarak bir katıfaza tutturulabilmektedir. Burada kullanılan üzere, "katıfaz desteği" terimi "katıfaz" ile eş anlamlıdır ve burada açıklanan immobilize yakalama ajanı için kullanılabilen herhangi bir matrise işaret etmektedir. Bir katıfaz, bir yakalama ajanını bağlamak bakımından yeterli

yüzeyle afinitesine sahip, uygun olan herhangi bir malzeme kullanılarak oluşturulabilmektedir. Seçilen katıfaz desteği, bunu çözünebilir veya bağlanmamış malzemeden kolaylıkla ayrılabilir hale getiren ve genel olarak örneğin fazlalık tepkenler, reaksiyon yan ürünleri veya çözücüler gibi bağlanmamış malzemelerin, katıfaz desteğine bağlı tahlil bileşeninden ayrılmasını veya giderilmesine (örneğin yıkama, filtreleme, santrifüjleme, ve benzeri vasıfıyla) olanak sağlayan bir fiziksel özelliğe sahip olabilmektedir. Bir katıfaz desteğinin nasıl meydana getirildiğine ve kullanıldığına dair sınırlayıcı olmayan örnekler, örneğin Molecular Cloning, A Laboratory Manual, supra, (2001); ve Current Protocols in Molecular Biology, supra, (2004) referanslarında açıklanmakta olup, bunlardan her biri buraya bütün yönleriyle referans olarak dahil edilmektedir.

Faydalı katı destekler şunları kapsamaktadır: doğal polimerik karbohidratlar ve bunların sentetik olarak modifiye edilmiş, çapraz bağlanmış veya ikame edilmiş türevleri, örneğin agar, agaroz, çapraz bağlı aljinik asit, ikameli ve çapraz bağlı guar zamkları, dekstran, diazoseülüz, karbohidratlar, nişasta, selüloz esterleri, özellikle nitrik asit ve karboksilik asitli olanlar, karışıklı selüloz esterleri, ve selüloz eterleri; nitrojen içeren doğal polimerler, örneğin çapraz bağlı veya modifiye jelatinler de dahil olmak üzere proteinler ve türevleri; doğal hidrokarbon polimerleri, örneğin lateks ve kauçuk; sentetik polimerler, örneğin, polietilen, polipropilen, polistiren, polivinilklorür, polivinilasetat ve bunun kısmen hidrolize türevleri, poliakrilamidler, polimetakrilatlar dahil olmak üzere vinil polimerler, kopolimerler ve yukarıdaki polikondensatların terpolimerleri, örneğin poliesterler, poliamitler, ve diğer polimerler, örneğin poliüretanlar veya poliepoksitler; inorganik maddeler, örneğin baryum sülfat, kalsiyum sülfat, kalsiyum karbonat da dahil olmak üzere alkalın toprak metallerinin sülfatları veya karbonatları ve magnezyum, alkali ve alkalın toprak metallerinin silikatları, alüminyum ve magnezyum; ve alüminyum veya silikon oksitler veya hidratlar, örneğin killer, alumina, talk, kaolin, zeolit, silika jel, veya cam (bu malzemeler, yukarıdaki polimerik maddeler ile birlikte filtreler olarak kullanılabilmektedir); ve yukarıdaki sınıflara ait kopolimerlerin karışımları, örneğin önceden mevcut olan doğal bir polimer üzerinde sentetik polimerler polimerizasyonunun başlatılmasıyla elde edilen aşırı kopolimerler. Nitroselüloz ve naylon da kullanılabilmektedir. Bu maddelerin tamamı filmler, tabakalar, tüpler, sütunlar; pimler veya "seviye çubukları" bir manyetik partikül, partikülatlar, mikropartiküller, boncuklar veya plakalar gibi uygun şekillerde kullanılabilmektedir veya kağıt, cam, plastik filmler, kumaşlar veya benzeri gibi uygun inert taşıyıcılar üzerine kaplanabilmektedir, bunlara bağlanabilmektedir veya laminatlanabilmektedir.

35

Alternatif olarak, bir katıfaz mikropartiküller oluşturabilmektedir. Uygun mikropartiküller, polistiren, polimetakrilat, polipropilen, lateks, politetrafloroetilen, poliakrilonitril, polikarbonat veya benzer maddelerden oluşanları kapsamaktadır. Dahası bir manyetik alan içerisinde mikropartikülün manipülasyonunun sağlanması için mikropartiküller, manyetik veya paramanyetik mikropartiküller olabilmektedir. Mikropartiküller, çözünebilir tepkenler ve biyolojik numunenin karışımında askıda tutulabilmektedir veya bir destek malzemesi vasıtasıyla alınyulabilmekte ve immobilize edilebilmektedir. İkinci durumda, destek malzemesi üzerindeki veya içerisindeki mikropartiküller, destek malzemesi içerisindeki herhangi bir yerdeki pozisyonlara ciddi ölçüde hareket etme kabiliyetine sahip değildir.

Alternatif olarak, mikropartiküller, çökeltme veya santrifüjleme vasıtasıyla çözünebilir tepkenler ve biyolojik numune karışımındaki süspansiyondan ayrılabilir. Mikropartiküllerin manyetik veya paramanyetik olması durumunda, mikropartiküller, bir manyetik alan vasıtasıyla çözünebilir tepkenler ve biyolojik numune karışımındaki süspansiyondan ayrılabilir.

15

Bir yakalama ajanı adsorpsiyon vasıtasıyla kat faza tutturulabilmektedir, burada hidrofobik kuvvetler vasıtasıyla tutulmaktadır. Alternatif olarak, bir katıfaz yüzeyi, yakalama ajanının desteğe kovalent bağlanmasıyla yol açan kimyasal prosesler vasıtasıyla aktif hale getirilebilmektedir. Bir yakalama ajanı iyonik yakalama vasıtasıyla katı faza tutturulabilmektedir, burada yüklü bir polimer vasıtasıyla tutulmaktadır.

20

Burada açıklanan inkübasyon adından sonra, örneğin bir rekombinant p-ajan kompleks, bir koagülasyon faktörü-ajan kompleksi, bir Faktör VII-antikör kompleksi, bir Faktör VIII-antikör kompleksi ve bir Faktör IX-antikör kompleksi gibi bir yakalama ajan kompleksinin zenginleştirilmesi için bir saflaştırma adımı gerçekleştirilebilmektedir. Genel olarak, kompleks saflaştırma işlemi, kompleksin daha konsantre bir forma yakalanması, katılaşma giderilmesine yönelik ara saflaştırma adımları ve/veya ilave katılaşma ve protein varyantlarının giderilmesine yönelik parlatma işlemini kapsayabilmektedir. Bakınız örneğin, Current Protocols in Protein Science, "Conventional chromatographic Separations," Bölümler 8-9, (John Wiley & Sons Inc., Hoboken, N.J., 1995). Yaygın saflaştırma yöntemleri, bunlarla sınırlı olmaksızın, afinite kromatografisi, jel filtrasyonu, çökeltme ve/veya boyut dışlama kromatografisiyi kapsamaktadır. Ara veya parlatma adımları olarak faydalı olan prosesler, katyon-değişim kromatografisi, anyon-değişim kromatografisi, hidrofobik-etkileşim kromatografisi ve seramik hidroksiapatit kromatografisi, ters-faz HPLC, jel filtrasyonu, çökeltme, diafiltrasyon, afinite kromatografisi veya kromatofokuslamayı kapsamaktadır.

35

Burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin veya bir aktivitesinin tespit edilmesi, bunlarla sınırlanmaksızın bir *in vitro* tahlil, bir hücre bazlı tahlil veya bir *in vivo* tahlil de dahil olmak üzere, izlenen polipeptit ile ilişkilendirilen mevcudiyeti veya bir aktiviteyi gösteren bir özelliği niteliksel veya niceliksel şekilde ölçebilen herhangi bir tahlil vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir. İlaveten, bir tahlil, spesifik olmayan bir polipeptit tahlili, örneğin UV absorpsiyon tahlili veya bir Bradford tahlili veya bir biüre tahlili gibi kimyasal bazlı bir tahlil veya bir spesifik polipeptit tahlili, örneğin bir kromojenik tahlil, bir kolorimetrik tahlil, bir kronometrik tahlil, bir kemiluminesans tahlili, bir elektrokemiluminesans tahlili, bir bioluminesans tahlili, bir floresan tahlil bir rezonan enerji aktarım tahlili, bir düzlemsel polarizasyon tahlili, bir akış sitometrisi tahlili, bir immün bazlı tahlil veya bir enzimatik aktivite, bir inhibitör aktivite, bir koagülasyon aktivitesi veya bir polimerizasyon aktivitesi gibi bir aktivite tahlili olabilmektedir. Burada açıklanan bir polipeptitin bir özelliğinin tespit edilmesinde kullanılan gerçek tahlil, bunlarla sınırlanmaksızın tahlil edilen polipeptit, mevcut olan polipeptit miktarı tahlil edilen özellik ve teknikte orta derecede uzman kişinin tercihi gibi faktörler göz önünde bulundurularak teknikte orta derecede uzman bir kişi tarafından belirlenebilmektedir. Burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin veya bir aktivitesinin tespit edilmesi, tek düzeyli veya çok düzeyli şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

20

Bir polipeptitin mevcudiyetinin veya aktivitesinin tespit edilmesi, modifikasyon içeren rekombinant polipeptitin mevcudiyetini göstermektedir.

İmmün bazlı tahlillerin sınırlanmayan örnekleri, immünblot analizi, örneğin Western blot ve noktasal-blot, immünopresipitasyon analizi, enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) ve sandviç ELISA'yı kapsamaktadır. Sinyalin tespit edilmesi, görüntülemeli otoradyografi, fosfor görüntüleme (AU), kemiluminesans (CL), elektrokemiluminesans (ECL), bioluminesans (BL), floresan, rezonans enerji aktarım, düzlemsel polarizasyon, kolorimetrik veya akış sitometrisi (FC) kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. İmmün-bazlı tespit sistemlerinin açıklamaları örneğin Michael M. Rauhut, Chemiluminescence, In Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3'üncü baskı John Wiley and Sons, 1985); A. W. Knight, A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenerated Chemiluminescence, Trends Anal. Chem. 18(1): 47-62 (1999); K. A. Fahrnich, ve ark., Recent Applications of Electrogenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis, Talanta 54(4): 531-559 (2001); Commonly Used Techniques in Molecular Cloning,

35

syf. A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3'üncü Cilt, 3'üncü Baskı 2001); Detection Systems, syf. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cilt 3, 3'üncü baskı 2001); Electrogenated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004) referanslarında
5 açıklanmakta olup, bunların her biri burada bütün yönleriyle referans olarak dahil edilmektedir.

Spesifik bir oligopeptit veya polipeptit kışmından oluşan peptit substratların veya bir kromoforun (boya taşıyıcısı) kullanıldığı bir kromojenik tahlil, proteaz aktivitesine sahip
10 faktörlerinin belirlenmesi için, örneğin kan ve plazma numunelerindeki koagülasyon faktörlerinin belirlenmesi için alışıldık şekilde kullanılmaktadır. Başlangıçta renksiz olan kromojenik peptit substratı numunede mevcut olan, burada açılan bir rekombinant polipeptitin miktarına ve/veya aktivitesine bağlı olarak bölünmektedir, böylelikle kromofor serbest bırakılmaktadır. Bölünme, bölünmeyen substratın özelliklerinden farklı olan ve
15 spektrofotometre vasıtasıyla ölçülebilen, ürünün optik özelliklerini değiştirmektedir. Bir peptit substratına bağlanabilen kromojenik grupların sınırlanmayan örnekleri, para-nitroanilin (pNA), 5-amino-2-nitrobenzoik asit (ANBA), 7-amino-4-metoksikumarin (ANC), kinonilamit (QUA), dimetil 5-aminoizoftalat (DPA) ve bunların türevleridir. Florojenik substratlar, bunlarla sınırlı olmamak üzere, Z-Gly-Pro-Arg-AMC [Z=Benziloksikarbonil; AMC=7-amino-4-
20 metilkumarin], homovanillik asit, 4-hidroksi-3-metoksifenilasetik asit, indirgenmiş fenoksazinler, indirgenmiş benzotiazinler, Amplex®, resorufin β -D-gataktopiranosit, floresin digalaktosit (FDG), floresin diglukuronit ve bunların yapısal varyantları (5,208,148; 5,242,805; 5,362,628; 5,576,424 ve 5,773,236 numaralı U.S. Patent Dokümanları) 4-
25 metilumbelliferil β -D-gaiaktopiranosit, karboksiumbelliferil β -D-galaktopiranosit ve florlu kumarin β -D-gaiaktopiranositleri kapsamaktadır (5,830,912 numaralı U.S. Patent Dokümanı)

Sınırlanmayan bir aktivite tahlili, FVIII aktivitesinin tespit edilmesi için kullanılabilen kan koagülasyon kaskadına dayanan bir kromojenik tahlildir. Bu tahlilde, trombin aktivi Faktör VIII, Faktör IXa ile bir kompleks oluşturmaktadır ve ardından bu kompleks Faktör X'i aktive
30 etmektedir. Aktifleştirilmiş Faktör X'e, p-nitro-anilin (pNA) gibi bir kromojenik grubu serbest bırakan bir kromojenik substratın hidrolizi vasıtasıyla erişilebilmektedir. dOD'de 405 nm'de ölçülen dakika başına absorbanstaki bir değişim ile belirlenen pNA salınımına başlangıç hızı, Faktör Xa aktivitesine ve ardından aynı numunedeki FVIII aktivitesine orantılıdır. Faktör IXa'nın fazlalığı ve Faktör X kullanılarak, Faktör X'in aktivasyon hızı yalnızca, numunede
35 mevcut olan trombin ile bölünmüş Faktör VIII'ün miktarına orantılıdır. Alternatif olarak,

Faktör IXa aktivitesi, koşulların değiştirilmesiyle belirlenebilmektedir, böylelikle Faktör VIII ve Faktör X fazlalıklı olmaktadır ve bu şekilde Faktör IXa hızlanmaktadır. Benzer şekilde, Faktör X aktivitesi, koşulların değiştirilmesiyle belirlenebilmektedir, böylelikle Faktör VIII ve Faktör IXa fazlalıklı olmaktadır ve bu şekilde Faktör X hızlanmaktadır. Dolayısıyla, Faktör VIII aktivitesinin yanı sıra Faktör IXa ve Faktör X, kan koagülasyon kaskadına dayanarak bir kromojenik tahlilin kullanılmasıyla belirlenebilmektedir.

Sınırlanmayan bir başka aktivite tahlili, trombin aktivitesinin tespit edilmesi için kullanılabilen kan koagülasyon kaskadına bağlı bir kromojenik tahlildir. Bu tür tahliller, pNA'ya bağlı peptit substratı Ala-Gly-Arg-pNA (PE-FACHROM®TG, Pentapharm Ltd., Basle, İsviçre) veya AMC'ye bağlı peptit substratı Gly-Cly-Arg-AMC'yi (Bachem) kullanabilmektedir. Trombin tarafından bölünen diğer uygun peptit substratları Msc-Val-Xaa-R₁ genel formüle sahip olanlarda burada Msc, metilsülfonil-etiloksikarbonildir, Val amino asit vardır ve Xaa bir amino asit kalıntısı olup, bu en az iki karbon atomu vasıtasıyla peptit omurgasından ayrılan bir terminal gaunidino grubunu veya üreido grubu içermektedir, ve burada R₁, Msc-Val-Arg-R₁ veya Msc-Val-Arg-pNA peptidine sahip bir kromojenik gruptur. Farklı proteazlar için özgüllüklere sahip kromojenik peptit substratların diğer örnekleri örneğin U.S. 4,508,644 numaralı dokümanda bulunabilmektedir.

Sınırlanmayan bir aktivite tahlili, FVIII aktivitesinin tespit edilmesi için kullanılabilen Aktive Edilmiş Kısmi Tromboplastik Zamanı (APTT) uygulayan tek aşamalı bir pıhtılaşma tahlilidir. Bu kronometrik tahlilde, CaCl₂ ile birlikte Faktör VIII'ü içeren numuneler, Faktör VIII'ü eksik plazmaya ilave edilmiştir, böylelikle koagülasyon sağlanmıştır ve plazmanın APTT pıhtılaşma zamanı üzerinde bu numunenin etkisi, bir MDA-II aparatı (BioMerieux, Marcy-l'Etoile) üzerinde belirlenebilmektedir ve Faktör VIII aktivitesinin bir ölçütüdür. Bilinmeyen numunelerin aktiviteleri, bilinen Faktör VIII aktivite numunelerinden meydana getirilen bir standart eğri ile gözlemlenen Faktör VIII aktivitesinin karşılaştırılmasıyla hesaplanmaktadır. Koagulan aktivitesi, bir robotik platform üzerinde kronometrik tahlil ile ölçülebilmektedir ve modifiye bileşiklerin kronometrik aktivitesi, bir iç standart olarak kullanılan yabancı bir FVIII'ün aktivitesi ile karşılaştırılabilmektedir. Bu kan pıhtılaşma tahlili, ayrıca, tahlil edilen proteinde eksik olan plazma kullanılarak, kan koagülasyon kaskadına dahil olan diğer herhangi bir protein için de kullanılabilir.

Burada açıklanan yöntemler, örneğin doğruluk, hassasiyet, tespit sınırı (LOD), nicelik sınırı (LOQ), aralık özgüllük, seçimlilik, lineerlik, sağlamlık ve sistem uygunluğu dahil çeltili

parametreler vasıtasıyla değerlendirilebilmektedir. Bir yöntemin doğruluğu, bir analitik yöntemin kesinliğinin, ölçülen değer ve bir konvansiyonel gerçek değer olarak kabul edilen değer veya kabul edilen bir referans değeri arasındaki uyuşmanın yakınlığı ölçütüdür. Bir yöntemin hassasiyeti, prosedür, bir homojen numunenin birçok örneğine tekrarlı şekilde uygulandığında, bireysel test sonuçları arasındaki uyuşma derecesidir. Bu şekilde, hassasiyet 1) tahlil içi değişkenliği; 2) gün içi değişkenliği (tekrar edilebilirlik); ve 3) gün arası değişkenliği (ara hassasiyet); ve 4) laboratuvar arası değişkenliği (yeniden üretilebilirlik) değerlendirmektedir. Varyasyon katsayısı (%CV), gözlemlenen veya teorik ortalama değere göre ifade edilen hassasiyetin niceliksel bir ölçütüdür.

10

Burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetini veya aktivitesini arkaplan üzerinden tespit edebilmelidir. Bir yöntemin tespit sınırı (LOD), negatif kontrolden veya kör numuneden büyük oranda farklı olan bir sinyale yol açan, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin konsantrasyonuna işaret etmektedir ve arka plandan ayrı edilebilen, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin en düşük konsantrasyonunu temsil etmektedir.

15

Dolayısıyla, bir yapılandırılmada, burada açıklanan bir yöntem, bir negatif kontrolden veya kör numuneden önemli oranda farklı olan bir miktarda olan, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin LOD'sini tespit edebilmektedir. Bu yapılandırılmada yönünde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 10 ng veya daha az, 9 ng veya daha az, 8 ng veya daha az, 7 ng veya daha az, 6 ng veya daha az, 5 ng veya daha az, 4 ng veya daha az, 3 ng veya daha az, 2 ng veya daha az, 1 ng veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu yapılandırılmada diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 900 pg veya daha az, 800 pg veya daha az, 700 pg veya daha az, 600 pg veya daha az, 500 pg veya daha az, 400 pg veya daha az, 300 pg veya daha az, 200 pg veya daha az, 100 pg veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu yapılandırılmada diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 90 pg veya daha az, 80 pg veya daha az, 70 pg veya daha az, 60 pg veya daha az, 50 pg veya daha az, 40 pg veya daha az, 30 pg veya daha az, 20 pg veya daha az, 10 pg veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu yapılandırılmada başka yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 9 pg veya daha az, 8 pg veya daha az, 7 pg veya daha az, 6 pg veya daha az, 5 pg veya daha az, 4 pg veya daha az, 3 pg veya daha az, 2 pg veya daha az, 1 pg veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu yapılandırılmada diğer yönlerinde, burada açıklanan bir

20

25

30

35

yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 0.9 pg veya daha az 0.8 pg veya daha az 0.7 pg veya daha az 0.6 pg veya daha az 0.5 pg veya daha az 0.4 pg veya daha az 0.3 pg veya daha az 0.2 pg veya daha az 0.1 pg veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir.

5

Bu yapılandırılan bir başka yönünde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 10 nM veya daha az 9 nM veya daha az 8 nM veya daha az 7 nM veya daha az 6 nM veya daha az 5 nM veya daha az 4 nM veya daha az 3 nM veya daha az 2 nM veya daha az veya 1 nM veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu

10

yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 900 pM veya daha az 800 pM veya daha az 700 pM veya daha az 600 pM veya daha az 500 pM veya daha az 400 pM veya daha az 300 pM veya daha az 200 pM veya daha az veya 100 pM veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu

15

yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 100 pM veya daha az 90 pM veya daha az 80 pM veya daha az 70 pM veya daha az 60 pM veya daha az 50 pM veya daha az 40 pM veya daha az 30 pM veya daha az 20 pM veya daha az veya 10 pM veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu yapılandırılan başka yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin, örneğin bir BoNT/A'nın 10 pM veya daha az 9 pM

20

veya daha az 8 pM veya daha az 7 pM veya daha az 6 pM veya daha az 5 pM veya daha az 4 pM veya daha az 3 pM veya daha az 2 pM veya daha az veya 1 pM veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 1000 fM veya daha az 900 fM veya daha az 800 fM veya daha az 700 fM veya daha az 600 fM veya daha az 500 fM veya

25

daha az 400 fM veya daha az 300 fM veya daha az 200 fM veya daha az veya 100 fM veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 100 fM veya daha az 90 fM veya daha az 80 fM veya daha az 70 fM veya daha az 60 fM veya daha az 50 fM veya daha az 40 fM veya daha az 30 fM veya daha az 20 fM veya daha az veya 10 fM

30

veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 10 fM veya daha az 9 fM veya daha az 8 fM veya daha az 7 fM veya daha az 6 fM veya daha az 5 fM veya daha az 4 fM veya daha az 3 fM veya daha az 2 fM veya daha az veya 1 fM veya daha az olan bir LOD'ye sahiptir.

35

Nicelik sınırları (LOQ), kabul edilebilir bir doğruluk ve hassasiyet seviyesi ile ölçülebilen bir numune veya örnek içerisinde, burada açılan bir rekombinant polipeptitin en düşük ve en yüksek konsantrasyonlarıdır. Alt nicelik sınırı bir tespit yönteminin arka plandan sürekli olarak ölçebildiği en düşük doza işaret etmektedir. Üst nicelik sınırı sinyal saturasyonu meydana gelmeden önce bir tespit yönteminin sürekli olarak ölçebildiği en yüksek dozdur. Yöntemin lineer aralığı, alt ve üst nicelik sınırları arasındaki alandır. Lineer aralık, üst nicelik sınırından alt nicelik sınırına kadar hesaplanmaktadır. Burada kullanılan üzere, "alt asimptota yönelik sinyal ile gürültü oranı" terimi, arkaplan sinyaline bölünen, alt tespit sınırında, yöntemde tespit edilen sinyale işaret etmektedir. Burada kullanılan üzere, "üst asimptota yönelik sinyal ile gürültü oranı" terimi, arkaplan sinyaline bölünen, üst tespit sınırında, yöntemde tespit edilen sinyale işaret etmektedir.

Dolayısıyla, bir yapılandırılmada, burada açılan bir yöntem, bir negatif kontrolden veya kör numuneden önemli oranda farklı olan bir miktarda olan, burada açılan bir rekombinant polipeptitin LOQ'sunu tespit edebilmektedir. Bu yapılandırılmada, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 10 ng veya daha az, 9 ng veya daha az, 8 ng veya daha az, 7 ng veya daha az, 6 ng veya daha az, 5 ng veya daha az, 4 ng veya daha az, 3 ng veya daha az, 2 ng veya daha az, 1 ng veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılmada diğer yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 900 pg veya daha az, 800 pg veya daha az, 700 pg veya daha az, 600 pg veya daha az, 500 pg veya daha az, 400 pg veya daha az, 300 pg veya daha az, 200 pg veya daha az, 100 pg veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılmada başka yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 90 pg veya daha az, 80 pg veya daha az, 70 pg veya daha az, 60 pg veya daha az, 50 pg veya daha az, 40 pg veya daha az, 30 pg veya daha az, 20 pg veya daha az, 10 pg veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılmada başka yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 9 pg veya daha az, 8 pg veya daha az, 7 pg veya daha az, 6 pg veya daha az, 5 pg veya daha az, 4 pg veya daha az, 3 pg veya daha az, 2 pg veya daha az, 1 pg veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılmada diğer yönlerinde, burada açılan bir yöntem, burada açılan bir rekombinant polipeptitin örneğin 0.9 pg veya daha az, 0.8 pg veya daha az, 0.7 pg veya daha az, 0.6 pg veya daha az, 0.5 pg veya daha az, 0.4 pg veya daha az, 0.3 pg veya daha az, 0.2 pg veya daha az, 0.1 pg veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir.

Bu yapılandırılan bir başka yönünde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 10 nM veya daha az, 9 nM veya daha az, 8 nM veya daha az, 7 nM veya daha az, 6 nM veya daha az, 5 nM veya daha az, 4 nM veya daha az, 3 nM veya daha az, 2 nM veya daha az veya 1 nM veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 900 pM veya daha az, 800 pM veya daha az, 700 pM veya daha az, 600 pM veya daha az, 500 pM veya daha az, 400 pM veya daha az, 300 pM veya daha az, 200 pM veya daha az veya 100 pM veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 100 pM veya daha az, 90 pM veya daha az, 80 pM veya daha az, 70 pM veya daha az, 60 pM veya daha az, 50 pM veya daha az, 40 pM veya daha az, 30 pM veya daha az, 20 pM veya daha az veya 10 pM veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılan başka yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin 10 pM veya daha az örneğin burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin 9 pM veya daha az, 8 pM veya daha az, 7 pM veya daha az, 6 pM veya daha az, 5 pM veya daha az, 4 pM veya daha az, 3 pM veya daha az, 2 pM veya daha az, 1 pM veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 1000 fM veya daha az, 900 fM veya daha az, 800 fM veya daha az, 700 fM veya daha az, 600 fM veya daha az, 500 fM veya daha az, 400 fM veya daha az, 300 fM veya daha az, 200 fM veya daha az, 100 fM veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 100 fM veya daha az, 90 fM veya daha az, 80 fM veya daha az, 70 fM veya daha az, 60 fM veya daha az, 50 fM veya daha az, 40 fM veya daha az, 30 fM veya daha az, 20 fM veya daha az, 10 fM veya daha az veya 10 fM veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin örneğin 10 fM veya daha az, 9 fM veya daha az, 8 fM veya daha az, 7 fM veya daha az, 6 fM veya daha az, 5 fM veya daha az, 4 fM veya daha az, 3 fM veya daha az, 2 fM veya daha az, 1 fM veya daha az olan bir LOQ'ya sahiptir.

30

Burada açıklanan bir yöntem, %50'den daha fazla olmayan bir hassasiyete sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılan yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, %50'den fazla olmayan, %40'tan fazla olmayan, %30'dan fazla olmayan veya %20'den fazla olmayan bir hassasiyete sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, %15'ten fazla olmayan, %10'dan fazla olmayan, %5'ten fazla olmayan bir

35

hassasiyete sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, %4'ten fazla olmayan, %3'ten fazla olmayan, %2'den fazla olmayan veya %1'den fazla olmayan bir hassasiyete sahip olabilmektedir.

- 5 Burada açıklanan bir yöntem en az %50 olan bir doğruluğa sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılan yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, en az %50, en az %60, en az %70 veya en az %80 olan bir doğruluğa sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, en az %85, en az %90, en az %95 olan bir doğruluğa sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılan diğer yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, en az %96, en az %97, en az %98 veya en az %99 olan bir doğruluğa sahip olabilmektedir.

Burada açıklanan bir yöntem, alt asimptot için istatistik olarak anlamlı olan bir sinyal ile gürültü oranına ve üst asimptot için istatistik olarak anlamlı olan bir sinyal ile gürültü oranına sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılan yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, alt asimptot için örneğin en az 3:1, en az 4:1, en az 5:1, en az 6:1, en az 7:1, en az 8:1, en az 9:1, en az 10:1, en az 15:1 veya en az 20:1 olan bir sinyal ile gürültü oranına sahip olabilmektedir. Bu yapılandırılan yönlerinde, burada açıklanan bir yöntem, üst asimptot için örneğin en az 10:1, en az 15:1, en az 20:1, en az 25:1, en az 30:1, en az 35:1, en az 40:1, en az 45:1, en az 50:1, en az 60:1, en az 70:1, en az 80:1, en az 90:1, veya en az 100:1, en az 150:1, en az 200:1, en az 250:1, en az 300:1, en az 350:1, en az 400:1, en az 450:1, en az 500:1, en az 550:1, veya en az 600:1 olan bir sinyal ile gürültü oranına sahip olabilmektedir

- 25 Burada açıklanan bir yöntemin özgüllüğü, yöntemin; örneğin burada açıklanan kısmen aktif veya inaktif bir rekombinant polipeptit gibi diğer ilgili bileşenlerin dâhilinde, burada açıklanan bir rekombinant polipeptiti ölçme yetisini tanımlamaktadır. Burada açıklanan bir yöntemin özgüllüğü, yöntemin, bir numune içerisindeki çeşitli maddeleri ayırt edebilme kabiliyetini tanımlamaktadır. Burada açıklanan bir yöntemin lineerliği, yöntemin, numune içerisinde, burada açıklanan bir rekombinant polipeptitin konsantrasyonuna doğrudan veya iyi tanımlanmış matematiksel bir dönüştürme vasıtasıyla orantısal olan sonuçları ortaya çıkarma yetisini açıklamaktadır. Dolayısıyla, bir yapılandırılmada, burada açıklanan bir yöntem, örneğin tamamen aktif olan bir rekombinant polipeptitin aktivitesinin %70 veya daha az, %60 veya daha az, %50 veya daha az, %40 veya daha az, %30 veya daha az, %20 veya daha az veya %10 veya daha azına sahip olan, burada açıklanan kısmen aktif bir rekombinant

polipeptitten, burada açılan bir rekombinant polipeptiti ayı edebilmektedir.

Burada açılan bir yöntemin dayanıklı yöntemin normal (ancak değişken) koşullar altında özdeş numunelere yönelik olarak elde edilen sonuçların yeniden üretilebilirliğini açıklamaktadır. Burada açılan bir yöntemin sağlamlığı yöntemin, yöntem parametrelerinde küçük ancak kasti varyasyonlardan etkilenmeden kalma kapasitesini ölçme yetisini açıklamaktadır ve normal kullanıma sırasında bunun güvenilirliğine dair bir gösterge sağlamaktadır. Dolayısıyla, dayanıklı kaçınılmaz değişimleri değerlendirirken, sağlamlı kasti değişimleri değerlendirmektedir. Dayanıklı ve sağlamlı ile değerlendirilen tipik parametreler, dondurma/çözdürme etkileri, inkübasyon süreleri, inkübasyon sıcaklığı, tepkenin uzun ömürlülüğü, numune preparasyonu, numune depolaması, hücre geçiş sayısı, toksin lotları, saflaştırmalar arasındaki değişkenlik ve kuma reaksiyonları arasındaki değişkenliği kapsamaktadır. Burada açılan bir yöntem için sağlamlı parametreleri, hücre bankası (dondurmanın başlangıcı, ortası ve sonu), hücre geçiş seviyesi, hücre tohumlama yoğunluğu, hücre stoğu yoğunluğu (kültür içerisindeki gün sayısı), cam kap içerisindeki hücre yaşı (tohumlamayı bekleme süresi), inkübasyon süresi, fazla serum miktarları ve tepken kaynakları kapsamaktadır. Burada açılan bir yöntemin sistem uygunluğu, yöntemin, tepkenlerin ve aletlerin performansında dahil olmak üzere yöntem performansını bir referans standardının analizi vasıtasıyla zamanla belirleyebilme yetisini açıklamaktadır. Sistem uygunluğu, analiz edilecek olan ekipman, elektronikler, tahlil performansları ve numunelerin bütünlüklü bir sistem oluşturduğuna işaret etmektedir. Sistem uygunluğu; log dozuna karşı yanıt planlanırken, referansın seri seyreltileri ve numunelerin seri seyreltilerinin paralel eğrilere yol açması gereken paralelizmin test edilmesiyle değerlendirilebilmektedir.

Mevcut buluşun bağlamında, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik yöntem; yakalama ajanının modifikasyona seçici şekilde bağlanması olanaklı kulan koşullar altında modifikasyonu seçici şekilde bağlayan bir yakalama ajanına sahip modifikasyonu içeren rekombinant polipeptiti kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, bu şekilde bir polipeptit-ajan kompleksinin oluşturulması burada rekombinant polipeptit ile ilişkilendirilen modifikasyon, PEGilasyon, HESilasyon, silasyon veya polisilylasyondan en az birinden seçilmektedir ve burada yakalama ajanı bir modifiaksiyon tanıma antikoru; numunedeki polipeptit-ajan kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant polipeptitin mevcudiyeti ve/veya bir polipeptit aktivitesinin tahlil edilmesi adımlarını içermektedir, burada rekombinant polipeptitin ve/veya polipeptit aktivitesinin tespit edilmesi, modifikasyonu içeren rekombinant polipeptitin mevcudiyetini göstermektedir.

Mevcut tarifnamenin yönleri, burada açıklanan yöntemlerin uygulanması için kullanılan bir veya daha fazla bileşen içeren kitleri açıklamaktadır. Bir kitin bir veya daha fazla bileşeni, burada açıklanan bir modifikasyonu içeren bir rekombinant polipeptitin bir aktivitesinin ve/veya mevcudiyetinin tespit edilmesi için gereken, burada açıklanan bir veya daha fazla yakalama ajanı, bir veya daha fazla katıfaz desteğini ve/veya bir veya daha fazla tepkeni içerebilmektedir. Burada açıklanan bir kit, bir katıfaz ve katıfaza tutturulan bir yakalama ajanı içerebilmektedir. Burada açıklanan bir kit ayrıca, yakalama ajanı ve/veya tahlil adımı için bir pozitif kontrol olarak kullanılabilen bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit içerebilmektedir. Arzu edilmesi halinde, test numunesinde tespit edilen sinyalin kaydedilebildiği bir standart eğrinin meydana getirilmesinin kolaylaştırılması için, bu bileşen çeşitli konsantrasyonlarda test kiti içerisinde bulundurulabilmektedir.

Bir kit genel olarak, bir veya daha fazla bileşim olarak veya tercihe bağlı şekilde tepkenlerin uygunluğunun mücadele ettiği ölçüde karışım olarak, bileşenleri tutan bir veya daha fazla kaba sahip bir paketi kapsamaktadır. Bir kit ayrıca, numunenin işlenmesi, yoklanması veya tahlile ait herhangi bir başka adımın gerçekleştirilmesinde faydalı olan bir tampon(tamponlar), bir seyreltici(seyrelticiler) veya bir standart(standartlar) gibi, bir kullanımdan açıldığında arzu edilebilen başka bir malzemeyi(malzemesi) de içerebilmektedir. Burada açıklanan bir kit, ayrıca, burada açıklanan bir veya daha fazla yöntemin uygulanmasına yönelik talimatlar da içerebilmektedir. Burada açıklanan kitlerde bulundurulmuş talimatlar, paketleme malzemesine tutturulabilmektedir veya bir paket eki olarak bulundurulabilmektedir. Talimatlar genel olarak yazılı veya basılı materyaller olsa da, bunlarla sınırlı değildir. Bu tür talimatlar depolayabilen ve bunları bir uç kullanıma iletebilen herhangi bir ortam, burada açıklanan yapılandırılmalar tarafından tasarlanmaktadır. Bu tür ortamlar, bunlarla sınırlı olarak, elektronik depolama ortamları (örneğin manyetik diskler, kasetler, kartuşlar çipler), optik ortamlar (örneğin CD ROM) ve benzerini kapsamaktadır. Burada kullanıldığı üzere, "talimatlar" terimi, talimatları sağlayan bir internet sitesi adresini kapsayabilmektedir.

Mevcut buluşun bağlamında, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik yöntemin uygulanmasına yönelik bir kitin kullanımı istemlerde tanımlanmış şekildedir.

Mevcut tarifnamenin yönleri ayrıca şu şekilde de açıklanabilmektedir:

1. Bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: yakalama ajanına modifiaksiyona seçici şekilde bağlanmasını olanak veren koşullar altında modifikasyonu seçici şekilde bağlayan bir yakalama ajanına sahip modifikasyonu içeren rekombinant polipeptiti kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir polipeptit-ajan kompleksinin oluşturulması numuneden polipeptit-ajan kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant polipeptitin mevcudiyetinin ve/veya bir polipeptit aktivitesinin tahlil edilmesi, burada rekombinant polipeptitin ve/veya polipeptit aktivitesinin tespit edilmesi, modifikasyonu içeren rekombinant polipeptitin mevcudiyetini göstermektedir.
- 10
2. Yaplantıma 1'e göre yöntem olup, burada numune, modifikasyona sahip olmayan bir polipeptiti veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan bir polipeptiti kapsamaktadır.
- 15
3. Yaplantıma 2'ye göre yöntem olup, burada rekombinant polipeptit, bir büyüme faktörü, bir sitokin, bir bağışıklık düzenleyici ajan, bir hormon, bir antikor, bir enzim, bir enzim inhibitörü, bir proteaz, bir proteaz inhibitörü, bir esteraz, bir transferaz, bir oksidoredüktaz, bir hidrolaz, bir asparajinaz, bir adenozin deaminaz, bir nörotoksin, bir karaciğer proteini, bir pankreatik protein, bir kas proteini, bir beyin proteini, bir akciğer proteini ve bir kan proteinidir.
- 20
4. Yaplantıma 3'e göre yöntem olup, burada esteraz, bir bütirilkolinesteraz veya bir asetilkolinesterazdır.
- 25
5. Yaplantıma 3'e göre yöntem olup, burada sitokin, bir kemokin, bir lenfokin, bir tümör nekroz faktörü, bir hematopoietik faktördür.
- 30
6. Yaplantıma 3'e göre yöntem olup, burada bağışıklık düzenleyici ajan bir interlökin veya bir interferondur.
- 35
7. Yaplantıma 3'e göre yöntem olup, burada kan proteini, bir eritropoez stimülatör ajanı bir proteaz, bir proteaz inhibitörü veya bir koagülasyon faktörüdür.
8. Yaplantıma 7'ye göre yöntem olup, eritropoez stimülatör ajanı bir eritropoietin, bir eritropoietin, bir eritropoietin veya bir darbepoietindir.

9. Yapılandırma 7'ye göre yöntem olup, proteaz tripsin, kimotripsin, elastaz, pepsin veya ADAMTS13'tür.

10. Yapılandırma 7'ye göre yöntem olup, proteaz inhibitörü bir α 1-antitripsin, α 1-antikimotripsin, C1-inhibitörü, veya α 2-antiplazmin, antitrombindir.

11. Yapılandırma 7'ye göre yöntem olup, burada koagülasyon faktörü bir Faktör II, bir Faktör IIa, bir Faktör VII, bir Faktör VIIa, bir Faktör VIII, bir Faktör VIIa, bir Faktör IX, bir Faktör IXa, bir Faktör X, veya bir Faktör Xa'dır

10

12. Yapılandırma 3'e göre yöntem olup, burada bir kan proteini, ADAMTS-13, α 1-antiplazmin, α 2-antiplazmin, antitrombin, antitrombin III, kanser prokoagülan, eritropoietin, Faktör II, Faktör IIa, Faktör V, Faktör Va, Faktör VI, Faktör VIa, Faktör VII, Faktör VIIa, Faktör VIII, Faktör VIIa, Faktör IX, Faktör IXa, Faktör X, Faktör Xa, Faktör XI, Faktör XIa, Faktör XII, Faktör XIIa, Faktör XIII, Faktör XIIIa, fibronektin, fibrinojen (Faktör I), heparin kofaktör II, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK), intramüsküler immünoglobulin, intravenöz immünoglobulin, plazmin, plazminojen, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI1), plazminojen aktivatör inhibitörü-2 (PAI2), prekallikrein, prostasiklin, protein C, aktif protein C (APC), protein S, protein Z, protein Z ile ilgili proteaz inhibitörü, trombomodulin, doku faktörü (Faktör III), Doku Faktörü yolak inhibitörü (TFPI), doku plazminojen aktivatörü (t-PA), ürokinaz, ve Von Willebrand Faktörüdür.

15

20

13. Bir modifikasyon içeren bir rekombinant koagülasyon faktörünün mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem aşağıdaki adımları içermektedir:

25

yakalama ajanını modifiaksiyona seçici şekilde bağlanmasını olanak veren koşullar altında modifikasyonu seçici şekilde bağlayan bir yakalama ajanı ile modifikasyonu içeren rekombinant koagülasyon faktörünü kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir faktör-ajan kompleksinin oluşturulması

30

numuneden faktör-ajan kompleksinin saflaştırılması ve

rekombinant koagülasyon faktörünün mevcudiyetinin ve/veya bir koagülasyon faktörü aktivitesinin tahlil edilmesi, burada rekombinant koagülasyon faktörünün ve/veya koagülasyon faktörü aktivitesinin tespiti, modifikasyonu içeren rekombinant

35

koagülasyon faktörünün mevcudiyetini göstermektedir.

14. Yapılandırma 13'e göre yöntem olup, burada numune, ayrıca modifikasyona sahip olmayan bir koagülasyon faktörünü ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip bir koagülasyon faktörünü kapsamaktadır

5

15. Yapılandırmalar 13 ila 14'ten herhangi birine göre yöntem olup, burada koagülasyon faktörü bir Faktör II, bir Faktör IIa, bir Faktör VII, bir Faktör VIIa, bir Faktör VIII, bir Faktör VIIa, bir Faktör IX, bir Faktör IXa, bir Faktör X, veya bir Faktör Xa'dır

10

16. Yapılandırmalar 1 ila 15'ten herhangi birine göre yöntem olup, burada modifikasyon bir asetat grubu, bir fosfat grubu, bir lipid grubu, veya bir karbohidrat grubu, bir miristat grubu, bir palmitat grubu, bir izoprenoid grubu, örneğin bir farnesol grubu ve geranilgeraniol grubu, bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) grubu, bir lipote grubu, bir flavin grubu, bir hem C grubu, bir 4'-fosfopanteteinil grubu, bir retiniliden grubu, bir diftamid grubu, bir etanolamin fosfoglicerol grubu, bir hipusin grubu, bir asetil grubu, bir formil grubu, bir alkil grubu, bir metil grubu, bir amid grubu, bir amino asit, bir bütil grubu, bir karboksil grubu, bir glikozil grubu, bir polisilyalik asit (PSA) grubu, bir hidroksil grubu, bir malonil grubu, bir iyodin grubu, bir fosfat grubu, bir adenilil grubu, bir süksinil grubu, bir sülfat grubu, bir selenyum grubu, bir karbohidrat grubu, bir nişasta grubu, bir hidroksil-etil nişasta (HES) grubu, bir polisakkarit grubu, bir şeker grubu, bir polietilen glikol (PEG) grubu, bir ubikitin grubu, bir pullulan grubu, bir kitosan grubu, bir hiyalüronik asit grubu, bir kondroitin sülfat grubu, bir dermatan sülfat grubu, bir dekstran grubu, bir karboksi-metil dekstran grubu, bir polialkilen oksit (PAO) grubu, bir polialkilen glikol (PAG) grubu, bir polipropilen glikol (PPG) grubu, bir polioksazolin grubu, bir poliakrilomorfolin grubu, bir polivinil alkol (PVA) grubu, bir polikarboksilat grubu, bir polivinilpirrolidon (PVP) grubu, bir polifosfazen grubu, bir polioksazolin grubu, bir polietilen-ko-maleik asit anhidrit grubu, bir polistiren-ko-maleik asit anhidrit grubu, bir poli(1-hidroksimetiletilen hidroksimetilformal) (PHF) grubu, ve bir 2-metakriloloksi-2'-etiltrimetilamonyum-fosfat (MPC) grubudur.

20

17. Yapılandırmalar 1 ila 16'dan herhangi birine göre yöntem olup, burada modifikasyon, rekombinant polipeptit ile miristoilasyon, palmitoilasyon, izoprenilasyon (prenilasyon), glipiasyon, lipoilasyon, flavinilasyon, fosfopanteteinilasyon, retinilidenilasyon, diftamidilasyon, etanolamin fosfoglicerilasyon, hipusinilasyon, asilasyon, asetilasyon, formilasyon, alkilasyon, amidasyon, arjinilasyon, poliglutamilasyon, poliglisisilasyon, bütirilasyon,

30

gammakarboksilasyon, glikozilasyon, polisiyalilasyon, malonilasyon, hidroksilasyon, iyodinasyon, nükleosilasyon, oksidasyon, fosforoesterfikasyon, fosforamidasyon, fosforilasyon, adenililasyon, propiyonilasyon, piroglutamat, S-glutatyonylasyon, S-nitrosilasyon, süksinilasyon, sülfasyon, selenoilasyon, glikasyon, biyotinilasyon, asilasyon, PEGilasyon, HESilasyon, Silasyon, sitrullinasyon, deamidasyon, eliminilasyon, karbamilasyon, deiminasyon, pupilasyon, neddilasyon, ubikitinasyon, SUMOilasyon, ve ISGilasyonu vasıfıyla ilişkilendirilmektedir.

18. Yapılandırılmalar 1 ila 17'den herhangi birine göre yöntem olup, burada numune, rekombinant polipeptitin saflaştırılmış bir preparasyonunu, rekombinant polipeptitin kısmen saflaştırılmış bir preparasyonunu, rekombinant polipeptitin saflaştırılmamış bir preparasyonunu, rekombinant polipeptitin formüle edilmiş bir preparasyonunu; rekombinant polipeptitin bir ham özütünü, rekombinant polipeptitin bir fraksiyonlu özütünü, rekombinant polipeptiti kapsayan bir hücre lizatı veya bir biyolojik numuneyi kapsamaktadır

15

19. Yapılandırılma 18'e göre yöntem olup, burada biyolojik numune, hücreler, bir doku numunesi, bir kan numunesi, bir vücut sıvısı numunesi veya bir bireyden doğrudan alınan bir organ numunesini içermektedir.

20. Yapılandırılma 19'a göre yöntem olup, burada vücut sıvıları, tükürük, meni, dışkı, salya, safra, serebral sıvı, nazal sürüntü, ürogenital sürüntü, nazal aspirat, veya omurilik sıvılarıdır

21. Yapılandırılma 18'e göre yöntem olup, burada biyolojik numune, bir bireyden doğrudan alınan bir numuneden elde edilen bir preparasyondur.

25

22. Yapılandırılma 21'e göre yöntem olup, burada bireyden doğrudan alınan numuneden elde edilen preparasyon, bir kan numunesinin bir plazma fraksiyonu, bir kan numunesinin bir serum fraksiyonu veya bir saflaştırılma prosesine ait bir eluattır

30

23. Yapılandırılmalar 1 ila 22'den herhangi birine göre yöntem olup, burada numune, rekombinant polipeptitin tespit edilebilirliğinin artırılması için veya rekombinant polipeptitin aktivitesinin artırılması için işlem görmektedir.

24. Yapılandırılma 23'e göre yöntem olup, burada işlem, lisizleme, seyreltme, saflaştırılma,

35

özütleme, filtreleme, damıtma, ayırma, konsantre etme, karışan bileşenlerin inaktivasyonu, tepkenlerin eklenmesi veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içermektedir.

25. Yapılandırılmalar 1 ila 24'ten herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı modifikasyonu içeren bir polipeptit için, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, veya $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla olan bir birleşme hız sabitine sahiptir.

26. Yapılandırılmalar 1 ila 25'ten herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı modifikasyonu içeren bir polipeptit için, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 'den az, veya $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 'den az olan bir ayrılma hız sabitine sahiptir.

27. Yapılandırılmalar 1 ila 26'dan herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı modifikasyonu içeren bir polipeptit için, 0.500 nM'den az, 0.450 nM'den az, 0.400 nM'den az, 0.350 nM'den az, 0.300 nM'den az, 0.250 nM'den az, 0.200 nM'den az, 0.150 nM'den az, 0.100 nM'den az, veya 0.050 nM'den az olan bir denge ayrılma sabitine sahiptir.

28. Yapılandırılmalar 1 ila 27'den herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı modifikasyona sahip olmayan bir polipeptit veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan bir polipeptit için, $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az, veya $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den az olan bir birleşme hız sabitine sahiptir.

29. Yapılandırılmalar 1 ila 28'den herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hız sabitine (K_a) ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hız sabitine (K_a) göre, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit için, $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla, $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla veya $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den fazla olan bir birleşme hız sabitine (K_a) sahiptir.

30. Yapılandırılmalar 1 ila 28'den herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hız sabitinden (K_a) ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan bir rekombinant polipeptite yönelik yakalama ajanının birleşme hız sabitinden (K_a) en az 2 kat fazla, en az 3 kat fazla, en az 4 kat fazla, en az 5 kat fazla, en az 6 kat fazla, en

az 7 kat fazla, en az 8 kat fazla, en az 9 kat fazla, en az 10 kat fazla, en az 100 kat fazla, en az 1,000 kat fazla veya en az 10,000 kat fazla olan, bir modifikasyon içeren bir rekombinantta ynelik bir birleşme h₂O'ya (Ka) sahiptir.

5 31. Yapılandırmalar 1 ila 28'den herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı bir modifikasyona sahip olmayan bir rekombinant polipeptite ve/veya farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan bir rekombinant polipeptite göre, bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit için, en az 2:1, en az 3:1, en az 4:1, en az 5:1, en az 6:1 en az 7:1, en az 8:1, en az 9:1, en az 10:1, en az 15:1, en az 20:1, en az 25:1, en az 30:1, en az 35:1, veya en az 40:1 olan bir bağlama özgüllüğü oranına sahiptir.

32. Yapılandırmalar 1 ila 31'den herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı çokdeğerlikli bir yakalama ajanıdır.

15 33. Yapılandırmalar 1 ila 32'den herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı bir modifikasyon içeren rekombinant polipeptiti, modifikasyon içermeyen aynı polipeptitten ayırt edebilmektedir.

20 34. Yapılandırmalar 1 ila 33'ten herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı bir modifikasyon içeren rekombinant polipeptiti, farklı bir modifikasyon örüntüsüne veya derecesine sahip olan aynı polipeptitten ayırt edebilmektedir.

35. Yapılandırmalar 1 ila 34'ten herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı bir antikordur.

25

36. Yapılandırma 35'e göre yöntem olup, burada antikor, bir anti-asetat antikor, bir anti-fosfat antikor, bir anti-lipid antikor, veya bir anti-karbohidrat antikor, bir anti-miristat antikor, bir anti-palmitat antikor, bir anti-izoprenoid antikor, örneğin bir anti-farnesol antikor ve geranilgeraniyol antikor, bir anti-glikozilfosfatidilinositol (GPI) antikor, bir anti-lipoat antikor, bir anti-flavin antikor, bir anti-hem C antikor, bir anti-4'-fosfopanteteinil antikor, bir anti-retiniliden antikor, bir anti-difthamit antikor, bir anti-etanolamin fosfogliserol antikor, bir anti-hipusin antikor, bir anti-asetil antikor, bir anti-formil antikor, bir anti-alkil antikor, bir anti-metil antikor, bir anti-amit antikor, bir anti-amino asit antikor, bir anti-bütül antikor, bir anti-karboksil antikor, bir anti-glikozil antikor, bir anti-polisiyalik asit antikor, bir anti-hidroksil antikor, bir anti-malonil antikor, bir anti-

35

iyodin antikoru, bir anti-fosfat antikoru, bir anti-adenilil antikoru, bir anti-süksinil antikoru, bir anti-sülfat antikoru, bir anti-selenyum antikoru, bir anti-karbohidrat antikoru, bir anti-polisakkarit antikoru, bir anti-nişasta antikoru, bir anti-hidroksil-etil nişasta (HES) antikoru, bir anti-şeker antikoru, bir anti-polietilen glikol (PEG) antikoru, bir anti-ubikitin antikoru, bir anti-pullulan antikoru, bir anti-kitosan antikoru, bir anti-hyalüronik asit antikoru, bir anti-kondroitin sülfat antikoru, bir anti-dermatan sülfat antikoru, bir anti-dekstran antikoru, bir anti-karboksimetil-dekstran antikoru, bir anti-polialkilen oksit (PAO) antikoru, bir anti-polialkilen glikol (PAG) antikoru, bir anti-polipropilen glikol (PPG) antikoru, bir anti-polioksazolin antikoru, bir anti-poliakrilolmorfolin antikoru, bir anti-polivinil alkol (PVA) antikoru, bir anti-polikarboksilat antikoru, bir anti-polivinilpirrolidon (PVP) antikoru, bir anti-polifosfazen antikoru, bir anti-polioksazolin antikoru, bir anti-polietilen-ko-maleik asit anhidrit antikoru, bir anti-polistiren-ko-maleik asit anhidrit antikoru, bir anti-poli(1-hidroksimetiletilen hidroksimetilformal) (PHF) antikoru, ve bir anti-2-meakriloloksi-2'-etiltrimetilamonyum-fosfat (MPC) antikoru.

15

37. Yapılandırmalar 1 ila 36'dan herhangi birine göre yöntem olup, burada modifikasyonu içeren rekombinant polipeptit veya modifikasyonu içeren rekombinant koagülayon faktörü, bir PEGilasyon Faktörü II, bir PEGilasyon Faktörü IIa, bir polisiyalizasyon Faktörü II, bir polisiyalilasyon Faktörü IIa, bir HESilasyon Faktörü II, bir HESilasyon Faktörü IIa, bir Silasyon Faktörü II, veya bir Silasyon Faktörü IIa'dır

20

38. Yapılandırmalar 1 ila 36'dan herhangi birine göre yöntem olup, burada modifikasyonu içeren rekombinant polipeptit veya modifikasyonu içeren rekombinant koagülayon faktörü, bir PEGilasyon Faktörü VII, bir PEGilasyon Faktörü VIIa, bir polisiyalilasyon Faktörü VII, bir polisiyalilasyon Faktörü VIIa, bir HESilasyon Faktörü VII, bir HESilasyon Faktörü VIIa, bir Silasyon Faktörü VII, veya bir Silasyon Faktörü VIIa'dır

25

39. Yapılandırmalar 1 ila 36'dan herhangi birine göre yöntem olup, burada modifikasyonu içeren rekombinant polipeptit veya modifikasyonu içeren rekombinant koagülayon faktörü, bir PEGilasyon Faktörü VIII, bir PEGilasyon Faktörü VIIIa, bir polisiyalilasyon Faktörü VIII, bir polisiyalilasyon Faktörü VIIIa, bir HESilasyon Faktörü VIII, bir HESilasyon Faktörü VIIIa, bir Silasyon Faktörü VIII, veya bir Silasyon Faktörü VIIIa'dır

30

40. Yapılandırmalar 1 ila 36'dan herhangi birine göre yöntem olup, burada modifikasyonu içeren rekombinant polipeptit veya modifikasyonu içeren rekombinant koagülayon faktörü,

35

bir PEGilasyon Faktörü IX, bir PEGilasyon Faktörü IXa, bir polisyalilasyon Faktörü IX, bir polisyalilasyon Faktörü IXa, bir HESilasyon Faktörü IX, bir HESilasyon Faktörü IXa, bir Silasyon Faktörü IX, veya bir Silasyon Faktörü IXa'dır

5 41. Yapılandırılmalar 1 ila 40'tan herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı bir katkı desteğe tutturulmaktadır

42. Yapılandırılma 41'e göre yöntem olup, burada katkı destek, çoklu kuyucuklu bir plaka, bir film, bir tüp, bir tabaka, bir sütun veya bir mikropartiküldür.

10

43. Bir PEGile rekombinant Faktörü VII'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PEG antikorunun PEGile rekombinant Faktör VII'ya seçici şekilde bağlanmasına olanak veren koşullar altında bir anti-PEG antikoruna sahip PEGile rekombinant Faktör VII'ya kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VII ve/veya Faktör VII aktivitesinin tespit edilmesi, PEGile rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetini göstermektedir, burada PEGile rekombinant Faktör VII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

20

44. Bir polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PSA antikorunun polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII'ya seçici şekilde bağlanmasına olanak veren koşullar altında bir anti-PSA antikoruna sahip polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII'ya kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VII ve/veya Faktör VII aktivitesinin tespit edilmesi, polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetini göstermektedir, burada polisyalillenmiş rekombinant Faktör VII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

30

45. Bir HESile rekombinant Faktörü VII'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun HESile rekombinant Faktör VII'ya seçici şekilde bağlanmasına olanak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip HESile rekombinant Faktör VII'ya kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir

35

Faktör VII-antikör kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VII-antikör kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VII mevcudiyetinin ve/veya Faktör VII aktivitesinin tespit edilmesi, HES ile rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetini göstermektedir, burada HES ile rekombinant Faktör VII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

46. Bir Sillenmiş rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikörünün Sillenmiş rekombinant Faktör VII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-S antikörüne sahip Sillenmiş rekombinant Faktör VII'ya kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VII-antikör kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VII-antikör kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VII ve/veya Faktör VII aktivitesinin tespit edilmesi, Sillenmiş rekombinant Faktör VII'nin mevcudiyetini göstermektedir, burada Sillenmiş rekombinant Faktör VII, bir Faktör VII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

47. Bir PEG ile rekombinant Faktörü VIII'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PEG antikörünün PEG ile rekombinant Faktör VIII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PEG antikörüne sahip PEG ile rekombinant Faktör VIII'ya kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VIII-antikör kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VIII-antikör kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VIII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VIII ve/veya Faktör VIII aktivitesinin tespit edilmesi, PEG ile rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetini göstermektedir, burada PEG ile rekombinant Faktör VIII, bir Faktör VIII ve/veya bir Faktör VIIa'dır

48. Bir polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PSA antikörünün polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PSA antikörüne sahip polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII'ya kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VIII-antikör kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VIII-antikör kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VIII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VIII ve/veya Faktör VIII aktivitesinin tespit edilmesi, polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetini göstermektedir, burada polisyalillenmiş rekombinant Faktör VIII, bir Faktör

VIII ve/veya bir Faktör VIIIa'dır

49. Bir HESile rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun HESile rekombinant Faktör VIII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip HESile rekombinant Faktör VIII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VIII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VIII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VIII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VIII ve/veya Faktör VIII aktivitesinin tespit edilmesi, HESile rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetini göstermektedir, burada HESile rekombinant Faktör VIII, bir Faktör VIII ve/veya bir Faktör VIIIa'dır

50. Bir Sillenmiş rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun Sillenmiş rekombinant Faktör VIII'ya seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip Sillenmiş rekombinant Faktör VIII'yı kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör VIII-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör VIII-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör VIII aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör VIII ve/veya Faktör VIII aktivitesinin tespit edilmesi, Sillenmiş rekombinant Faktör VIII'nin mevcudiyetini göstermektedir, burada Sillenmiş rekombinant Faktör VIII, bir Faktör VIII ve/veya bir Faktör VIIIa'dır

51. Bir PEGile rekombinant Faktörü IX'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PEG antikorunun PEGile rekombinant Faktör IX'e seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-PEG antikoruna sahip PEGile rekombinant Faktör IX'i kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör IX-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör IX-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör IX aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör IX ve/veya Faktör IX aktivitesinin tespit edilmesi, PEGile rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetini göstermektedir, burada PEGile rekombinant Faktör IX, bir Faktör IX ve/veya bir Faktör IXa'dır

52. Bir polisyalillenmiş rekombinant Faktörü IX'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-PSA antikorunun polisyalillenmiş rekombinant Faktör IX'e seçici şekilde bağlanması olarak veren koşullar altında bir anti-

PSA antikoruna sahip polisyalillenmiş rekombinant Faktör IX'i kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör IX-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör IX-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör IX aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör IX ve/veya Faktör IX aktivitesinin tespit edilmesi, polisyalillenmiş rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetini göstermektedir, burada polisyalillenmiş rekombinant Faktör IX, bir Faktör IX ve/veya bir Faktör IXa'dır

53. Bir HESile rekombinant Faktörü IX'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun HESile rekombinant Faktör IX'e seçici şekilde bağlanması olanak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip HESile rekombinant Faktör IX'i kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör IX-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör IX-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör IX aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör IX ve/veya Faktör IX aktivitesinin tespit edilmesi, HESile rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetini göstermektedir, burada HESile rekombinant Faktör IX, bir Faktör IX ve/veya bir Faktör IXa'dır

54. Bir Sillenmiş rekombinant Faktörü IX'nin mevcudiyetinin tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, yöntem şu adımları içermektedir: anti-S antikorunun Sillenmiş rekombinant Faktör IX'e seçici şekilde bağlanması olanak veren koşullar altında bir anti-S antikoruna sahip Sillenmiş rekombinant Faktör IX'i kapsayan bir numunenin inkübe edilmesi, böylelikle bir Faktör IX-antikor kompleksinin oluşturulması numuneden Faktör IX-antikor kompleksinin saflaştırılması ve rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetinin ve/veya bir Faktör IX aktivitesinin tahlil edilmesi, burada Faktör IX ve/veya Faktör IX aktivitesinin tespit edilmesi, Sillenmiş rekombinant Faktör IX'in mevcudiyetini göstermektedir, burada Sillenmiş rekombinant Faktör IX, bir Faktör IX ve/veya bir Faktör IXa'dır

55. Yaptırımlar 1 ila 54'ten herhangi birine göre yöntem olup, burada tahlil adımları bir niteliksel tahlil veya bir niceliksel tahlil kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

56. Yaptırımlar 1 ila 55'ten herhangi birine göre yöntem olup, burada tahlil adımları bir *in vitro* tahlil, bir hücre bazlı tahlil veya bir *in vivo* tahlil kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

57. Yaptırımlar 1 ila 56'dan herhangi birine göre yöntem olup, burada tahlil adımları

spesifik olmayan bir polipeptit tahlili veya spesifik bir polipeptit tahlili kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

58. Yaptırma 57'ye göre yöntem olup, burada spesifik olmayan polipeptit tahlili, bir UV absorpsiyon tahlili, bir biyore tahlili veya bir Bradford tahlilidir.

59. Yaptırma 57'ye göre yöntem olup, burada spesifik polipeptit tahlili bir kromojenik tahlil, bir kolorimetrik tahlil, bir kronometrik tahlil, bir kemiluminesans tahlili, bir elektrokemiluminesans tahlili, bir biyoluminesans tahlili, bir floresan tahlil, bir rezonans enerji aktarım tahlili, bir düzlemsel polarizasyon tahlili, bir akış sitometrisi tahlili, bir immün bazlı tahlil veya bir aktivite tahlilidir.

60. Yaptırma 59'a göre yöntem olup, burada aktivite tahlili, bir enzimatik aktivite tahlili, bir inhibitör aktivitesi tahlili, bir koagülasyon aktivitesi tahlili veya bir polimerizasyon aktivitesi tahlilidir.

61. Yaptırma 1 ila 60'tan herhangi birine göre yöntem olup, burada yakalama ajanı seçici şekilde bağlanmasınötr ila alkalın arasınd bir pH'ta meydana gelmektedir.

62. Yaptırma 1 ila 61'den herhangi birine göre yöntem olup, burada rekombinant polipeptit, bir terapötik polipeptittir.

63. Yaptırma 63'e göre yöntem olup, burada terapötik bir polipeptit, Faktör IX (FIX), Faktör VIII (FVIII), Faktör VIIa (FVIIa), Von Willebrand Faktörü (VWF), Faktör V (FV), Faktör X (FX), Faktör XI (FXI), Faktör XII (FXII), trombin (FII), protein C, protein S, tPA, PAI-1, doku faktörü (TF), ADAMTS 13 proteaz, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, koloni stimülasyon faktörü-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, granülosit koloni stimülasyon faktörü (G-CSF), EPO, interferon-a (IFN-a), konsensus interferon, IFN-β, IFN-γ, IFN-ω, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoietin (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, anjiyopietin-benzeri polipeptit 1 (ANGPTL1), anjiyopietin-benzeri polipeptit 2 (ANGPTL2), anjiyopietin-benzeri polipeptit 3 (ANGPTL3), anjiyopietin-benzeri polipeptit 4 (ANGPTL4), anjiyopietin-benzeri polipeptit 5 (ANGPTL5), anjiyopietin-benzeri polipeptit 6 (ANGPTL6), anjiyopietin-benzeri polipeptit 7 (ANGPTL7), vitronektin, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenin, aktivin A, aktivin B, aktivin C, kemik morfojenik protein-1, kemik

morfojenik protein-2, kemik morfojenik protein-3, kemik morfojenik protein-4, kemik morfojenik protein-5, kemik morfojenik protein-6, kemik morfojenik protein-7, kemik morfojenik protein-8, kemik morfojenik protein-9, kemik morfojenik protein-10, kemik morfojenik protein-11, kemik morfojenik protein-12, kemik morfojenik protein-13, kemik morfojenik protein-14, kemik morfojenik protein-15, kemik morfojenik protein reseptörü IA, kemik morfojenik protein reseptörü IB, kemik morfojenik protein reseptörü II, beyin türevli nörotrofik faktör, kardiyotrofin-1, siliyer nötrofik faktör, siliyer nötrofik faktör reseptörü, kripto, kriptik, sitokin-indüklü nötrofil kemotaktik faktör 1, sitokin indüklü nötrofil, kemotaktik faktör 2 α , sitokin indüklü nötrofik kemotaktik faktör 2 β , β -endotelial hücre büyüme faktörü, endotelin 1, epidermal büyüme faktörü, epijen, epiregulin, epitelyal türevli nötrofil atraktan, fibroblast büyüme faktörü 4, fibroblast büyüme faktörü 5, fibroblast büyüme faktörü 6, fibroblast büyüme faktörü 7, fibroblast büyüme faktörü 8, fibroblast büyüme faktörü 8b, fibroblast büyüme faktörü 8c, fibroblast büyüme faktörü 9, fibroblast büyüme faktörü 10, fibroblast büyüme faktörü 11, fibroblast büyüme faktörü 12, fibroblast büyüme faktörü 13, fibroblast büyüme faktörü 16, fibroblast büyüme faktörü 17, fibroblast büyüme faktörü 19, fibroblast büyüme faktörü 20, fibroblast büyüme faktörü 21, fibroblast büyüme faktörü asidik, fibroblast büyüme faktörü bazik, gliyal hücre hattı türevli nötrofik faktör reseptörü α 1, gliyal hücre hattı türevli nötrofik faktör reseptörü α 2, büyümeyle ilgili protein, büyümeyle ilgili protein α , büyümeyle ilgili protein β , büyümeyle ilgili protein γ , heparin bağlama epidermal büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü reseptörü, hepatoma türevli büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü I, insülin-benzeri büyüme faktörü reseptörü, insülin-benzeri büyüme faktörü II, insülin-benzeri büyüme faktörü bağlama proteini, keratinosit büyüme faktörü, lösemi inhibisyon faktörü, lösemi inhibisyon faktörü reseptörü α , sinir büyüme faktörü sinir büyüme faktörü reseptörü, nöropoietin, nörotrofin-3, nörotrofin-4, onkostatın M (OSM), plasenta büyüme faktörü, plasenta büyüme faktörü 2, platelet türevli endotelial hücre büyüme faktörü, platelet türevli büyüme faktörü, platelet türevli büyüme faktörü A zinciri, platelet türevli büyüme faktörü AA, platelet türevli büyüme faktörü AB, platelet türevli büyüme faktörü B zinciri, platelet türevli büyüme faktörü BB, platelet türevli büyüme faktörü reseptörü α , platelet türevli büyüme faktörü reseptörü β , ön-B hücre büyüme stimülasyon faktörü, kök hücre faktörü (SCF), kök hücre faktörü reseptörü, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, dönüştürücü büyüme faktörü .alfa., dönüştürücü büyüme faktörü β , dönüştürücü büyüme faktörü β 1, dönüştürücü büyüme faktörü β 1.2, dönüştürücü büyüme faktörü β 2, dönüştürücü büyüme faktörü β 3, dönüştürücü büyüme faktörü β 5, latent dönüştürücü büyüme faktörü β 1, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama proteini I, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama proteini II, dönüştürücü büyüme faktörü β bağlama

proteini III, timik stromal lenfopoietin (TSLP), tümör nekroz faktörü reseptörü tip I, tümör nekroz faktörü reseptörü tip II, ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü, fosfolipaz-aktivasyon proteini (PUP), insülin, lektin risin, prolaktin, koriyonik gonadotropin, folikül-stimülasyon hormonu, tiroid-stimülasyon hormonu, doku plazminojen aktövatörü, IgG, IgE, IgM, IgA, ve IgD, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, DNAz, fetuin, lüteinleyici hormon, östrojen, insülin, albümin, lipoproteinler, fetoprotein, transferrin, trombopoietin, ürokinaz, integrin, trombin, leptin, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanersept), veya bunların biyolojik olarak aktif bir fragmenti, türevi veya varyantlarıdır.

64. Yaptırımlar 1 ila 64'ten herhangi birine göre bir yöntemin uygulanması için faydalı olan bir veya daha fazla bileşen içeren bir kit.

65. İstem 64'e göre kit olup, burada bir veya daha fazla bileşen, bir rekombinant polipeptitin bir aktivitesinin ve/veya mevcudiyetinin tespit edilmesi için gereken bir veya daha fazla yakalama ajanı, bir veya daha fazla katı destekli ve/veya bir veya daha fazla tepkeni içermektedir.

66. Yaptırımına 65'e göre kit olup, burada yakalama ajanı katı desteğe tutturulmaktadır.

67. Yaptırımlar 64 ila 66'dan herhangi birine göre kit olup, burada kit ayrıca, yakalama ajanı ve/veya tahlil adını için bir pozitif kontrol olarak faydalı olan bir modifikasyon içeren bir rekombinant polipeptit içermektedir.

ÖRNEKLER

Aşağıdaki sınırlanmayan örnekler, burada tasarlanan temsili yaptırımların daha bütünlüklü bir şekilde anlaşılmasını sağlamak için yalnızca açıklama amaçları için sağlanmaktadır. Bu örneklerin, burada açıklanan modifikasyona bağlı aktivite tahlillerinin yöntemleri ve bu yöntemler kullanılarak işlenen ürünlerle ilgili olanlar da dahil olmak üzere, mevcut tarifnamede açıklanan yaptırımlardan hiçbirini sınırlanmadığı düşünülmemelidir. Örneklerin, mevcut buluşun kapsamını dışında kalan konular içerdiği durumlarda, bunlar yalnızca referans amaçları için buraya dahil edilmektedir.

Örnek 1

35

PBS içindeki PEG ile FVIII'ya yönelik MDAA

Bu örnek, PEG ile FVIII'ya yönelik MDAA'nın, tamponlu bir çözeltide uygulanabildiğini göstermektedir.

5

Bir katı desteğe, bir modifikasyon tanıma antikorunun tutturulması için, tavşan anti-PEG antikorları 0.43 mg/mL'si (B47-2061-1; Epitomics, Inc., Burlingame, CA), pH 9.5'te, 0.1 M NaHCO₃-Na₂CO₃ içerisinde 1/50 seyreltilmiştir ve gece boyunca 0±10°C'de bir F96 Maxisorp plakası (100 µL/kuyucuk) kuyucuklarında inkübe edilmiştir. Ardından plakalar, fosfat-tamponlu tuzlu su (PBS; 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 1.26 g/L Na₂HPO₄ x 2 H₂O, natf pH) ve %0.05 Tween 20 içeren Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır. Plakalar kuyucuklarından, 60 ± 10 dakika boyunca 37 ± 5°C'de PBS ve 10 mg/mL insan serum albümin içeren Seyrelti Tamponunun 200 µL/kuyucuğunun inkübasyon ile bloke edilmiştir. Bloke edilen kuyucuklar Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır.

15

Bir numunenin bir katı desteğe seçici şekilde bağlanması için, yandaki numunelerin 100 µL'si bir kuyucuğa ilave edilmiştir, 1) 10 mg/mL insan serum albümini (HSA) içeren PBS kullanılarak PEG ile rekombinant FVIII standardı bir seyrelti serisi veya 2) 10 mg/mL HSA içeren PBS kullanılarak hazırlanan insan referans plazması bir seyrelti serisi. Yaklaşık 2 değerinde bir PEGilasyon derecesine sahip PEG ile rekombinant FVIII kullanılmıştır ve bir kromojenik yöntem ile ölçülen, 2333 IU FVIII/mL'nin bir FVIII:C aktivitesine sahip olmuştur ve 56.2 µg/mL bağlı PEG/mL içermiştir. Numuneler plakaya yüklenmiştir ve 60 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C'de inkübe edilmiştir. Bu koşullar altında, PEG ile rekombinant FVIII, bir anti-PEG antikorunu kullanarak kendi PEG kısmıyla katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır. Ardından plaka Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkanmıştır, sonrasında pH 7.4'te, 3.4 g/L imidazol, 5.85 g/L NaCl; 10 mg/mL HSA içeren bir FVIII seyrelti tamponunun 200 µL/kuyucuğu ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu dengeleme, 3 dakika boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Yıkama Tamponu ile bir yıkama adından sonra, kuyucuklar boşaltılmıştır ve Immunokrom FVIII kiti (Technoclone, GmbH, Viyana, Avusturya) kullanılarak gerçekleştirilen standart kromojenik prosedürün ardından FVIII aktivitesi bir kromojenik tahlil ile ölçülmüştür. Kuyucuklar 20 µL FVIII seyrelti tamponu ile doldurulmuştur, ardından 20 µL tepken A ve tepken B ardışık olarak ilave edilmiştir. Ardından plaka 5 dakika boyunca 37 ± 5°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında, önceden test edilmiş substrat çözeltisi ilave edilmiştir (100 µL/kuyucuk) ve 5 dakika boyunca 37 ± 5°C'de inkübe edilmiştir. Son olarak, reaksiyon %20 asetik asit (40 µL/kuyucuk) eklenmesiyle durdurulmuştur.

Sonrasında, plaka bir ELISA okuyucu ile 405 nm'de (referans dalgaboyu 620 nm) ölçülmüştür.

Şekil 1, PEG ile FVIII preparasyonu ve bir insan referans plazma preparasyonu için elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerini göstermektedir. PEG ile FVIII preparasyonu için elde edilen, 7.3 ila 233 mIU/mL arasında bir FVIII aktivite aralığını kapsayan doz-yanıt eğrisi, doğruluk, hassasiyet ve lineerliğe yönelik kabul edilen gereklilikleri karşılamıştır ve dolayısıyla dizi değerlendirme numuneleri için uygun olduğu düşünülmüştür. Özellikle, iyileştirilmiş konsantrasyonlar nominal olanlar ile ortalama bağışlılığı olarak hesaplanan %100.1'lik bir ortalama doğruluk ve bu ortalamanın standart sapması olarak ifade edilen %4.9'luk bir hassasiyet ile birlikte, lok-log regresyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0.9993 idi. Alternatif olarak, bir lin-lin regresyon analizine dayanan bir kalibrasyon eğrisi de makul olabilmektedir. Bu durumda, %104.4'lük bir ortalama doğruluk ve %6.2'lik bir hassasiyet ile birlikte 4 noktalı kalibrasyon eğrisi, yalnızca 29.2 ila 233 mIU/mL aralığında yer almaktadır. Bu veriler, kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için log-log yaklaşımını desteklemektedir, zira bu yaklaşım, daha yüksek doğruluk ve hassasiyet ile birlikte daha yüksek duyarlılığı sağlamaktadır. Diğer veriler, yalnızca modifiye FVIII'ün ölçülmesine yönelik yaklaşımın mutlak özgüllüğünü sergilemiştir. 1 IU/mL'lik bir konsantrasyonda modifiye edilmemiş, natif insan FVIII içeren insan referans plazması ciddi bir sinyal meydana getirmemiştir. Bu veriler, PEG ile FVIII'ün FVIII aktivitesinin, hassas ve özgül bir şekilde ölçülebildiğini göstermiştir.

Örnek 2

İnsan Plazmasındaki PEG ile FVIII'ya yönelik MDAA

25

Bu örnek, PEG ile FVIII'ya yönelik MDAA'nın kan plazmasındaki varlığında uygulanabildiğini göstermektedir.

30

Bir modifikasyon tanıma antikoruna, pH 9.5'te 4 µg/mL tavşan anti-PEG antikorları (B47-2061-1; Epitomics, Inc., Burlingame, CA), 0.1 M NaHCO₃-Na₂CO₃ içeren 100 µl/kuyucuk kaplama antikor çözeltisinin kullanılması durumunda, Örnek 1'de açıklandığı şekilde bir katı desteğe tutturulmuştur.

35

Numuneler seçici şekilde bir katı desteğe bağlanmıştır ve 1) rekombinant PEG ile FVIII'ün bir birinci seyrelti serisinin, 1/10,000 ila 1/320,000 arasında bir seyrelti serisi elde etmek için 30

mg/mL yağsüz süt içeren PBS içerisinde hazırlanmış olması 2) rekombinant PEG ile FVIII'ün bir ikinci seyrelti serisinin, insan plazmasında seyreltim vasıtasıyla hazırlanmış olması ve 3) FVIII aktivitesinin, $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de substrat için 15 dakika boyunca bir inkübasyon süresi kullanılarak kromojenik tahlilde ölçülmesi dışında, FVIII aktivitesi, Örnek 1'de açıklandığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür.

Şekil 2, farklı safınlara sahip iki preparasyona yönelik doz-yanıt eğrilerini göstermektedir. İki konsantrasyon-yanıt eğrisi, %1'den az oranlarda farklılık gösteren eğimleri tarafından gösterildiği üzere oldukça benzerdir. Bu veriler, 1/200 oranında seyreltildiğinde, PEG ile FVIII için modifikasyona bağlı aktivite tahlilinin insan plazmasında yeterli şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Plazma içerisinde bulunan, PEG ile olmayan FVIII, kesişen konsantrasyon-yanıt eğrileri tarafından gösterildiği üzere sinyale katkıda bulunmamıştır.

Örnek 3

15

PEG ile FVIII'e yönelik MDAA'nın Doğruluğu ve Hassasiyeti

Bu örnek, PEG ile FVIII'e yönelik MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini göstermektedir.

20 Bir katı desteğe, bir modifikasyon tanıma antikorunun tutturulması için, pH 9.5'te $4 \mu\text{g/mL}$ tavşan anti-PEG antikorları (B47-2061-1; Epitomics, Inc., Burlingame, CA), 0.1 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 içeren $100 \mu\text{L}$ /kuyucuk kaplama antikoru çözeltisi, gece boyunca $0 \pm 10^\circ\text{C}$ 'de bir F96 Maxisorp plakasındaki kuyucuklarda inkübe edilmiştir. Ardından plakalar, PBS ve %0.05 Tween 20 içeren Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır. Plakalarındaki kuyucuklardan, 60 ± 10 dakika boyunca 18°C ila 26°C 'de PBS, %3 yağsüz süt ve 50 mM benzamidin içeren Blokaj Tamponununun $200 \mu\text{L}$ /kuyucuğunun inkübasyonu ile bloke edilmiştir. Bloke edilen kuyucuklar Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır.

30 Bir numunenin bir katı desteğe seçici şekilde bağlanması için, şu numunelerin $100 \mu\text{L}$ 'si bir kuyucuğa ilave edilmiştir, 1) PBS, %3 yağsüz süt ve 50 mM benzamidin ile seyreltilen ve 2.2 mU/mL ila 69 mU/mL arasında bir FVIII konsantrasyon aralığını kapsayan 1/10 insan plazma çözeltisi kullanılarak hazırlanan PEG ile rekombinant FVIII'ün bir seyrelti serisi; 2) PBS, %3 yağsüz süt ve 50 mM benzamidin ile seyreltilen 1/10 insan plazma çözeltisi kullanılarak hazırlanan bir seyrelti serisi; veya 3) yaklaşık 2'lik bir PEGilasyon derecesi ile birlikte PBS, %3 yağsüz süt ve 50 mM benzamidin PEG ile rekombinant FVIII ile seyreltilen 1/10 insan plazma

çözeltisi kullanılarak hazırlanan bir test kontrolünün bir seyrelti serisi kullanılarak ve bir kromojenik yöntem ile ölçüldüğü üzere 2333 IU FVIII/mL değerinde bir FVIII:C aktivitesine sahip olmuştur ve 56.2 µg/mL bağlı-PEG/mL içermiştir. Numuneler plakaya yüklenmiştir ve 120 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C'de inkübe edilmiştir. Bu koşullar altında, PEG ile rekombinant FVIII, bir anti-PEG antikoru kullanılarak kendi PEG kısmı vasıtasıyla katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır. Ardından plaka Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkanmıştır. Sonrasında pH 7.4'te, 3.4 g/L imidazol, 5.85 g/L NaCl; 10 mg/mL HSA içeren bir FVIII seyrelti tamponununun 200 µL/kuyucuğu ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu dengeleme, 5 ila 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C arasında gerçekleştirilmiştir.

Yıkama Tamponu ile bir yıkama adından sonra, kuyucuklar boşaltılarak ve Immunokrom FVIII kiti (Technoclone, GmbH, Viyana, Avusturya) kullanılarak gerçekleştirilen standart kromojenik prosedürün ardından FVIII aktivitesi bir kromojenik tahlil ile ölçülmüştür. Kuyucuklar 20 µL FVIII seyrelti tamponu ile doldurulmuştur, ardından 20 µL tepken A ve tepken B ardışık olarak ilave edilmiştir. Numuneler 500 rpm'ye ayarlanan bir karıştırma cihazına koyulmuştur ve 15 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C'de inkübe edilmiştir. Ardından 100µL/kuyucuk substrat çözeltisi ilave edilmiştir ve 45 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C'de inkübe edilmiştir. Son olarak, reaksiyon 40 µL/kuyucuk %20 asetik asit eklenmesiyle durdurulmuştur. Optik yoğunluklar (OD'ler) 405 nm'de (referans dalga boyu 620 nm) bir ELISA okuyucusu içerisinde ölçülmektedir. Niceliksel değerlendirme, çift-logaritmik kalibrasyon eğrisine dayanmaktadır. Bireysel kalibrasyon eğrisi standartların kör numune-düzeltilmeli ortalama OD'leri kendi FVIII konsantrasyonları ile ilişkilendirilecektir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi, OD'leri kalibrasyon eğrisi tarafından kapsanan OD aralığındayken numunelerin FVIII konsantrasyonları ölçülmesi için kullanılmaktadır. Operatöre bağlı bir etkinin kontrol edilmesi için bu çalışmaya üç farklı analist katılmıştır.

Tablo 1, kalibrasyon eğrilerine ait orijinal verilerin ortalamaları (n=24) ve bunların özelliklerini vermektedir. Özellikle, 2.2 mU/mL ila 69 mU/mL arasında değilen FVIII konsantrasyonlarına sahip olan altı kalibrasyon eğrisi standardı D1 ila D6 ve ilgili kör numuneler için ölçülen ortalama kör numune düzeltilmeli OD'leri vermektedir. Bu doğrudan tahlil dışı okumaların dışında, kalibrasyon eğrisi özellikleri eğimi, y-kesme noktası ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları gösterilmektedir. Son olarak, bağlı toplam hata (RTE), eğri uydurmanın doğruluğu ve hassasiyetinin birleştirilmiş bir ölçütü

verilmektedir. RTE, her bir kalibrasyon eğrisi standard için ölçülen OD'lerin iyileştirilmesiyle hesaplanmıştır. Bu şekilde elde edilen konsantrasyonlar seyrelti faktörü ile çarpılmıştır ve son olarak ortalama iyileştirilmiş konsantrasyonun elde edilmesi için ortalaması alınmıştır. Böylelikle RTE, nominal konsantrasyon yüzdesi ($RTE = (|x_n - \bar{x}_m| + 2 \times SD) / \bar{x}_m \times 100$; \bar{x}_n ve \bar{x}_m sırasıyla nominal ve ölçülen ortalamayı temsil etmektedir ve SD, \bar{x}_m 'nin standart sapmasını temsil etmektedir) olarak ifade edilen, iyileştirilmiş ortalama konsantrasyonun tahlil standardı ve çift standart sapmasını ortalama iyileştirilmiş konsantrasyonu ve nominal konsantrasyon arasındaki mutlak farkın toplamıdır.

Tablo 1. PEG ile FVIII'nin MDAA'sına yönelik ortalama orijinal veriler ve kalibrasyon eğrisi özellikleri

Nitelik	D1	D2	D3	D4	D5	D6	Kör Numune	Eğim	Kesme noktası	r	RTE
Ortalama	1.984	1.051	0.540	0.270	0.130	0.065	0.176	0.9974	-1.528	0.9994	8.3
RSD	18.3	22.9	25.0	26.5	27.1	27.8	6.6	3.7	-8.3	n.a.	n.a.

n.a. uygulanamaz anlamına gelmektedir.

Bireysel doğrudan dolaş okumalar, yani kör numune düzeltmeli OD'ler, bireysel tahlil kalibrasyon standartları D1 ile D6 için ölçülen kör numune düzeltmeli OD'lere yönelik %18.3 ile %27.8 RSD'ler ile farklı tahliller arasındaki belirli, ancak kabul edilebilir olan değişkenliği göstermekteyken, kör numune, %6.6'lık düşük RSD'yi göstermektedir. Doğrudan dolaş okumadaki bu farklılıkların dengelenmesi için, kalibrasyon eğrisi her tek plaka üzerinde oluşturulmaktadır. Ortalama eğim ve ortalama y-kesme noktası için belirlenen düşük RSD'ler, tahlil standartları için ölçülen OD'lerdeki farklılıklara rağmen elde edilen kalibrasyon eğrilerinin şekil bakımından oldukça benzer olduğunu göstermektedir ve mutlak dolaş okumalar arasındaki farklılıkların dengelenmesi bakımından bu prosedürün etkili olduğunu doğrulamıştır. Dolayısıyla, kalibrasyon eğrilerinin ortalama eğrisi ve ortalama y-kesme noktası için %3.7 ve %8.3'lük RSD'ler bulunmuştur. Bu lineerlik, tüm bireysel değerler 0.9978'den az olmayacak şekilde ortalama korelasyon katsayısı $r = 0.9994$ tarafından gösterildiği üzere yeterliydi. Korelasyon katsayısı lineerlik ve doğruluk için aldatıcı bir ölçüt olduğundan dolayı ayrıca eğrilerin RTE'si de hesaplanmıştır. %8.3'lük ortalama RTE, kalibrasyon eğrilerinin doğruluğu ve lineerliği için bir belirteç olarak yüksek korelasyon katsayılarının doğrulamıştır. RTE'ye yönelik bireysel değerler %2.0 ile %17.6 aralığında değişmiştir. 24 RTE'nin yalnızca 1'inin %15'ten fazla olması ve 24 RTE'nin 16'sinin %10'dan az olması gerçeği, ayrıca, sinyal ve FVIII aktivitesi arasındaki ilişkinin açıklanması için seçilen çift algoritmik kalibrasyon modelinin uygunluğunu göstermiştir. İlaveten, yalnızca doz-yanıt ilişkisinin sahte-lineer kısmını birleştirse de kalibrasyon eğrisinin, altı bireysel nokta içerdiği göz önünde

bulundurulmalıdır. Bu tasarımı, seçilen kalibrasyon modelinden bağımsız olarak LBA'lara yönelik altkalibrasyon noktalarının minimum bir sayısına gerektiren biyoanalitik yöntem doğrulama üzerine olan EMA kılavuzu ile kalibrasyon eğrisini uyumlu hale getirmektedir. Dar bir aralığa sahip lineer bir değerlendirme modeli kullanılsa da, buradaki kalibrasyon eğrileri bu talep ile uyumludur. Şekil 3, 24 yürütme için elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisini göstermektedir. Ek, ilgili nominal konsantrasyonların bir yüzdesi olarak iyileştirilmiş tahlil kalibrasyon standartlarının uyumunu vermektedir. Biyoanalitik yöntem doğrulama üzerine olan mevcut kılavuz, iyileştirilmiş konsantrasyonların %75'inin \pm %20 aralığında olmasını gerektirmektedir.

10

Ortalama iyileştirilmiş konsantrasyonlar, altkalibrasyon eğrisi standardının tamamının %5'ten daha az farklılık göstermiştir. FVIII konsantrasyonuna bağlı olan bağılı hatalara yönelik bir trend mevcut değildi, bundan ziyade tüm kalibrasyon eğrisi aralık boyunca sabit bir dağılım mevcuttu. 2.2 mU/mL'lik en düşük FVIII konsantrasyonuna sahip olan standart D6 için belirlenen ortalama RE'nin, diğer tahlil standartları için belirlenenlerden farklı olmadığına dikkate değerdir. Bu açık bir şekilde, numunenin yalnızca bir seyreltisinin, kalibrasyon eğrisi tarafından kapsanan aralık dahilinde bir sinyal vereceği alt nicelik belirleme sınırına yakın olan PEG ile rekombinant FVIII konsantrasyonları ile numunelerin ölçümünü desteklemektedir. Bireysel RE'ler \pm %12 aralığında ve dolayısıyla doğrulama protokolünün kabul kriterleri ile uyumluydu.

15

Genel olarak, tüm veriler, PEG ile rekombinant FVIII'ün ölçümüne yönelik olarak MDAA için kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasını doğruluğunu, hassasiyet ve sağlamlığını doğrulamıştır.

25

Örnek 4

PEG ile FVIII'e yönelik MDAA'nın Özgüllüğü

Bu örnek, bir rekabet tahlili kullanılarak PEG ile FVIII'e yönelik MDAA'nın özgüllüğünün nasıl doğrulandığını göstermektedir.

Bir modifikasyon tanıma antikoru, Örnek 3'te açıklandığı üzere bir kat desteğe tutturulmuştur.

35

Numuneler bir katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır ve rekombinant PEGile FVIII numunelerinin 69 mU/mL'lik bir konsantrasyona seyreltilmesi ve 100 µg/mL ila 0.012 µg/mL (14 seyrelti) arasında değişen nihai PEG 5000 konsantrasyonlarında elde edilmesi için PEG 5000 ile 1+1 şekilde karıştırılmasında, FVIII aktivitesi, Örnek 3'te açıklandığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür.

Her bir rekabet numunesi tek yürütmede dört kez ölçülmüştür. Elde edilen ortalama sinyaller, bunun ardından, hesaplanan ilgili sinyallere rekabetçi içermeyen numunelerden elde edilenler ile tekrar ilişkilendirilmiştir. Şekil 4, bu yaklaşım ile elde edilen rekabet eğrisini göstermektedir ve ilaveten, IC₅₀'yi, yani yarım maksimal rekabet sağlayan PEG 5000 konsantrasyonunu ve Windows, GraphPad Software için GraphPad Prism versiyon 5.00 kullanılarak bu IC₅₀ için hesaplanan ilgili güven aralığı CI_{95%}'i vermektedir. Veriler, yakalama adımı özgülüğünü açık bir şekilde göstermektedir, zira PEG 5000 varlığında ölçülen sinyalin açık bir şekilde doza bağlı indirgemesi belirlenmiştir. Yarım maksimal rekabete, 2.4 µg/mL'lik bir PEG konsantrasyonu ile belirli tahlil koşullarında ulaşılmıştır.

Örnek 5

PEGile FVIII'e yönelik MDAA'nın Özgülüğü

Bu örnek, bir rekabet tahlili kullanılarak PEGile FVIII'e yönelik MDAA'nın özgülüğünü göstermektedir.

Bir modifikasyon tanıma antikoru, Örnek 3'te açıklandığı üzere bir katı desteğe tutturulmuştur.

Numuneler bir katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır ve 1) rekombinant PEGile FVIII numunelerinin 40 mU/mL'lik bir konsantrasyona seyreltilmesi ve 605 µg/mL ila 0.00007 µg/mL arasında değişen nihai konsantrasyonlarında elde edilmesi için PEG antikorları (PEG-B-47; Epitomics, Inc., Burlingame, CA) ile 1+1 şekilde karıştırılmasında, FVIII aktivitesi, Örnek 3'te açıklandığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür.

Her bir rekabet numunesi tek yürütmede iki kez ölçülmüştür. Elde edilen ortalama sinyaller, bunun ardından, hesaplanan ilgili sinyallere rekabetçi içermeyen numunelerden elde edilenler ile tekrar ilişkilendirilmiştir. Şekil 5, bu yaklaşım ile elde edilen rekabet eğrisini göstermektedir

ve ilaveten, IC_{50} 'yi, yani yarım maksimal rekabet sağlayan antikor konsantrasyonunu ve Windows, GraphPad Software için GraphPad Prism versiyon 5.00 kullanılarak bu IC_{50} için hesaplanan ilgili güven aralığı (%95) vermektedir. $R^2=0.9969$ tayininin katsayısının iyi olması ile karakterize edilen bir ortak rekabet eğrisi tarafında bulunmuştur. 0.095 µg/mL'lik bir anti-PEG konsantrasyonu, belirli tahlil koşullarında sinyalin yarım maksimal indirgemesine sebep olmuştur ve yakalama adımı seçimliliğini doğrulamıştır.

Örnek 6

10 Plazma içerisinde PEGile FVIII'e yönelik MDAA'nın Doğruluğu ve Hassasiyeti

Bu örnek, bir spayk-geri kazanım tahlili kullanılarak plazma içerisinde PEGile FVIII'e yönelik MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini göstermektedir.

15 Bir modifikasyon tanıma antikoru, Örnek 3'te açıklandığı üzere bir katı desteğe tutturulmuştur.

Numuneler bir katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır ve 1) numunelerin, 0.07 ila 2 U/mL arasında değişen beş konsantrasyonda PEGile rekombinant FVIII ile spayklanan normal insan plazması (NHP) içermesi; veya 2) numunelerin, piyasada mevcut olan sekiz FVIII eksikliği olan plazma numunesi içermesi ve 0.07 U/mL ve 0.5 U/mL'de PEGile rekombinant FVIII ile spayklanmadan önce ve sonra ölçülmesi dışında, FVIII aktivitesi, Örnek 3'te açıklandığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür. FVIII eksikliği olan sekiz plazma, George King Bio-Medical Inc. (Chelsea, MA): GK897-1966 (#1), GK892-2056 (#2), GK896-2031 (#3), Pool-1928 (#4), Pool-1930 (#5), GK893-1964 (#6), GK895-1959 (#7) ve GK894-1965 (#8)'den elde edilmiştir.

Yürütme içi (n=6) ve yürütmeler arasında hassasiyet (n=6), spayklanan plazma ve tampon numuneleri için belirlenirken, tahlilin doğruluğu, spayklanan miktarların geri kazanımını hesaplanmasyla belirlenmiştir. Son olarak, toplam hata, yürütmeler arasında hassasiyet ve doğruluğun toplamı olarak hesaplanmıştır. Mevcut EMA kılavuzu, bu toplam hatanın, tahlilin alt nicelik sınırında (LLOQ) %30 veya %40'ü aşmaması gerektiğini belirtmektedir. Tablo 2 yukarıda açıklanan verileri özetlemektedir.

Tablo 2. PEGile FVIII'e yönelik MDAA'nın hassasiyeti ve doğruluğu								
Nominal Konsantrasyon	Yürütmeler arası hassasiyet		Yürütme içi hassasiyet		Doğruluk		Toplam hata	
	NHP	Tampon	NHP	Tampon	NHP	Tampon	NHP	Tampon
0.07	9.3	13.2	n.d	n.d	91.5	101.4	17.7	14.7
0.25	10.0	6.5	n.d	n.d	95.4	99.3	14.6	7.1
0.5	7.2	5.6	5.1	3.7	95.0	105.8	12.2	11.4
1.0	8.4	6.5	n.d	n.d	96.9	103.2	11.6	9.7
2.0	7.8	7.1	n.d	n.d	99.6	107.2	8.2	14.2
n.d. gerçekleştirilmemiş anlamına gelmektedir.								

Yüksek kalitedeki veriler, normal insan plazmasında ve tampon matrisi içerisinde tahlilin hassasiyetinin ve doğruluğunun belirlenmesiyle elde edilmiştir. Ayrıca, PEGile rekombinant FVIII'e yönelik MDAA'nın toplam hatası tahlilin 0.07 U/mL'lik LLOQ'sunda bile açığı bir şekilde %20'den düşük olmuştur. Bu veriler, PEGile rekombinant FVIII'e yönelik MDAA'nın doğru ve hassas bir yöntem olduğunu, bir biyoanalitik yöntem olarak kullanılabileceğini uygun olduğunu belirlemektedir.

Tablo 3, FVIII eksikliği olan sekiz plazma numunesinde gerçekleştirilen spayk-geri kazan çalışmalarının sonuçlarını göstermektedir. Spayklanan PEGile rekombinant FVIII'ün geri kazanımı FVIII eksikliği olan plazma numunelerinde de iyiydi. Özellikle 0.07 U/mL ve 0.5 U/mL PEGile rekombinant FVIII/mL spayklandığında %91.3 ve %98.5'lik ortalama geri kazanımlar tespit edilmiştir. Şekil 6, 0.5 U/mL ile spayklanan, FVIII eksikliği olan sekiz plazma numunesinin dördüne yönelik temsili eğrileri göstermektedir. Spayklanan numunelerin eğrilerinin, tahlil standardının eğrilerine olan yüksek benzerliği aşikardır. Spayklanan numunelerin eğrileri için elde edilen eğimler, tahlil kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinden \pm %10'dan az oranda farklı olup, spayklanan FVIII eksikliği olan plazma numuneleri için elde edilen doz-yanıt eğrilerinin üstün lineerliğini göstermektedir.

Tablo 3. FVIII eksikliği olan plazma numunelerinde geri kazanım							
Lot No.	Öge	Spayk 1	Spayk 2	Lot No:	Öge	Spayk 1	Spayk 2
GK897-1966	#1	85.5	100.0	Havuz-1930	#5	92.8	110.2
GK892-2056	#2	98.6	95.9	GK893-1964	#6	87.0	93.9
GK896-2031	#3	89.9	93.9	GK895-1959	#7	97.1	95.9
Havuz-1928	#4	88.4	104.1	GK894-1965	#8	91.3	93.9

Örnek 7

PBS veya İnsan Plazmasında Polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA

- 5 Bu örnek, polisyalillenmiş FVIII'ya yönelik MDAA'nın, kan plazmasında varlığında veya bir tamponlu çözelti içerisinde uygulanabildiğini göstermektedir.

Bir katı desteğe, bir modifikasyon tanıma antikorunun tutturulması için, pH 9.5'te fare anti-polisyalik asit NCAM antikorları (MAB5324-klon 2-2B; Millipore, Inc.), 0.1 M NaHCO₃-Na₂CO₃'ün 1/400 seyreltisini içeren 100 µL/kuyucuk kaplama antikoru çözeltisi, gece boyunca 0 ± 10°C'de bir F96 Maxisorp plakasındaki kuyucuklarda inkübe edilmiştir. Ardından plakalar, PBS ve %0.05 Tween 20 içeren Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır. Plakalar kuyucuklardan, 60 ± 10 dakika boyunca 37 ± 5°C'de PBS ve 10 mg/mL insan serum albümin içeren Seyrelti Tamponununun 200 µL/kuyucuğunun inkübasyon ile bloke edilmiştir.

15 Bloke edilen kuyucuklar, bunun ardından, Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır.

Bir numunenin bir katı desteğe seçici şekilde bağlanması için, yandaki numunelerin 100 µL'si bir kuyucuğa ilave edilmiştir, 1) 10 mg/mL HSA içeren PBS kullanılarak hazırlanan polisyalillenmiş rekombinant FVIII standardının 1/40,000 ila 1/1,280,000'lik bir seyrelti serisi veya 2) 10 mg/mL HSA içeren PBS kullanılarak hazırlanan insan referans plazmasında 1/20 ila 1/320'lik bir seyrelti serisi. Polisyalillenmiş rekombinant FVIII, bir aktif aminooksi grubu içeren bir 20kDa polisyalik asit tepkeninin, FVIII'ün oksitlenmiş N-glikanlarla bağlanmasıyla hazırlanmıştır (bakınız 20110027350 ve 20110028693 numaralı U.S. Yayınları). Preparasyon, bir kromojenik yöntem ile ölçülen, 3110 IU FVIII/mL'nin bir FVIII:C aktivitesine sahip olmuştur ve yaklaşık 7 ila 8'lik bir polisyalilasyon derecesi ile sonuçlanan 483 µg/mL N-asetilnöraminik asit içermiştir. Numuneler plakaya yüklenmiştir ve 60 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C'de inkübe edilmiştir. Bu koşullar altında, Polisyalillenmiş rekombinant FVIII, bir anti-PSA antikoru kullanılarak kendi polisyalik asit (PSA) kimliğiyle katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır. Ardından plaka Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkanmıştır. Sonrasında pH 7.4'te, 3.4 g/L imidazol, 5.85 g/L NaCl; 10 mg/mL HSA içeren bir FVIII seyrelti tamponununun 200 µL/kuyucuğu ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu dengeleme, 3 dakika boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Yıkama Tamponu ile bir yıkama adından sonra, kuyucuklar boşaltılmış ve Immunokrom FVIII kiti (Technoclone, GmbH, Viyana, Avusturya) kullanılarak gerçekleştirilen standart kromojenik prosedürün ardından FVIII aktivitesi bir kromojenik tahlil ile ölçülmüştür. Kuyucuklar 20 µL FVIII seyrelti

tamponu ile doldurulmuştur, ardından 20 µL tepken A ve tepken B ardışık olarak ilave edilmiştir. Ardından plaka 5 dakika boyunca 37 ± 5°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında, önceden 10^{-5} substrat çözeltisi ilave edilmiştir (100 µL/kuyucuk) ve 15 dakika boyunca 37 ± 5°C'de inkübe edilmiştir. Nihai olarak, %20 asetik asit (40 µL/kuyucuk) eklenmesiyle reaksiyon durdurulmuştur. Sonrasında, plaka bir ELISA okuyucu ile 405 nm'de (referans dalgaboyu 620 nm) ölçülmüştür.

Şekil 7, 2.4 ila 78 mIU/mL olan bir FVIII aktivite aralığında, polisyalillenmiş FVIII preparasyonu için elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisini göstermektedir. Polisyalillenmiş FVIII'e yönelik konsantrasyon-yanıt eğrisi, logaritmik dönüştürmeden sonra tüm FVIII konsantrasyon aralığı boyunca iyi bir lineerlik sergilemiştir. Bu, korelasyon katsayısı = 0.9989 tarafından gösterilmiştir ve tüm aralık boyunca nominal olanlardan %12'den az olacak şekilde farklılık gösteren (aralık %89.8 ila %108.5; ortalama %100.2), kalibrasyon eğrisinin bireysel noktalar için hesaplanan, iyileştirilmiş konsantrasyonlar tarafından desteklenmiştir. Veriler ayrıca, MDAA'nın özgüllüğünü de doğrulamıştır, zira polisyalillenmiş FVIII için gerçekleştirildiği üzere benzer FVIII konsantrasyonlarında ölçüldüğünde, modifiye edilmemiş FVIII içeren insan plazmasında hiçbir yanıt sergilememiştir.

MDAA üzerinde insan plazmasında etkisi ayrıca, 1/200 önceden seyreltiliş olan, insan plazmasında seyreltilen polisyalillenmiş FVIII'e yönelik yanıt ölçülmesiyle araştırılmıştır. Tablo 4, tampon içinde ve insan plazmasında seyreltilen polisyalillenmiş FVIII için ölçülen, kör numune ile düzeltilen ortalama optik yoğunluklar (OD'ler) doğrudan karşılaştırılmaktadır. Bu ayrıca, aşağıda tampon içinde ve insan plazmasındaki iki seyrelti serisine yönelik iyileştirilmiş FVIII konsantrasyonları ve nominal konsantrasyonları bir yüzdesi olarak verilen, nominal FVIII konsantrasyonları ile uyum sağlamamaktadır.

		Tampon içerisindeki Polisyalillenmiş FVIII			Plazma içerisindeki Polisyalillenmiş FVIII		
Seyrelti	mIU/mL	OD	İyileştirilmiş (mIU/mL)	%nominal	OD	Dış okuma (mIU/mL)	%nominal
40,000	77.7	1.715	79.8	102.6	1.786	83.6	107.6
80,000	38.9	0.911	38.1	98.1	1.016	43.3	111.4
160,000	19.4	0.510	19.4	99.7	0.532	20.3	104.7
320,000	9.7	0.290	10.0	103.2	0.274	9.4	96.6
640,000	4.9	0.142	4.4	89.8	0.157	4.9	100.9
1,280,000	2.4	0.092	2.6	107.5	0.089	2.5	104.1

Eğim	0.8571	0.8762
%eğim	100.0	102.2

Polisyalillenmiş FVIII preparasyonu için elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri, %3'ten daha az farklılık gösteren eğimleri tarafından gösterildiği üzere, tampon ve insan plazması içerisinde oldukça benzerdi. İnsan plazmasında polisyalillenmiş FVIII aktivitesinin geri kazanım, tamponda olduğu kadar iyiydi. İnsan plazmasında seyreltilen polisyalillenmiş preparasyon için %96.6 ve 111.4 arasında ve tampon içerisinde aynı preparasyon için %100.2 olan bireysel değerler ile birlikte ortalama geri kazanım %104.2 idi. Bu veriler, 1/200 oranında seyreltildiğinde, polisyalillenmiş FVIII için modifikasyona bağlı aktivite tahlilinin insan plazmasında yeterli şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Plazma içerisinde bulunan, polisyalillenmiş olmayan FVIII, polisyalillenmiş FVIII için MDAA'nın mutlak özgüllüğünü gösteren sinyale katkıda bulunmamıştır.

Örnek 8

15 Farklı Hayvan Türlerine Ait Plazma İçerisindeki Polisyalillenmiş FVIII'e Yönelik MDAA

Bu örnek, polisyalillenmiş FVIII'ya yönelik MDAA'nın, kan plazmasında varlığında uygulanabildiğini göstermektedir.

20

Bir modifikasyon tanıma antikoru, Örnek 7'de açıklandığı üzere bir katı desteğe tutturulmuştur.

25

Numuneler seçici şekilde bir katı desteğe baplanmıştır ve 1) 10 mg/mL HSA ve 50 mM benzamidin içeren PBS ile 1/20,000 oranında seyreltim, ardından ayrıca farklı türlere ait, önceden 1/5 oranında seyreltilmiş plazma numunelerinin 1+1 oranında seyreltilmesi ve son olarak, doğrudan plaka üzerinde 1+1 seyreltim (plazmanın nihai konsantrasyonu 1/20'lik bir seyreltiye karşılık gelmiştir) vasıtasıyla rekombinant polisyalillenmiş FVIII'ün hazırlanması ve 2) preparasyonların şu türlere ait plazma ile seyreltilmesi dışında, FVIII aktivitesi Örnek 7'de açıklandığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür: Sığır, fare, FVIII eksikliği olan fare, sinomolgus maymunu ve insan referans plazması

30

Şekil 8, farklı plazma matrislerinde polisyalillenmiş FVIII için elde edilen konsantrasyon-yanıt

eğrilerini göstermektedir ve tamponda belirlenen eğriye göre bunların eğrilerini göstermektedir. Lineer konsantrasyon-yanı eğriler, araştırılan plazma numuneleri için elde edilmiştir. İlaveten, bu eğriler, tamponda elde edilen eğrilere oldukça paraleldi ve bunların eğimleri, tamponda belirlenen eğrinin eğimine kıyasla yalnızca marjinal şekilde, yani %4'ten daha az oranda farklılık gösterdi. Dolayısıyla bu veriler, araştırılan farklı türlere ait plazmanın, 1/20 oranında seyreltildiğinde, polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'ya müdahale etmediğini göstermiştir. Dahası bu veriler, seyrelti tamponu içerisinde MDAA kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve plazma numunelerinin ölçülmesi için bu seyrelti serilerinin kullanılmasını desteklemektedir.

10

Örnek 9

Polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın Performansı ve Duyarlılığı

15 Bu örnek, bir spayk geri kazanım tahlili kullanılarak polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın performansını ve duyarlılığını göstermektedir.

Bir modifikasyon tanıma antikorunu, Örnek 7'de açıklandığı üzere bir kat desteğe tutturulmuştur.

20

Numuneler seçici şekilde bir kat desteğe bağlanmıştır ve liyofilize polisyalillenmiş rekombinant FVIII'ün 250 IU/mL ile bir çözelti elde etmek için çözündürülmesi ve PBS, %0.05 Tween 20, 10 mg/mL HSA, ve 50 mM benzamidin içeren Seyrelti tamponu ile, 10, 5, 2.5, 1 ve 0.5 IU/mL'lik nominal FVIII konsantrasyonlarına seyreltilmesi, ayrıca ardından sıçan plazması ile 1/10 oranında seyreltilmesi, sonrasında tampon ile 1/10 oranında seyreltilmesi dışında, FVIII aktivitesi, Örnek 7'de açıklandığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür. Ardından bu numuneler ayrıca, doğrudan plaka üzerinde 1+1 oranında seyreltilerek, 1/20'lik bir konsantrasyona karşılık gelen bir nihai sıçan plazması konsantrasyonu elde edilmiştir. İlaveten, FVIII aktivitesi, substrat tepkenleri için 15 dakikalık bir inkübasyon süresi ve substrat çözeltisi için ise 45 dakikalık bir inkübasyon süresi kullanılarak kromojenik tahlilde ölçülmüştür.

Şekil 9, 1 ila 0.05 IU/mL aralığında olan polisyalillenmiş FVIII konsantrasyonları içeren bu numunelere yönelik konsantrasyon-yanı eğrilerini göstermektedir. Spayklanan sıçan plazması numunelerinin konsantrasyon-yanı eğrileri, üçten fazla veri noktası içerdiklerinde, tampon

35

5 içerisinde seyreltilen tahlil standardı için elde edilene paralel ve lineer olmuştur. Bu durumlarda, eğimler, yalnızca tampon içeren numune için belirlenen seyrelti serilerinininkine kıyasla %7'den az oranda farklılık göstermiştir. 0.05 IU/mL polisyalillenmiş FVIII ile spayklanan numune bile lineer bir konsantrasyon-yanıt eğrisi sergilemiştir. Bunun eğimi, 10 tampon numunesinininkine kıyasla yalnızca %13.5 oranında farklılık göstererek, MDAA'nın, sıçan plazmasında içerisinde, ayrıca varsayılan nicelik sınırına yakın olan, oldukça düşük polisyalillenmiş FVIII konsantrasyonlarında bile düzgün şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Spayklanan polisyalillenmiş FVIII'ün geri kazanımların nominal konsantrasyonların %100 ± 20 aralığında olmuştur. Bu veriler, polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın, 1/20 oranındaki bir minimal seyreltide, sıçan plazmasındaki numunelerinde kabul edilebilir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir.

Örnek 10

15 Polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın Doğruluğu ve Hassasiyeti

Bu örnek, polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini göstermektedir.

20 Bir modifikasyon tanıma antikoru, Örnek 7'de açıklandığı üzere bir katı desteğe tutturulmuştur.

Numuneler bir katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır ve FVIII aktivitesi, Örnek 9'da açıklandığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür.

25 Tablo 5, farklı günlerde oluşturulan, 16 kalibrasyon eğrisi için elde edilen orijinel verileri ve kalibrasyon eğrisi özelliklerini sunmaktadır. 1.6 ila 25 mIU/mL'lik polisyalillenmiş FVIII aktivitesi aralığını kapsayan, kalibratörler D1 ila D5'in kör numune düzeltmeli optik yoğunlukları (OD'ler), kör numune, eğim, y-kesme noktası, korelasyon katsayısı ve bağıntı toplam hata (RTE). RTE, $RTE = (|\bar{x}_N - \bar{x}_M| + 2SD) / \bar{x}_M \times 100$ 'e göre hesaplanmıştır. \bar{x}_N ve \bar{x}_M , sırasıyla nominal ve ölçülen ortalamayı temsil etmektedir ve SD ise, \bar{x}_M 'nin standart sapmasını temsil etmektedir. Ortalama \bar{x}_M 'nin elde edilmesi için, bireysel seyreltilerin ortalama OD'leri, eğri üzerinde iyileştirilmiştir, ilgili seyrelti ile çarpılarak normalize edilmiştir ve son olarak ortalaması alınmıştır.

35

Tablo 5. Kalibrasyon eğrisinin hassasiyeti										
Test No.	D1	D2	D3	D4	D5	Kör Numune	Eğim	Kesme noktası	r	RTE
AE-0501	0.488	0.256	0.135	0.067	0.029	0.137	1.0076	-1.699	0.9983	12.8
AE-0502	0.391	0.210	0.104	0.047	0.025	0.132	1.0145	-1.809	0.9993	8.5
AE-0503	0.386	0.212	0.110	0.048	0.024	0.129	1.0227	-1.814	0.9983	13.0
AE-0504	0.424	0.233	0.131	0.066	0.032	0.129	0.9272	-1.651	0.9988	10.9
AE-0491	0.480	0.270	0.146	0.074	0.039	0.139	0.9117	-1.579	0.9995	6.7
AE-0492	0.413	0.233	0.131	0.067	0.041	0.134	0.8460	-1.566	0.9992	8.7
AE-0493	0.448	0.228	0.127	0.064	0.034	0.134	0.9324	-1.654	0.9998	4.7
AE-0494	0.456	0.247	0.127	0.063	0.033	0.142	0.9604	-1.672	0.9998	4.9
AE-0521	0.403	0.221	0.125	0.069	0.036	0.142	0.8652	-1.602	0.9998	4.4
AE-0522	0.400	0.207	0.116	0.060	0.031	0.141	0.9221	-1.686	0.9997	5.4
AE-0523	0.427	0.237	0.129	0.062	0.038	0.140	0.8950	-1.616	0.9988	10.6
AE-0524	0.438	0.247	0.136	0.074	0.039	0.141	0.8727	-1.570	0.9998	4.1
AE-0531	0.488	0.283	0.161	0.087	0.049	0.143	0.8361	-1.471	0.9998	4.6
AE-0532	0.383	0.215	0.119	0.062	0.038	0.142	0.8468	-1.602	0.9991	9.1
AE-0533	0.454	0.252	0.138	0.071	0.039	0.144	0.8954	-1.586	0.9997	5.0
AE-0534	0.452	0.249	0.143	0.077	0.043	0.142	0.8521	-1.535	0.9999	3.2
Ortalama	0.433	0.237	0.130	0.066	0.035	0.138	0.9130	-1.632	0.9994	7.3
RSD	8.2	9.3	10.8	15.2	18.6	3.6	6.8	-5.6	n.a.	n.a.
n.a. uygulanamaz anlamına gelmektedir.										

Beş kalibratörün ortalama OD'leri, kendi konsantrasyonlarına ters orantılı olan, ancak ayrı ayrı en düşük FVIII konsantrasyonu için de %20'den yüksek olmayan, kabul edilebilir RSD'ler sergilemiştir. Kalibrasyon eğrileri, sırasıyla eğim ve y-kesme noktası için %6.8 ve %5.6'lık RSD'lere sahipti. İlave olarak, bunların lineerliği, korelasyon katsayıları 0.9983'ten yüksek olacak ve RTE'ler %13.0'dan düşük olacak şekilde, kabul edilebilecek kadar iyiydi.

Şekil 10, ortalama kalibrasyon eğrisini göstermektedir. Veriler, tahlillerin sağlamlığını sergilemiştir ve kalibrasyon eğrisinin, kabul edilebilir bir tekrarlanabilirlik ile oluşturulabildiğini göstermiştir. Bu eğrilerin doğruluğu, ayrıca, ölçülen OD'lerin iyileştirilmesi ve nominal değerler ile uyumunun hesaplanmasıyla kontrol edilmiştir. Şekil 11, iyileştirilen konsantrasyonların, tüm aralık üzerinden nominal olanların \pm % 10'luk bir aralıkta olduğunu sergileyen, bireysel eğrilerin beş kalibrasyonuna yönelik bu verileri göstermektedir.

15 Örnek 11

MDAA kullanılarak Bir Kan Numunesinden Polisyalillenmiş FVIII'nin Tespit Edilmesi

Bu örnek, bir MDAA kullanılarak bir kan proteininin in vivo tespiti göstermektedir.

5

Polisyalillenmiş rekombinant FVIII, Örnek 7'de açıkladığı üzere hazırlanmış Preparasyon, bir kromojenik yöntem ile ölçülen, 3110 IU FVIII/mL'lik bir FVIII:C aktivitesine sahip olmuştur ve yaklaşık 7 ila 8'lik bir polisyalilasyon derecesi ile sonuçlanan 483 µg/mL N-asetilnöraminik asit içermiştir. Polisyalillenmiş rekombinant FVIII, CD sıçanlar üzerinde uygulanmış ve uygulamadan önce ve 0.08 saat, 0.5 saat, 2 saat, 6 saat, 12 saat, 24 saat, 36 saat, ve 48 sa sonra alınan sitratlı sıçan plazması numunelerinin içerisinde, polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA ile FVIII aktivitesi izlenmiştir.

10

Bir modifikasyon tanıma antikoru, Örnek 7'de açıkladığı üzere bir kat desteğe

15

Numuneler bir kat desteğe seçici şekilde bağlanmış ve FVIII aktivitesi, Örnek 7'de açıkladığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür.

20

Şekil 12 elde edilen farmakokinetik profili göstermektedir. Veriler, polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın, endojen FVIII içeren bir hayvan modelinde polisyalillenmiş FVIII'ün farmakokinetik profilinin belirlenmesi için uygun olduğunu göstermiştir. Endojen, modifiye edilmemiş sıçan FVIII'e ait bir müdahale mevcut değildi ve polisyalillenmiş FVIII, oldukça yüksek duyarlılıkta ölçülebildi.

25

Örnek 12

Polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın Doğruluğu ve Hassasiyeti

30

Bu örnek, polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini göstermektedir.

Bir kat desteğe, bir modifikasyon tanıma antikorusunun tutturulması için, pH 9.5'te fare anti-polisyalik asit NCAM antikoru (MAB5324-klon 2-2B; Millipore, Inc.), 0.1 M NaHCO₃-Na₂CO₃'ün 1/1,000 seyreltisini içeren 100 µL/kuyucuk kaplama antikoru çözeltisi, gece

35

boyunca $0 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 'de bir F96 Maxisorp plakasındaki kuyucuklarda inkübe edilmiştir. Ardından plakalar, PBS ve %0.05 Tween 20 içeren Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır. Plakalar kuyucuklardından, 60 ± 10 dakika boyunca $37 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de PBS ve 10 mg/mL insan serum albümin içeren Seyrelti Tamponununun 200 μL /kuyucuğunun inkübasyon ile bloke edilmiştir.

5 Bloke edilen kuyucuklar Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır

Bir numunenin bir katı desteğe seçici şekilde bağlanması için, şu numunelerin 100 μL 'si bir kuyucuğa ilave edilmiştir, 1) PBS, %3 yağsız süt ve 50 mM benzamidin ile seyreltilen ve 1.1 mU/mL ila 34.2 mU/mL arası (1/6,000 ila 1/192,000'lik seyrelti faktörlerini temsil etmektedir) bir FVIII konsantrasyon aralığını kapsayan 1/10 insan plazma çözeltisi kullanılarak hazırlanan bir polisyalillenmiş rekombinant FVIII'ü kapsayan altı numunenin bir seyrelti serisi; 2) PBS, %3 yağsız süt ve 50 mM benzamidin ile seyreltilen 1/10 insan plazma çözeltisi kullanılarak hazırlanan insan plazmasındaki bir seyrelti serisi; veya 3) PBS, %3 yağsız süt ve 50 mM benzamidin Polisyalillenmiş rekombinant FVIII ile seyreltilen 1/10 insan plazma çözeltisi kullanılarak hazırlanan bir test kontrolünün bir seyrelti serisi, bir aktif amino asit grubu içeren bir 20kDa polisyalik asit tepkeninin, FVIII'ün oksitlenmiş N-glikanlarına bağlanmasıyla hazırlanmıştır. bakınız 20110027350 ve 20110028693 numaralı U.S. Yayınları. Preparasyon, bir kromojenik yöntem ile ölçülen, 3110 IU FVIII/mL'lik bir FVIII:C aktivitesine sahip olmuştur ve yaklaşık 7 ila 8'lik bir polisyalilasyon derecesi ile sonuçlanan 483 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N-asetilnöraminik asit içermiştir. Numuneler plakaya yüklenmiştir ve 120 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C 'de inkübe edilmiştir. Bu koşullar altında, Polisyalillenmiş rekombinant FVIII, bir anti-PSA antikoru kullanılarak kendi polisyalik asit (PSA) kimliği vasıtasıyla katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır. Ardından plaka Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkanmıştır. sonrasında pH 7.4'te, 3.4 g/L imidazol, 5.85 g/L NaCl; 10 mg/mL HSA içeren bir FVIII seyrelti tamponununun 200 μL /kuyucuğu ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu dengeleme, 5 ila 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C arasında gerçekleştirilmiştir.

Yıkama Tamponu ile bir yıkama adından sonra, kuyucuklar boşaltılır ve Immunokrom FVIII kiti (Technoclone, GmbH, Viyana, Avusturya) kullanılarak gerçekleştirilen standart kromojenik prosedürün ardından FVIII aktivitesi bir kromojenik tahlil ile ölçülmüştür. Kuyucuklar 20 μL FVIII seyrelti tamponu ile doldurulmuştur, ardından 20 μL tepken A ve tepken B ardışık şekilde eklenmiştir. Numuneler 500 rpm'ye ayarlanan bir karıştırma cihazına koyulmuştur ve 15 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C 'de inkübe edilmiştir. Ardından 100 μL /kuyucuk substrat çözeltisi ilave edilmiştir ve 45 dakika boyunca yaklaşık

18°C ila yaklaşık 26°C’de inkübe edilmiştir. Son olarak, reaksiyon 40 µL/kuyucuk %20 asetik asit eklenmesiyle durdurulmuştur. Optik yoğunluklar (OD’ler) 405 nm’de (referans dalga boyu 620 nm) bir ELISA okuyucusu içerisinde ölçülmektedir. Niceliksel değerlendirme, çift-logaritmik kalibrasyon eğrisine dayanmaktadır. Bireysel kalibrasyon eğrisi standartlar için kör numune-düzeltilmeli ortalama OD’leri kendi FVIII konsantrasyonları ile ilişkilendirilecektir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi, OD’leri kalibrasyon eğrisi tarafından kapsanan OD aralığındayken numunelerin FVIII konsantrasyonları ölçülmesi için kullanılmaktadır. Operatöre bağlı bir etkinin kontrol edilmesi için bu çalışmaya üç farklı analist katılmıştır.

10 Tablo 6, kalibrasyon eğrilerine ait orijinal verilerin ortalamaları (n=112) ve bunların özelliklerini göstermektedir. Özellikle, 34.2 ila 1.1 mU/mL arasında değişen FVIII konsantrasyonlarına sahip olan altı kalibrasyon eğrisi standardı D1 ila D6 ve ilgili kör numuneler için ölçülen ortalama kör numune düzeltilmeli OD’leri vermektedir. Bu doğrudan tahlil dışı okumaları dışında, kalibrasyon eğrisi özellikleri eğimi, y-kesme noktası ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları gösterilmektedir. Son olarak, bağlı toplam hata (RTE), eğri uydurmanın doğruluğu ve hassasiyetinin birleştirilmiş bir ölçütü verilmektedir. RTE, her bir kalibrasyon eğrisi standardı için ölçülen OD’lerin iyileştirilmesiyle hesaplanmıştır. Bu şekilde elde edilen konsantrasyon seyrelti faktörü ile çarpılmış ve son olarak ortalama iyileştirilmiş konsantrasyonun elde edilmesi için ortalaması alınmıştır.

15 Böylelikle RTE, nominal konsantrasyon yüzdesi olarak ifade edilen, iyileştirilmiş ortalama konsantrasyonun tahlil standardı ve çift standart sapması ile ortalama iyileştirilmiş konsantrasyonu ve nominal konsantrasyon arasındaki mutlak farkın toplamı olmuştur ($RTE = (|\bar{x}_n - \bar{x}_m| + 2 \times SD) / \bar{x}_m \times 100$; \bar{x}_n ve \bar{x}_m sırasıyla nominal ve ölçülen ortalamayı temsil etmektedir ve SD, \bar{x}_m ’nin standart sapmasını temsil etmektedir).

25

Tablo 6. Polisiyalillenmiş rekombinant FVIII’e yönelik MDAA’nın ortalama kalibrasyon eğrisi (n=112)											
Nitelik	D1	D2	D3	D4	D5	D6	Kör Numune	Eğim	Kesme noktası	r	RTE
Ortalama	1.348	0.758	0.400	0.203	0.097	0.049	0.127	0.9659	-1.329	0.9990	11.2
RSD	16.3	18.0	18.3	18.6	20.0	18.9	14.7	2.6	-6.7	n.a.	n.a.

n.a. uygulanamaz anlamına gelmektedir.

MDAA’nın doğrudan dışı okumaları kalibrasyon eğrisi standartları için kör numune düzeltilmeli OD’leri, 112 kalibrasyon eğrisinin ortalamasının RSD’si olarak ifade edilen, %20’den yüksek olmayan, kabul edilebilir bir değişkenlik göstermiştir. Bireysel kalibrasyon eğrisi standartları

5 için ölçülen RSD'ler, %16.3 ila %20.0 aralığında, yalnızca marjinal şekilde değişkenlik göstermiştir. Ayrıca, kör numune (%14.7) için belirlenen RSD, bu RSD'lerden açıkça farklı değildi. Bu veriler, tahlilin tüm prosedürü oda sıcaklığında gerçekleştirildiği için, doğrudan dışarıdaki alterasyonlardan sorumlu olan, oda sıcaklığındaki hafif değişimlere işaret etmektedir. Ancak, bu hafif alterasyonların, aşağıdaki veriler tarafından gösterildiği üzere tahlil performansını negatif şekilde etkilemesi beklenmemektedir. Bu veriler, fazlaca benzer olan kalibrasyon eğrileri ile sonuçlanmıştır. Bunların ortalama eğimi ve y-kesme noktası sırasıyla %2.6 ve %6.7 olan RSD'lere sahipti, ki bu da farklı operatörler tarafından farklı günlerde oluşturulan bu eğrilerin paralelliğini göstermektedir. Dahası bu eğriler, $r = 0.9990$ 'lık bir ortalama korelasyon katsayısıyla birlikte 0.9972 ila 1.0000 aralığında değişen korelasyon katsayıları tarafından gösterildiği üzere lineerdir. Korelasyon katsayısı lineerlik ve doğruluk için aldatıcı bir ölçüt olduğundan dolayı, ayrıca kalibrasyon eğrisinin performansını daha yeterli şekilde açıklayan, RTE de bir ölçüt olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, bireysel değerler %2.4 ila %19.7 arasında değişecek şekilde, %11.2'lik bir ortalama RTE belirlenmiştir. Daha yakından incelendiğinde, 112 RTE'den yalnızca 12'si %15'ten yüksek iken, RTE'lerden 41'inin %10'dan düşük olduğu görülmüştür. Uyumun kalitesine yönelik ilave bir test olarak ve seçilen kalibrasyon modelinin doğrulanması için, ayrıca iyileştirilmiş tahlil kalibrasyon eğrisi standartları, bunların nominal konsantrasyonları ile olan uyumlarında hesaplanmıştır. Tablo 7, elde edilen ortalama sonuçları ve aralıkları vermektedir.

20

Tablo 7. Polisiyalillenmiş rekombinant FVIII'e yönelik MDAA'nın kalibrasyon eğrilerine yönelik iyileştirilmiş konsantrasyonların uyumu

Nitelik	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Ortalama	93.4	102.8	105.9	104.6	97.2	96.9
RSD	2.1	2.0	2.1	2.8	3.2	3.1
Min	88.8	98.1	100.6	97.2	86.7	90.1
Maks	99.4	107.8	111.8	112.5	104.2	106.1

25 Tahlil kalibrasyon standartları, ortalama iyileştirilmiş konsantrasyonları ilgili nominal konsantrasyonlar ile iyi uyuma göstermiştir. En yüksek polisiyalillenmiş rekombinant FVIII konsantrasyonuna sahip tahlil standardı D1, nominal konsantrasyondan en yüksek sapmayı gösterirken, en düşük tahlil standardı D6 ise, tahlil standartları D3 ve D4'e kıyasla daha az farklılık göstermiştir. Bu ayrıca, düşük polisiyalillenmiş rekombinant FVIII konsantrasyonlarına sahip numunelerin doğru şekilde değerlendirilebildiğini göstermektedir. Ancak, tüm bireysel iyileştirilmiş konsantrasyonlar, iyileştirme sonrasında tahlil kalibrasyon standartları en az %70'i için $\pm\%20$ uyuma gerektiren güncel regülasyonlara uyan bir aralık dahilinde olmuştur.

Şekil 13, 24 yürütme için elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisini göstermektedir. Ek, ilgili nominal konsantrasyonların bir yüzdesi olarak iyileştirilmiş tahlil kalibrasyon standartlarının uyumunu vermektedir.

- 5 Genel olarak, tüm veriler, polisyalillenmiş rekombinant FVIII'ün ölçümüne yönelik olarak MDAA için kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasının doğruluğunu, hassasiyet ve sağlamlığını doğrulamıştır.

Örnek 13

10

Polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın Özgüllüğü

Bu örnek, bir rekabet tahlili kullanılarak polisyalillenmiş FVIII'e yönelik bir MDAA'nın özgüllüğünü göstermektedir.

15

Bir modifikasyon tanıma antikoruna, Örnek 12'de açıkladığı üzere bir katı desteğe tutturulmuştur.

20 Numuneler bir katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır ve 1) rekombinant PEGile FVIII numunelerinin 68.4 mU/mL'lik bir konsantrasyona seyreltilmesi ve ardından, 0.06 µg/mL ile 1,000 µg/mL arasında değişen nihai konsantrasyonların elde edilmesi için 20 kDa polisyalik asit (Lipoxen, İngiltere) ile 1+1 şekilde karıştırılmasında, FVIII aktivitesi, Örnek 12'de açıkladığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür.

25 Her bir rekabet numunesi tek yürütmede iki kez ölçülmüştür. Elde edilen ortalama sinyaller, bunun ardından, hesaplanan ilgili sinyallere rekabetçi içermeyen numunelerden elde edilenler ile tekrar ilişkilendirilmiştir. Şekil 14, bu yaklaşım ile elde edilen rekabet eğrisini göstermektedir ve ilaveten, IC₅₀'yi, yani yarımaksimal rekabet sağlayan polisyalik asit konsantrasyonunu ve Windows, GraphPad Software için GraphPad Prism versiyon 5.00 kullanılarak bu IC₅₀ için hesaplanan ilgili güven aralığı (CI)₉₅'i vermektedir. Elde edilen veriler, yakalama adının özgüllüğünü açık bir şekilde doğrulamıştır zira polisyalik asit varlığında ölçülen sinyalin açık bir şekilde doza bağlı olarak indirilmesi belirlenmiştir. Yarımaksimal rekabete, 60.5 µg/mL'lik bir polisyalik asit konsantrasyonu ile belirli tahlil koşullarında ulaşılmıştır.

Örnek 14

35

Polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın Hassasiyeti

Bu örnek, polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın hassasiyetini göstermektedir.

5

Bir modifikasyon tanıma antikoru, Örnek 12'de açıklandığı üzere bir katı desteğe tutturulmuştur.

10 Numuneler bir katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır ve 1) 1:5,000'lik seyreltide başlayarak rekombinant PEGile FVIII'ün altı seri 1+1 seyreltisinin hazırlanmasında, FVIII aktivitesi, Örnek 12'de açıklandığı üzere kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür.

15 Sonuçlar, yalnızca, kalibrasyon eğrisi tarafından kapsanan aralıktaki olan ve bu amaçla en az üç seyrelti kullanılan ortalama OD'leri değerlendirilmektedir. Ancak çoğu durumda, ortalama, açığa %15'ten düşük olan RSD'ler ile sonuçlanan seyrelti serilerine ait beş bireysel seyrelti için hesaplanmıştır. Bu, tahlil kontrolüne ait seyrelti serilerinin, tahlil kalibratörününkiler ile paralel olduğunu ve ayrıca yüksek, orta ve düşük analit konsantrasyonlarına sahip çeşitli kontrol numunelerinin ölçülmesine dair gereklilikleri karşıladığını doğrulamıştır. Sonuçlar, polisyalillenmiş rekombinant FVIII'ün toplamda 113 kez ölçülmesi ile sonuçlanan, iki operatör tarafından gerçekleştirilen 39 yürütmeyi temsil etmektedir. 180 ± 11.2 U/mL'lik bir ortalama konsantrasyon, tahlilin yürütmeler arasındaki hassasiyetini açıklayan %6.2'lik bir RSD'ye dönüşmüştür. Yürütme başına iki ila dört ölçüm için belirlenen ortalama yürütmeler arasındaki hassasiyet, değerler %0.3 ila %7.4 arasında değişecek şekilde %3.8 olmuştur. Şekil 15 bu verileri göstermektedir ve verilerin sıkı dağılımını göstermektedir.

25

Polisyalillenmiş rekombinant FVIII'e yönelik MDAA'nın hassasiyeti; bu yöntemin, bir ligand bağlama tahlilinin prensipleri ile bir aktivite tahlilinin prensiplerini birleştirmesi bakımından oldukça üstündü. Dolayısıyla, görece yüksek numune seyreltiler, yani 1/5,000'lik bir seyreltide başlayan seyrelti serileri, seçici yakalama için gereklidir. Aşağıdaki kromojenik aktivite tahlili, çeşitli tepken aktarımları ve inkübasyon adımlarını içermektedir. Genel prosedürün karmaşıklığına rağmen, yürütmeler arasındaki hassasiyeti açıklayan RSD düşüktü. 39 yürütmenin ortalaması %6.2'lik bir RSD'ye sahipti.

30

Örnek 15

35

Plazma İçerisinde Polisiyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın Doğruluğu ve Hassasiyeti

Bu örnek, bir spayk-geri kazanım tahlili kullanılarak plazma içerisinde polisiyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın doğruluğunu ve hassasiyetini göstermektedir.

Bir modifikasyon tanıma antikor, Örnek 12'de açıklandığı üzere bir katı desteğe tutturulmuştur.

Numuneler bir katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır ve numunelerin, FVIII eksikliği olan farelerden (E17), sıçanlardan ve sinomolgus maymunlarından plazma içermesi ve 0.05 U/mL ila 15 U/mL arasında değişen beş konsantrasyonda polisiyalillenmiş rekombinant FVIII ile spayklamadan önce ve sonra ölçülmesi dışında, FVIII aktivitesi, Şekil 12'de açıklanan kromojenik tahlil kullanılarak ölçülmüştür.

Yürütme içi hassasiyet (n=6; polisiyalillenmiş rekombinant FVIII konsantrasyonu 0.05, 0.5 ve 15 U/mL için belirlenmişti) ve yürütmeler arası hassasiyet (n=6; 0.05, 0.25, 0.5, 1 ve 15 U/mL için belirlenmiştir), spayklanan plazma numuneleri için belirlenirken, tahlilin doğruluğu, spayklanan miktarların gerikazanım hesaplanmasıyla belirlenmiştir. Son olarak, toplam hata, yürütmeler arası hassasiyet ve doğruluğun toplamı olarak hesaplanmıştır. Mevcut EMA kılavuzu, bu toplam hatanın, tahlilin alt nicelik sınırında (LLOQ) %30 veya %40'ü aşmaması gerektiğini belirtmektedir. Tablo 8, spayklanan hayvan plazması ve tampon numuneleri için elde edilen, ilgili ortalamaların RSD'leri olarak ifade edilen hassasiyet verilerini özetlemektedir.

25

Nominal (U/mL)	Yürütmeler arası hassasiyet (n=6)				Yürütme içi hassasiyet (n=6)			
	Sıçan	E17	Maymun	Tampon	Sıçan	E17	Maymun	Tampon
0.05	5.4	9.7	13.8	5.7	5.7	6.1	6.0	3.2
0.25	4.1	7.0	4.1	4.7	n.d	n.d	n.d	n.d
0.5	5.3	6.7	3.8	2.7	6.3	3.5	2.8	3.0
1	5.5	5.4	2.8	3.6	n.d	n.d	n.d	n.d
15	3.9	4.9	2.9	4.5	3.4	1.0	3.2	2.7
Ortalama	4.8	6.7	5.5	4.3	5.1	3.5	4.0	3.0

n.d. gerçekleştirilmemiş anlamına gelmektedir.

Bir numune dışında tüm numuneler için %10'dan daha az RSD bulduk. %13.8'lik bir RSD'nin belirlendiği bu belirli maymun plazması numunesi, 0.05 U/ml ile spayklanmış olup, bu tahlilin alt nicelik sınırlarını temsil etmektedir. Araştırılan aralık üzerinden yürütmeler arası ve yürütme için hassasiyeti açıklayan ortalama RSD'ler, gerçek konsantrasyondan ve spayk için kullanılan ilgili hayvan plazmasından büyük oranda bağlanmıştır. Dolayısıyla, örneğin farmakokinetik parametrelerin belirlenmesi için gerektiği üzere hayvan plazması numunelerindeki polisialillenmiş rekombinant FVIII'ün ölçümü için uygun olan oldukça hassas bir biyoanalitik yöntem olarak, bu hassasiyet profili, polisialillenmiş rekombinant FVIII'e yönelik MDAA'ya nitelik kazandırmaktadır. Tablo 9, 0.05 U/mL'lik alt nicelik sınırlardaki bireysel polisialillenmiş rekombinant FVIII konsantrasyonları ve 0.25 U/mL ile 15 U/mL aralığında olan polisialillenmiş rekombinant FVIII konsantrasyonları için hesaplanan toplam hata, ve tahlilin doğruluğunun bir ölçütü olarak belirlenen geri kazanımlarını sunmaktadır.

Nominal (U/mL)	Doğruluk (%Geri Kazanım)			Nominal (U/mL)	Toplam hata		
	Sığan	E17	Maymun		Sığan	E17	Maymun
0.05	98.3	98.0	99.0	0.05	7.1	11.7	14.8
0.25	95.3	96.0	101.3	0.25-15	8.9	11.0	5.8
0.5	95.0	97.0	100.0	n.d	n.d	n.d	n.d
1	97.4	93.2	99.5	n.d	n.d	n.d	n.d
15	96.2	96.6	98.0	n.d	n.d	n.d	n.d
Ortalama	96.0	95.7	99.7	n.d	n.d	n.d	n.d
n.d. gerçekleştirilmemiş anlamına gelmektedir.							

Spayklanan polisialillenmiş rekombinant FVIII'ün geri kazanımı burada test edilen tüm hayvan plazması numunelerinde, spayklanan 0.05 U/mL'lik en düşük konsantrasyonda bile oldukça üstünde. Ayrıca, araştırılan durumlardan hiç birinde toplam hata %15'ten yüksek değildi. Biyoanalitik tahlil doğrulamasına yönelik EMA kılavuzu gerekliliklerini karşılayan bu veriler, laboratuvar hayvanları plazmasındaki polisialillenmiş rekombinant FVIII'ün ölçümü için kullanılmak üzere, polisialillenmiş rekombinant FVIII'e yönelik MDAA'ya açık şekilde nitelik kazandırmaktadır. Son olarak Şekil 16, 1/20 oranında seyreltilen ve polisialillenmiş rekombinant FVIII (0.068 U/mL) ile spayklanan, üç hayvan plazması numunesinin tamamına yönelik doz-yanıt eğrilerini göstermektedir. Ayrıca tahlilin alt nicelik sınırlarını belirleyen 1/20 değerindeki bu minimum seyrelti tanımlanmıştır zira bu veriler, tespit edilebilen ciddi bir etkinin olmadığını göstermiştir.

1/20 oranında seyreltilen hayvan plazmasında elde edilen doz yanıt eğrilerinin lineerliği, yalnızca tamponun içerisindeki tahlil standardı ile ilgili seyrelti serileri için belirlenen lineerlik kadar iydi. Daha düşük ölçümler oldukça benzerdi ve spayklanan E17 ve sıçan plazmasındaki humesi için %2'den az ve spayklanan maymun plazmasındaki humesi için ise %9'dan az oranda farklılık gösterdi.

Örnek 16

10 PEG ile FIX'e yönelik MDAA

Bu örnek, PEG ile FIX'e yönelik MDAA'yı göstermektedir.

Bir katı desteğe, bir modifikasyon tanıma antikorunun tutturulması için, pH 9.5'te 4 µg/mL tavşan anti-PEG antikorları (B47-2061-1; Epitomics, Inc., Burlingame, CA), 0.1 M NaHCO₃-Na₂CO₃ içeren 100 µL/kuyucuk kaplama antikor çözeltisi, gece boyunca 0 ± 10°C'de bir F96 Maxisorp plakasındaki kuyucuklarda inkübe edilmiştir. Ardından plakalar, PBS ve %0.05 Tween 20 içeren Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır. Plakalarındaki kuyucuklardan, 60 ± 10 dakika boyunca 18°C ila 26°C'de PBS, %3 yağsız süt ve 50 mM benzamidin içeren Blokaj Tamponununun 200 µL/kuyucuğunun inkübasyonu ile bloke edilmiştir. Bloke edilen kuyucuklar Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır.

Bir numunenin bir katı desteğe seçici şekilde bağlanması için, yandaki numunelerin 100 µL'si bir kuyucuğa ilave edilmiştir, 1) 10 mg/mL HAS içeren PBS kullanılarak hazırlanan ve 45.5 mU/mL ila 0.28 mU/mL 1 aralıkta bir FIX konsantrasyon aralığını kapsayan PEG ile rekombinant FIX standardı bir seyrelti serisi veya 2) 10 mg/mL HSA içeren PBS kullanılarak hazırlanan ve 350 mU/mL ila 25,000 mU/mL aralıkta bir FIX konsantrasyon aralığını kapsayan, modifiye edilmemiş rekombinant FIX'in bir seyrelti serisi. Yaklaşık 1 değerinde bir PEGilasyon derecesine sahip PEG ile rekombinant FIX kullanılmıştır. Numuneler plakaya yüklenmiştir ve 60 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C'de inkübe edilmiştir. Bu koşullar altında, PEG ile rekombinant FIX, bir anti-PEG antikorunu kullanarak kendi PEG kimyasıyla katı desteğe seçici şekilde bağlanmıştır. Ardından plaka Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkanmıştır. Sonrasında pH 7.4'te, 3.4 g/L imidazol, 5.85 g/L NaCl; 10 mg/mL HSA içeren bir FIX seyrelti tamponununun 200 µL/kuyucuğu ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu dengeleme, 3 dakika boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Yıkama Tamponu ile bir yıkama

adından sonra, kuyucuklar boşaltıldı ve imalatçı (HYPHEN Biomed, Viyana, Avusturya) talimatları doğrultusunda bir FIX kromojenik tahlili ile FIX aktivitesi ölçülmüştür.

Şekil 17, PEG ile FIX ve modifiye edilmemiş FIX için elde edilen verileri göstermektedir. PEG ile FIX, 5.7 ila 0.28 mU FIX/mL aralığındaki bir lineer sinyal ile konsantrasyon ilişkisi ile birlikte, net bir konsantrasyona bağlı sinyal sergilemiştir. Bunun aksine, PEG ile olmayan FIX, 1000 kat daha yüksek konsantrasyonlarda bile ciddi hiçbir sinyal sergilememiştir.

Örnek 17

10

PEG ile FVIII'e yönelik MDAA'nın Koagülasyon Tahlili Formatı

Bu örnek, PEG ile rekombinant FVIII'ya yönelik MDAA'nın bir koagülasyon tahlili formatında da uygulanabildiğini göstermektedir.

15

Bir modifikasyon tanıyan antikorun bir katı desteğe tutturulması için, MaxiSorp Star tüpleri (Nunc), 18 saat boyunca $0 \pm 10^\circ\text{C}$ 'de, afinitesi saflaştırılmış tavşan anti-PEG antikorunun (#A151) 20 $\mu\text{g/mL}$ 'sini ve PBS içeren bir kaplama antikoru çözeltisinin 0.5 mL'si inkübe edilmiştir. Ardından tüpler, PBS ve %0.05 Tween 20 içeren Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır. Plakalar kuyucukları ardından, 60 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C 'de PBS, %3 yağsız süt ve 50 mM benzamidin içeren Blokaj Tamponununun 1 μL 'sinin inkübasyonu ile bloke edilmiştir. Bloke edilen kuyucuklar Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır.

20

Bir numunenin bir katı desteğe seçici şekilde bağlanması için, 1) 0.04 mU/mL ila 4 mU/mL arası bir FVIII konsantrasyonu aralığı kapsayan bir PEG ile rekombinant FVIII standardı içeren beş numunenin bir seyrelti serisi'nin 0.5 mL'si; ve 2) 0.04 mU/mL ila 4 mU/mL arası bir FVIII konsantrasyon aralığı kapsayan bir Advat rekombinant FVIII standardı içeren beş numunenin bir seyrelti serisi. Seyrelti tamponu bir kör numune olarak işlev görmüştür. Numuneler tüpe yüklenmiştir ve 60 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C 'de inkübe edilmiştir. Ardından plaka Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkanıldı sonrasında pH 7.4'te, 3.4 g/L imidazol, 5.85 g/L NaCl; 10 mg/mL HSA içeren bir FVIII seyrelti tamponunun 0.5 μL 'si ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu dengeleme, 5 ila 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ila yaklaşık 26°C arasında gerçekleştirilmiştir. Ardından tüpler boşaltıldı ve 200 μL FVIII seyrelti tamponu ve 100 μL FVIII eksikliği olan plazma (#481C00D, Technoclone, GmbH, Viyana, Avusturya) ilave edilmesiyle bir pıhtılaşma tahlili gerçekleştirilmiştir.

30

35

Koagülasyonun başlatılması için 100 µL 25-mM CaCl₂ eklemeyen önce karışımı 3 dakika boyunca 37 ± 5°C'de inkübe edilmiştir. Tüpler 37 ± 5°C'de bir su banyosunda tutulmuştur ve pıhtı oluşumu için görsel olarak kontrol edilmiştir.

- 5 Şekil 18 elde edilen sonuçları göstermektedir. Pıhtılaşma yalnızca, PEG ile rekombinant FVIII içeren tüplerde meydana gelirken, Advat rekombinant FVIII içeren tüpler, 80 dakika boyunca hiçbir pıhtı oluşumu belirtisi göstermemiştir. Daha uzun pıhtılaşma süresi ve PEG ile rekombinant FVIII'ün konsantrasyonu arasında bir ilişki mevcuttu. Bu veriler, kromojenik aktivite ölçümünden farklı olan bir tekniğin, bir MDAA için kullanılabildiğini göstermektedir.

10

Örnek 18

Polisyalillenmiş FVIII'e yönelik MDAA'nın Koagülasyon Tahlili Formatı

- 15 Bu örnek, polisyalillenmiş rekombinant FVIII'ya yönelik MDAA'nın, bir koagülasyon tahlili formatında da uygulanabildiğini göstermektedir.

Bir modifikasyon tanıyan antikorun bir katı desteğe tutturulması için, MaxiSorp Star tüpleri (Nunc), 18 saat boyunca 0 ± 10°C'de, bir fare anti-PSA NCAM antikorunun (MAB5324) 20 µg/mL'sini ve PBS içeren bir kaplama antikor çözeltisinin 0.5 mL'si inkübe edilmiştir. Ardından tüpler, PBS ve %0.05 Tween 20 içeren Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır. Plakaların kuyucuklarından, 60 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ile yaklaşık 26°C'de PBS, %3 yağsız süt ve 50 mM benzamidin içeren Blokaj Tamponununun 1 mL'sinin inkübasyonu ile bloke edilmiştir. Bloke edilen kuyucuklar Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır.

25

Bir numunenin bir katı desteğe seçici şekilde bağlanması için, 1) 0.04 mU/mL ile 4 mU/mL arasında bir FVIII konsantrasyonu aralığını kapsayan bir polisyalillenmiş rekombinant FVIII standardı içeren beş numunenin bir seyrelti serisi'nin 0.5 mL'si; ve 2) 0.04 mU/mL ile 4 mU/mL arasında bir FVIII konsantrasyon aralığını kapsayan bir Advat rekombinant FVIII standardı içeren beş numunenin bir seyrelti serisi. Seyrelti tamponu bir kör numune olarak işlev görmüştür. Numuneler tüpe yüklenmiştir ve 60 ± 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ile yaklaşık 26°C'de inkübe edilmiştir. Ardından plaka Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkanmıştır. Sonrasında pH 7.4'te, 3.4 g/L imidazol, 5.85 g/L NaCl; 10 mg/mL HSA içeren bir FVIII seyrelti tamponununun 0.5 mL'si ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu dengeleme, 5 ile 10 dakika boyunca yaklaşık 18°C ile yaklaşık 26°C arasında gerçekleştirilmiştir. Ardından tüpler

35

boşaltılmıştır ve 200 µL FVIII seyrelti tamponu ve 100 µL FVIII eksikliği olan plazmanın (#481C00D, Technoclone, GmbH, Viyana, Avusturya) ilave edilmesiyle bir polimerleşme tahlili gerçekleştirilmiştir. Koagülasyonun başlatılması için 100 µL 25 mM CaCl₂ ekleden önce karışım 3 dakika boyunca 37 ± 5°C'de inkübe edilmiştir. Tüpler 37 ± 5°C'de bir su banyosunda tutulmuştur ve polimerleşümü için görsel olarak kontrol edilmiştir.

Şekil 19, elde edilen sonuçları göstermektedir. Polimerleşme yalnızca, polisyalillenmiş rekombinant FVIII içeren tüplerde meydana gelirken, Advat içeren tüpler, 80 dakika boyunca hiçbir polimerleşümü belirtisi göstermemiştir. Daha kısa polimerleşme süresi ve polisyalillenmiş rFVIII'ün konsantrasyonu arasında bir ilişki mevcuttu. Bu veriler, kromojenik aktivite ölçümünden farklı olan bir tekniğin, bir MDAA için kullanılabildiğini göstermektedir.

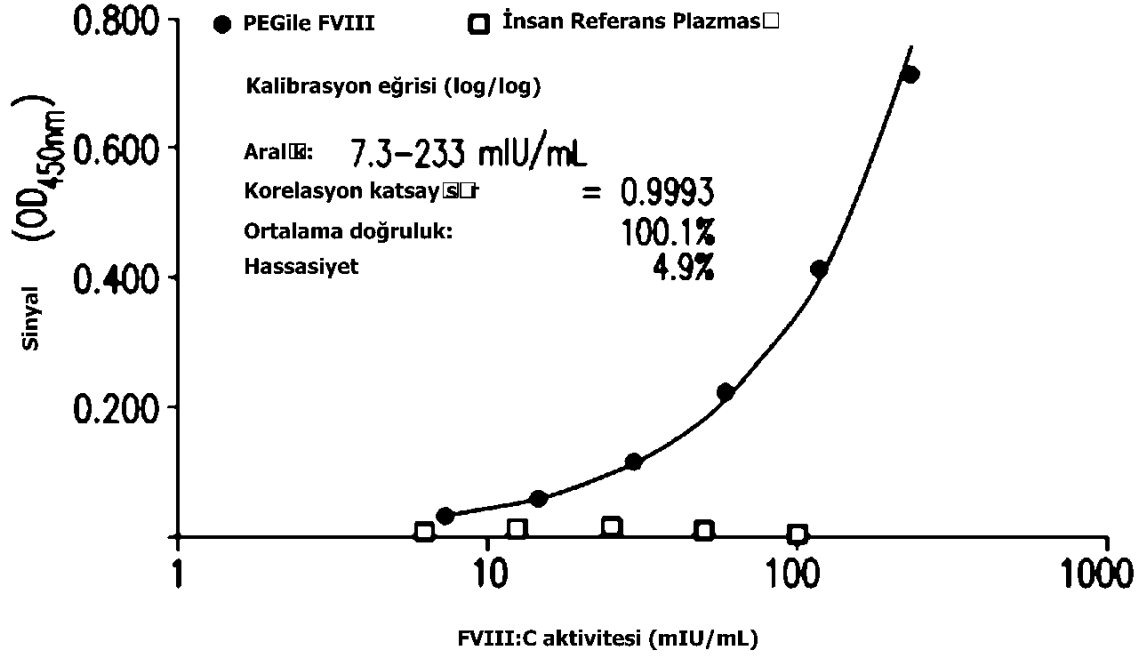
Aksi belirtilmedikçe, mevcut tarifnamede ve istemlerde kullanılan, bir özellik, öge, miktar, parametre, nitelik, terim ve benzerini ifade eden tüm sayısal, tüm durumlarda "yaklaşık" terimi ile modifiye edildiği anlaşılmalıdır. Burada kullanılan üzere, "yaklaşık" terimi, bu şekilde nitelendirilen özellik, öge, miktar, parametre, nitelik veya terimin, belirtilen özellik, öge, miktar, parametre, nitelik ve terimin değerinin artı veya eksi yüzde on üzerini veya altını kapsadığı anlamına gelmektedir. Bu bağlamda, aksi belirtilmedikçe, tarifnamede ve ekli istemlerde öne sürülen sayısal parametreler, değişkenlik gösterebilen tahminlerdir. Son olarak, ancak istemlerin kapsamına eşdeğerlikle doktrininin uygulanmasına bir sınır getirmeksizin, her bir sayısal gösterim, en azından, belirtilen anlamlı aralıkların sayısal aralığında ve sınırdan yuvarlama teknikleri uygulanarak anlaşılmalıdır. Buluşun geniş kapsamına ortaya çıkan sayısal aralıklar ve değerler yaklaşık değerleri olmasına rağmen, belirli örneklerde öne sürülen sayısal aralıklar ve değerler, mümkün olduğunca kesin şekilde belirtilmektedir. Ancak herhangi bir sayısal aralık veya değer, ilgili test ölçümlerinde bulunan standart sapmadan kaynaklanan belirli hatalar içerebilmektedir. Buradaki değerlerin sayısal aralıklarının belirtilmesinin, aralık dahilinde olan her bir ayrı sayısal değere bireysel olarak referans vermenin bir kısa yöntemi olarak işlev sağlaması amaçlanmaktadır. Aksi belirtilmedikçe, sayısal bir aralığın bireysel her değeri, burada bireysel olarak belirtilmişçesine mevcut tarifnameye dahil edilmektedir.

Burada kullanılan üzere, mevcut buluşun açıklanması bağlamında özellikle istemlerin bağlamında dahilinde kullanılan "bir" terimi ve benzer terimlerin, aksi burada belirtilmediği sürece veya bağlam ile açıkça çelişmediği sürece, hem tekil hem de çoğul anlamları kapsadığı anlaşılmalıdır. Burada açıklanan tüm yöntemler, burada aksi belirtilmedikçe veya bağlam ile

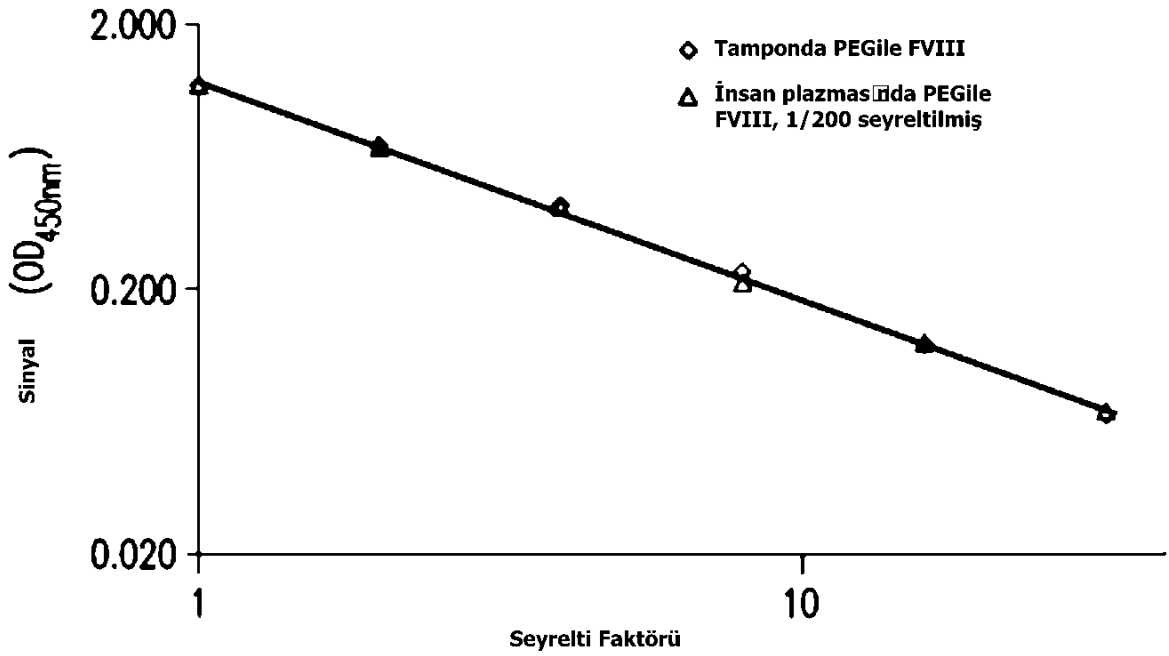
açıkça çelişmediği sürece uygun olan herhangi bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Örneklerin tamamını veya herhangi birinin kullanılması veya burada sağlanan örnekleyici dilin (örneğin "gibi"), yalnızca, mevcut buluşu daha iyi tasvir etmesi ve aksi belirtilmedikçe buluşun kapsamını sınırlandırmaması amaçlanmaktadır. Mevcut tarifnamedeki hiçbir ifadenin, buluşun uygulanması için gerekli olan, talep edilmeyen hiçbir elemana işaret etmediği anlaşılmalıdır.

Burada açıklanan belirli yapılandırmalar, oluşmak veya esasen oluşmak terimleri kullanılarak istemlerde ilaveten sınırlandırılmaktadır. İstemlerde kullanıldığında, değişiklik başına kayda geçirilmiş veya eklenmiş olsa da, "oluşmak" terimi, istemlerde belirtilmeyen herhangi bir eleman, madde veya içerik maddesini dışarıda bırakmaktadır. "Esasen oluşmak" terimi, bir istemin kapsamı belirtilen malzemeler veya adlarla ve temel ve yeni özellikleri somut olarak etkilemeyenlerle sınırlandırılmaktadır. İstemlerde belirtilen mevcut buluşun yapılandırmaları burada kendiliğinden veya açık bir şekilde tanımlanmaktadır ve olanaklı kılınmaktadır.

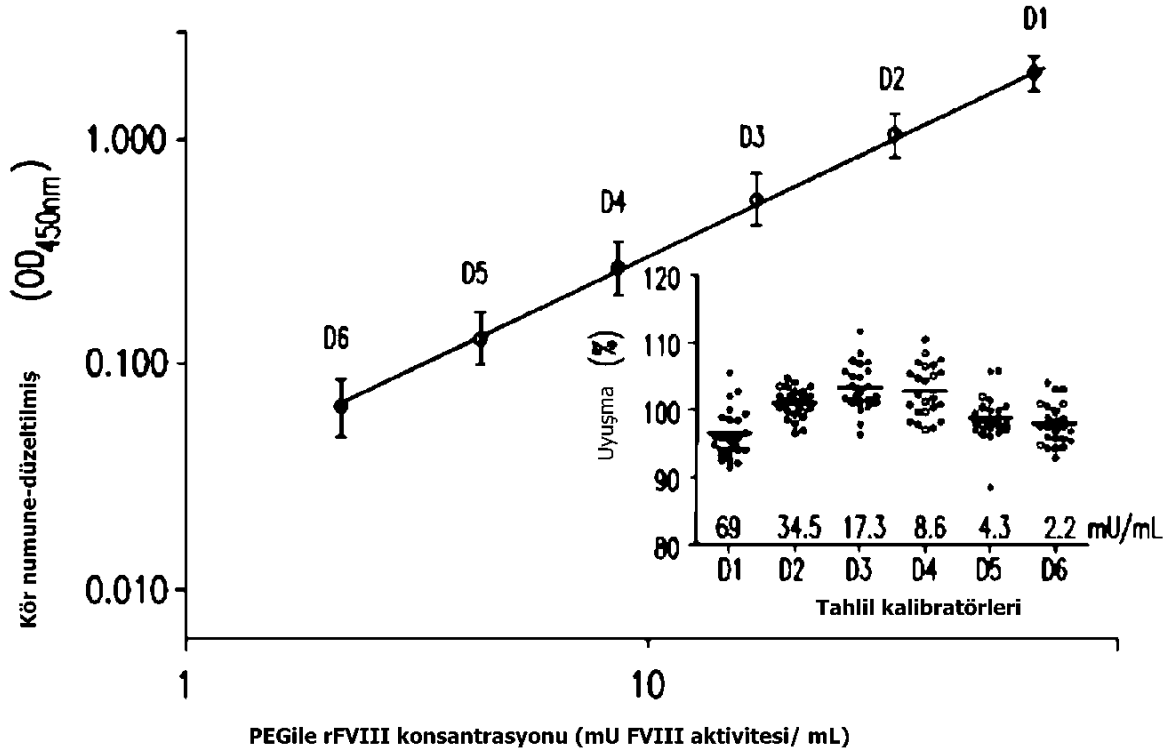
15



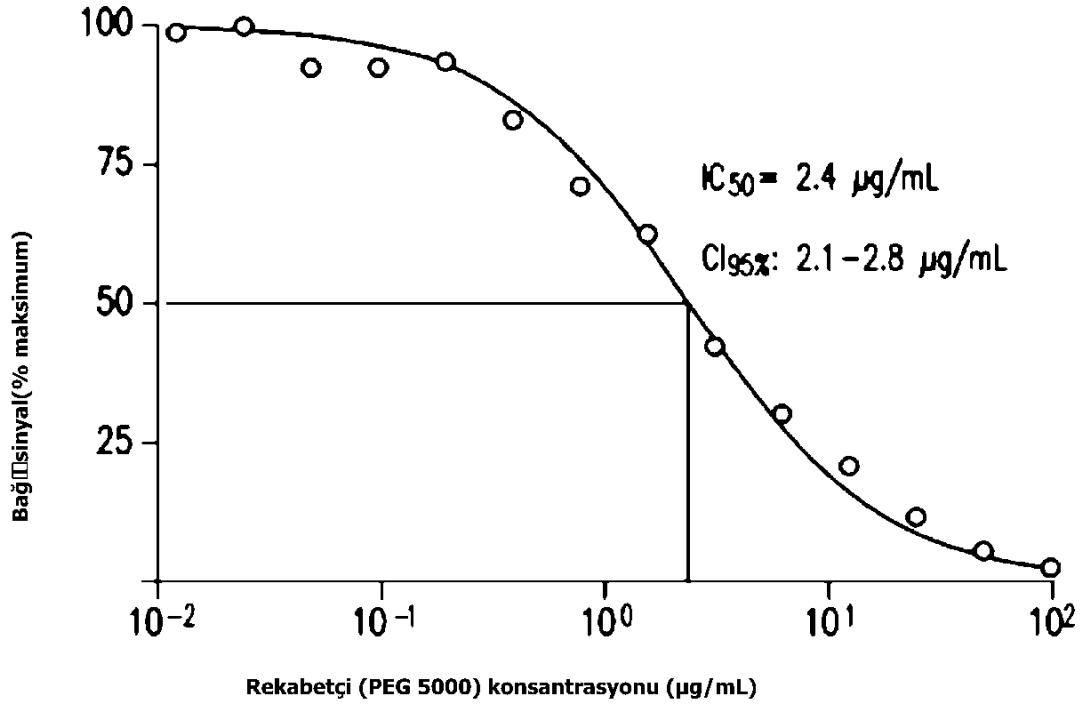
Şekil 1



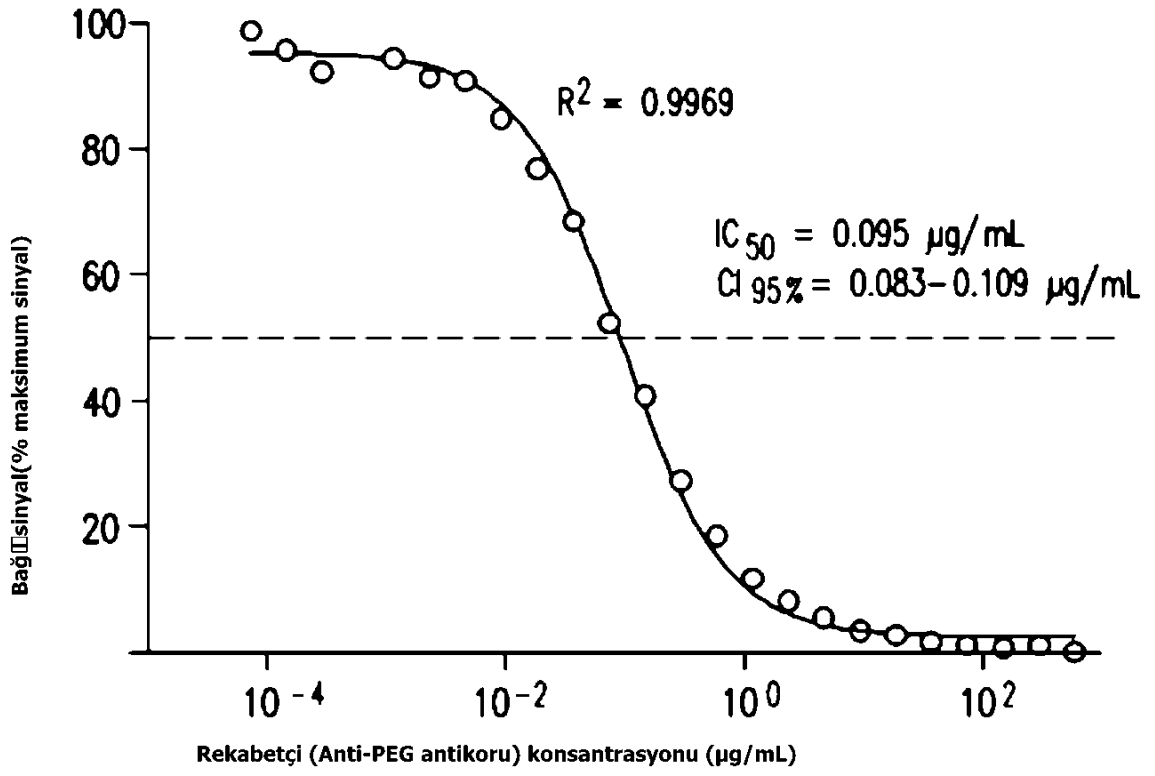
Şekil 2



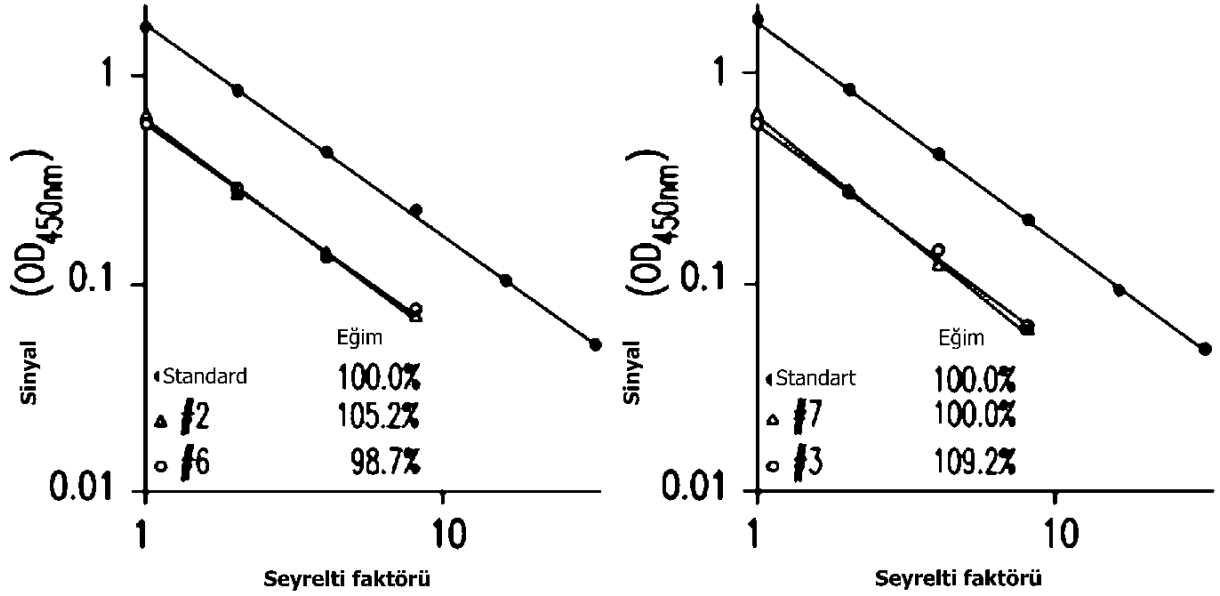
Şekil 3



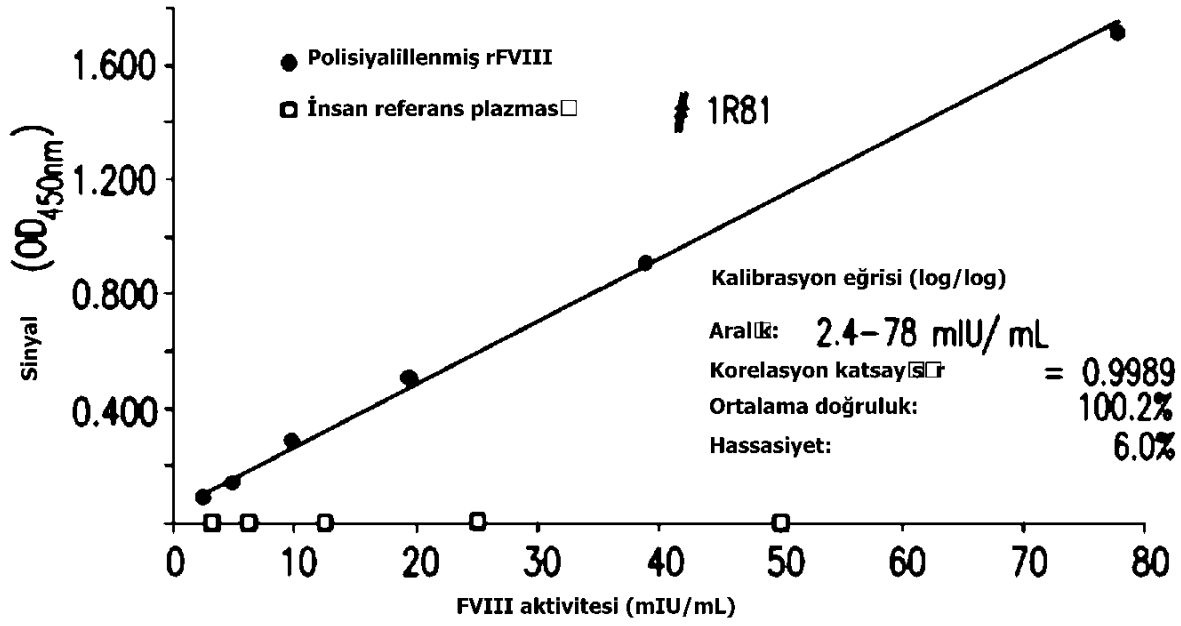
Şekil 4



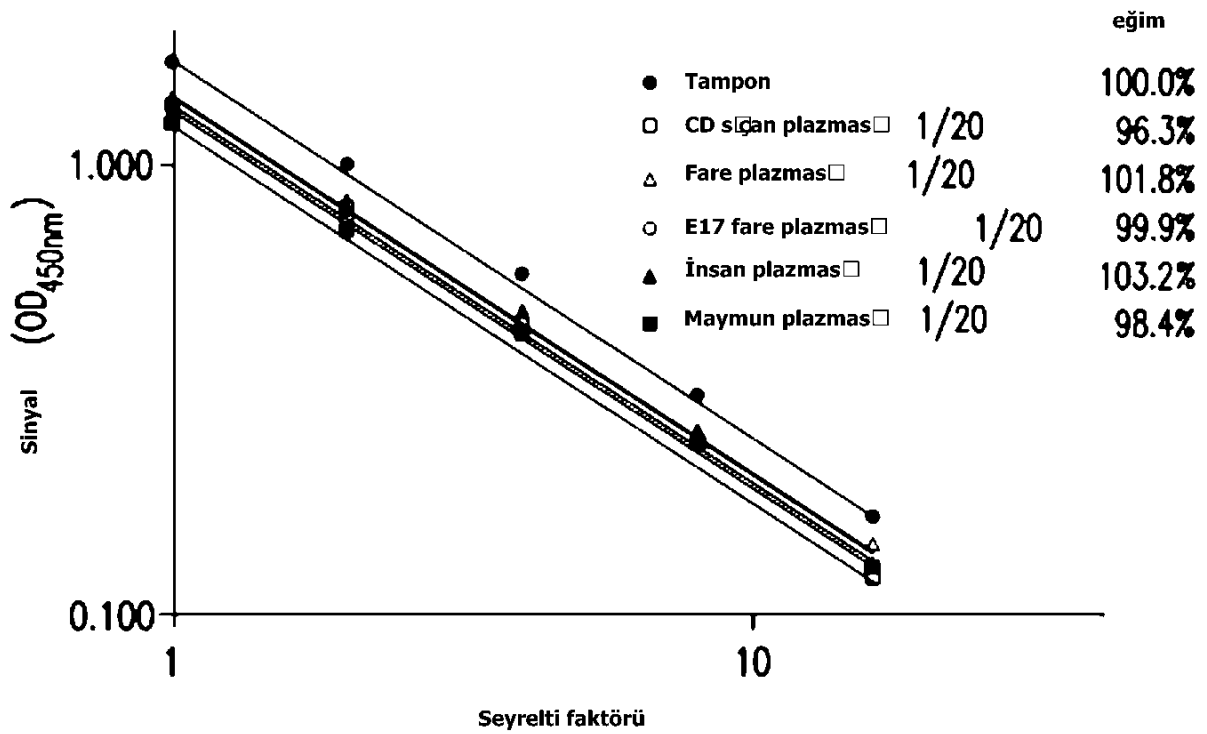
Şekil 5



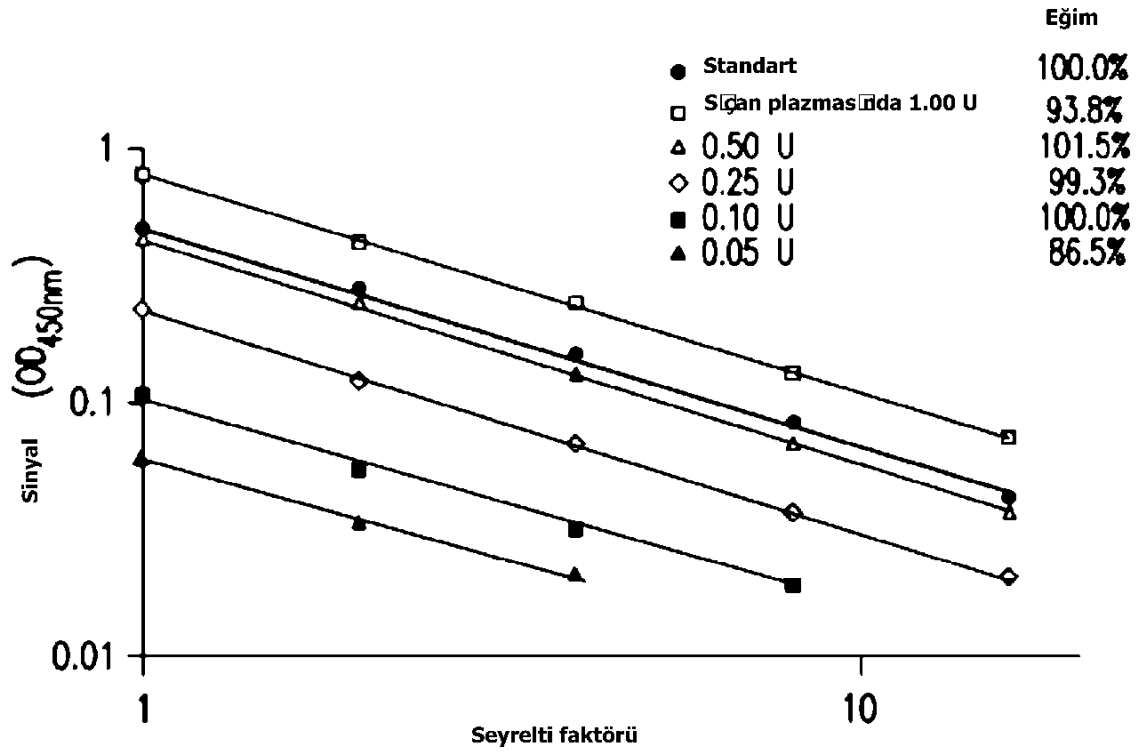
Şekil 6



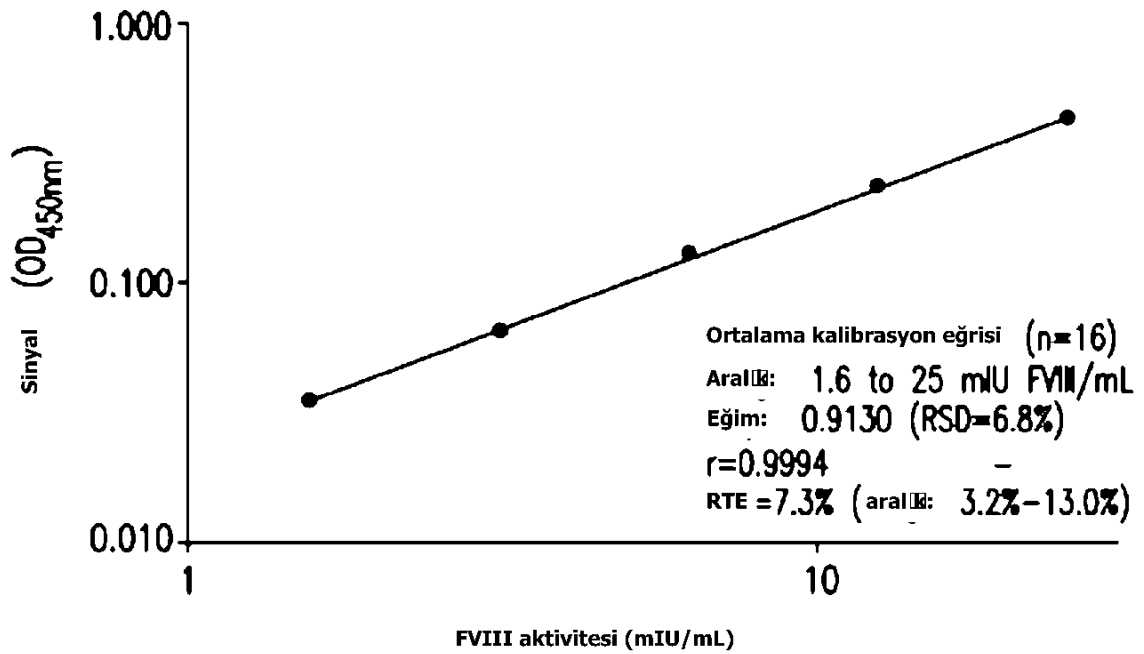
Şekil 7



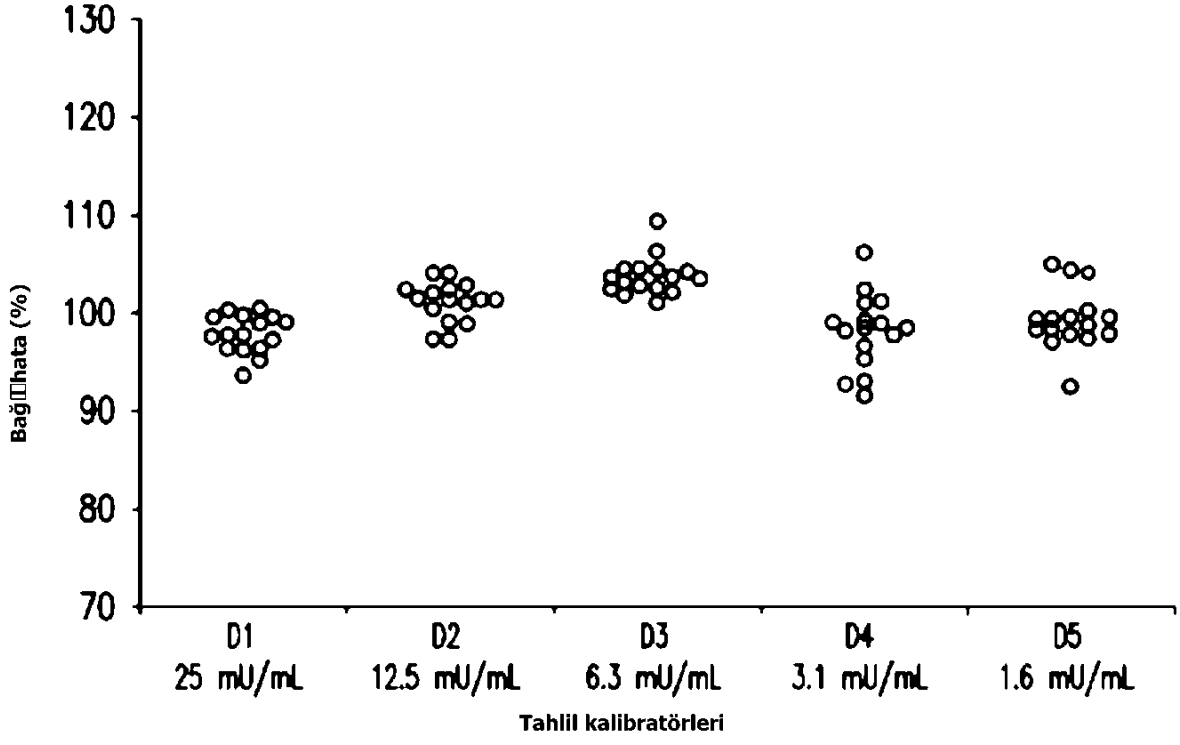
Şekil 8



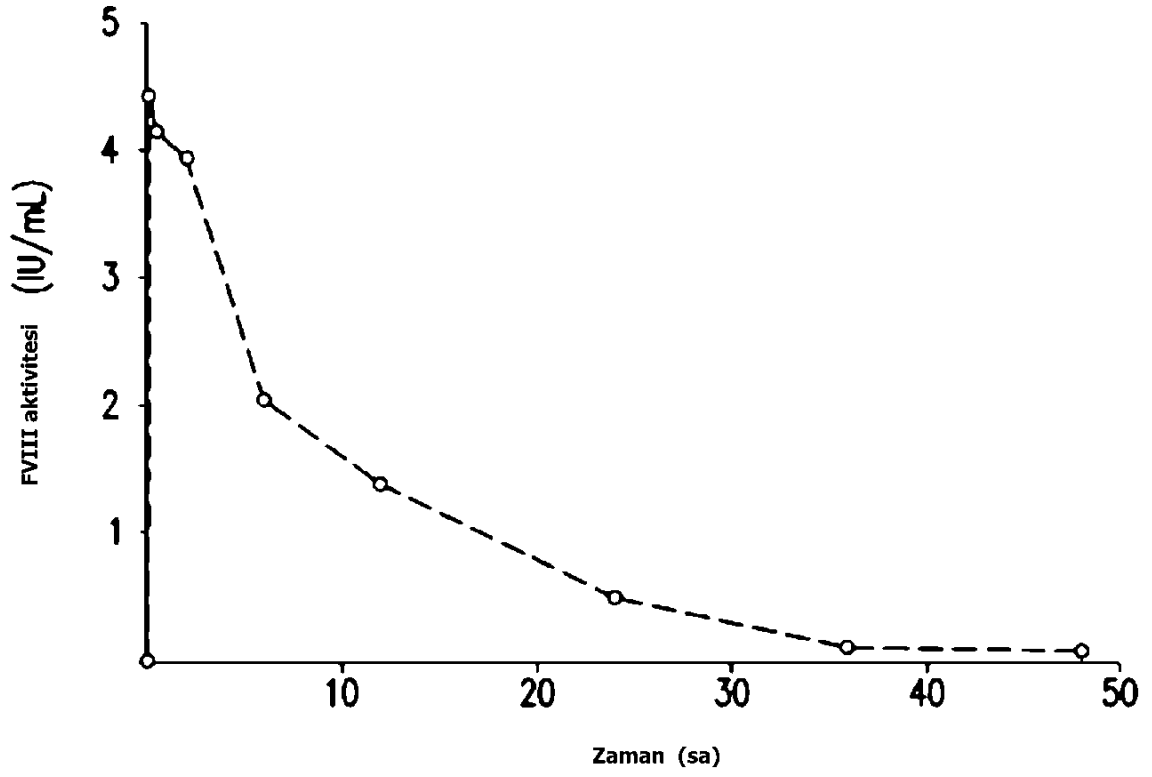
Şekil 9



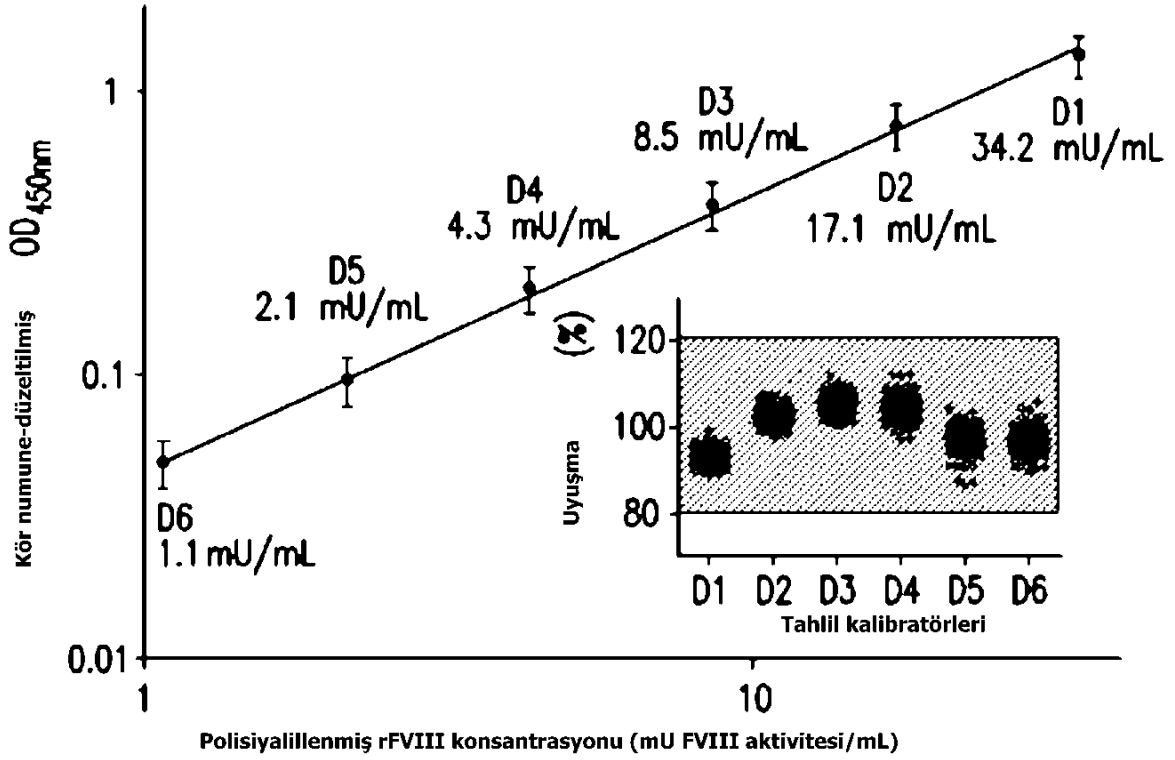
Şekil 10



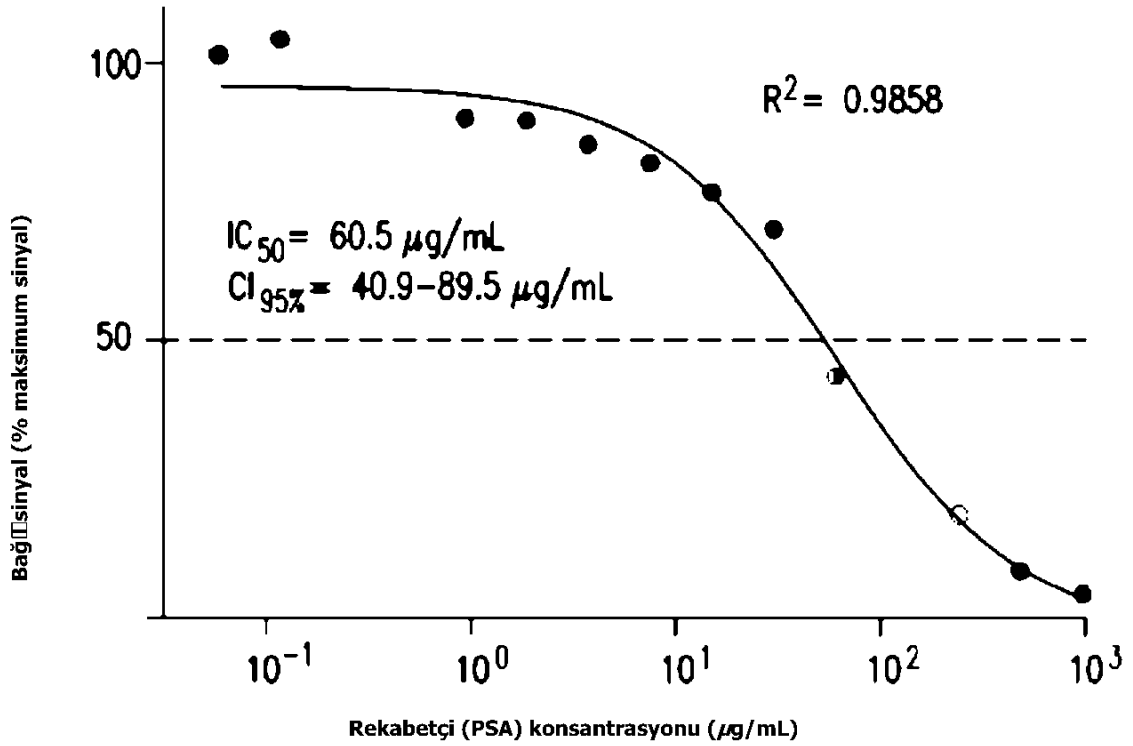
Şekil 11



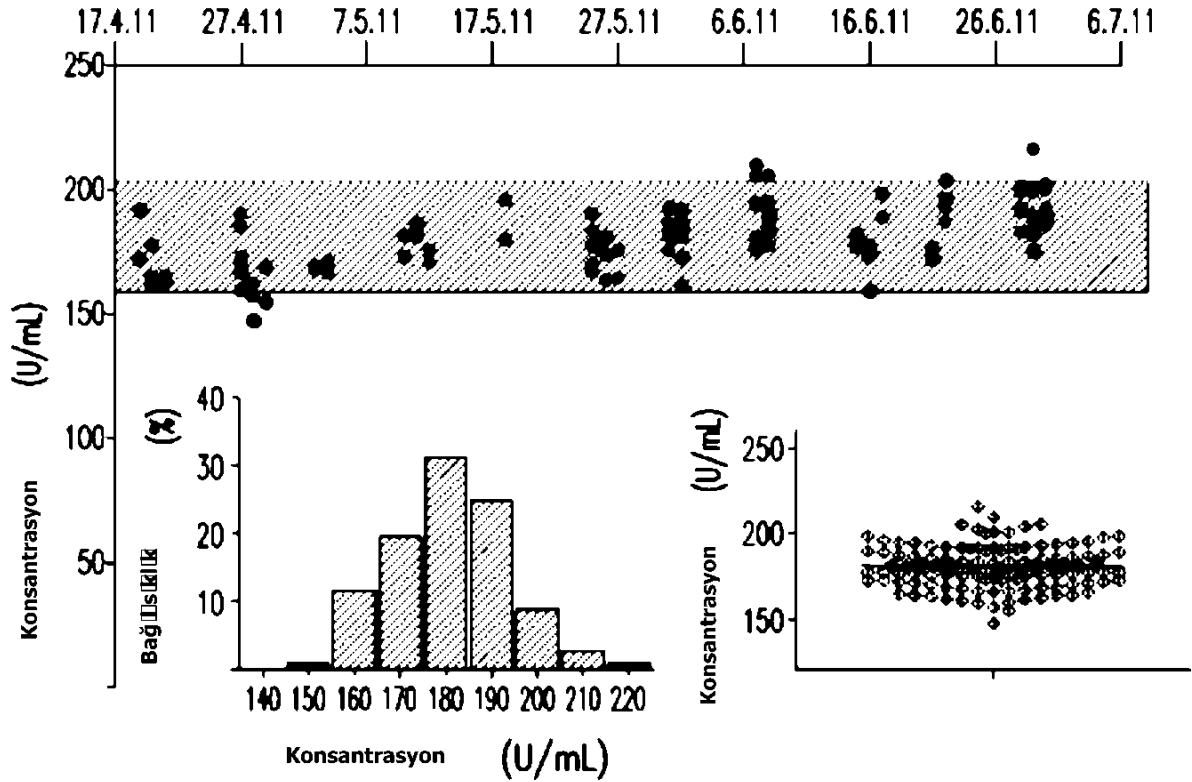
Şekil 12



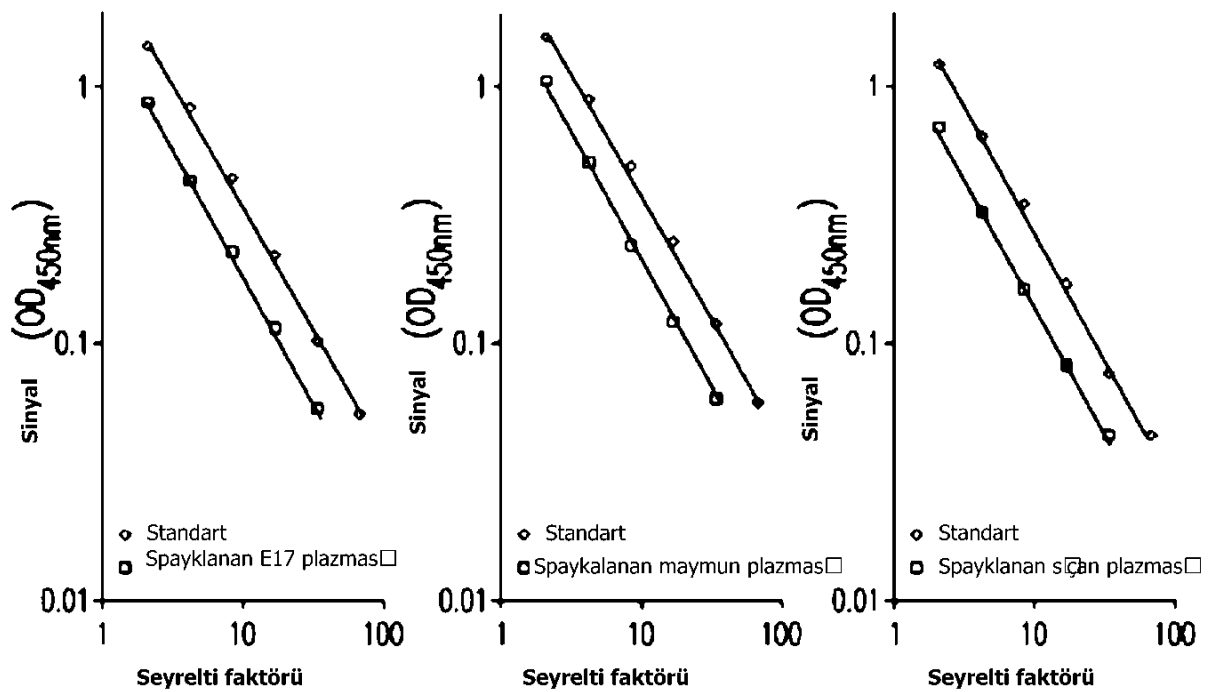
Şekil 13



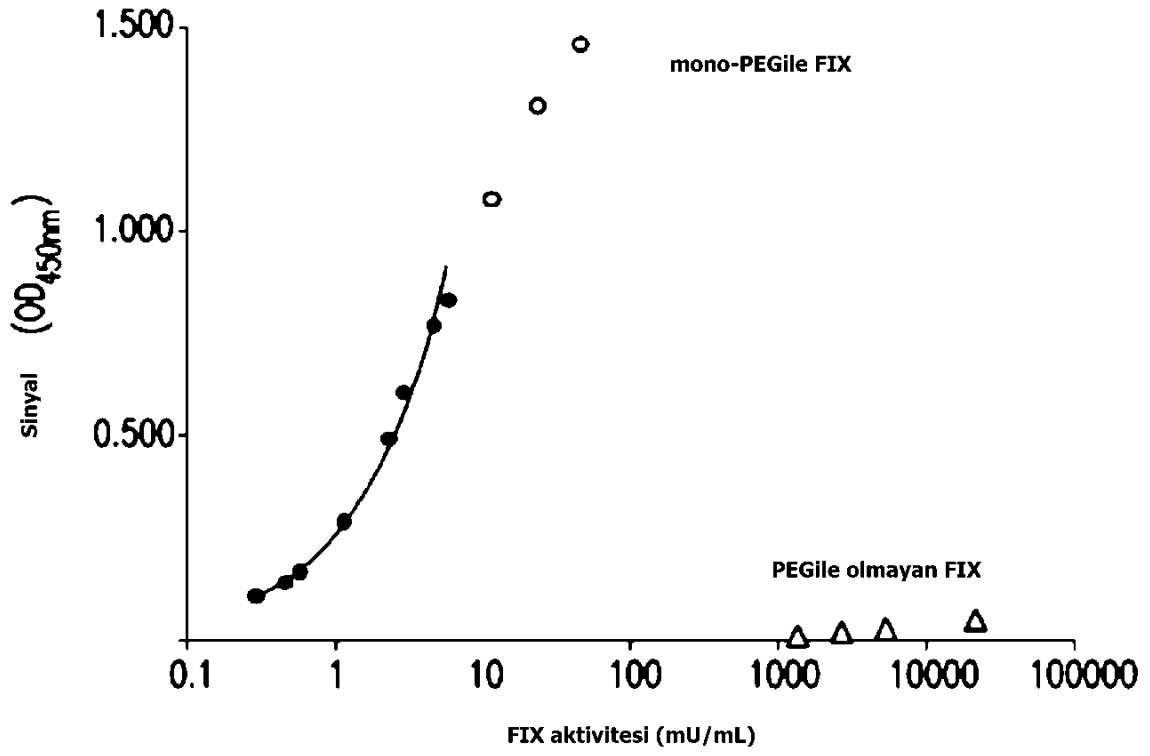
Şekil 14



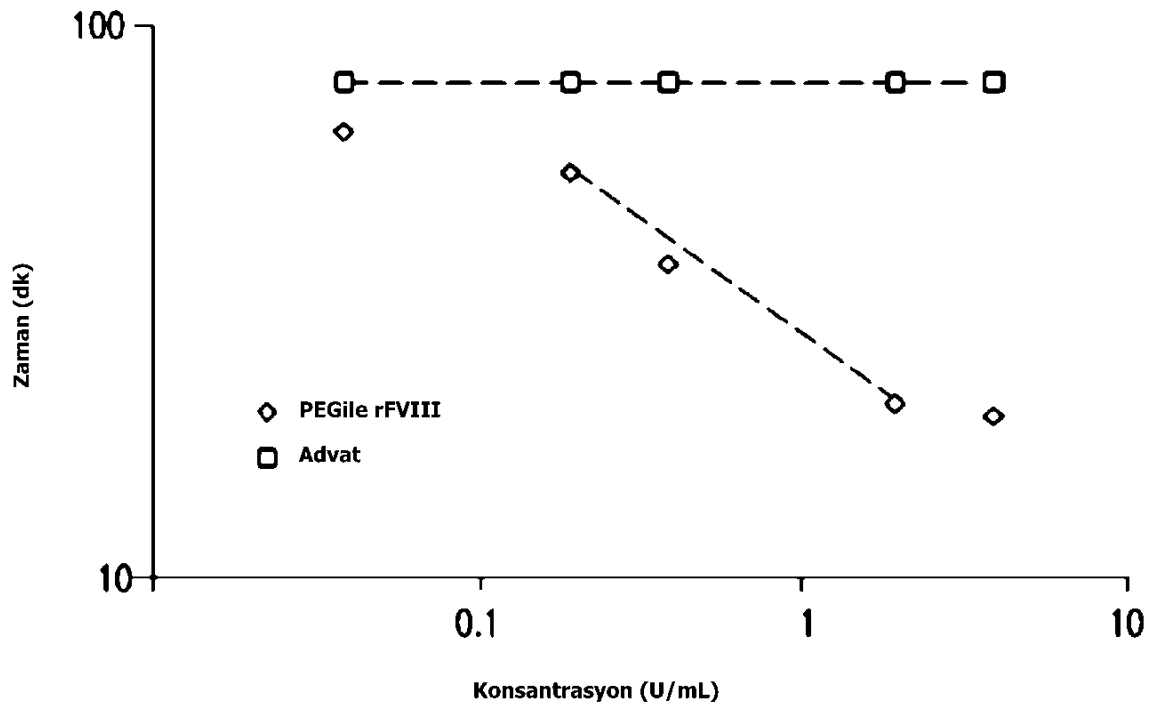
Şekil 15



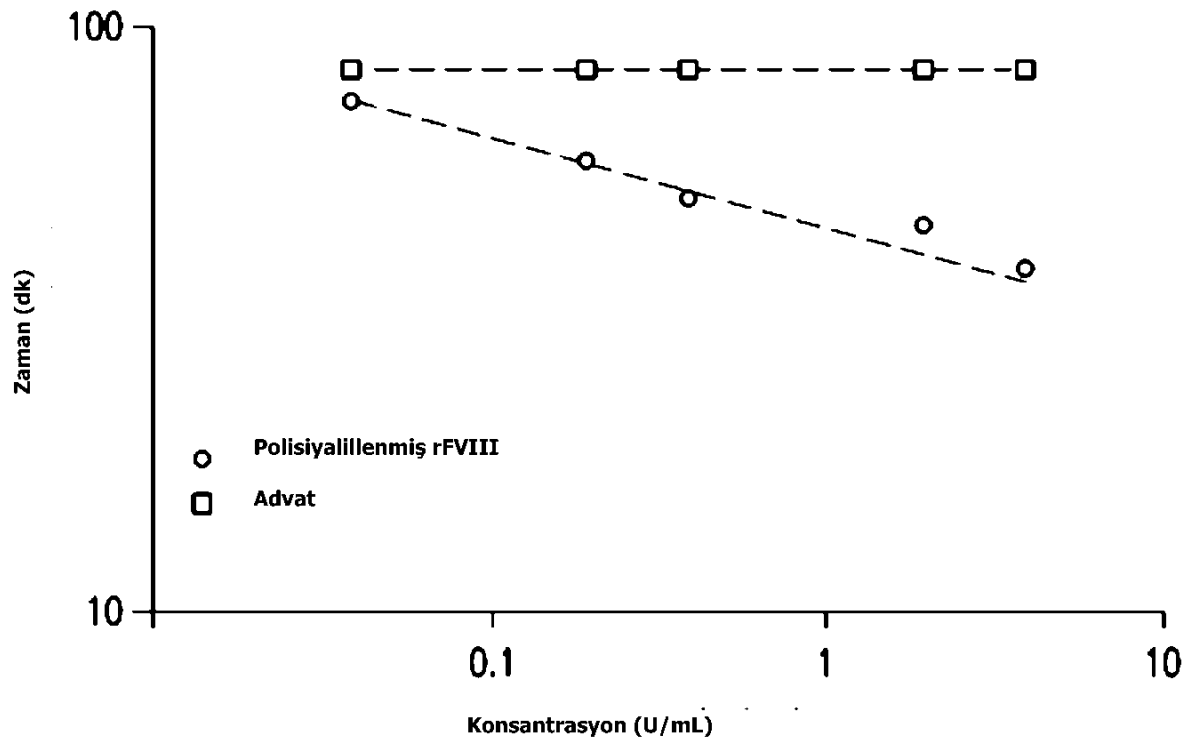
Şekil 16



Şekil 17



Şekil 18



Şekil 19