

ÖZET

PAKLİTAKSEL, PAKLİTAKSEL ANALOGLARI VEYA PAKLİTAKSEL KONJUGATLARININ FARMASÖTİK BİLEŞİMLERİ VE İLGİLİ PREPARASYON VE KULLANIM YÖNTEMLERİ

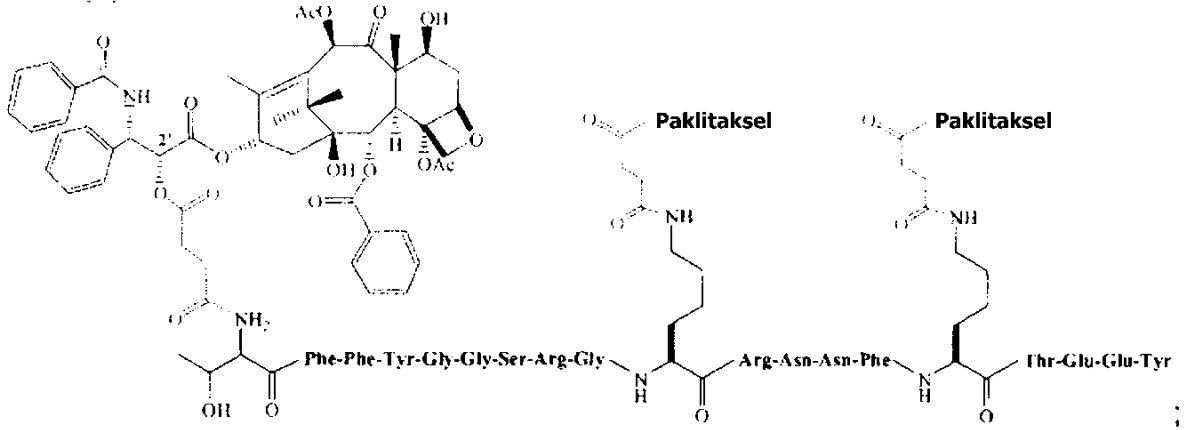
5

10 Cremophor barındırmayan hidrofobik ajanlar paklitaksel, paklitaksel analogları ve bunların konjugatları (örneğin ANG1005) için faydalı farmasötik bileşimler. Bileşimler ayrıca, bir opsiyonel tonisite ajanı, bir tamponlama ajanı, bir hacim artırıcı ajan ve söz konusu bileşimlerin ve hazırlanmasında ve söz konusu bileşimlerin kanser tedavisine aynı zamanda dahil edilmesinin Cremophor Yöntemleri olmayan bir çözücü ajan içermektedir.

İSTEMLER

1. Bir liyofilize bileşim olup, aşağıdakini içermektedir:

5 (a) ANG1005, burada ANG1005 aşağıdaki yapıya sahiptir:



(b) bir opsiyonel tonisite ajanı

10 (c) bir tamponlama ajanı

(d) bir hacim artırıcı ajan;

(e) bir çözme ajanı burada söz konusu çözme ajanı bir yağ asidin bir polioksietilen esteridir; ve

(f) %0.2 ila 10 oranında DMSO.

15

2. İstem 1'e göre liyofilize bileşim olup, burada söz konusu tonisite ajanı sodyum klorürdür;

burada söz konusu tamponlama ajanı glisin, sitrik asit veya laktik asittir;

burada söz konusu çözme ajanı Solutol HS 15'tir;

burada söz konusu hacim artırıcı ajan manitol veya sorbitoldür;

20

burada DMSO miktarı %5'ten daha az, daha özellikle %1'den daha az, daha da özellikle %0.2 ve %1.0 arasında ve/veya burada söz konusu bileşim polioksietillenmiş hint yağı büyük ölçüde barındırmamaktadır özellikle burada söz konusu bileşim polioksietillenmiş hint yağı barındırmamaktadır

25

3. İstem 1'e göre liyofilize bileşim olup, aşağıdakileri içermektedir:

Bileşik	Yüzde (su olmayan ağırlıkça)
ANG1005	%0.1 ila 5
Tonosite ajanı	%1 ila 15
Tamponlama ajanı	%1 ila 10
Hacim arttırıcı ajan	%0 ila 15
Solutol HS 15	%40 ila 75
DMSO	%0.2 ila 10

4. İstem 3'e göre liyofilize bileşim olup, aşağıdakileri içermektedir:

Bileşik	Yüzde (su olmayan ağırlıkça)
ANG1005	%1.8 ila 2.3
Tonosite ajanı	%9 ila 11
Tampon	%4.5 ila 6
Hacim arttırıcı ajan	%8 ila 10
Solutol HS 15	%69 ila 75
DMSO	0.2 ila 2

5

5. Söz konusu tonosite ajanı sodyum klorür olduğu, söz konusu tamponlama ajanı glisin olduğu ve söz konusu hacim arttırıcı ajanı manitol olduğu, İstem 3 veya 4'e göre liyofilize bileşim.

10 6. İstem 1'e göre liyofilize bileşim olup, aşağıdakileri içermektedir

Bileşik	Yüzde (su olmayan ağırlıkça)
ANG1005	%1.8 ila 4.0
Tampon	%0.1 ila 6
Hacim arttırıcı ajan	%2 ila 10
Solutol HS 15	%80 ila 95
DMSO	%0.2 ila 1

7. Söz konusu tamponun, laktik asit veya sitrik asit olduğu ve söz konusu hacim arttırıcı ajanı manitol olduğu, İstem 6'ya göre liyofilize bileşim.

15

8. Kanser tedavisinde kullanıma yönelik İstem 5'e göre liyofilize bileşim olup, söz konusu

yöntem, söz konusu kanserin tedavi edilmesi için yeterli miktarda söz konusu bileşimin buna ihtiyacı olan bir hastaya uygulanmasını içermektedir, özellikle burada söz konusu kanser bir beyin, over, akciğer, karaciğer, dalak veya böbrek kanseridir, daha özellikle burada söz konusu beyin kanseri, gliyoblastom, astrositom, gliyoma, meduloblastom ve aligodendroma, nörogloma, ependimoma ve meningiomadan oluşan gruptan seçilmektedir.

9. İstem 5'e göre liyofilize bileşimi barındıran bir sızdırmaz kap.

10. 10. Bir kit olup, aşağıdakileri içermektedir:

- (a) İstem 5'e göre sızdırmaz kap; ve
- (b) kullanıma yönelik talimatlar.

15. 11. İstem 1'e göre bir liyofilize farmasötik bileşimi hazırlamaya yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem aşağıdakileri içermektedir:

- (a) bir karışımın oluşturulması için bir birinci çözme ajanında söz konusu konjugatın çözündürülmesi;
- (b) adım (a)'nin karışımına bir ikinci çözme ajanının eklenmesi;
- (c) suyun ve bir tamponlama ajanının söz konusu karışıma opsiyonel olarak eklenmesi;
- (d) adım (c)'nin karışımının liyofilize edilmesi; burada söz konusu liyofilizasyon, söz konusu birinci çözme ajanı miktarının en az %20 oranında bir azalmasıyla sonuçlanmaktadır ancak söz konusu ikinci çözme ajanı miktarını büyük ölçüde azaltmamaktadır

12. İstem 11'e göre yöntem olup, burada söz konusu birinci çözme ajanı DMSO'dur;

burada söz konusu ikinci çözme ajanı bir yağ asidin bir polioksietilen esteri, özellikle Solutol HS 15'dir;

burada adım (b)'nin karışımına adım (c)'de liyofilize edilmeden önce filtrelenmektedir.

burada söz konusu karışım, adım (c)'de liyofilize edilmeden önce bir flakonun içine yerleştirilmektedir;

burada söz konusu yöntem ayrıca adım (e)'ye ait söz konusu liyofilize ürününün yeniden süspansiyon halinde tutulmasını içermektedir.

13. İstem 12'ye göre yöntem olup, burada su ve bir tamponlama ajanı adını (c)'de eklenmektedir ve söz konusu adı (d)'deki liyofilize etme aşamaları içermektedir:

5

(i) söz konusu karışımı dondurulması

(ii) söz konusu suyun en azından bir bölümünün giderilmesi için yeterli olan bir birinci sıcaklıkta ve basınçta söz konusu dondurulmuş ürünün kurutulması ve

(iii) söz konusu ürünün, söz konusu birinci çözücünün en azından bir bölümünün giderilmesi için yeterli bir ikinci sıcaklıkta ve basınçta kurutulması

10

özellikle burada söz konusu birinci çözücü, DMSO'dur ve söz konusu ikinci çözücü Solutol HS 15'tir.

TARİFNAME

PAKLİTAKSEL, PAKLİTAKSEL ANALOGLARI VEYA PAKLİTAKSEL KONJUGATLARININ FARMASÖTİK BİLEŞİMLERİ VE İLGİLİ PREPARASYON VE KULLANIM YÖNTEMLERİ

Önceki Teknik

Buluş, istemlerde belirlendiği üzere paklitaksel konjugatların formülasyonlarıyla ilgilidir.

Sulu çözeltideki çözünmezlikten dolayı paklitaksel ve paklitaksel analogları gibi hidrofobik ajanlar tipik olarak ya sulu olmayan veya sürfaktan tamponlarında çözündürülmektedir ya da bir hastaya uygulanmasından önce sulu çözeltide artmış çözünürlük için hidrofilik kısımlara tutturulmaktadır. Paklitaksel, her bir ml'nin 6 mg paklitaksel, 527 mg'lık saflaştırılmış Cremophor® EL (polioksetillenmiş hint yağı) ve hacim cinsinden %49.7 oranında suyu almayan alkol USP ve etanol barındıran bir formülasyonda ticari olarak tedarik edilmektedir. Uygulamadan önce, formüle edilen paklitaksel, bir sodyum klorür/dekstroz veya Ringer çözeltisinde dekstrozda seyreltilmektedir. Cremophor, aşırı duyarlı (örneğin, anafilaktik) reaksiyonlara yol açabildiği için, paklitaksel alan hastalar, bu reaksiyonların meydana gelmesinin önlenmesi için deksametazon ile önceden tedavi edilmektedir. Bu reaksiyonlardan dolayı paklitaksel, aşırı duyarlı etkilerinin en aza indirilmesi için 4 saat boyunca uygulanmaktadır.

Standart paklitaksel formülasyonlarına Cremophor'un dahil edildiği için yüksek orandaki yan etkilerden dolayı alternatif formülasyonlar oluşturulmaktadır. Bu formülasyonlar, bir çözünür bileşik ile paklitakselin ilişkisine dayanmaktadır. Abraksan, paklitakselin albümine bağlandığı paklitaksel formülasyonudur. Liposomal paklitaksel formülasyonları aynı zamanda önerilmektedir.

Paklitaksel gibi hidrofobik ajanların mevcut formülasyonlarına arzu edilmeyen yardımcı maddeler barındırılarak ya da imalat zor olduğu için, bu tür ajanların yeni formülasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

WO 2004/060403 A2 numaralı patent dokümanı bir ajanın a-e kan-beyin bariyeri boyunca taşınmaya yönelik bir taşıyıcı olarak aprotinini açılmaktadır.

WO 2006/089290 A1 numaralı patent dokümanı bir taksan ve albümin içeren bir nanopartikülün uygulanması ve ayrıca bir diğer kemoterapötik ajanın uygulanması içeren hiperproliferatif hastalıkların tedavi etmeye yönelik yöntemleri açıklamaktadır

5

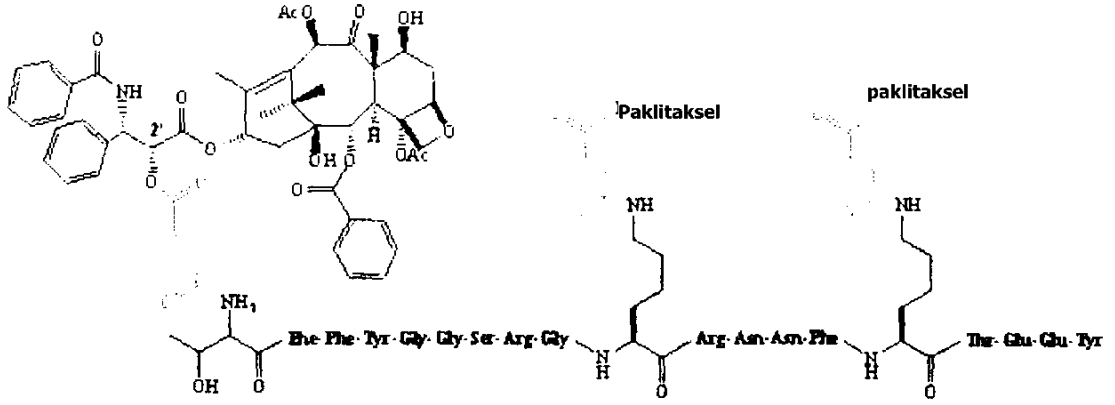
WO 02/43765 A2 numaralı patent dokümanı cremophor®-içermeyen paklitaksel formülasyonları açıklamaktadır

WO 2007/009229 A1, WO 2006/086870 A1 ve WO 2008/144919 A1 numaralı patent dokümanları ilaçların iletimi için taşıyıcılar olarak aprotinin polipeptitlerini açıklamaktadır

Buluşun Kısa Açıklaması

Açıklanan, (a) bir hidrofobik ajan-paklitakseli, bir paklitaksel analogunu veya bir konjugat (örneğin, ANG 1005) (i) bir polipeptit vektörünü; ve (ii) terapötik ajanın bir polipeptide veya burada açıklanan herhangi bir hidrofobik ajana konjuge edildiği, paklitaksel ve bir paklitaksel analogundan oluşan gruptan seçilen bir terapötik ajanı kapsayan); (b) bir opsiyonel tonisite ajanı (örneğin, sodyum klorürü veya burada açıklanan herhangi bir tonisite ajanı); (c) bir tamponlama ajanı (örneğin, glisin, laktik asit, veya sitrik asit veya burada açıklanan herhangi bir tamponlama ajanı); (d) bir hacim artırıcı ajanı (örneğin, manitol, sorbitol, veya burada açıklanan herhangi bir hacim artırıcı ajanı); ve (e) örneğin çözme ajanı Cremophor olmadıkça bir çözme ajanı (örneğin, Solutol HS 15 gibi bir yağ asidin polioksietilen esterini veya burada açıklanan herhangi bir çözme ajanı) kapsamaktadır. Polipeptit vektörü, SEKANS KİMLİK NUMARALARI:1 ila 105 ve 107 ila 116 (örneğin, AngioPep-1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:67); AngioPep-2 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:97), veya AngioPep-7'den (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 112)) oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansına büyük ölçüde özdeş olan (örneğin en az %70, %80, %90, %95 veya %100) bir amino asidi kapsayabilmektedir. Belirli yapılandırmalarda, tamponlama ajanı çözeltiyi 6'dan daha az pH'ta (örneğin, pH 4 ila 6) tutmaktadır. Belirli yapılandırmalarda, bileşim ayrıca %0.01 ila 10 oranında (örneğin, %8, %6, %5, %4, %3, %2, %1, %0.75, %0.5, %0.2 veya %0.1'den daha az) DMSO'yu kapsamaktadır. Belirli yapılandırmalarda, bileşim büyük ölçüde Cremophor içermemektedir (örneğin, Cremophorsuz). Bileşim suda çözündürülebilmektedir. Bir yapılandırmada, mevcut buluş şunları içeren bir liyofilize bileşim ile ilgilidir.

35 (a) ANG 1005, burada ANG1005 şu yapıya sahiptir:



(b) bir opsiyonel tonisite ajanı

5 (c) bir tamponlama ajanı

(d) bir hacim artırıcı ajan;

10 (e) bir çözme ajanı burada söz konusu çözme ajanı bir yağ asidin bir polioksietilen esteridir; ve

(f) %0.2 ila 10 DMSO.

15 Belirli yapılandırılmalarda, liyofilize bileşim, Tablolar 1 ila 4'ten herhangi birinde gösterilen miktarda ajanlar içermektedir.

Tablo 1

Bileşik	Yüzde (su olmayan ağırlıkça)
ANG1005	%0.1 ila 5
Tonisite ajanı	%0 ila 15
Tamponlama ajanı	%1 ila 10
Hacim artırıcı ajan	%0 ila 15
Solutol HS 15	%40 ila 75
DMSO	%0.2 ila 10

Tablo 2

Bileşik	Yüzde (su olmayan ağırlıkça)
ANG1005	%1.8 ila 2.3
Tonosite ajanı	%9 ila 11
Tampon	%4.5 ila 6
Hacim artırıcı ajan	%8 ila 10
Solutol HS 15	%69 ila 75
DMSO	%0.2 ila 1

Tablo 3

Bileşik	Yüzde (su olmayan ağırlıkça)
ANG1005	%1.8 ila 4.0
Tampon	%0.1 ila 6
Hacim artırıcı ajan	%2 ila 10
Solutol HS 15	%80 ila 95
DMSO	%0.2 ila 1

Tablo

Bileşik	Yüzde (su olmayan ağırlıkça)
ANG1005	%2.0 ila 3.0
Tampon	%0.5 ila 6
Hacim artırıcı ajan	%4 ila 7
Solutol HS 15	%85 ila 95
DMSO	%0.2 ila 0.6

Bu bileşimlerde, tonisite ajanı mevcut ise, sodyum klorür olabilmektedir, tamponlama ajanı glisin, laktik asit, veya sitrik asit olabilmektedir ve/veya hacim artırıcı ajan manitol olabilmektedir. Bileşim, yaklaşık %0.1, %0.2, %0.3, %0.4, %0.5, %0.6, %0.7, %0.8, %0.9, %1.0 1.1, 1.2, %1.3, %1.4, %1.5, %1.6, %1.7, %1.8, %1.9, %2.0, %2.1, %2.2, %2.3, %2.4, %2.5, %2.6, %2.7, %2.8, %3.0, %3.2, %3.5, %4.0, veya %5.0 oranında veya bu değerlerin herhangi birinin herhangi bir aralığında ANG1005'ten üretilebilmektedir. ANG1005, ayrıca bir sulu çözeltide seyreltilebilen, yeterli miktarda Solutol HS 15, ve/veya DMSO çözündürülebilmektedir.

Yukarıdaki bileşimler sıvı hâle getirilebilen bir kapta bulunabilmektedir. Kap, ayrıca kullanıma yönelik (örneğin, burada açılanlar gibi herhangi bir hastalığın tedavisine yönelik bileşimi uygulamaya yönelik) talimatlar kapsayan bir kitin bir parçası olabilmektedir.

Açıklanan, bir hastalıktan, örneğin kanser gibi burada açıklanan herhangi bir hastalıktan (örneğin, over, beyin, akciğer, karaciğer, dalak veya böbrek kanseri) muzdarip olan hastaya yukarıdaki yönlerin bir bileşimini uygulamaya yönelik bir yöntemdir. Yöntem, hastalığın tedavi edilmesi veya profilaktik olarak tedavi edilmesi için yeterli bir miktarda bileşimin hastaya uygulanmasını kapsamaktadır. Belirli yapılandırılmalarda, kanser, gliyoblastom, astrositom, gliyom, meduloblastom, ve oligodendroma, nöroglıyoma, ependimoma ve menıngıyomadan oluşan gruptan seçilen bir beyin kanseridir. Başka bir yönde, buluş, şunları içeren mevcut buluşun bir liyofilize farmasötik bileşimini hazırlamaya yönelik bir yöntem özelliğini taşımaktadır.

- (a) bir karışımın oluşturulması için bir birinci çözme ajanında söz konusu konjugatın çözündürülmesi;
- (b) adın (a)'nin karışımına bir ikinci çözme ajanının eklenmesi;
- (c) söz konusu karışımın suyun ve bir tamponlama ajanının opsiyonel olarak eklenmesi;
- (d) adın (c)'nin karışımının liyofilize edilmesi; burada söz konusu liyofilizasyon, söz konusu birinci çözme ajanının miktarında en az %20 oranında bir azalma ile sonuçlanmaktadır ancak söz konusu ikinci çözme ajanının miktarında büyük ölçüde azaltılmamaktadır.

Açıklanan, (a) bir karışımın oluşturulması için bir birinci çözme ajanında (örneğin DMSO veya burada açıklanan herhangi bir bu tür ajan) bir hidrofobik ajanda çözündürülmeyi; (b) adın (a)'nin karışımına bir ikinci çözme ajanının (örneğin Solutol HS 15 gibi yağ asidin polioksietilen esteri veya burada açıklanan herhangi bir bu tür ajan) eklenmesi; (c) karışımın opsiyonel olarak suyun ve bir tamponlama ajanının eklenmesi; (d) adın (c)'nin karışımının liyofilize edilmesi; burada liyofilizasyon, (örneğin, liyofilize ürünün toplam ağırlığının %0.2, %0.4, %0.6, %0.8, %1.0, %1.5, %2, %3, %4, %5, %8'den daha az bir nihai bölüme) birinci çözme ajanının miktarının en az %5 (örneğin %10, %20, %30, %50, %75, %90, %95, veya %99) oranında bir azalması ile sonuçlanmaktadır. Belirli yapılandırılmalarda, liyofilize ikinci çözme ajanının miktarında büyük ölçüde azaltılmamaktadır. Belirli yapılandırılmalarda, hidrofobik ajan, paklitaksel veya bir paklitaksel analogu kapsamaktadır. Hidrofobik ajan, (a) bir polipeptit vektörü ve (b) ajanın vektöre konjuge edildiği burada açıklanan bir ajan (örneğin, paklitaksel ve bunların ajanları) kapsayabilmektedir. Polipeptit vektörü, SEKANS KİMLİK NUMARALARI:1 ila 105 ve 107 ila 116 (örneğin, AngıoPep-1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:67); AngıoPep-2 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:97), veya

AngioPep-7'den (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 112)) oluşan gruptan seçilen bir amino asit sekansına büyük ölçüde özdeş olabilmektedir. Özel yapılandırılmalarda, konjugat ANG 1005'tir. Belirli yapılandırılmalarda, su ve tamponlama ajanı adını (c)'de eklenmektedir ve adını (d) liyofizleme, (i) karışımı dondurulması (ii) suyun en az bir bölümünün (örneğin, en az 5 %50, %60, %70, %80, %90, %95, %99, %99.5, %99.9 veya %99.99) giderilmesi için yeterli bir birinci sıcaklıkta ve basınçta dondurulmuş ürünün kurutulması ve (iii) birinci çözücünün en az bir bölümünün giderilmesi için (örneğin, en az %5 (örneğin, %10, %20, %30, %50, %75, %90, %95 veya %99) yeterli bir ikinci sıcaklıkta ve basınçta ürünün kurutulması kapsamaktadır. Adını (b)'nin karışım adını (c) liyofilize edilmeden önce 10 filtrelenebilmektedir veya adını (c) liyofizlemeden önce bir flakonun veya kabın içine yerleştirilebilmektedir. Yöntem ayrıca, (c) liyofilize ürünün yeniden süspansiyon halinde tutulması kapsayabilmektedir.

Açıklanan, adını (a) bir polipeptit vektörüne konjuge edilen paklitaksel veya paklitaksel analogunu kapsayan bir konjugatın DMSO'da çözündürülmesini, böylelikle karışımın oluşturulması (b) karışım Solutol HS 15'in eklenmesini; (c) suyun, bir tamponlama ajanı ve opsiyonel olarak tuz veya bir hacim artırıcı ajanın eklenmesini; ve (d) karışımın suyu ve DMSO'yu gideren koşullar altında karışımın liyofilize edilmesini kapsayan bir farmasötik bileşim üretmeye yönelik bir yöntemdir. Solutol HS 15, suyun, tampon ajanı ve opsiyonel tonisite ajanı, karışımın çözünürlüğünü muhafaza eden bir miktarda eklendiği, karışımın eklenmeden önce su, bir tamponlama ajanı ve opsiyonel olarak bir tonisite ajanı veya bir hacim artırıcı ajan ile karıştırılabilmektedir. Tamponlama ajanı 4 ve 6 arasında bir pH'ta çözeltiyi muhafaza edebilmektedir. DMSO, adını (a) çözündürmeden önce pH 3.5 ve 4.5 arasında asitleştirilebilmektedir. Belirli yapılandırılmalarda, liyofilizasyon, karışımın Solutol HS 15'in miktarını büyük ölçüde azaltmamaktadır. Konjugat, burada açıklanan polipeptitlerin (örneğin, AngioPep-2) herhangi birini kapsayabilmektedir. Özel yapılandırılmalarda, paklitaksel-polipeptit konjugatı ANG1005'dir.

Açıklanan, yukarıda açıklanan yöntemlerden herhangi biri ile üretilen bir farmasötik bileşimdir.

"Tamponlama ajanı ile, bir çözeltinin pH'ını (örneğin, herhangi bir pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, ve 13.5 arasında) aksi halde pH'ını değiştirebilen ajanların eklenmesi üzerine belirli bir aralık için 35 muhafaza edebilen herhangi bir bileşik veya bileşikler grubunu ifade etmektedir. Örnekleyici

tamponlama ajanları burada açıklanmaktadır

“Tonisite ajanı” ile, bir sulu çözeltinin ozmolaritesini değiştiren herhangi bir ajan ifade edilmektedir (örneğin, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 5 veya 2000 mM arasındaki herhangi bir aralık veya aralığı herhangi biri). Sodyum klorür gibi, iyonik tuzlar, tonisitenin ayarlanması için kullanılabilmektedir. Ek tonisite ajanları burada açıklanmaktadır

“Hacim arttırıcı ajan” ile, bir dehidrasyon veya liyofilizasyon prosedürünü takip eden bir kimyasal bileşimin fiziksel formunu değiştiren bir bileşik ifade edilmektedir. Örnekleyici hacim arttırıcı ajanlar burada açıklanmaktadır

“Çözünü ajan” ile, özel bir bileşimi çözebilen herhangi bir çözücü ifade edilmektedir (örneğin, paklitaksel veya bir paklitaksel analogunu barındıran bir bileşik veya konjugat gibi bir hidrofobik bileşik). Hidrofobik bileşikler için uygun olan örnekleyici çözme ajanları burada açıklanmaktadır

“Vektör” ile, bir özel hücre tipine (örneğin, karaciğer, akciğer, dalak veya kas) veya BBB boyunca taşıyabilen bir polipeptit gibi bir bileşik veya molekül ifade edilmektedir. Vektör, bir ajana tutturulabilmektedir (kovalent olarak veya olmayarak) veya konjuge edilebilmektedir ve böylelikle özel bir hücre tipine veya BBB boyunca ajanı taşıyabilmektedir. Belirli yapılandırılmalarda, vektör, kanser hücrelerinin veya beyin endotelial hücrelerinin üzerinde bulunan reseptörlere bağlanabilmektedir ve böylelikle kanser hücrelerini veya BBB boyunca transitozis ile taşıyabilmektedir. Vektör, hücre veya BBB bütünlüğü etkilenmeden yüksek seviyelerde transendotelial taşımanın elde edilebildiği bir molekül olabilmektedir. Vektör, polipeptit veya bir peptidomimetik olabilmektedir ve doğal olarak oluşabilmektedir veya kimyasal sentez veya rekombinant genetik teknolojisi ile üretilmektedir.

“Konjugat” ile bir ajana bağlantı olan bir vektör ifade edilmektedir. Konjugasyon, bir bağlantıyı gibi yapılar kimyasal veya örneğin bir raportör molekül ile (örneğin yeşil floresan protein, β -galaktosidaz, Histag, vb.) bir füzyon proteini gibi, örneğin rekombinant genetik teknolojisi ile yapılar genetik olabilmektedir.

“Bir özel hücre tipine etkili bir şekilde taşıyan” bir vektör veya konjugat ile, konjuge edilmemiş ajana kıyasla, ya bir kontrol maddesi ya da bir konjugat durumunda en az %10 (örneğin,

%25, %50, %100, %200, %500, %1,000, %5,000 veya %10,000) oranında daha büyük olan hücre tipinde birikebilen (örneğin, ya hücre artırımsız taşınmadan ya da hücreden azaltılımsız atımdan ya da bunların bir kombinasyonundan dolayı) bir vektör veya konjugat ifade edilebilmektedir.

5

“Büyük ölçüde saf” veya “izole edilmiş” ile, diğer kimyasal bileşenlerden ayrılan bir bileşik (örneğin, bir polipeptit veya konjugat) ifade edilmektedir. Tipik olarak, bileşen, diğer bileşenlerden ayrılmaya en az %30 oranında bağlanımsız olduğunda büyük ölçüde saftır. Belirli yapılandırılmalarda, preparasyon, diğer bileşenlerden ayrılmaya en az %50, %60, %75, %85, %90, %95, %96, %97, %98 veya %99 oranında bağlanımsızdır. Bir saflaştırılımsız polipeptit, örneğin bu tür bir polipeptidi kodlayan bir rekombinant polinükleotidin ekspresyonu ile veya polipeptidin kimyasal olarak sentezlenmesi ile elde edilebilmektedir. Saflığı herhangi bir uygun yöntemle, örneğin, kolon kromatografisi, poliakrilamid jel elektroforez veya HPLC analizi ile ölçülebilmektedir.

15

Bir maddeden “büyük ölçüde bağlanımsız olan” bir farmasötik bileşim, bir bileşimde bir maddenin miktarının, bir bileşimin kuru ağırlığına %5, %4, %3, %2, %1, %0.5, %0.3, %0.2, %0.1, %0.05 veya %0.01’inden daha az olduğunu ifade etmektedir.

20

“Büyük ölçüde özdeş” ile, bir referans amino aside veya nükleik asit sekansına en az %35, %40, %50, %55, %60, %65, %70, %75, %85, %90, %95, hatta %99 oranında özdeşlik sergileyen bir polipeptit veya nükleik asidi ifade etmektedir. Polipeptitlere yönelik olarak, karşılaştırılma sekanslarının uzunluğu genel olarak en az 4 (örneğin en az 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, veya 100) amino asit olacaktır. Nükleik asitlere yönelik olarak, karşılaştırılma sekanslarının uzunluğu genel olarak, en az 60 nükleotit, tercihen en az 90 nükleotit, veya daha tercihen en az 120 nükleotit veya tam uzunlukta olabilmektedir. Burada boşlukların, orijinal polipeptidin amino asitlerine özdeş veya benzer olan bir analogun amino asitleri arasında bulunabildiği anlaşılmalıdır. Boşluklar, amino asit, orijinal polipeptide özdeş veya benzer olmayan bir veya daha fazla amino asit kapsamayabilmektedir. Vektörlerin (polipeptitlerin) biyolojik olarak aktif analogları bununla kapsamaktadır. Yüzde özdeşlik, örneğin, varsayılan boşluk ağırlıkları kullanılarak, Wisconsin Genetics Yazılım Paketi Sürüm 7.0’da n algoritması, GAP, BESTFIT veya FASTA ile saptanabilmektedir.

35

“Fragment” ile, bir orijinal veya ebeveyn sekansının bir bölümünden veya söz konusu

ebeveyn sekansından bir analogundan kaynaklanan bir polipeptit ifade edilmektedir. Fragmentler, bir veya daha fazla amino asidin kesikliğine sahip olan polipeptitleri kapsamaktadır burada kesiklik, amino-uç (N-ucu), karboksi uç (C-ucu) veya proteinin iç kısmından kaynaklanabilmektedir. Bir fragment, orijinal sekansın karşılık gelen bölümü ile aynı sekansı kapsayabilmektedir. Burada açılan vektörün (polipeptit) fonksiyonel fragmentleri tarifname ile kapsamaktadır. Fragmentler, en az 5 (örneğin, en az 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 100, veya 150) amino asit olabilmektedir. Buluşa ait fragmentler, örneğin 7, 8, 9 veya 10 amino asit ile 18 amino asitlik bir polipeptidi kapsayabilmektedir. Fragmentler, burada açılan modifikasyonlardan herhangi birini barındırabilmektedir (örneğin, asilasyon, amidasyon, amino asit ikameleri).

“Doğal olarak oluşan amino asit” bir memelide doğal olarak üretilmeyen veya bulunmayan bir amino asittir.

15

“Ajan” ile, herhangi bir bileşik, örneğin, bir antikor, veya bir terapötik ajan, bir markör, bir izleyici, veya bir görüntüleme bileşiği ifade edilmektedir.

“Terapötik ajan” ile, bir biyolojik etkinliğe sahip olan bir ajan ifade edilmektedir. Bazı durumlarda, terapötik ajan, bir hastalığın semptomlarını, bir fiziksel veya mental durumun, bir hasarı veya bir enfeksiyonun tedavi edilmesi için kullanılmaktadır ve merkezi sinir sistemi seviyesinde aktif olan anti-kanser ajanları, antibiyotikleri, anti-anjiyojenik ajanları ve molekülleri kapsamaktadır.

“Küçük moleküllü ilaç” ile, 1000 g/mol veya daha az (örneğin, 800, 600, 500, 400, veya 200 g/mol’den daha az) bir molekül ağırlığına sahip olan bir ilaç ifade edilmektedir.

“Süje” ile bir insan veya insan olmayan hayvan ifade edilmektedir (örneğin, bir memeli).

Bir süjede bir hastalığın, rahatsızlığın veya durumun “tedavi edilmesi” ile, bir terapötik ajanın süjeye uygulanması ile hastalığın, rahatsızlığın veya durumun en az birinin azaltılması ifade edilmektedir.

Bir süjede bir hastalığın, rahatsızlığın veya durumun “profilaktik olarak tedavi edilmesi” ile, bir terapötik ajanın süjeye uygulanması ile hastalığın, rahatsızlığın veya durumun oluşum

sıklığı azaltılması (örneğin, önlenmesi) ifade edilmektedir.

5 "Kanser" ile, benzersiz özelliğinin, düzenlenmemiş büyüme, farklılaşma eksikliği veya dokulara istila etme ve metastaz yeteneği ile sonuçlanabilen normal kontrollerin kaybolduğu herhangi bir hücresel profilerasyonu ifade etmektedir. Kanser, herhangi bir doku veya herhangi bir organda gelişebilmektedir. Kanserin, sınırlama olmada, beyin, karaciğer, akciğer, böbrek veya dalak kanserini kapsamaması amaçlanmaktadır. Ek kanserler burada açıklanmaktadır.

10 "Uygulanması" ve "uygulama" ile, sınırlama olmadan, oral olarak, intra-arter olarak, intranasal olarak, intraperitoneal olarak, intravenöz olarak, intramusküler olarak, subkütan olarak, transdermal olarak veya ağzından kapsayan bir iletim biçimi ifade edilmektedir. Bir günlük dozaj, bir zaman periyodu boyunca bir, iki veya daha fazla zamanda uygulanacak olan uygun bir formda bir, iki veya daha fazla doza bölünebilmektedir.

15 "Terapötik olarak etkili" veya "etkili miktar" ile, tedavi edilen hastalığı veya durumun herhangi bir semptomunun iyileştirilmesi, azaltılması, önlenmesi, geciktirilmesi, bastırılması veya durdurulması için yeterli olan bir terapötik ajan miktarı ifade edilmektedir. Terapötik olarak etkili miktarda bir ajanla, bir hastalığı veya durumu iyileştirmesi gerekmemektedir ancak hastalığı veya durumun başlangıcını geciktirecek, engelleyecek veya önleyecek şekilde veya hastalığı veya durum semptomlarını iyileştirilecek veya hastalığı veya durumun koşulu değiştirilecek, örneğin daha az şiddetli olacak veya iyileşme bir bireyde hızlandırılacak şekilde bir hastalığa veya duruma yönelik bir tedavi sağlayacaktır.

25 Bir "aralık" veya "maddeler grubu", bir özel karakteristiğe nispeten bahsedilmekte ise (örneğin sıklık, konsantrasyon, zaman ve benzeri), buluş, burada her bir ve her spesifik eleman ve buradaki alt-aralıklar ve alt-grupların kombinasyonu ile ilgilidir ve bunlar açıkça dahil etmektedir. Bu yüzden, örneğin, 9 ila 18 arasında amino asidin uzunluğuna istinaden, burada her bir ve her ayrı uzunluğun, örneğin 18, 17, 15, 10, 9 uzunluğu ve bunların arasında herhangi bir sayıyı spesifik olarak dahil edildiği anlaşılmalıdır. Bu yüzden, spesifik olarak bahsedilmedikçe, burada bahsedilen her bir aralığı kapsayıcı olduğu anlaşılmalıdır. Örneğin, 5 ila 19 amino asit uzunluğunda ifadesinde 5 ila 19 dahil edilecektir. Bu durum benzer şekilde, sekanslar, uzunluk, konsantrasyonlar, elementler ve benzeri gibi diğer parametrelere istinaden geçerlidir.

35

Burada belirlenen sekanslar, bölgelerin, bölümlerin her biri, bu şekilde açılan her bir ve her ayrı sekans bölgesi ve bölümü bunun yanı sıra her bir ve her olası alt-sekans alt-bölgeyi, ve alt bölümü, bu tür sekanslar, alt bölgelerin ve alt bölümlerin özel olmaları veya bunların bir kombinasyonunu hariç tuttuğu şekilde, pozitif olarak özel olmaları kapsadığı şekilde belirlenmesine bakılmaksızın kapsamaktadır. Örneğin, bir bölgeye yönelik olarak bir dizi için şu şekilde okunabilmektedir: "söz konusu polipeptidin 4, 5, 6, 7, 8 veya 9 amino asitten daha kısa olması şartıyla. Bir negatif sınırlamanın başka bir örneği şu şekildedir: SEKANS KİMLİK NUMARASI: Y'ye ait bir polipeptidin hariç tutulması ile SEKANS KİMLİK NUMARASI: X'i kapsayan bir sekans; vb. Negatif sınırlamanın ek bir örneğinin şu şekildedir: söz konusu polipeptidin SEKANS KİMLİK NUMARASI: Z'yi (kapsamaması veya bundan oluşmaması) şartıyla.

Buluşun diğer özellikler ve avantajları aşağıdaki Ayrıntılı Açıklamadan, Şekillerden ve İstemlerden belirgin olacaktır.

15

Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1 ANG1005'i kapsayan bir farmasötik bileşim hazırlamaya yönelik bir örnekleyici yöntemin bir şematik tasviridir.

Şekil 2 zaman için klinik kullanılan koşullar altında D5W'de 1.0 mg/ml'ye Enjeksiyon ile seyreltilmesi için sulandırılmış ANG1005'in HPLC profillerini gösteren bir grafikdir.

Şekil 3 2.0 mg/mL ve ~6sa depolamada numuneden toplanan ve DMSO'da çözündürülen santrifüj edilen sedimentin HPLC profilini gösteren bir grafikdir.

Ayrıntılı Açıklama

Paklitaksel ve paklitaksel analogları veya bunların konjugatları (örneğin, ANG1005) kapsayan hidrofobik terapötik ajanlar için faydalı olan farmasötik formülasyonlar ve bu tür formülasyonlar ile farmasötik bileşimler üretmeye ve uygulamaya yönelik yöntemler geliştirilmiştir. Hidrofobik terapötik ajanlar (örneğin, paklitaksel) sıklıkla hidrofobik çözücülerde çözündürülmektedir (ve, aslında, sıklıkla gerektirmektedir). Paklitaksele yönelik yaygın olarak kullanılan çözücüler, hastalar tarafından iyice tolere edilemeyen Cremophor ve DMSO'yu kapsamaktadır. Cremophor, özellikle, anafilaktik tepkimelere yol açabilmektedir, böylelikle kortikosteroidler gibi ajanlar ile ön tedavi gerektirmektedir. Bu tür kötü bir şekilde tolere edilen çözücülerden kaçınması için, örnekleyici polipeptit-paklitaksel konjugatları,

35

ANG1005 yönelik yeni formülasyonlar geliştirilmiştir. Burada açılan formülasyonlar, Cremophor kullanılmadan üretilmeleri, düşük bozunum ve yüksek etkinlikte aktif ajan ile sonuçlanacak şekilde minimal DMSO konsantrasyonları için hazırlanabilmeleri, ve geleneksel yöntemler kullanılmadan üretilmeleri bakımından avantajlıdır. Kötü bir şekilde tolere edilen yardımcı maddeleri barındırmayan bileşimler, yüksek dozlarda hastalara uygulanabilmektedir, daha hızlı olarak uygulanabilmektedir (örneğin, intravenöz uygulama durumunda), daha sıkı uygulanabilmektedir veya bu tür yardımcı maddelere toleransın arttırılması için ajanlar (örneğin, kortikosteroidler) ile ön tedavilere ihtiyaç duyulmasını önleyebilmektedir.

10

ANG1005'e yönelik bir formülasyonun geliştirilmesi

Örnekleyici hidrofobik ajanın, ANG1005 bir yeni formülasyonunun geliştirilmesinde, ilk olarak çeşitli çözücülerde ve çözücülerin kombinasyonlarında bunun çözünürlüğünü test ettik. Örnek 1'de özetlendiği üzere ve paklitaksel ile olduğu üzere, ANG1005, sulu çözeltilerde düşük çözünürlüğe sahiptir ancak DMSO'da oldukça çözünürdür (120 mg/ml). ANG1005 aynı zamanda 75°C'de (6 mg/ml) etanol ile Solutol HS 15'te (BASF, Parsippany, N.J.) çözünürdür. Düşük toksisitesi ve ilaç ile uyumundan dolayı Solutol HS 15, bir çözücü ajan olarak seçilmiştir. Bununla birlikte, Solutol HS 15'in kendi başına çözündürülmesi, ANG1005'in büyük oranda bozunumu ile sonuçlanmıştır. ANG1005'in çözündürülmesi için, Solutol HS 15, en az 65°C'ye ısıtılmalıdır. Ek olarak, tamponlanmamış Solutolün 25°C'den 50°C'ye ısıtılması, pH'ın 6.0'dan 9.0'a arttırılması belirtilmelidir. Bu yüzden, yüksek sıcaklık ve yüksek pH kombinasyonu muhtemelen, bu koşullar altında ANG1005'in gözlemlenen düzensizliğine katkı sağlamaktadır.

25

Aşırı bozunumdan kaçınması için, ANG1005 ilk olarak, 50°C Solutolün eklenmesinden önce (bakınız Örnek 2) asitleştirilmiş DMSO'da (pH 3.5 ila 4.0) çözündürülmüştür. ANG1005'in daha fazla stabilize edilmesi için, ANG1005'in çözünürlüğün muhafaza eden pH 5.0'da glisin ile ön karıştırılmayla Solutol HS 15 asitleştirilmiştir. Bunu gerçekleştirerek ANG1005'in bozunumu en aza indirilmiştir. ANG1005'in çözünürlüğü etkilenmeden ANG1005'in eklenmesinden önce Solutole en fazla %20 (örneğin, %1, %5, %10, veya %15) oranında tamponun eklenmesi mümkün iken, Solutol ile büyük miktarda tamponun karıştırılması tamamlanmamış çözünme ile sonuçlanmaktadır.

30

ANG1005 stabilitesinin temin edilmesi için, formülasyon, ANG1005 pH 6 ve yukarıda artan

5 bir şekilde düzensiz olduğunu gözlemlediğimiz için, pH 5'te glisin ile tamponlaması sulu çözeltide seyreltilmiştir. Asetat ve fosfat kapsayan bu pH aralığındaki diğer tamponlar değerlendirilmiştir, ancak bunlar formülasyon ile daha az uyumludur. Aynı zamanda nihai pH'ı 4'e indirgeyerek ANG1005'in stabilize edilmesine çalışılmıştır ancak sonuçta oluşan liyofilize kek bir berrak çözeltiye yeniden düzenlenmemiştir.

Örnekleyici ANG1005 bileşimi aşağıdaki Tablo 5'te sunulmaktadır

Tablo 5: Enjeksiyona yönelik ANG1005'te Bileşen Fonksiyonu

Bileşen	Amaç	Hedef Miktar/Yığılı	Hedef Miktar/flakon
ANG1005	API	60 g	120 mg
Sodyum klorür, USP	Ozmolarite	290 g	580 mg
Glisin	Tampon	150 g	300 mg
Manitol	Hacim artırıcı ajan	260 g	520 mg
Solutol HS 15	API'nin çözülmesi	2000 ml	4 ml
DMSO	Liyofilizasyondan önce API'nin çözülmesi	500 ml ¹	1 ml ¹
HCl	pH ayarlaması	pH'ın ayarlanması için	
Enjeksiyonluk su, USP	Çözücü	Yeterli miktara kadar 10 L ¹	20 ml ¹ 'ye

¹Liyofilizasyon ile giderilmiş

10 Hacim artırıcı ajanlar aynı zamanda liyofilize ürünün yeniden düzenlenmesini kolaylaştırması için eklenmiştir. Formülasyonları barındıran hem manitol hem de sorbitol değerlendirilmiştir. Manitol üstün bir kek vermiştir.

Liyofilizasyon

15

DMSO/Solutol/tampon preparasyonu arzu edilmeyen seviyelerde DMSO barındırıldığı ve yeterince stabil olmadığı için, DMSO'nun azaltılması ve ANG1005'in artırılması için tasarlanan bir liyofilizasyon protokolü geliştirilmiştir. Çok sayıda alternatif liyofilizasyon döngüsü, DMSO içeriğinin en aza indirilmesi için değerlendirilmiştir (yani, ikincil kurutmanın uzunluğunun ve sıcaklığının artırılması bakınız Örnek 3). Liyofilizasyon koşulları aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Bir birinci liyofilizasyon protokolü denenmiştir ve bu prosedür %1'den daha fazla DMSO konsantrasyonları ile sonuçlanmıştır. Bu prosedürün ayrıntıları Tablo 6'da gösterilmektedir.

20

Tablo 6

Enjeksiyona yönelik ANG1005 için Liyofilizasyon Döngüsü			
Adım	Sıcaklık	Vakum	Tutma süresi
Yükleme	$\leq -40^{\circ}\text{C}$	Atmosferik	UYGULANAMAZ
Dondurma	$\leq -40^{\circ}\text{C}$	Atmosferik	3 ± 1 saat
Birincil Kurutma	$\geq -25^{\circ}\text{C}$	50 mT	90 ± 1 saat
İkincil Kurutma	$> 22^{\circ}\text{C}$	50 mT	9 ± 1 saat
Tıkama	$\geq 22^{\circ}\text{C}$	5-10 mmHg	UYGULANAMAZ

Bir optimize iki adımlı kurutma prosedürü kullanılarak, %1'den daha da az DMSO konsantrasyonunu indirgeyebildik. Kesacasın ürünün dondurulması takiben, liyofilizasyon, 5 üründen suyun çoğunun giderilmesi için yeterli bir süre boyunca ve bir raf sıcaklığında gerçekleştirilmektedir. Raf sıcaklığı yükseltilmiştir ve ürün DMSO'nun giderilmesi için uygun bir sıcaklığa kurutulmuştur. Tam koşullar, kurutulan numunenin hacmine, kullanılan basınç ve sıcaklığa ve kullanılan formülasyon ve tamponlara bağlı olarak değişecektir. Burada açıklanan prosedüre dayanarak, teknikte uzman kişi, burada açıklanan bileşimlerin üretilmesi için uygun kurutma koşulları saptayabilecektir.

10

Bir örnekleyici prosedürde, formül, -70 ve $+25^{\circ}\text{C}$ (örneğin, -40°C) arasında bir sıcaklıkta yüklenmektedir. Sıcaklık sonrasında, çözeltinin soğutulması için yeterli olan ayarlı bir sıcaklığa arttırılmaktadır (-40°C gibi 0°C ve -70°C arasındaki herhangi bir sıcaklık) ve sıcaklık ürünün dondurulması için yeterli bir süre boyunca ve tercihen liyofilizasyon kekinin çökelmeyeceğinin 15 temin edilmesi için yeterli bir süre boyunca bu sıcaklıkta tutulmaktadır. -40°C 'de, en az 12 saatlik (örneğin en az 15, 18, 20, 24, 36 veya 48 saat) dondurma süresinin kekin çökelmemesinin temin edilmesi için gerekli olduğunu saptadık. Dondurmayı takiben, vakum, birincil kurutma döngüsü için üründen suyun giderilmesi için yeterli olan bir basınç (örneğin, 10-500 mT gibi 20, 50, 100, 200, veya 500 mT) ve sıcaklık (örneğin -25°C gibi -15 ila -35°C) ayarlanmıştır. Bu amaçla, 10 ila 100 mT arasındaki basınçlar, bulgularda minimal varyasyon ile test edilmiştir. Kurutma süresi, üründe bulunan suyun büyük bir bölümünün (örneğin, en az %50, %60, %70, %80, %90, %95, %98, %99, %99.5, %99.9) giderilmesi için yeterli bir süre boyunca (örneğin, en az 6 saat, 12 saat, 1 gün, 2 gün, 4 gün, 6 gün, 8 gün, 10 gün, veya 14 gün) olabilmektedir. Birincil kurutma döngüsünü takiben, DMSO'nun 20 giderilmesi için bir ikincil kurutma döngüsü gerçekleştirilmiştir. Ürün, DMSO'nun giderilmesi için $10-30^{\circ}\text{C}$ (örneğin, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, veya 27°C) arasında daha yüksek bir sıcaklığa arttırılmıştır. Tercih edilen bir yapılandırılmada, raf sıcaklığı 2 saat boyunca 27°C 'ye arttırılmıştır ve sonrasında bir saat boyunca 27°C 'de tutulmuştur. Raf sıcaklığı sonrasında, 30

25

5 dakika boyunca 23 ve 27°C arasında arttırılır (veya muhafaza edilmiştir) ve sonrasında en az bir 10 saat daha (örneğin, en az 15, 20, 25, 30, 40, 48, 60, veya 72 saat) bu sıcaklıkta tutulmuştur. Kalıtım DMSO'nun erimesinin önlenmesi için, ürün 25°C'nin altında tutulabilmektedir. Bu yöntemle yönelik bir örnekleyici protokol Tablo 7'de gösterilmektedir.

5 Liyofilizasyon, bir Hull Freezer Dryer, Model 72FS100-SS20C kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7

Segment	Çalışma	Sıcaklık	Zaman
1	Yük Ayar Noktası	-40°C	UYGULANAMAZ
DONDURMA			
2	Raf Artır	-40°C	0 dakika
3	Raf Tut	-40°C	420 ila 1440 dakika
BİRİNCİL KURUTMA			
Adım 4 ila 7'ye yönelik olarak vakum kontrolünü 50mT'ye ayarla & yoğunlaştırıcı kontrolünü -50°C'ye ayarla			
4	Raf Artır	-25°C	120 dakika
5	Raf Tut	-25°C	5760 dakika
İKİNCİL KURUTMA			
6	Raf Artır	27°C	120 dakika
7	Raf Tut	27°C	60 dakika
8	Raf Artır	23 ila 27°C	30 dakika
9	Raf Tut	23 ila 27°C	900 ila 1200 dakika

Ürünün Sulandırılması

10 Ürünün laboratuvar analizi veya bir hastaya enjeksiyondan önce, liyofilize ürün sulandırılabilir. Herhangi bir tampon, çözücü ve tamponun(tamponlar) ve çözücünün(çözücülerin) kombinasyonu sulandırmaya için kullanılabilir; tampon önemli değildir. Bununla birlikte, aktif ajanın çözeltide yeterince stabil olması ve kullanılan tamponun(tamponlar) veya çözücünün(çözücülerin) hastalara uygulama için çözeltilerde hastalar tarafından yeterince iyi tolere edilmesi sıklıkla arzu edilmektedir. ANG1005'in

15 durumunda, ürün, pH 6.0'ın yukarısında daha az stabil olduğu için, pH'ın 6.0'ın altında muhafaza eden bir sulandırmaya çözücüsü/tamponunun kullanılması genellikle arzu edilmektedir. ANG1005'e yönelik olarak, bir tercih edilen çözücü sistemi, etanol ve laktat Ringer/%5 Dekstrozun bir kombinasyonudur. Bu sistemde etanol, ürünü barındıran flakona

20 eklenmektedir, nazikçe karıştırılmaktadır ve sonrasında laktat Ringer/%5 Dekstroz ürünün çözdürülmesi için eklenmektedir. Seyrelticiler olarak enjeksiyon (WFI) veya saline yönelik olarak geleneksel suyun kullanılması ANG1005'in bozunumuna yol açan, yüksek pH seviyeleri

vermiştir. Çözünmeyi takiben, karışımı ayrıca su veya diğer tampon sistemlerinde seyreltilmektedir. Liyofilize ürünün sulandırılmasına yönelik örnekleyici koşullar aşağıdaki Örnek 4'te ayrıca açıklanmaktadır

5 Formülasyon Bileşimleri

Yukarıda açıkladığı üzere, hastalara uygulama için uygun olan örnekleyici hidrofobik ajan, ANG1005'in formülasyonları geliştirdik. Liyofilizasyondan önce, formülasyon, belirli yapılandırılmalarda, DMSO'nun önemli bir oranını barındırabilmektedir. Bu tür bileşimler, Tablolar 8A ve 8B'de gösterildiği üzere şu bileşenlere (örneğin kuru ağırlık) sahip olabilmektedir. Tablo 8C, liyofilizasyondan önce sulu çözeltide çeşitli bileşenin örnekleyici konsantrasyonları göstermektedir.

Tablo 8A Suyu kapsamayan ağırlıkça yüzde

Bileşik	Yüzde (ağırlıkça)	Tercih edilen yüzdelere	Örnekleyici yüzdelere
ANG1005	%0.1 ila 5	%1 ila 3	%1.8
Tonite ajanı (örneğin, sodyum klorür)	%1 ila 15	%5 ila 12	%8.6
Tampon (örneğin, glisin)	%1 ila 10	%3 ila 7	%4.5
Hacim artırıcı ajan (örneğin, manitol)	%0 ila 15	%5 ila 12	%7.7
Solutol HS 15	%40 ila 75	%50 ila 70	%61.1
DMSO	%3 ila 20	%10 ila 20	%16.3

15

Tablo 8B Sulu çözeltide yüzde (önlilyofilizasyon)

Bileşik	Yüzde (ağırlıkça)	Tercih edilen yüzdelere	Daha tercih edilen yüzdelere	Örnekleyici yüzdelere
ANG1005	%0.05 ila 1.5	%0.1 ila 1.0	%0.2 ila 0.8	%0.55
Tonite ajanı (örneğin, sodyum klorür)	%0.1 ila 10	%0.5 ila 6	%1 ila 3	%2.7
Tampon (örneğin, glisin)	%0.05 ila 5	%0.1 ila 4	%0.5 ila 1.5	%1.4
Hacim artırıcı ajan (örneğin, manitol)	%0 ila 5	%0.2 ila 4	%1.0 ila 3.0	%2.4
Solutol HS 15	%1 ila 40	%3 ila 30	%10 ila 25	%19.0
DMSO	%0.5 ila 15	%1 ila 10	%2 ila 8	%5.0
Su	%25 ila 85	%50 ila 80	%65 ila 75	%69.0

Tablo 8C: Konsantrasyonlar (mg/ml) önlüyofilizasyon sulu çözeltisi

Bileşik	Konsantrasyon (mg/ml)	Tercih edilen Konsantrasyonlar	Daha Tercih Edilen Konsantrasyonlar	Örnekleyici Konsantrasyonlar
ANG1005	0.1 ila 10.0	2 ila 7	4 ila 6.5	6.0
Tonisite ajanı (örneğin, sodyum klorür)	5 ila 200	10 ila 100	10 ila 50	29
Tampon (örneğin, glisin)	1 ila 200	3 ila 100	5 ila 25	15
Hacim artırıcı ajan (örneğin, manitol)	0 ila 100	2 ila 50	5 ila 35	26
Solutol HS 15	10 ila 400	20 ila 300	50 ila 250	206
DMSO	1 ila 200	15 ila 200	30 ila 100	55

Bileşim tipik olarak liyofilizasyondan önce suda seyreltilmektedir (liyofilizasyon koşulları bakımından aşağıya bakınız). Çoğu klinik uygulamalara yönelik olarak, çözelti, ANG1005'in tek dozluk uygulaması için uygun miktarlara bölünmektedir (örneğin, yaklaşık 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 200, 240, 300, 400, veya 500 mg). Liyofilizasyondan sonra (örneğin burada açıklanan koşullar altında), DMSO konsantrasyonu büyük oranda azaltılabilmektedir. Liyofilizasyondan sonra, buluşa ait bir ANG 1005 bileşimi, Tablo 9'da gösterildiği üzere aşağıdaki karakteristiklere (örneğin kuru ağırlık) sahip olabilmektedir.

Tablo 9

Bileşik	Yüzde (ağırlıkça) (açıklanan)	Tercih edilen yüzdeler (açıklanan)	Daha tercih edilen yüzdeler	Örnekleyici yüzdeler (%0.5 DMSO)
ANG1005	%0.1 ila 5	%1.5 ila 3	%1.8 ila 2.3	2.11
Tonisite ajanı (örneğin, sodyum klorür)	%0 ila 15	%0 ila 12	%9 ila 11	10.18
Tampon (örneğin, glisin)	%1 ila 10	%3 ila 7	%4.5 ila 6	5.27
Hacim artırıcı ajan (örneğin, manitol)	%0 ila 15	%5 ila 12	%8 ila 10	9.13
Solutol HS 15	%40 ila 75	%50 ila 70	%69 ila 75	72.32
DMSO	%0.01 ila 10	%0.1 ila 5	%0.2 ila 0.5	0.50

10

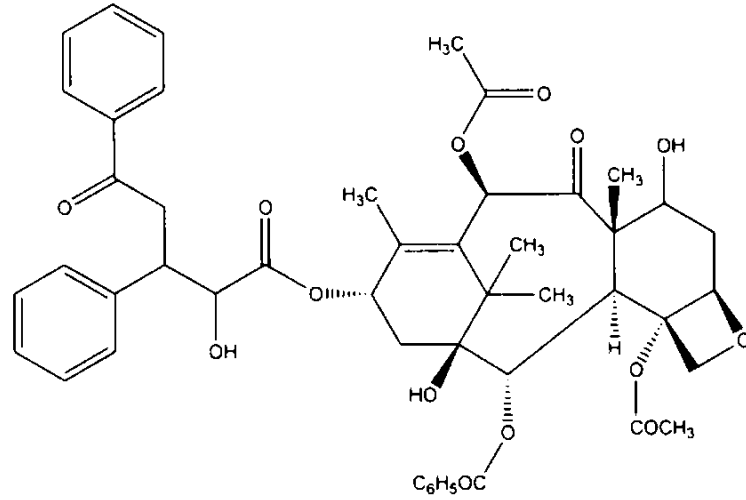
Hidrofobik ajanlar

Herhangi bir hidrofobik ajanın, bileşimlerde ve yöntemlerde kullanılabileceği açıklanmaktadır. Örnekleyici bileşikler aşağıda açıklanmaktadır.

15

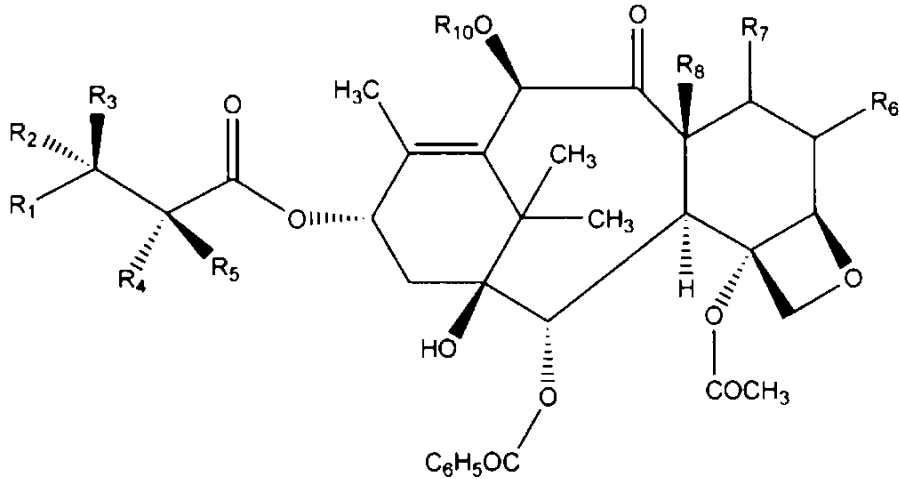
Paklitaksel ve ilgili bileşikler

Buluş, ANG1005, bir AngioPep2-paklitaksel konjugat içeren bir liyofilize bileşim ile ilgilidir. Burada açıklanan formülasyonlar, paklitaksel, paklitaksel analoglar veya bunların konjugatları ile kullanılabilmektedir. Paklitaksel şu formüle sahiptir:



Paklitakselin yapısal analogları, 6,911,549 numaralı U.S. Patent dokümanında açıklanmaktadır ve şu formül ile açıklanabilmektedir:

10



burada R₁; -CH₃; -C₆H₅, veya bir, 2 veya 3 C₁-C₄ alkil ile ikame edilen fenil, C₁-C₃ alkoksi, halo, C₁-C₃ alkiltiy, triflorometil, C₂-C₆, dialkilamino, hidroksil veya nitro; ve -2-furil, 2-tienil, 1-naftil, 2-naftil veya 3,4-metilendioksifenilden oluşan gruptan seçilmektedir; R₂; -H,-
15 NHC(O)H,-NHC(O)C₁-C₁₀ alkil (tercihen -NHC(O)C₄-C₆ alkil), -NHC(O)fenil, bir, 2 veya 3 C₁-C₄ alkil ile ikame edilen -NHC(O)fenil, C₁-C₃ alkoksi, halo, C₁-C₃ alkiltiy, triflorometil, C₂-C₆ dialkilamino, hidroksi veya nitro, -NHC(O)C(CH₃)=CHCH₃, -NHC(O)OC(CH₃)₃, -NHC(O)OCH₂

fenil, -NH₂, -NHSO₂-4-metilfenil, -NHC(O)(CH₂)₃COOH, -NHC(O)-4-(SO₃H)fenil, -OH,
 -NHC(O)-1-adamantil, -NHC(O)O-3-tetrahidrofuranil,-NHC(O)O-4-tetrahidropiranil,
 -NHC(O)CH₂C(CH₃)₃, -NHC(O)C(CH₃)₃, -NHC(O)OC₁-C₁₀ alkil, -NHC(O)NHC₁-C₁₀
 alkil, bir, 2 veya 3 C₁-C₄ alkil ile ikame edilen -NHC(O)NHPH,-NHC(O)NHPH, C₁-C₃ alkoksi,
 5 halo, C₁-C₃ alkiltiyo, triflorometil, C₂-C₆ dialkilamino veya nitro, -NHC(O)C₃-C₈ sikloalkil,
 -NHC(O)C(CH₂CH₃)₂CH₃, -NHC(O)C(CH₃)₂CH₂Cl,-NHC(O)C(CH₃)₂CH₂CH₃, fthalimido, -NHC(O)-
 1-fenil-1siklopentil,-NHC(O)-1-metil-1- sikloheksil, -NHC(S)NHC(CH₃)₃, -NHC(O)NHCC(CH₃)₃
 veya -NHC(O)NHPH'den oluşan gruptan seçilmektedir; R₃, genel olarak R₂ ve R₃'ten birinin,
 -H olmaması ancak R₂ ve R₃'ün her ikisi -H olması şartı ile -H, -NHC(O)fenil veya
 10 -NHC(O)OC(CH₃)₃'ten oluşan gruptan seçilmektedir; R₄, -OH,-OAc (-OC(O)CH₃), -OC(O)OCH₂
 C(Cl)₃, -OCOCH₂CH₂NH₃⁺HCOO⁻, -NHC(O)fenil, -NHC(O)OC(CH₃)₃, -OCOCH₂CH₂COOH ve
 bunun farmasötik olarak kabul edilebilir kabul edilebilir tuzlarından, -OCO(CH₂)₃COOH ve
 bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarından ve -OC(O)-Z-C(O)-R''den oluşan gruptan
 seçilmektedir [burada Z, etilen(-CH₂CH₂-), propilen (-CH₂CH₂CH₂-), -CH=CH-, 1,2-sikloheksan
 15 veya 1,2-fenilendir, R', -OH, -OH bazı -NR'₂R'₃, -OR'₃, -SR'₃, -OCH₂C(O)NR'₄R'₅'tir burada R'₂
 -H veya -CH₃, R'₃ is -(CH₂)_nNR'₆R'₇ veya (CH₂)_nN⁺R'₆R'₇R'₈X'tir. burada n, 1 ila 3'tür, R'₄ -H
 veya -C₁-C₄ alkildir, R'₅ -H. -C₁-C₄ alkil, benzil, hidroksietil, -CH₂CO₂H veya dimetilaminoetildir,
 R'₆ ve R'₇ -CH₃, -CH₂CH₃, benzildir veya NR'₆R'₇'nin nitrojeni ile birlikte R'₆ ve R'₇, pirrolidino,
 piperidino, morfolino veya N-metilpiperizino grubunu oluşturmaktadır; R'₈ -CH₃, -CH₂CH₃ veya
 20 benzil, X halojenürdür ve baz NH₃, (HOC₂H₄)₃N, N(CH₃)₃, CH₃N(C₂H₄)₂NH, NH₂(CH₂)₆NH₂, N-
 metilglukamin, NaOH veya KOH], -OC(O)(CH₂)_n NR² R³'tür [burada n, 1 ila 3'tür, R², -H veya -
 C₁-C₃ alkildir ve R₃, -H veya -C₁-C₃ alkyl], -OC(O)CH(R'')NH₂'dir [burada R'', -H, -CH₃, -CH₂
 CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂ fenil,-(CH₂)₄NH₂, -CH₂CH₂COOH,
 -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂], amino asit prolinin kalıntısı -OC(O)CH=CH₂,
 25 -C(O)CH₂CH₂C(O)NHCH₂CH₂SO₃⁻ Y⁺, -OC(O)CH₂CH₂C(O)NHCH₂CH₂CH₂SO₃⁻ Y⁺'den oluşan
 gruptan seçilmektedir burada Y⁺, Na⁺ veya N⁺(Bu)₄, -OC(O)CH₂CH₂C(O)OCH₂CH₂OH'dir; R₅,
 R₅'in -OH olması şartı ile, R₄'ün -H olması şartı ile ve ayrıca R₅'in -H olması R₄'ün -H olmaması
 şartı ile -H veya -OH'dir; R₆, R₇ α-R₇₁:β-R₇₂ olduğunda -H:-H'dir burada R₇₁ ve R₇₂'den biri -
 H'dir ve R₇₁ ve R₇₂'den diğeri -X'tir burada X halodur ve R₈ -CH₃'tür; R₆, R₇ α-H: β-R₇₄
 30 olduğunda -H:-H'dir burada R₇₄ ve R₈ siklopropil halkasının oluşturulması için bir araya
 getirilmektedir; R₁₀, -H veya -C(O)CH₃; ve bileşiğin ya bir asidik ya da bazik fonksiyonel
 grubu barındırması durumunda bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları

Özel paklitaksel analogları ((azidofenil)ureido)taksoid, (2α,5,7β,9α,10β,13α)-5,10,13,20-
 35 tetrasetoksi-11-en-2,7,9-triol, (2α,5α,9α,10β)-2,9,10-triasetoksi-5-((β-D-

glukopiranosil)oksi)-3,11-siklotaks-11-en-13-on, 1 β -hidroksibakkatin I, 1,7-dihidroksitaksinin, 1-aseti-5,7,10-deasetil-bakkatin I, 1-dehidroksibakkatin VI, 1-hidroksi-2-deasetoksi-5-desinnamoil-taksinin j, 1-hidroksi-7,9-dideasetilbakkatin I, 1-hidroksibakkatin I, 10-asetil-4-deasetiltaksoter, 10-deasetoksipaklitaksel, 10-Deasetil bakkatin III dimetil sülfoksit disolvat, 5 10-deasetil-10-(3-aminobenzoil)paklitaksel, 10-deasetil-10-(7-(dietilamino)kumarin-3-karbonil)paklitaksel, 10-deasetil-9-dihidrotaksol, 10-deasetilbakkatin III, 10-deasetilpaklitaksel, 10-deasetiltaksinin, 10-deasetiltaksol, 10-deoksi-10-C-morfolinoetil dosetaksel, 10-O-asetil-2-O-(sikloheksilkarbonil)-2-debenzoiltaksoter, 10-O-sec-aminoetil dosetaksel, 11-desmetillaulimalid, 13-deokso-13-asetiloksi-7,9-diasetil-1,2-dideoksitaksin, 13-10 deoksibakkatin III, 14-hidroksi-10-deasetil-2-O-debenzoilbakatin III, 14-hidroksi-10-deasetilbakkatin III, 14 β -benzoiloksi-13-deasetilbakkatin IV, 14 β -benzoiloksi-2-deasetilbakkatin VI, 14 β -benzoiloksibakkatin IV, 19-hidroksibakkatin III, 2',2''-metilendosetaksel, 2',2''-metilenpaklitaksel, 2'-(valil-lösil-lisil-PABC)paklitaksel, 2'-asetiltaksol, 2'-O-asetil-7-O-(N-(4'-fluoreseinkarbonil)alanil)taksol, 2,10,13-triasetoksi-taksa-4(20),11-15 dien-5,7,9-triol, 2,20-O-diasetiltaksumairol N, 2-(4-azidobenzoil)taksol, 2-deasetokstaksinin J, 2-debenzoil-2-m-metoksibenzozil-7-trietilsilil-13-okso-14-hidroksibakkatin III 1,14-karbonat, 2-O-(sikloheksilkarbonil)-2-de-benzoilbakkatin III 13-O-(N-(sikloheksilkarbonil)-3-sikloheksilizoserinat), 2 α , 7 β ,9 α ,10 β ,13 α -pentaasetoksiltaksa-4 (20), 11-dien-5-ol, 2 α ,5 α ,7 β ,9 α ,13 α -pentahidroksi-10 β -asetoksitaksa-4(20),11-dien, 2 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13-20 pentaasetoksi- 11 β -hidroksi-5 α -(3'-N,N-dimetilamino-3'-fenil)-propioniloksitaksa-4(20),12-dien, 2 α ,7 β -diasetoksi-5 α ,10 β ,13 β -trihidroksi-2(3-20)abeotaksa-4(20), 11-dien-9-on, 2 α ,9 α -dihidroksi-10 β ,13 α -diasetoksi-5 α -(3'-metilamino-3'-fenil)-propioniloksitaksa-4(20),11-dien, 2 α -hidroksi-7 β ,9 α ,10 β ,13 α -tetraasetoksi-5 α -(2'-hidroksi-3'-N,N-dimetilamino-3'-fenil)-propioniloksitaksa-4(20),11-dien, 3'-(4-azidobenzamido)taksol, 3'-N-(4-25 benzoildihidrosinnamoil)-3'-N-debenzoilpaklitaksel, 3'-N-m-aminobenzamido-3'-debenzamidopaklitaksel, 3'-p-hidroksipaklitaksel, 3,11-siklotaksinin NN-2, 4-deasetiltaksol, 5,13-diasetoksi-taksa-4(20),11-dien-9,10-diol, 5-O-benzoillenmiş taksinin K, 5-O-fenilpropioniloksitaksinin A, 5 α ,13 α -diasetoksi-10 β -sinnamoiloksi-4(20),11-taksadien-9 α -ol, 6,3'-p-dihidroksipaklitaksel, 6- α -hidroksi-7-deoksi-10-deasetilbakkatin-III, 6-fluoro-10-30 asetildosetaksel, 6-hidroksitaksol, 7,13-diasetoksi-5-cinnamiloksi-2(3-20)-abeo-taksa-4(20),11-dien-2,10-diol, 7,9-dideasetilbakkatin VI, 7-(5'-Biyotinilamidopropanoil)paklitaksel, 7-asetiltaksol, 7-deoksi-10-deasetilbakkatin-III, 7-deoksi-9-dihidropaklitaksel, 7-epipaklitaksel, 7-metiliyometilpaklitaksel, 7-O-(4-benzoildihi-drosinnamoil)paklitaksel, 7-O-(N-(4'-fluoreseinkarbonil)alanil)taksol, 7-ksilosil-10-deasetiltaksol, 8,9-tek-epoksi brevifolin, 9-35 dihidrobakkatin III, 9-dihidrotaksol, 9 α -hidroksi-2 α ,10 β ,13 α -triasetoksi-5 α -(3'-N,N-

dimetilamino-3'-fenil)-propioniloksitaksa-4(20), 11-dien, bakkatin III, bakkatin III 13-O-(N-benzoil-3-sikloheksilizoserinat), BAY59, benzoiltaksol, BMS 181339, BMS 185660, BMS 188797, brevifoliol, butitaksol, sefalomannin, dantaksusin A, dantaksusin B, dantaksusin C, dantaksusin D, dibromo-10-deasetilsefalomannin, DJ927, dosetaksol, Flutaks 2, 5 glutarilpaklitaksol 6-aminoheksanol glukuronid, IDN 5109, IDN 5111, IDN 5127, IDN 5390, izolaualimalid, laulimalid, MST 997, N-(paklitaksol-2'-O-(2-amino)fenilpropionat)-O-(β -glukuronil)karbamat, N-(paklitaksol-2'-O-3,3-dimetil bütanoat)-O-(β -glukuronil)karbamat, N-debenzoil-N-(3-(dimetilamino)benzoil)paklitaksol, nonataksol, oktreotid-konjuge paklitaksol, Paklitaksol, paklitaksol-transferrin, PNU 166945, poli(etilen glikol)-konjuge paklitaksol-2'- 10 glisinat, poliglutamik asit-paklitaksol, protaksol, protaksol, RPR 109881A, SB T-101187, SB T-1102, SB T-1213, SB T-1214, SB T-1250, SB T-12843, tasumatrol E, tasumatrol F, tasumatrol G, taksa-4(20),11(12)-dien-5-il asetat, taksa-4(20),1 1(12)-dien-5-ol, taksan, takssinin N, taksokultin, taksezopidin M, taksezopidin N, taksin, taksinin, taksinin A, taksinin M, taksinin NN-1, taksinin NN-7, taksol C-7-ksiloz, taksol-sialil konjugat, taksumairol A, taksumairol B, 15 taksumairol G, taksumairol H, taksumairol I, taksumairol K, taksumairol M, taksumairol N, taksumairol O, taksumairol U, taksumairol V, taksumairol W, taksumairol-X, taksumairol-Y, taksumairol-Z, taksusin, taksuspinanan A, taksuspinanan B, taksuspin C, taksuspin D, taksuspin F, taksuiunnanin C, taksuiunnanin S, taksuiunnanin T, taksuiunnanin U, taksuiunnanin V, tRA-96023, ve vallifoliyolu kapsamaktadır Diğ er paklitaksol analoglar 20 1-deoksi paklitaksol, 10-deasetoksi-7-deoksi paklitaksol, 10-O-deasetil paklitaksol 10-monosüksinil ester, 10-süksinil paklitaksol, 12b-asetiloksi-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodekahidro 4,11-dihidroksi-12-(2,5-dimetoksibenziloksi)-4a,8,13,13-tetrametil-5-okso-7,11-metano-1H-siklodeka(3,4)benz(1,2-b)okset-9-il 3-(tert-büti-loksikarbonil)amino-2-hidroksi-5-metil-4-heksanoat, 130-nm albümin-bağ lı paklitaksol, 2'-paklitaksol metil 2-glukopiranosil 25 süksinat, 3'-(4-azidofenil)-3'-defenil paklitaksol, 4-fluoropaklitaksol, 6,6,8-trimetil-4,4a,5,6,7,7a,8,9-oktahidrosiklopenta(4,5)siklohepta(1,2-c)-furan-4,8-diol 4-(N-asetil-3-fenilizoserinat), 6,6,8-trimetil-4,4a,5,6,7,7a,8,9 oktahidrosiklopenta(4,5)siklohepta(1,2-c)-furan-4,8-diyol 4-(N-tert-butoksikarbonil-3-fenilizoserinat), 7-(3-metil-3-nitrosotiobütiril) paklitaksol, 7-deoksi paklitaksol, 7-süksinil paklitaksol, A-Z-CINN 310, AI-850, 30 albümin-bağ lı paklitaksol, AZ 10992, izotaksol, MAC321, MBT-0206, NK105, Paklieks, paklitaksol poliglumeks, paklitaksol-EC-1 konjugat polilaktofat, ve TXD 258'i kapsamaktadır Diğ er paklitaksol analoglar 4,814,470, 4,857,653, 4,942,184, 4,924,011, 4,924,012, 4,960,790; 5,015,744; 5,157,049; 5,059,699; 5,136,060; 4,876,399; ve 5,227,400 Numaralı U.S. Patent dokümanlarında aç ılanmaktadır

Diğer hidrofobik ajanlar

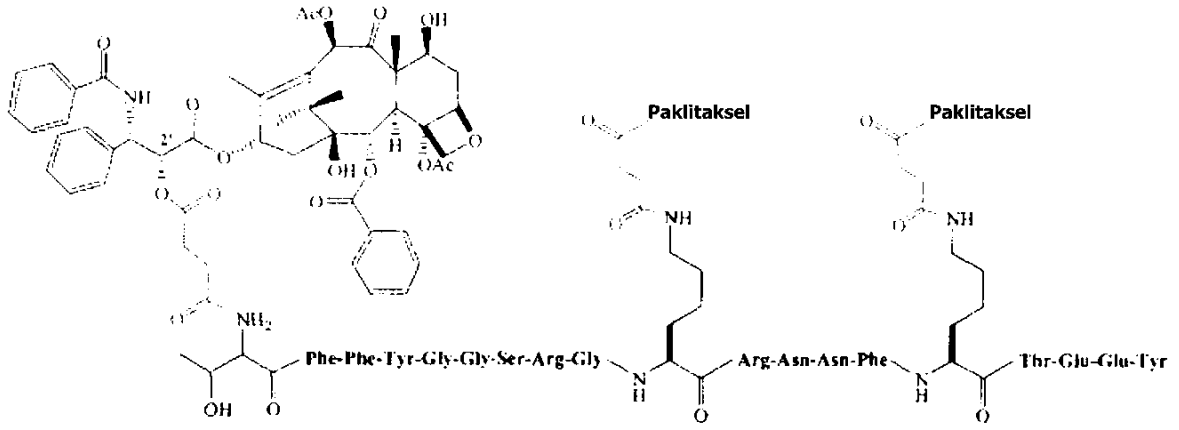
Diğer hidrofobik ajanlar, analjezikler ve antiinflamatuvar ajanlar (örneğin, aloksiprin, auranofin, azapro-pazon, benorylat, diflunisal, etodolak, fenbufen, fenoprofen kalsiyum, flurbiprofen, ibuprofen, indometasin, ketoprofen, meklofenamik asit, mefenamik asit, nabumeton, naproksen, oksifenbutazon, fenilbutazon, piroksikam, sulindak), antihelmintikler (örneğin, albendazol, bephenium hidrokinaftoat, kambendazol, diklorofen, ivermektin, mebendazol, oksamnikuin, oksfendazol, oksantel embonat, pirazikantel, pilantel embonat, tiabendazol), antiaritmik maddeler (örneğin, amiodaron HCl, disopirimit, flecainid asetat, kinidin sülfat, anti-bakteriyel ajanlar (örneğin, benetamin penisilin, sinoxacin, siprofloksasin HCl, klaritromisin, klofazimin, klorosasilin, demesilisiklin, doksisisiklin, eritromisin, etiyonamid, imipenem, nalidiksik asit, nitrofurantoin, rifampisin, spiramisin, sulphabenzamid, sulfadoksine, sulfamerazin, sulfasetamid, sulfadiazin, sulfafurazol, sulphametoksazol, sulfapiridin, tetrasiklin, trimetoprim), pıhtılaşma önleyiciler (örneğin, dikumarol, dipiridamol, nikumalon, fenindion), antidepresanlar (örneğin, amoks-apin, maprotilin HCl, mianserin HCl, nortriptilin HCl, trazodon HCl, trimipramin maleat), antidiyabetikler (örneğin, asetoheksamid, klorpropamid, glibenklamid, gliklazid, glipizid, tolazamid, tolbutamid), anti-epileptikler (örneğin, beklamid, karbamazepin, klonazepam, etotoin, metoin, metsüksimid, metilfenobarbiton, okskarbazepin, parametadion, fenasemid, fenobarbiton, fenitoin, fensüksimid, primidon, sultiam, valproik asit), mantar önleyici ajanlar (örneğin, amfoterisin, butokonazol nitrat, klotrimazol, ekonazol nitrat, flukonazol, flusitosin, griseofulvin, itrakonazol, ketokonazol, mikonazol, natamisin, nistatin, sulkonazol nitrat, terbinafin HCl, terkonazol, tiokonazol, undesenoik asit), gut önleyici ajanlar (örneğin, allopurinol, probenesid, sulfin-pirazon), antihipertansif ajanlar (örneğin, amlodipin, benidipin, darodipin, dilitazem HCl, diazoksit, felodipin, guanabenz asetat, isradipin, minoksidil, nikardipin HCl, nifedipin, nimodipin, fenoksibenzamin HCl, prazosin HCl, reserpin, terazosin HCl), antimalaryaller (örneğin, amodiakuin, klorokuin, klorproguanil HCl, halofantrin HCl, meflokuin HCl, proguanil HCl, pirimetamin, kuinin sülfat), anti-migraine agentsmigren önleyici ajanlar (örneğin, dihidroergotamin mesilat, ergotamin tartrat, metisergid maleat, pizotifen maleat, sumatriptan süksinat), anti-müskaridik ajanlar (örneğin, atropin, benzheksol HCl, biperiden, etopropazin HCl, hiossiamin, mepenzolat bromür, oksifensilsimin HCl, tropikamid), anti-neoplastik ajanlar ve immünosüpresanlar (örneğin, aminoglutetimid, amsakrin, azatioprin, busülfan, klorambusil, siklosporin, dakarbazin, estramustin, etoposid, lomustin, melfalan, merkaptopurin, metotreksat, mitomisin, mitotan, mitozantron, prokarbazin HCl, tamoksifen sitrat, testolakton), anti-protazoal ajanlar (örneğin, benznidazol, kliokuinol, dekoquinat,

diiidohidroksi-kuinolin, diloksanid furoat, dinitolmid, furzolidon, metronidazol, nimorazol, nitrofurazon, ornidazol, tinidazol), anti-tiroid ajanlar (örneğin, karbimazol, propiyltiourasil), anksiolitik, sedatifler, hipnotikler ve nöroleptikler (örneğin, alpra-zolam, amilobarbiton, barbiton, bentazepam, bromazepam, bromperidol, brotizolam, butobarbiton, karbromal, klordiazepoksid, klormetiazol, klorpromazin, klobazam, klotiazepam, klozapin, diazepam, droperidol, etinamat, flunanison, flunitrazepam, fluopromazin, flupentiksol dekanoat, flufenazin dekanoat, flurazepam, haloperidol, lorazepam, lormetazepam, medazepam, meprobamat, metakualon, midazolam, nitrazepam, oksazepam, pentobar-biton, perfenazin pimozid, proklorperazin, sulpirid, temazepam, tiyoridazin, triazolam, zopiklon), β -Blokörler (örneğin, asebutolol, alprenolol, atenolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oksprenolol, pindolol, propranolol), kardiyak inotropik ajanlar (örneğin, amrinon, digitoksin, digoksin, enoksimon, lanatosid C, medigoksin), kortikosteroidler (örneğin, beklometazon, betametazon, budesonid, kortizon asetat, desoksimetazon, deksametazon, fludrokortizon asetat, flunisolid, flucortolone, flutikazon propiyonat, hidrokortizon, metilprednizolon, prednizolon, prednizon, triamsinolon), diyüretik: asetazolamid, amilorid, bendrofluazid, bumetanid, klorotiazid, klorthalidon, etakrinik asit, fruse-mide, metolazon, spironolakton, triamteren), anti-parkinson ajanlar (örneğin, bromokriptin mesilat, lisurit maleat), gastrointestinal ajanlar (örneğin, bisakodil, simetid, sisaprid, difenoksilat HCl, domperidon, famotidin, loperamid, mesalazin, nizatidin, omeprazol, ondansetron HCl, ranitidin HCl, sülfasalazin), histamin H₁-reseptör antagonistleri (örneğin, akrivastin, astemizol, sinarizin, siklizin, siproheptadin HCl, dimenhidrinat, flunarizin HCl, loratadin, meklozin HCl, oksatomid, terfenadin), lipid düzenleyici ajanlar (örneğin bezafibrat, klofibrat, fenofibrat, gemfibrozil, probucol), nitratlar ve diğer anti-anjinal ajanlar (örneğin, amil nitrat, gliseril trinitrat, izosorbit dinitrat, izosorbit mononitrat, pentaeritritol tetranitrat), opioid analjezikler (örneğin, kodein, dekstropropioksifen, diamor-fine, dihidrokodein, meptazinol, metadon, morfin, nalbupin, pentazosin), seks hormonlar (örneğin, klomifen sitrat, danazol, etinil östradiol, medroksiprogesteron asetat, mestranol, metiltestosteron, noretisteron, norg-estrel, östradiol, konjuge östrojenler, progesteron, stanozolol, stibestrol, testosteron, tibolon), ve uyarıcılar (örneğin, amfetamin, deksamfetamin, deksfenfluramin, fenfluramin, mazindol) kapsamaktadır.

Polipeptit konjugatlar

Bir aktif ajan bir polipeptidi kapsayan konjugatlar burada açıklanan formülasyonda kullanılabilmektedir. 2006/0182684, ve 2006/0189515 Numaralı U.S. Patent Başvuru

Yayınlarında ve Aralık 20,2007'de dosyalanan 61/008,880 Numaralı U.S. Geçici Başvurusunda açıkladığı üzere, polipeptit-ajan konjugatları geliştirdik. Bu tür konjugatlar, burada açıklanan herhangi bir polipeptidi, paklitaksel veya bir paklitaksel analogu (örneğin, burada açıklananlar) ve bir bağlantılayıcı (örneğin burada açıklananlar) gibi bir hidrofobik ajanı kapsayabilmektedir. Paklitaksel konjugatlar, N-ucunda ester bağlantıları aracılığıyla, konumlar 10 ve 15'te lisinler aracılığıyla üç paklitaksel moleküle konjuge edilen AngioPep-2 peptidi (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 97) kapsayan ANG 1005 ile örneklendirilmektedir. ANG 1005'in yapısı şu şekildedir:



10

Belirli yapılandırmalarda, konjugatlar, kan-beyin bariyerini (BBB) geçebilmektedir veya karaciğer, akciğer, böbrek, kas hücreleri gibi belirli hücre tiplerine tercihe bağlı olarak hedeflenebilmektedir veya tümör hücrelerine (burada açıklanan herhangi bir hücre tipinde) hedeflenebilmektedir. Bu peptitlere konjuge edilen bu ajanlar, örneğin, reseptör-aracılı endositozis ile (örneğin bir LRP reseptörü aracılığıyla) hedeflenen hücrelere artırımlı tutulum sergileyebilmektedir. Konjuge edilen ajanlar, alternatif olarak veya ek olarak, hücreden artırımlı stabilite veya azaltımlı atılım sergileyebilmektedir (örneğin P-glikoprotein aracılı atımdan dolayı)

20

Polipeptitler

Bileşimlerin ve yöntemlerin, burada açıklanan herhangi bir polipeptidi, örneğin, Tablo 10'da açıklanan polipeptitlerden herhangi birini (örneğin, SEKANS KİMLİK NUMARALARI: 1 ila 97, 99, 100, 101, veya 107 ila 112 gibi SEKANS KİMLİK NUMARALARI: 1 ila 105 ve 107 ila 112'den herhangi birinde belirlenen bir polipeptit) ve bunun herhangi bir fragmentini, analogunu, türevini veya varyantını kapsayabilmektedir. Belirli yapılandırmalarda, polipeptit,

25

burada açılan bir polipeptide en az %35, %40, %50, %60, %70, %80, %90, %95, %99 veya hatta %100 oranında özdeşliğe sahip olabilmektedir. Polipeptit, burada açılan sekanslardan birine göre bir veya daha fazla (örneğin, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, veya 15) ikameye sahip olabilmektedir. Diğer modifikasyonlar aşağıda daha ayrıntılı olarak açıklanmaktadır

Aynı zamanda açılan, bu polipeptitlerin fragmentleridir (örneğin bir fonksiyonel fragment). Belirli yapılandırmalarda, fragmentler, özel bir hücre tipinde (örneğin karaciğer, akciğer, böbrek, dalak veya kas) girebilmektedir veya birikebilmektedir veya BBB'yi geçebilmektedir. Polipeptidin kesikliği, ya polipeptidin N-ucundan, polipeptidin C-ucundan ya da bunun bir kombinasyonundan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, veya daha fazla amino asit olabilmektedir. Diğer fragmentler, polipeptidin iç bölümlerinin silindiği sekansları kapsamaktadır

Ek polipeptitler, 2006/0189515 Numaralı U.S. Patent Başvurusunda açıklanan deneylerden veya yöntemlerden biri veya teknikte bilinen herhangi bir yöntem kullanılarak tanımlanabilmektedir. Örneğin, bir aday vektör, Taksol ile konjuge edilen ve bir laboratuvar hayvanına uygulanan, geleneksel polipeptit sentezi ile üretilebilmektedir. Bir biyolojik olarak aktif vektör, örneğin, bir konjugat ile tedavi edilmeyen bir kontrole kıyasla (örneğin konjuge edilmemiş ajan ile tedavi edilen) tümör hücreleri ile enjekte edilen ve konjugat ile tedavi edilen bir hayvanın sağ kalımını artırması için etkililiğine bağlı olarak tanımlanabilmektedir.

Başka bir örnekte, bir biyolojik olarak aktif polipeptit, in situ serebral perfüzyon deneyinde parenkimada yerine bağlı olarak tanımlanabilmektedir. CELLIAL™ Technologies tarafından geliştirilen model gibi, in vitro BBB deneyleri, bu tür vektörlerin tanımlanması için kullanılabilmektedir.

Diğer dokulardaki birikimin saptanması yönelik deneyler aynı şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bir polipeptidin etiketli konjugatları bir hayvana uygulanabilmektedir ve farklı organlardaki birikim ölçülebilmektedir. Örneğin, tespit edilebilir etikete konjuge edilen (örneğin, Cy5.5 bir yakınlı-IR floresan spektroskopisi etiketi) bir polipeptit, canlı in vivo görselleştirmesine olanak sağlamaktadır. Bu tür bir polipeptit, bir hayvana uygulanabilmektedir ve bir organda polipeptidin varlığı tespit edilebilmektedir, bu yüzden arzu edilen organda polipeptidin birikim hızını ve miktarını saptanması olanak sağlamaktadır. Diğer yapılandırmalarda, polipeptit, bir radyoaktif izotop (örneğin, ¹²⁵I) ile

etiketlenebilmektedir. Polipeptit sonrasında bir hayvana uygulanmaktadır. Bir süre sonra, hayvan feda edilmektedir ve hayvanın organları çıkarılmaktadır. Her bir organdaki radyoizotop miktarı sonrasında teknikte bilinen herhangi bir araç kullanılarak ölçülebilmektedir. Etiketli kontrolün miktarı olmadan özel bir organda bir etiketlenmiş aday polipeptidin miktarının karşılaştırılmasıyla, özel bir dokudaki bir aday polipeptidin birikim hızı veya miktarı aday polipeptidin yeteneği doğrulanabilmektedir. Uygun negatif kontroller, bir özel hücre tipine taşınmadığı bilinen herhangi bir polipeptidi kapsamaktadır.

TABLO 10
SEKANS
KİMLİK NO:

1	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D
2	T	F	Q	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	T	E	K	E
3	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	F	D	T	E	E	Y
4	S	F	Y	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	E
5	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
6	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
7	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	Y	K	R	A	K	Y
8	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y

TABLO 10

9	T	F	Q	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
10	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
11	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
12	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
13	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
14	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	Y	K	R	A	K	Y
15	P	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
16	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y
17	P	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	F	K	R	A	K	E
18	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	D
19	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	A	K	Y
20	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	E	Y
21	P	F	F	Y	G	G	C	G	A	N	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
22	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	T	A	K	Y
23	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
24	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
25	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
26	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	K	R	A	K	Y
27	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
28	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
29	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	K	S	A	K	Y
30	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	D	R	E	K	Y
31	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	E	K	E
32	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	F	D	R	A	K	Y
33	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	G	N	N	F	D	R	A	K	Y
34	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	K	Y
35	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	G	N	N	Y	V	T	A	K	Y
36	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	G	N	N	F	L	T	A	K	Y
37	S	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	L	T	A	K	Y
38	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y
39	T	F	F	Y	G	G	C	M	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y
40	T	F	F	Y	G	G	S	M	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y
41	P	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	Y	V	R	E	K	Y

TABLO 10

42	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	V	R	E	K	Y	
43	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	V	R	E	K	Y	
44	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	L	T	A	K	Y	
45	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	L	T	A	E	Y	
46	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	K	S	A	E	Y	
47	P	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	K	T	A	E	Y	
48	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	K	T	E	E	Y	
49	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	D	
50	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y	
51	S	F	F	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y	
52	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	L	R	E	K	Y	
53	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y	
54	S	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	Y	L	R	E	K	Y	
55	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y	
56	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	E	Y	
57	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	G	N	N	F	V	S	A	E	Y	
58	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	D	R	A	E	Y	
59	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	L	R	E	E	Y	
60	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	Y	
61	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	Y	L	R	E	E	Y	
62	P	F	F	Y	G	G	s	G	G	N	R	N	N	Y	L	R	E	E	Y	
63	M	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	V	A	R	I	
64	A	R	I	I	R	Y	F	Y	N	A	K	A	G	L	C	0	T	F	V	YG
65	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	Y	K	S	A	E	D	C	M	R	TCG
66	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	c	V	A	R	I	I	R	YFY
67	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y	
68	K	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y	
69	T	F	Y	Y	G	G	c	R	G	K	R	N	N	Y	K	T	E	E	Y	
70	T	F	F	Y	G	G	s	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y	
71	C	T	F	F	Y	G	c	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
72	T	F	F	Y	G	G	c	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y	C
73	C	T	F	F	Y	G	s	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
74	T	F	F	Y	G	G	s	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y	C

TABLO 10

75	P	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
76	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	K	E	Y
77	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
78	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	K	R	Y
79	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	T	A	E	Y
80	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	T	A	G	Y
81	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y
82	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
83	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
84	T	F	F	Y	G	C	G	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
85	T	F	F	Y	G	G	R	C	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
86	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	D	T	E	E	E
87	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
88	Y	N	K	E	F	G	T	F	N	T	K	G	C	E	R	G	Y	R	F
89	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	M	N	N	F	E	T	L	E	E
90	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	L	R	L	K	Y
91	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	L	K	Y
92	K	T	K	R	K	R	K	K	Q	R	V	K	I	A	Y	E	E	I	FKNY
93	K	T	K	R	K	R	K	K	Q	R	V	K	I	A	Y				
94	R	G	G	R	L	S	Y	S	R	R	F	S	T	S	T	G	R		
95	R	R	L	S	Y	S	R	R	R	F									
96	R	Q	I	K	1	W	F	Q	N	R	R	M	K	W	K	K			
97	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
98	M	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	V	A	R	I
	1	R	Y	F	Y	N	A	K	A	G	L	C	Q	T	F	V	Y	G	G
	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D	C	M	R	T	C	GGA
99	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	K	E	Y
100	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	L	K	Y
101	T	F	F	Y	G	G	c	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
102	N	A	K	A	G	L	c	Q	T	F	V	Y	G	G	C	L	A	K	RNNF
	E	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G	G	A						

TABLO 10

103	Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G A
104	G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A
105	L C Q T F V Y G G C E A K R N N F K S A
107	T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
108	R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
109	R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
110	R F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y
111	T F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y
112	T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y
113	C T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
114	T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C
115	C T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y
116	T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y C

Peptit numarası 5, SEKANS KİMLİK NUMARASI:5'in sekansı kapsamaktadır ve C-ucunda amidleştirilmektedir (bakınız örneğin Şekil 1).

5 Peptit Numarası 67, SEKANS KİMLİK NUMARASI:67'nin sekansı kapsamaktadır ve C-ucunda amidleştirilmektedir (bakınız örneğin Şekil 1).

Peptit Numarası 76, SEKANS KİMLİK NUMARASI:76'nin sekansı kapsamaktadır ve C-ucunda amidleştirilmektedir (bakınız örneğin Şekil 1).

10 Peptit Numarası 91, SEKANS KİMLİK NUMARASI:91'in sekansı kapsamaktadır ve C-ucunda amidleştirilmektedir (bakınız örneğin Şekil 1).

Peptit Numarası 107, SEKANS KİMLİK NUMARASI:97'nin sekansı kapsamaktadır ve C-ucunda amidleştirilmektedir.

Peptit Numarası 109, SEKANS KİMLİK NUMARASI:109'un sekansı kapsamaktadır ve C-ucunda amidleştirilmektedir.

15 Peptit Numarası 110, SEKANS KİMLİK NUMARASI:110'un sekansı kapsamaktadır ve C-ucunda amidleştirilmektedir.

Angiopep-1'in (SEKANS KİMLİK NUMARASI:67) ve Angiopep-2'nin (SEKANS KİMLİK NUMARASI:97) amin grupları ajanların konjugasyonuna yönelik bölgeler olarak kullanılmaktadır. Konjugasyonda amin gruplarının rolünün ve bunların bu vektörlerin toplam taşıma kapasitesi üzerindeki etkisine çalışılması için, Angiopep-1 ve Angiopep-2 sekansına dayanarak yeni vektörler, değişken reaktif amin grupları ve değişken toplam yük ile tasarlanmıştır. Bu polipeptitler Tablo 11'de gösterilmektedir.

Tablo 11 Değişken amin grup hedeflerine sahip vektörler

Polipeptit İsmi	Polipeptit Sekanslar□	Reaktif aminler (konumlar)	Yük	SEKANS KİMLİK No.
Angiopep-3*	Ac ¹ -TFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2 (10,15)	+1	107
Angiopep-4b	R FFYGGSRGKRNNFKTEEY	3 (1,10,15)	+3	108
Angiopep-4a	Ac ¹ - R FFYGGSRGKRNNFKTEEY	2 (10,15)	+2	109
Angiopep-5	Ac ¹ - R FFYGGSRGKRNN F TEEY	1 (10)	+2	110
Angiopep-6	TFFYGGSRGKRNN F TEEY	2 (1,10)	+2	111
Angiopep-7	TFFYGGSR GRR NN F TEEY	1 (1)	+2	112

*Angiopep-3, Angiopep-2'nin bir asetillenmiş formudur.
¹Ac asetilasyonu temsil etmektedir.

Modifiye edilmiş polipeptitler

Açılan bileşimler ve yöntemler aynı zamanda, burada açılan bir amino asit sekansları (örneğin AngioPep-3, -4a, -4b, -5, -6, veya -7 gibi SEKANS KİMLİK NUMARALARI: 1 ila 105 ve 107 ila 116'dan herhangi birinde açılan bir sekansa sahip olan polipeptit) bir modifikasyonuna sahip olan bir polipeptiti kapsayabilmektedir. Belirli yapılandırmalarda, modifikasyon, arzu edilen biyolojik etkinliği büyük oranda ortadan kaldırmamaktadır. Bazı yapılandırmalarda, modifikasyon, biyolojik etkinlikte bir azalmaya yol açabilmektedir (örneğin en az %5, %10, %20, %25, %35, %50, %60, %70, %75, %80, %90, veya %95 ile). Diğer yapılandırmalarda, modifikasyon, biyolojik etkinlik üzerinde hiç etkiye sahip değildir veya (örneğin, en az %5, %10, %25, %50, %100, %200, %500 veya %1000 ile) orijinal polipeptidin biyolojik etkinliğini artırabilmektedir. Modifiye edilen polipeptit, bazı durumlarda gerek duyulabilen veya arzu edilebilen bir polipeptidin bir veya daha fazla karakteristiğini optimize edebilmektedir veya buna sahip olabilmektedir. Bu tür karakteristikler, in vivo stabiliteyi, biyoyararlanabilirliği, toksisiteyi, immüno-biyolojik etkinliği veya immüno-biyolojik kimliği kapsayabilmektedir.

Açılan polipeptitler, ya posttranslasyonel işleme gibi doğal prosesler ya da teknikte bilinen kimyasal modifikasyon teknikleri ile modifiye edilen amino asitleri veya sekansları kapsayabilmektedir. Modifikasyonlar, polipeptit omurgasındaki amino asit yan-zincirlerini ve amino- veya karboksi-ucunu kapsayan bir polipeptitte herhangi bir yerde meydana gelebilmektedir. Aynı tipte modifikasyon, belirli bir polipeptitte birkaç bölgede aynı veya değişken derecelerde bulunabilmektedir ve bir polipeptit bir tipte modifikasyondan daha fazlasını barındırabilmektedir. Polipeptitler, ubikutin ekleme sonucunda dallanabilmektedir ve

bunlar dallanma ile veya olmayarak siklik olabilmektedir. Siklik, dallı ve dallı siklik polipeptitler, posttranslasyonel doğal proseslerden kaynaklanabilmektedir veya sentetik olarak üretilmektedir. Diğer modifikasyonlar, pegilasyon, asetilasyon, asilasyon, asetomidometil (Acm) grubunun eklenmesi, ADP-ribosilasyon, alkilasyon, amidasyon, biyotinilasyonu karbamoilasyon, karboksietilasyon, esterifikasyon, flavine kovalent tutturma, bir hem kisteine kovalent tutturma, bir nükleotidin veya nükleotit türevinin kovalent tutturması, ilaç kovalent tutturması, bir markörün (örneğin, floresan veya radyoaktif) kovalent tutturması, bir lipit veya lipit türevinin kovalent tutturması, fosfatidilinositolün kovalent tutturması, çapraz bağlama, siklizasyon, disülfid bağ oluşumu, demitlasyon, kovalent çapraz bağlar oluşumu, sistein oluşumu, piroglutamat oluşumu, formilasyon, gama-karboksilasyon, glikosilasyon, GPI dübel oluşumu, hidroksilasyon, iyodinasyon, metilasyon, miristoilasyon, oksidasyon, proteolitik işleme, fosforilasyon, prenilasyon, rasemizasyon, selenoilasyon, sülfasyon, amino asitlerin arginilasyon ve ubikutin ekleme gibi proteinlere transfer-RNA aracılığıyla eklenmesini kapsamaktadır.

15

Bir modifiye edilmiş polipeptit ayrıca, polipeptit sekansında (örneğin, polipeptidin biyolojik etkinliğini bu tür değişikliklerin büyük ölçüde değiştirmediği) ya konservatif ya da konservatif olmayan (örneğin, D-amino asitleri, desamino asitleri) şekilde bir amino asit araya eklemesini, delesyonu, veya ikamesini kapsayabilmektedir.

20

İkameler konservatif (yani burada bir kalıtıma aynı genel tip veya gruptan diğer ile yer değiştirmektedir) veya konservatif olmayan (yani, burada bir kalıtıma başka tipte bir amino asit ile yer değiştirmektedir) olabilmektedir. Ek olarak, bir doğal olarak oluşmayan amino asit, bir doğal olarak oluşan amino asit ile ikame edilebilmektedir (yani, doğal olmayarak oluşan konservatif amino asit ikamesi veya bir doğal olmayarak oluşan konservatif olmayan amino asit ikamesi).

25

Sentetik olarak üretilen polipeptitler, DNA tarafından doğal olarak kodlanmayan amino asitlerin ikamelerini (örneğin, doğal olmayarak oluşan veya doğal olmayan amino asit) kapsayabilmektedir. Doğal olmayarak oluşan amino asitlerin örnekleri; D-amino asitlerini, sisteininin bir sülfür atomuna tutturulan bir asetilaminometil grubuna sahip olan bir amino asidi, bir pegile amino asidi, n'nin, 2 ila 6 olduğu formül $NH_2(CH_2)_nCOOH$ 'in omega amino asitlerini, sarkosin, t-bütül alanin, t-bütül glisin, N-metil izolösün ve norlösün gibi nötral polar olmayan amino asitleri kapsayabilmektedir. Fenilglisin, Trp, Tyr, veya Phe ile ikame edilebilmektedir; sitrulin ve metiyonin sülfoksit nötr polar olmayan sisteik asit asidiktir ve

35

ornitin baziktir. Prolin, hidroksiprolin ile ikame edilebilmektedir ve konformasyon sunan özellikleri alınyabilmektedir.

5 Analoglar, ikameli mutajenez ile üretilebilmektedir ve orijinal polipeptidin biyolojik etkinliğini alınyabilmektedir. "Konservatif ikameler" olarak tanımlanan ikamelerin örnekleri Tablo 12'de gösterilmektedir. Bu ikamelerin arzu edilmeyen bir değişiklik ile sonuçlanmasında halinde, o zaman Tablo 12'de "örnekleyici ikameler" olarak adlandırılan veya amino asit sınıflarına istinaden burada ayrıca açıklanan şekilde diğer tipte ikameler, tanınmaktadır ve ürünler taranmaktadır

10

Fonksiyonda veya immünolojik kimlikteki önemli modifikasyonlara, (a) örneğin bir tabaka veya helisel konformasyon olarak, ikame alanında polipeptit omurgasının yapısını (b) hedef bölgesinde molekülün yükünün veya hidrofobikliğinin veya (c) yan zincirin yğününü muhafaza edilmesi üzerinde etkileri bakımından büyük ölçüde farklılık gösteren ikamelerin seçilmesi ile ulaşmaktadır Doğal olarak oluşan kalıtlar, ortak yan zincir özelliklerine bağıolarak gruplara ayrılmaktadır

15

(1) hidrofobik: norlösin, metiyonin (Met), Alanin (Ala), Valin (Val), Lösin (Leu), İzölösün (Ile), Histidin (His), Triptofan (Trp), Tirosin (Tyr), Fenilalanin (Phe),

20

(2) nötral hidrofilik: Sistein (Cys), Serin (Ser), Treonin (Thr)

(3) asidik/negatif olarak yüklü: Aspartik asit (Asp), Glutamik asit (Glu)

25

(4) bazik: Asparajin (Asn), Glutamin (Gln), Histidin (His), Lysin (Lys), Arjinin (Arg)

(5) zincir yönelimini etkileyen kalıtlar: Glisin (Gly), Prolin (Pro);

(6) aromatik: Triptofan (Trp), Tirosin (Tyr), Fenilalanin (Phe), Histidin (His),

30

(7) polar: Ser, Thr, Asn, Gln

(8) bazik pozitif yüklü: Arg, Lys, His, ve;

35

(9) yüklü: Asp, Glu, Arg, Lys, His

Diğer konservatif amino asit ikameleri Tablo 3'te listelenmektedir.

Tablo 12: Amino asit ikamesi

Orijinal kalın	Örnekleyici ikame	Konservatif ikame
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norlösün	Leu
Leu (L)	Norlösün, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norlösün	Leu

5 Ek analoglar

Açılan polipeptitler ve konjugatlar, teknikte bilinen aprotinine ait polipeptit analogları kapsayabilmektedir. Örneğin, 5,807,980 Numaralı U.S. Patent dokümanı Bavin Pankreas Tripsin İnhibitörü (aprotinin)-kökenli inhibitörlerin yanısıra, SEKANS KİMLİK NUMARASI:102'nin polipeptidini kapsayan, bunların preparasyonuna ve terapötik kullanıma yönelik bir yöntemi açıklamaktadır. Bu polipeptitler, bir anormal görünüm veya anormal tromboz gibi doku faktörü ve/veya faktör Villa miktarıyla karakterize edilen bir durumun tedavisine yönelik olarak kullanılmaktadır. 5,780,265 Numaralı U.S. Patent dokümanı SEKANS KİMLİK NUMARASI:103'ün plazma kalikreinini inhibe edebilen serin proteaz inhibitörlerini açıklamaktadır. 5,118,668 Numaralı U.S. Patent dokümanı SEKANS KİMLİK NUMARASI:105'i kapsayan Bovin Pankreas Tripsin İnhibitörü varyantlarını açıklamaktadır.

Aprotinin amino asit sekansı (SEKANS KİMLİK NUMARASI:98), Angiopep-1 amino asit sekansı (SEKANS KİMLİK NUMARASI:67) ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:104 bunun yanı sıra biyolojik olarak aktif analogların bazı sekansları WO 2004/060403 Numaralı Uluslararası Başvuru Yayınlarında bulunabilmektedir.

5

Bir aprotinin analogunu kodlayan bir örnekleyici nükleotit sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 106'da gösterilmektedir (atgagaccag atttctgcct cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatc cgttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgcagacct tcgtatacgg cggctgcaga gctaagcgta acaactcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgcgg tgggtcttag;

10

Genbanka erişim Numarası X04666). Bu sekans, SEKANS KİMLİK NUMARASI:98'de bulunduğu üzere, bir valinin yerine bir konum 16'da bir lizin kodlamaktadır SEKANS KİMLİK NUMARASI:106'nın nükleotit sekansında bir mutasyon, konum 16'da bir valine sahip olan SEKANS KİMLİK NUMARASI:98'in polipeptidinin üretilmesini değiştirmek üzere teknikle bilinen yöntemler ile gerçekleştirilebilmektedir. Ek mutasyonlar veya fragmentler teknikle bilinen herhangi bir teknik kullanılarak elde edilebilmektedir.

15

Aprotinin analoglarının diğer örnekleri, Uluslararası Başvuru Numarası PCT/CA2004/000011'de açıklanan sentetik aprotinin sekansı kullanılarak (ya da bunun bir bölümü) bir protein BLAST'ı (Genbanka www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) gerçekleştirilerek bulunabilmektedir. Örnekleyici aprotinin analogları erişim Numaraları CAA37967 (GI:58005) ve 1405218C (GI:3604747) 'de bulunmaktadır

20

Polipeptit türevlerinin ve peptidomimetiklerin preparasyonu

25

Yalnızca doğal olarak oluşan amino asitlerden oluşan polipeptitlere ek olarak, peptidomimetik veya polipeptit analogları aynı zamanda kullanılabilmektedir. Polipeptit analogları kalıpla polipeptidinin özelliklerine analog özelliklere sahip polipeptit olmayan ilaçlar olarak farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Polipeptit olmayan bileşikler, "polipeptit mimetikler" veya peptidomimetik olarak isimlendirilmektedir (Fauchere ve ark., Infect. Immun. 54:283-287,1986; Evans ve ark., J. Med. Chem. 30:1229-1239, 1987). Terapötik olarak faydalı polipeptitlere yapısal olarak ilişkin olan polipeptit mimetikleri, bir eşdeğer veya artırımsız terapötik veya profilaktik etkinin üretilmesi için kullanılabilmektedir. Genel olarak, peptidomimetikler, doğal olarak oluşan reseptör-bağlayıcı polipeptitler gibi paradigma polipeptidine (yani, bir biyolojik veya farmakolojik etkinliğe sahip olan bir polipeptit) yapısal

30

35

olarak benzerdir ancak teknikte bilinen yöntemler ile (Spatola, Peptide Backbone Modifications, Vega Data,1(3):267, 1983); Spatola ve ark. (Life Sci. 38:1243-1249, 1986); Hudson ve ark. (Int. J. Pept. Res. 14:177-185, 1979); ve Weinstein. B., 1983, Chemistry and Biochemistry, of Amino Acids, Peptides and Proteins, Weinstein eds, Marcel Dekker, New-York) -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂- -CH=CH- (cis and trans), -CH₂SO-, -CH(OH)CH₂-, -COCH₂- vb. gibi bağlantılar ile opsiyonel olarak yeri değiştirilebilen bir veya daha fazla peptit bağlantısına sahiptir. Bu tür polipeptit mimetikleri, daha ekonomik üretimi, daha fazla kimyasal stabiliteyi, artmış farmakolojik özellikleri (örneğin, yarı-ömür, absorpsiyon, güçlülük, etkinlik), azaltmış antijenliği ve diğerlerini kapsayan doğal olarak oluşan polipeptilere göre önemli avantajlara sahip olabilmektedir.

Polipeptitler, özel hücre tiplerine (örneğin burada açılanlar) girerken etkili olabilirken, bunların etkililiği proteazların varlığı ile azaltılabilmektedir. Serum proteazların spesifik substrat gerekliliklerine sahiptir. Substrat, yarı-ömürüne yönelik olarak hem L-amino asitlerine hem de peptit bağlarına sahip olmalıdır. Ayrıca, serumdaki proteaz etkinliğinin en önemli bileşeni temsil eden eksopeptidazlar genellikle, polipeptidin birinci peptit bağı üzerinde etki etmektedir ve bir serbest N-ucunu gerektirmektedir (Powell ve ark., Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993). Bu doğrultuda, polipeptitlerin modifiye edilmiş versiyonlarının kullanılmasıyla avantajlıdır. Modifiye edilmiş polipeptitler, IGF-1'ye göre biyolojik etkinlik veren orijinal L-amino asit polipeptitlerinin yapısal karakteristiklerini almamaktadır ancak avantajlı bir şekilde proteaz ve/veya eksopeptidazlar ile yarı-ömürüne kolaylıkla yatkın değildir.

Bir konsensüs sekansında bir veya daha fazla amino asidinin aynı tipte D-amino asidi ile sistematik ikamesi (örneğin, L-lisinin yerinde D-lisin) daha stabil polipeptitlerin üretilmesi için kullanılabilmektedir. Bu yüzden, bir polipeptit türevinin veya peptidomimetinin tümü L, tümü D veya karışık D, L polipeptit olabilmektedir. Bir N-ucu veya C-ucu D-amino asidinin varlığı bir polipeptidin *in vivo* stabilitesini artırmaktadır çünkü peptidazlar bir substrat olarak bir D-amino asidi kullanamayabilmektedir (Powell ve ark., Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993). Ters-D polipeptitler, L-amino asitlerini barındıran bir polipeptide göre bir ters sekansta düzenlenen, D-amino asitlerini barındıran polipeptitlerdir. Bu yüzden, bir L amino asit polipeptidinin C-ucu

kalınlaşmış D-amino asit polipeptidi için N-ucu olmaktadır ve benzeri. Ters D-polipeptitleri, L-amino asit polipeptitleri ile aynı üçüncül konformasyonu ve dolayısıyla aynı etkililiği almamaktadır ancak *in vitro* ve *in vivo* enzimatik bozunuma daha stabildir ve bu yüzden orijinal polipeptitten daha fazla terapötik etkililiğe sahiptir (Brady and Dodson, Nature

368:692-693, 1994; Jameson ve ark., Nature 368:744-746, 1994). Ters-D- polipeptitlere ek olarak, bir konsensüs sekansı veya büyük ölçüde özdeş bir konsensüs sekansı varyasyonunu içeren sınırlanmış polipeptitler teknikle iyi bilinen yöntemler ile üretilebilmektedir (Rizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387-418, 1992). Örneğin, sınırlanmış polipeptitler, disülfid köprülerini oluşturabilen sistein kalıntıları eklenmesi ile üretilebilmektedir ve böylelikle, bir siklik polipeptidi ile sonuçlanmaktadır. Siklik polipeptitler serbest N- veya C- uçlarına sahip değildir. Bu doğrultuda, bunlar, elbette peptid uçlarında yararlanılan endopeptidazlara yatkın olmalarına rağmen eksopeptidazlar ile proteolize yatkın değildir. N-ucu veya C-ucu D-amino asitlerine sahip polipeptitlerin ve siklik polipeptitlerin amino asit sekansları ile, N-ucu veya C-ucu D-amino asidi kalıntılarının varlığı dışında karşılaştıkları polipeptitlerin sekanslarına veya bunların dairesel yapılarına genellikle özdeştir.

Bir intramoleküler disülfid bağları olan bir siklik türevi, amino ve karboksil uçları gibi siklizasyon için seçilen konumlarda uygun S-koruyucu sistein veya homosistein kalıntıları dahil ederken geleneksel katıfaz sentezi ile hazırlanabilmektedir (Sah ve ark., J. Pharm. Pharmacol 48:197, 1996). Zincir kurulumunun tamamlanmasından sonra, siklizasyon ya (1) bir S-S bağlarının oluşturulması için, iki serbest SH-fonksiyonuna karşı gelen bir uyumlu destek oksidasyonu ile S-koruyucu grubunun seçici olarak giderilmesi, bunu takiben geleneksel ürünün destek ve uygun saflaştırma prosedüründen giderilmesi ile ya da (2) polipeptidin tamamlanmasıyla zincir koruyucu grubun uzaklaştırılmasıyla birlikte destekten giderilmesi,

bunu takiben yüksek derecede seyreltilmiş sulu çözeltide serbest SH-fonksiyonlarının oksidasyonu ile gerçekleştirilebilmektedir.

Bir intramoleküler amid bağları olan siklik türevi, siklizasyon için seçilen konumda, uygun amino ve karboksil yan zincir koruyucu amino asit türevlerini dahil ederken geleneksel katıfaz sentezi ile hazırlanabilmektedir. İntramoleküler-S-alkil bağları olan siklik türevleri, siklizasyon için seçilen konumda uygun bir amino-koruyucu yan zincir ve bir uygun S-koruyucu sistein veya homosistein kalıntısıyla bir amino asit kalıntısı dahil ederken geleneksel katıfaz kimyasıyla hazırlanabilmektedir.

Bir polipeptidin N-ucu veya C-ucu kalıntılarına üzerine etki eden peptidazlara direnç vermeye yönelik başka bir etkili yaklaşım, modifiye edilmiş polipeptid peptidaz için artırılabilecek bir substrat olmayacak şekilde, polipeptid uçlarında kimyasal grupların eklenmesidir. Bir kimyasal

modifikasyon, uçlardan birinde veya her ikisinde polipeptitlerin glikosilasyonudur. Belirli kimyasal modifikasyonlar, özellikle N-ucu glikosilasyonu, insan serumunda polipeptitlerin stabilitesine artırdığını göstermiştir (Powell ve ark., Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993). Serum stabilitesini artıran diğer kimyasal modifikasyonlar, bir asetil grubu gibi bir veya yirmi arasında karbona sahip bir düşük alkilden oluşan, bir N-ucu alkil grubunun ilavesini ve/veya bir C-ucu amidinin veya ikameli amid grubunun ilavesini kapsayabilmektedir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Özellikle, mevcut buluşa ait olan bileşimler ve yöntemler, bir N-ucu asetil grubunu ve/veya bir C-ucu amid grubunu taşıyan polipeptitlerden oluşan modifiye edilmiş polipeptitleri kapsayabilmektedir.

10

Aynı zamanda mevcut buluş ile dahil edilenler, türevin polipeptidin arzu edilen fonksiyonel etkinliğini tutmasıyla normalde polipeptidin parçası olmayan ilave kimyasal kısımları barındıran diğer tipte polipeptit türevleridir. Bu tür türevlerin örnekleri, (1) amino ucunun veya başka bir serbest amino grubunun N-asil türevleri, burada asil grubu bir alkanil grubu (örneğin, asetil, heksanoil, oktanoil) bir aroil grubu (örneğin benzoil) veya F-moc (florenilmetil-O-CO-) gibi bir engelleyici grup olabilmektedir; (2) karboksil ucunun veya başka bir serbest karboksil veya hidroksil grubunun esterleri; (3) amonyak ile veya uygun bir amin ile tepkimeyle üretilen karboksil-ucunun veya başka serbest karboksil grubunun amidi; (4) fosforilatlanmış türevleri; (5) bir antikora veya diğer biyolojik liganda veya diğer tipteki türevlere konjuge edilen türevleri kapsamaktadır.

20

Ek amino asit kalıntıları polipeptitlere ilavesinden kaynaklanan daha uzun polipeptit sekansları aynı zamanda açılmaktadır. Bu tür daha uzun polipeptit sekansları, yukarıda açıklanan polipeptitler ile aynı biyolojik etkinliğe (örneğin özel hücre tiplerine girmesi) sahip olmasından beklenmektedir. Önemli sayıda ilave amino asitlere sahip olan polipeptitler hariç tutulmamakta, bazen büyük polipeptitlerin, etkili sekans maskeleyen, böylelikle bir hedefe bağlanmayı önleyen (örneğin LRP veya LRP2 gibi LRP reseptör ailesinin bir üyesi) bir konfigürasyonu üstlenebildiği anlaşılmaktadır. Bu türevler yararlı antagonistler olarak etki edebilmektedir. Bu yüzden, mevcut buluş polipeptitleri veya bir uzantıya sahip olan burada açıklanan polipeptitlerin türevlerini kapsarken, arzu edilebilir şekilde uzantı polipeptidin veya türevin hücre hedefleme etkinliğini ortadan kaldırmamaktadır.

30

Kullanılabilen diğer türevler, alanin kalıntıları kısa bir gerilmesi ile veya proteolize yönelik bir varsayılan bölge ile ya doğrudan ya da bir aralayıcı aracılığıyla birbirlerine kovalent olarak bağlantılanan burada açıklanan iki aynı veya iki farklı polipeptitten oluşan çift polipeptitlerdir.

35

(örneğin, katepsin ile, bakınız örneğin, 5,126,249 Numaralı U.S. Patent dokümanına ve 495 049 Numaralı Avrupa Patent dokümanına Polipeptitlerin multimerleri, aynı veya farklı polipeptitlerden veya bunların türevlerinden oluşturulan moleküllerin polimerinden oluşmaktadır)

5

Mevcut buluş aynı zamanda, amino- veya karboksi-ucunda, veya her iki ucunda, farklı bir proteinin bir amino asit sekansına bağlantılanan burada açılan bir polipeptidi veya bunun fragmentini barındıran kimerik veya füzyon proteinleri olan polipeptit türevlerini kapsamaktadır. Bu tür bir kimerik veya füzyon proteini, bir nükleik asit kodlayan proteinin rekombinant ekspresyonu ile üretilebilmektedir. Örneğin, bir kimerik veya füzyon proteini, mevcut buluşta kullanılan bir polipeptidin en az 6 amino asidini barındırmaktadır ve arzu edilen şekilde buluşta kullanılan bir polipeptide eşit veya bundan daha büyük bir fonksiyonel etkinliğe sahiptir.

10

15

Polipeptit türevleri, arzu edildiğinde, fonksiyonel olarak eşdeğer molekül, veya fonksiyonel olarak artırılmış veya azaltılmış molekül sağlamak üzere ikame, ilave veya delesyon veya bir amino asit kalıntısıyla amino asit sekansları değiştirilmesi ile üretilebilmektedir. Türevler, birincil amino asit sekansları olarak, fonksiyonel olarak eşdeğer amino asit kalıntıları barındıran değiştirilmiş sekansları kapsayan burada açılan polipeptitlerin (örneğin, SEKANS KİMLİK NUMARALARI: 1 ila 105 ve 107 ila 106) tümünü veya bir kısmını barındıranları kapsamaktadır ancak bunlarla sınırlı değildir. Örneğin, sekansları içindeki bir veya daha fazla amino asit kalıntısıyla bir çekinik alterasyon ile sonuçlanan, bir fonksiyonel eşdeğer olarak etki eden bir benzer polariteye sahip başka bir amino asit ile ikame edilebilmektedir. Sekansları içindeki bir amino aside yönelik ikame, amino asidin ait olduğu sınırlı diğer üyelerinden seçilebilmektedir. Örneğin, pozitif olarak yüklü (bazik) amino asitleri, arjinin, lizin ve histidini kapsamaktadır. Polar olmayan (hidrofobik) amino asitler, lösin, izolösin, alanin, fenilalanin, valin, prolin, triptofan ve metiyonini kapsamaktadır. Yüksüz amino asitler, serin, treonin, sistein, tirozin, asparajin ve glutamini kapsamaktadır. Negatif yüklü (asit) amino asitleri, glutamik asidi ve aspartik asidi kapsamaktadır. Amino asit glisin, ya polar olmayan amino asit ailesine ya da yüksüz (nötral) polar amino asit ailesine dahil edilebilmektedir. Bir amino asit ailesinin içinde yapılan ikamelerin genel olarak konservatif ikameler olduğu anlaşılmaktadır.

20

25

30

Peptidomimetikleri kimliklemeye yönelik tahliller

35 Yukarıda açıklandığı üzere, yöntemler ile kimliklenen polipeptitlerin omurga geometrisini ve

farmakofor gösterimini (peptidomimetikler) kopyalaması için üretilen peptidil olmayan bileşikler, daha fazla metabolik stabilite, daha yüksek güçlülük, daha uzun etki süresi ve daha iyi biyoyararlanım özelliklerine sahip olabilmektedir.

- 5 Peptidomimetik bileşikler, teknikte bilinen birleşimsel kütüphane yöntemlerindeki çeşitli yaklaşımlardan herhangi biri kullanılarak elde edilebilmekte olup, şunları kapsamaktadır: biyolojik kütüphaneler; uzamsal olarak adreslenebilir paralel kat faz veya çözelti faz kütüphaneleri; ters evrişim gerektiren sentetik kütüphane yöntemleri; 'bir-boncuk bir -bileşik' kütüphane yöntemi; ve afinite kromatografi seçimini kullanan sentetik kütüphane yöntemleri.
- 10 Biyolojik kütüphane yaklaşımı polipeptit kütüphanelerine sınırlı olarak, diğer dört yaklaşım polipeptide, peptit olmayan oligomere veya bileşiklerin küçük molekül kütüphanelerine uygulanabilir (Lam, Anticancer Drug Des. 12:145, 1997). Moleküler kütüphanelerin sentezine yönelik yöntemlerin örnekleri teknikte bulunabilmektedir, örneğin: DeWitt ve ark. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909, 1993); Erb ve ark. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422, 1994); Zuckermann ve ark., J. Med. Chem. 37:2678, 1994); Cho ve ark. (Science 261:1303, 1993); Carell ve ark. (Angew. Chem, Int. Ed. Engl. 33:2059, 1994 ve aynı eserde 2061); ve Gallop ve ark. (Med. Chem. 37:1233, 1994). Bileşiklerin kütüphaneleri, çözeltide (örneğin, Houghten, Biotechniques 13:412-421, 1992) veya boncuklar (Lam, Nature 354:82-84, 1991), çipler (Fodor, Nature 364:555-556, 1993), bakteriler veya sporlar (5,223,409 Numaralı U.S. Patent dokümanı) plazmidler (Cull ve ark., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869, 1992) üzerinde veya (Scott and Smith, Science 249:386-390, 1990) veya lusiferaz ve uygun bir substratın ürüne dönüşümünün saptanması ile tespit edilen enzimati etiket üzerinde sunulabilmektedir.
- 25 Kullanılabilen bir polipeptit kimliklendiğinde, diferansiyel çözünürlüğü (örneğin, çöktürme), santrifüjlemeyi, kromatografiyi (örneğin, afinite, iyon değişimi, boyut dışlanma ve benzeri) kapsayan, ancak bunlarla sınırlı olmayan herhangi bir sayıda standart yöntem ile veya polipeptitlerin, peptidomimetiklerin veya proteinlerin saflaştırılması için kullanılan herhangi bir diğer standart teknik ile izole edilebilmekte veya saflaştırılabilmektedir. Bir kimliklenen ilgili polipeptidin fonksiyonel özellikleri, teknikte bilinen herhangi bir fonksiyonel tahlili kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Arzu edilen şekilde, hücre içi sinyallemede aşağıdaki reseptör fonksiyonunu değerlendirmeye yönelik tahlil kullanılabilmektedir (örneğin, hücre profilerasyonu).

Örneğin, peptidomimetik bileşikler şu üç-fazlı proses kullanılarak elde edilebilmektedir: (1) burada açılan özel hücre tiplerinin hedeflenmesi için gerekli olan ikincil yapı bölgelerinin kimliklenmesi için mevcut buluşta kullanılan polipeptitlerin taranması (2) omurga geometrisinin refine edilmesi ve bu vekillere karşı gelen organik platformların sağlanması için konformasyonel olarak standart olan dipeptit vekillerinin kullanılması ve (3) doğal polipeptidin arzu edilen etkinliğinin taklit edilmesi için tasarlanan adaylar kütüphanelerinde organik farmakoforların gösterilmesi için en iyi organik platformların kullanılması. Daha ayrıntılı olarak üç şu şekildedir. Faz 1'de, öncü aday polipeptitler taranmaktadır ve bunların yapı etkinlikleri için gerekliliklerin kimliklenmesi için çalışılmaktadır. Orijinal olan bir dizi polipeptit analogu sentezlenmektedir. Faz 2'de, en iyi polipeptit analogları konformasyonel olarak standart olan dipeptit vekilleri kullanılarak incelenmektedir. İndolizidin-2-on, indolizidin-9-on ve kuinolizidinone amino asitleri (sırasıyla I²aa, I⁹aa ve Qaa), en iyi polipeptit adaylarının omurga geometrisinin çalışılması için platformlar olarak kullanılmaktadır. Bu ve ilgili platformlar (Halab ve ark., Biopolymers 55:101-122, 2000; ve Hanessian ve ark. Tetrahedron 53:12789-12854, 1997 eserinde incelenen), farmakoforların farklı yönlere yönlendirilmesi için polipeptidin spesifik bölgelerinde uygulanabilmektedir. Bu analogların biyolojik değerlendirmesi, etkinlik için geometrik gerekliliklerini taklit eden gelişmiş öncü polipeptitleri kimliklemektedir. Faz 3'te, en aktif öncü polipeptitlerden platformlar, doğal polipeptitlerin etkinliğinden sorumlu olan farmakoforların organik vekillerini göstermesi için kullanılmaktadır. Farmakoforlar ve yapı iskeleleri bir paralel sentez formatında birleştirilmektedir. Polipeptitlerin ve yukarıdaki fazların türevine teknikte bilinen yöntemler kullanılarak diğer şekillerde ulaşılabilmektedir.

Polipeptitler, polipeptit türevleri, peptidomimetikler veya mevcut buluşta kullanılan diğer küçük moleküllerden saptanan yağ fonksiyon ilişkileri, benzer veya daha iyi özelliklere sahip olan analog moleküler yapıların refine edilmesi ve hazırlanması için kullanılabilmektedir. Bu doğrultuda, mevcut buluşta kullanılan bileşikler aynı zamanda, burada açılan polipeptitlerin yapı polarite, yük karakteristikleri ve yan zincir özelliklerini paylaşan molekülleri kapsamaktadır.

30

Özet olarak, burada açıklanana dayanarak, teknikte uzman kişiler, bir ajanın özel hücre tiplerine (örneğin, burada açıklananlara) hedeflenmesine yönelik bileşiklerin kimliklenmesi için faydalı olan polipeptitler ve peptidomimetikler tarama tahlillerini geliştirebilmektedir. Tahliller, düşük-giripçik veya yüksek-giripçik veya ultra-yüksek giripçik tarama formatlarına yönelik olarak geliştirilebilmektedir. Tahliller, otomasyona uygun olan tahlilleri kapsamaktadır.

35

Konjugatlar

Burada açıklanan polipeptitler veya bunların türevleri bir ajana bağlantılabilmektedir. Örneğin, polipeptit (örneğin, burada açıklanan herhangi biri) bir terapötik ajana, bir 5 diagnostik ajana, veya bir etikete tutturulabilmektedir. Belirli yapılandırmalarda, polipeptit, bir hastalığın veya durumun teşhisine yönelik olarak radyo görüntüleme ajanı gibi bir tespit edilebilir bir etiket ile bağlantılabilmekte veya etiketlenebilmektedir. Bu ajanların örnekleri, antikörün bir hastalığa veya durum-spesifik antijene (örneğin, teşhis veya terapiye yönelik olarak) bağlandığı radyo görüntüleme ajanı antikör-vektör konjugatını kapsamaktadır. Diğer 10 bağlama molekülleri aynı zamanda buluş ile tasarlanmaktadır. Diğer durumlarda, polipeptit veya türev, bir hastalığın veya durumun tedavi edilmesi için bir terapötik ajana bağlantılabilmektedir veya bunların karışımları ile bağlantılabilmekte veya etiketlenebilmektedir. Hastalık veya durum, ajanın BBB boyunca veya bir özel hücre tipinin içine taşınmasına olanak sağlayan koşullar altında bir bireye bir vektör-ajan konjugatının 15 uygulanması ile tedavi edilebilmektedir. Her bir polipeptit en az 1, 2, 3, 4, 5, 6, veya 7 ajanı kapsayabilmektedir. Diğer yapılandırmalarda, her bir ajan buna tutturulan en az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 veya daha fazla polipeptide sahiptir. Konjugatlar; bir süjenin karaciğeri, akciğeri, böbreği, dalağı veya kası gibi özel bir hücre tipinde veya dokuda ajanın birikimini (örneğin, arttırılması veya azaltılması) gidermeden dolayı destekleyebilmektedir.

20

Ajan, özel bir hücre tipine veya BBB boyunca taşınmadan sonra vektörden serbest bırakılabilmektedir. Ajan, örneğin, enzimatik yarıma veya vektör ve ajan arasındaki bir kimyasal bağın başka bir kopması ile serbest bırakılabilmektedir. Serbest bırakılan ajan 25 sonrasında, vektörün yokluğunda amaçlanan kapasitesinde işlev görebilmektedir.

25

Terapötik ajanlar. Bir terapötik ajan herhangi bir biyolojik olarak aktif ajan olabilmektedir. Örneğin, bir terapötik, bir hastalığın tedavi edilmesi için (örneğin kanser hücrelerinin öldürülmesi için) bir ilaç, hap, bir ajan yayılımı radyasyon, bir seller toksin (örneğin, bir kemoterapötik ajan), bunun bir biyolojik olarak aktif fragmanı veya bunun bir karışımı 30 olabilmektedir veya bu bir bireydeki bir hastalığın veya durumun tedavi edilmesi için bir ajan olabilmektedir. Bir terapötik ajan, fungal, bakteriyel veya diğer mikroorganizma (örneğin mikroorganizma veya virüs), sürüngen gibi hayvan veya bitki kökenli bir ürün veya bir sentetik ürün olabilmektedir. Bir terapötik ajan ve/veya bunun biyolojik olarak aktif fragmenti, enzimatik olarak aktif ajan ve/veya bunun fragmenti olabilmektedir veya önemli 35 ve/veya esas selüler yolağı inhibe edilmesi veya bloke edilmesi ile veya önemli ve/veya esas

doğal olarak oluşan selüler bileşen ile yarışılmasınle etki edebilmektedir. Diğer terapötik ajanlar, antikorlarve antikor fragmentlerini kapsamaktadır

Antikkanser ajanlar. Teknikte bilinen herhangi bir antikanser ajan bir konjugatın bir parçası olabilmektedir. Belirli yapılandırılmalarda, ajan paklitaksel veya bir paklitaksel analogudur (örneğin burada açıklananlar). Beynin kanserleri, BBB boyunca etkili bir şekilde taşınan bir vektörü (örneğin, AngioPep-1, AngioPep-2, AngioPep-3, AngioPep-4a, AngioPep-4b, AngioPep-5, veya AngioPep-6) barındıran bir konjugat ile tedavi edilebilmektedir. Karaciğer, akciğer, böbrek veya dalak kanserleri, uygun hücre tipine etkili bir şekilde taşınan bir vektöre konjuge edilen bir antikanser ajanınle tedavi edilebilmektedir (örneğin, AngioPep-7). Örnekleyici ajanlar; abareliks, aldeslökin, alemtuzumab, alitretinoin, allopurinol, altretamin, amifostin, ana-kinra, anastrozol, arsenik trioksit, asparajinaz, azasitidin, BCG Canlı, bevakuzimab, beksaroten, bleomisin, bleo-misin, bortezombi, bortezomib, busülfan, busülfan, kalusteron, kapasitabin, karboplatin, karbüsin, selekoksib, se-tuksimab, klorambusil, sisplatin, kladribin, klofarabin, siklofosfamid, sitarabin, dakarbazin, daktinomisin, aktinomisin D, dalteparin (örneğin, sodyum), darbepoetin alfa, dasatinib, daunorubisin, daunomisin, desitabin, denilökin, Denilökin difitoks, deksrazoksan, dozetaksel, doksorubisin, dromostanolon propionat, ekulizumab, epirubisin (örneğin, HCl), epoetin alfa, erlotinib, estramustin, etoposid (örneğin, fosfat), eksemestan, fentanil (örneğin, sitrat), filgrastim, floksuridin, fludarabin, flourourasil, 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabin (örneğin, HCl), gemtuzumab ozogamisin, goserelin (örneğin, asetat), histrelin (örneğin, asetat), hidroksiüre, ibritumomab tiuksetan, idarubisin, ifosfamid, imatinib (örneğin, mesilat), Interferon alfa-2b, irinotekan, lapatinib ditosilat, lenalidomid, letrozol, lökovorin, löprolid (örneğin, asetat), levamizol, lomustin, CCNU, mekloretamin (nitrojen hardalı) megestrol, melfalan (L-PAM), merkaptopurin (6-MP), mesna, metotreksat, metokssalen, mitomisin C, mitotan, mitoksantron, nandrolon fenpropionat, nelarabin, nofetumomab, oprelvekin, oksaliplatin, paklitaksel, palifermin, pamidronat, panitumumab, pegademaz, pegaspargaz, pegfilgrastim, peginterferon alfa-2b, pemetreksed (örneğin, disodyum), pentostatin, pipobroman, plikamisin (mitramisin), porfimer (örneğin, sodyum), prokarbazin, kuinakrin, rasburikaz, rituksimab, sargramostim, sorafenib, streptozosin, sunitinib (örneğin, maleat), talk, tamoksifen, temozolomid, teniposid (VM-26), testolakton, talidomid, tiyoguanin (6-TG), tiyotepa, tiyotepa, tiyotepa, topotekan (örneğin, hcl), toremifen, Tositumomab/I-131 (tositumomab), trastuzumab, trastuzumab, tretinoin (ATRA), urasil hardalıvalrubisin, vinblastin, vinkristin, vinorelbin, vorinostat, zoledronat, ve zoledronik asidi kapsamaktadır

Tespit edilebilir etiketler. Tespit ve teşhis amaçlı, konjugat etiketlenebilmektedir. Tespit edilebilir etiketler veya markörler, bir radyo etiket, bir floresan etiket, bir nükleer manyetik rezonans aktif etiket, bir luminesan etiket, bir kromofor etiket, PET tarayıcı için bir pozitron yayan izotop, kemiluminesans etiket veya bir enzimatik etiket olabilmektedir. Örnekleyici radyasyon yayan radyo görüntüleme ajanları (tespit edilebilir radyo etiketler) indiyum-111, teknityum-99, veya düşük dozlu iyodin-131'i kapsamaktadır. Gama ve beta yayan radyonüklitler, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ^{99m}Tc, ve ²⁰¹Tl) kapsamaktadır. Pozitron yayan radyonüklitler, ¹⁸F, ⁵⁵Co, ⁶⁰Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁶Ga, ⁶⁸Ga, ⁸²Rb, ve ⁸⁶Y kapsamaktadır. Floresan etiketler, Cy5.5, Alexa 488, yeşil floresan Protein (GFP), fluorescein, ve rodamine kapsamaktadır. Kemiluminesans etiketler, lusiferaz ve β-galaktosidaz kapsamaktadır. Enzimatik etiketler peroksidaz ve fosfat kapsamaktadır. Bir histag, bir tespit edilebilir etiket olabilmektedir. Örneğin, konjugatlar, ayrıca bir etiketi kapsayabilen, bir vektör kısmı ve bir antikör kısmı (antikör veya antikör fragmenti) kapsayabilmektedir. Bu durumda, etiket, ya vektöre ya da antikora tutturulabilmektedir.

Antikorlar. Antikorlar aynı zamanda bir konjugatın bir parçası olabilmektedir. Konjugasyona teknikte bilinen herhangi bir araç kullanılarak ulaşılabilir (örneğin, burada açıklanan konjugasyon stratejileri kullanılarak). Herhangi bir diagnostik veya terapötik antikör, bir veya daha fazla (örneğin, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, veya daha fazla) vektöre konjuge edilebilmektedir. Ek olarak, antikör fragmentleri (örneğin bir antijene bağlanabilen) aynı zamanda vektörlere konjuge edilebilmektedir. Antikör fragmentleri, bir antikörün Fab ve Fc bölgelerini, ağı zinciri ve hafif zincirini kapsamaktadır (örneğin burada açıklanan antikörden herhangi birinin). Kanser teşhisinde ve terapisinde kullanıma yönelik örnekleyici antikorlar; ABX-EGF (Panitimumab), OvaRex (Oregovemab), Theragyn (pemtumomabritriyum-90), Therex, Bivatuzumab, Panorex (Edrecolomab), ReoPro (Absiksimab), Bexxar (Tositumomab), MAb, idiyotipik 105AD7, Anti-EpCAM (Katumaksomab), MAb akciğer kanseri (Sitoklonaldan), Herceptin (Trastuzumab), Rituxan (Ritüksimab), Avastin (Bevasizumab), AMD Fab (Ranibizumab), E-26 (2'inci gen. IgE) (Omalizumab), Zevalin (Ritüksan +itriyum-90) (Ibritumomab tiuksetan), Cetuksimab, BEC2 (Mitumomab), IMC-1C11, nuC242-DM1, LimfoSid (Epratuzumab), LimfoSid Y-90, CEA-Sid (Labetuzumab), CEA-Cide Y-90, CEA-Scan (Tc-99m-etiketli arsitumomab), LeukoScan (Tc-99m-etiketli sulesomab), LimfoScan (Tc-99m-etiketli bektumomab), AFP-Scan (Tc-99m-etiketli), Hu-maRAD-HN (+ itriyum-90), HumaSPECT (Votumumab), MDX-101 (CTLA-4), MDX-210 (her-2 artan ekspresyon), MDX-210/MAK, Vitaxin, MAb 425, IS-IL-2, Campath (alemtuzumab), CD20 streptavidin, Avidisin, (albümin + NRLU13), Onkolim (+ iyodin-131) Cotara (+ iyodin-131), C215 (+ staphylococcal

enterotoksin, MAb akciğer/böbrek kanseri (Pharmacia Corp.'den), nakolomab tafenatoks (C242 staphylococcal enterotoksin), Nuvion (Visilizumab), SMART M195, SMART ID10, CEAVac, TriGem, TriAb, NovoMAB-G2 radyo etiketli, Monofarm C, GlioMAB-H (+ gelonin toksin), Rituksan (Ritüksimab), ve ING-1'i kapsamaktadır Ek terapötik antikorlar, 5G1.1 (Ekluzumab), 5G1.1-SC (Pekselizumab), ABX-CBL (Gavili-momab), ABX-IL8, Antegren (Natalizumab), Anti-CD11a (Efalizumab), Anti-CD 18 (Genetech'ten), Anti-LFA1, Antova, BTI-322, CDP571, CDP850, Korsevin M, D2E7 (Adalimumab), Humira (Adalimumab), Hu23F2G (Rovelizumab), IC14, IDEC-114, IDEC-131, IDEC-151, IDEC-152, Infliksimab (Remisad), LDP-01, LDP-02, MAK-195F (Afelimomab), MDX-33, MDX-CD4, MEDI-507 (Siplizumab), OKT4A, OKT3 (Muromonab- CD3), ve ReoPro (Absiksimab) kapsamaktadır

Konjugasyon bağlayıcılar

Konjugat (örneğin, bir polipeptit-ajan konjugatı) herhangi bir çapraz-bağlantı (konjugasyon) reaktifi veya birçoğunun piyasada satıldığı teknikte bilinen protokol kullanılarak elde edilebilmektedir. Bu tür protokoller ve reaktifler, amino, karboksi, sülfhidril, karbonil, karbonhidrat ve/veya fenol grupları ile reaktif olan çapraz-bağlayıcılar kapsamaktadır. Bu tür protokollerin miktarı zaman ve şartlar konjugasyonun optimize edilmesi için değiştirilebilmektedir. Çapraz-bağlayıcı reaktifler, en az iki reaktif grubu barındırmaktadır ve genel olarak homofonksiyonel çapraz-bağlayıcılara (özdeş reaktif grupları barındıran) ve heterofonksiyonel çapraz-bağlayıcılara (özdeş olmayan reaktif grupları barındıran) ayrılmaktadır. Çapraz bağlayıcılar ya homobi-fonksiyonel ve/veya heterobifonksiyonel olabilmektedir. Ayrıca, çapraz-bağlayıcı reaktif kümeleri arasında bir aralayı dahil edebilmektedir ve çapraz-bağlayıcıdaki iki reaktif küme doğrudan bağlantılabilmektedir. Bağlar, ester bağları kapsayabilmektedir.

Örnekleyici bağlayıcılar, BS³ [Bis(sülfosüksinimidil)subrat], NHS/EDC (N-hidroksisüksinimit ve N-etil-(dimetilaminopropil) karbodimid, Sülf-EMCS ([N-e-Maleimidokaproik asit] hidrazit), SATA (N-süksinimidil-S-asetiltiyoasetat) ve hidrazidi kapsamaktadır. BS³, erişilebilir birincil aminleri hedefleyen homobifonksiyonel N-hidroksisüksinimid esterdir. Bir konjugasyon, Şekil 2'de örneklendirilmektedir. NHS/EDC, karboksil grupları ile birincil amin grupları konjugasyonuna olanak sağlamaktadır. Sülf-EMCS, sülfhidril ve amino gruplarına doğru reaktif olan heterobifonksiyonel reaktif grupları (maleimid ve NHS-ester). Sülf-NHS/EDC aktivasyonu kullanılarak amin birleştirme, Şekiller 3 ve 4'te örneklendirildiği üzere, polipeptitler ile terapötik antikorları çapraz bağlanması için kullanılabilmektedir. Bu, h

basit ve çoğaltılabilir birleştirme tekniğidir. Sonuçta oluşan konjugat stabildir ve antikorun biyolojik etkinliğini tutmaktadır. Dahası, güvenilir bir şekilde kontrol edilebilen yüksek konjugasyon kapasitesine ve birleştirme prosedürleri sırasında bir düşük spesifik-olmayan etkileşime sahiptir. SATA, aminlere doğru reaktiftir ve korunmuş sülfhidril grupları eklemektedir. NHS-esteri, stabil amid bağlarının oluşturulması için birincil aminler ile tepkimeye girmektedir. Sülfhidril grupları hidroksilamin kullanılarak koruyucu gruptan uzaklaştırılabilmektedir. Bu konjugasyon yöntemi Şekil 5'te örneklendirilmektedir. Hidrazit, Şekil 6'da gösterildiği üzere, karboksil grupları birincil aminlere bağlantılması için kullanılabilmektedir ve bu yüzden glikoproteinlerine bağlantılması için faydalıdır. Ek örnekleyici bağlantılar Şekil 7'de gösterilmektedir.

Terapötik ajanlar gibi küçük moleküller, polipeptitlere konjuge edilebilmektedir (örneğin, burada açıklananlar gibi). Örnekleyici küçük molekül, paklitaksel, konjugasyon için faydalı olan iki stratejik konuma (konum C2' ve C7) sahiptir. Bir vektörün veya vektörün paklitaksel konjugasyonu, şu şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 8). Kıscası, paklitaksel konum 2'de bir süksinil grubunu tutturması için oda sıcaklığında üç saat boyunca anhidrit süksinik piridin ile tepkimeye girmektedir. 2'-süksinil paklitaksel, ksüksinik asidi kolaylıkla serbest bırakabilen konum 2'de bir yarılabılır ester bağına sahiptir. Bu yarılabılır ester bağını ayırma arzu edildiğinde, bağlayıcılar ile çeşitli modifikasyonlar için kullanılabilmektedir. Sonuçta oluşan 2'-O-süksinil-paklitaksel sonrasında, oda sıcaklığında dokuz saat boyunca DMSO'da EDC/NHS ile tepkimeye girmektedir, bunu takiben oda sıcaklığında dört saat boyunca bir ek tepkime süresi boyunca Ringer/DMSO'da vektör ve vektör eklenmektedir. Şekil 8'de tasvir edilen konjugasyon tepkimesi HPLC ile izlenmektedir. Paklitaksel, 2'-O-süksinil-paklitaksel ve 2'-O-NHS-süksinil-paklitaksel gibi her bir ara madde, saflaştırılmaktadır ve HPLC, ince sıvı kromatografisi, NMR (¹³C veya ¹H değişimi), erime noktası, kütle spektrometrisi gibi farklı yaklaşımlar kullanılarak onaylanmaktadır. Nihai konjugat, kütle spektrometrisi ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilmektedir.

Bu durum, her bir vektör üzerine konjuge edilen paklitaksel moleküllerinin sayısını saptanması olanak sağlamaktadır.

30

Farmasötik bileşimler

Hidrofobik ajanlar, buluşa ait sulu çözeltide, farmasötik bileşimlerde sıklıkla sınırlı çözünürlük sergilediği için, bir çözme ajanını kapsamaktadır, burada söz konusu çözme ajanı bir yağ asidin bir polioksietilen esteridir. ANG1005'e ait örnekleyici formülasyonları DMSO ve

35

Solutol HS 15'i kapsamaktadır ancak, diğer çözme ajanlarına bu ajanların yerinde ya da bunlara ek olarak, buluşun bileşimlerinde faydalı olabilmektedir. Bileşimler ayrıca, tamponlama ajanlarını, opsiyonel olarak tonisite ajanlarını ve hacim arttırıcı ajanları kapsamaktadır.

5

Çözündürücü ajanlar

Bileşimler ve yöntemler teknikte bilinen herhangi bir çözündürücü ajanı kapsayabilmektedir. Bu tür ajanlar, bileşimin kütlelerinin en az %1, %2, %5, %10, %15, %20, %25, %30, %35, %40, %50, %60 veya %70'ini kaplayabilmektedir. Örnekleyici çözündürücüler; suda-çözünür organik çözücüler (örneğin, polietilen glikol 300, polietilen glikol 400, etanol, propilen glikol, gliserin, *N*-metil-2-pirolidon, dimetilasetamit ve dimetilsülfoksit), iyonik olmayan sürfaktanlar (örneğin, Cremophor EL, Cremophor RH 40, Cremophor RH 60, α -tokoferol polietilen glikol 1000 süksinat, polisorbata 20, polisorbata 80, Solutol HS 15 (Makrogol 15 Hidroksistearat), sorbitan monooleat, poloksamer 407, Labrafil M-1944CS, Labrafil M-2125CS, Labrasol, Gellucire 44/14, Softigen 767 ve PEG 300, 400 veya 1750'deki mono ve di-yağ asit esterleri), suda çözünmeyen lipitler (örneğin, hint yağı, mısır yağı, pamuk tohumu yağı, zeytin yağı, yerfındığı yağı, nane yağı, aspir yağı, susam yağı, soya yağı, hidrojenlenmiş bitkisel yağlar, hidrojenlenmiş soya fasulyesi yağı ve hindistancevizi yağı ve hurma tohumu yağları orta zincirli trigliseritleri), organik sıvılar/yarıkatılar (balmumu, α -tokoferol, oleik asit, orta zincirli mono ve digliseritler), siklodekstrinler (örneğin α -siklodekstrin, β -siklodekstrin, hidroksipropil- β -siklodekstrin ve sülfobutiller- β -siklodekstrin), ve fosfolipitler (örneğin, hidrojene edilmiş soya fosfatidilkolin, distearoilfosfat-diygliserol, 1- α -dimiristoilfosfatidilkolin, 1- α -dimiristoilfosfatidilgliserol) kapsamaktadır. Mevcut buluşun liyofilize bileşimlerinde, çözündürücü ajan bir yağ asidin bir polioksietilen esteridir.

25

Tamponlama ajanları

Buluşun bileşimleri aynı zamanda bir veya daha fazla tamponlama ajanını kapsamaktadır. Hidrofobik ajana bağlı olarak, farmasötik bileşimin pH veya tonisitesinin muhafaza edilmesi arzu edilebilmektedir (örneğin, aktif ajanların bozunumunun en aza indirilmesi için veya tedavide kullanıldığında ajanların güvenliğinin veya etkililiğinin maksimuma çıkarılması için). Herhangi bir özel pH veya pH aralığına tamponlamaya, uygun tamponlama kullanılarak ulaşılabilmektedir (örneğin, pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, veya bu değerler arasındaki herhangi

35

bir aralığa). Tampon, arzu edilen tamponlama etkisine ulaşması için herhangi bir gerekli kuvvette bulunabilmektedir (örneğin, 1 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 1.0 M, 1.5 M, veya bu değerler arasındaki herhangi bir aralık). Örnekleyici tampon ajanları sitrik asit/fosfat, asetat, barbital, borat, Britton-Robinson, kakodilat, sitrat, kollidin, format, maleat, McIlvaine, fosfat, Prideaux-Ward, süksinat, sitrat-fosfat-borat (Teorell-Stanhagen), veronal asetat, MES (2- (N-morfolino) etansülfonik asit), BIS-TRIS (bis (2-hidroksietil) iminotris- (hidroksimetil) metan), ADA (N- (2-asetami-do) -2-iminodiasetik asit), ACES (N- (karbamoilmetil) -2-aminoetansülfonik asit), PIPES (piperazin-N, N'-bis (2-etansülfonik asit)), MOPSO (3- (N-morfolino) -2-hidroksipropansülfonik asit), BIS-TRIS PROPAN (1,3-bis (tris (hidroksimetil) metilamino) propan), BES (N, N-bis (2-hidroksietil) -2-amino-etansülfonik asit), MOPS (3- (N-morfolino)propanesülfonik asit), TES (N-tris(hidroksimetil) metil-2-aminoetansülfonik asit), HEPES (N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-(2-etansülfonik asit), DIPSO (3-(N,N-bis(2-hidroksietil)amino)-2-hidroksipropansülfonik asit), MOBS (4-(N-morfolino)bütanesülfonik asit), TAPSO (3-(N-tris(hidroksimetil)metilamino)-2-hidroksipropanesülfonik asit), TRIZMA (tris(hidroksimetil-aminometan), HEPPSO (N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-(2-hidroksipropanesülfonik asit), POPSO (piperazin-N, N'-bis(2-hidroksipropansülfonik asit)), TEA (trietanolamin), EPPS (N-(2-hidroksietil) -piperazin-N'-(3-propansülfonik asit), TRİKİN (N-tris(hidroksi-metil)metilglisin), GLY-GLY (glisillisin), BİSİN (N,N-bis (2-hidroksietil) glisin), HEPBS (N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-(4-bütanesülfonik asit)), TAPS (N-tris (hidroksimetil)metil-3-amino-propansülfonik asit), AMPD (2-amino-2-metil-1, 3-propandiol), ve/veya teknikte bilinen herhangi bir diğer tamponu kapsamaktadır

Tonisite, bir tamponlama ajanı ek olarak veya bunun yerine, teknikte bilinen herhangi bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuz kullanılarak muhafaza edilebilmektedir. Örnekleyici tuzlar, sodyum asetat, sodyum laktat, sodyum klorür, potasyum klorür ve kalsiyum klorürü kapsamaktadır. Bu tür tuzlar ya tamponlama ajanları ile birlikte ya da kombinasyon halinde, arzu edilen tonisitenin muhafaza edilmesi için yeterli bir miktarda bulunabilmektedir (örneğin, 1 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 1.0 M, 1.5 M, veya bu değerler arasındaki herhangi bir aralık).

30

Diğer yardımcı maddeler

Buluşa ait bileşimler ve yöntemler bir hacim artırıcı ajanı kapsamaktadır. Hacim artırıcı ajanlar özellikle farmasötik bileşimin bir dehidre (örneğin, liyofilize) formda sağlandığında arzu edilmektedir. Liyofilize bileşimler, ağırlıkça %10'dan daha az (örneğin, %8, %5, %4, %3,

35

%2, %1, %0.5, %0.1, %0.05'ten daha az) su veya diğerk çözücüyü barındırabilmektedir. Parental yollar ile uygulanan dehidre bileşimler tipik olarak, bir hastaya uygulanmadan önce bir sulu çözeltide çözüldürüldüğü için, dehidrasyon prosesinin yeniden çözünmeye olanak sağlayan bir şekilde ilerlemesi önemli olabilmektedir. Hacim arttırıcı ajanlar, liyofilize ürünün daha kolaylıkla yeniden çözüldürülebilmesinin temin edilmesi için eklenebilmektedir. Bu tür ajanlar teknikte bilinmektedir ve polietilen glikol, polivinil alkol, polivinil pirrolidin, dekstran, dekstroz, manitol, sükröz, laktoz, trehaloz ve sorbitol gibi şekerleri; glisin, arjinin, aspartik asit gibi amino asitleri; ve kolajen, jelatin veya serum albumin gibi çözünen proteinleri kapsamaktadır.

10 Bileşimler ayrıca, koruyucular (örneğin, timerosal, benzil alkol, parabenler), polietilen glikol gibi polimerlerin proteine kovalent tutturulmasını, metal iyonlar ile kompleks oluşturmayı veya malzemenin, poliaktik asit, poliglikolik asit, hidrojel vb. gibi polimerik bileşiklerin partikül preparasyonlarına veya üzerine veya lipozomlar, mikroemülsiyonlar, misellerin, ünilemeler veya multilameler keseciklerin, eritrosit hayaletlerin veya sferoplastların üzerine dahil edilmesini içerebilmektedir. Bu tür bileşimler, fiziksel hali, çözünlülüğü, stabilizeyi, in vivo salınım hızı ve in vivo klerensin hızı etkileyecektir. Kontrollü ve yavaş salınım bileşimler, lipofilik depolarda (örneğin yağ asitler, mumlar yağlar) formülasyonu kapsamaktadır. Aynı zamanda kapsanan, polimerler (örneğin poloksamerler veya poloksaminler) ile kaplanan partikül bileşimleridir. Bileşimlerin diğer yapılarındakiler partikül form koruyucu kaplamalar, proteaz inhibitörlerini veya parenteral, pulmoner, nazal, oral, vajinal, rektal yolları kapsayan çeşitli uygulama yollarına yönelik geçirgenlik artırıcıları dahil etmektedir. Bir yapılarında farmasötik bileşim, parenteral olarak, parakanseral olarak, transmukozal olarak, transdermal olarak, intramüsküler olarak, intravenöz olarak, intradermal olarak, subkütan olarak, intraperitoneal olarak, intraventriküler olarak, intrakraniyal olarak ve intratümöral olarak uygulanmaktadır.

Oral kullanıma yönelik katı dozaj formları

30 Oral kullanıma yönelik formülasyonlar, toksik olmayan farmasötik olarak kabul edilebilir yardımcı maddeler ile bir karışımında aktif içeriği (içerikleri) barındıran tabletleri kapsamaktadır ve bu tür formülasyonlar teknikte uzman kişice bilinmektedir (örneğin, 5,817,307, 5,824,300, 5,830,456, 5,846,526, 5,882,640, 5,910,304, 6,036,949, 6,036,949, 6,372,218). Bu yardımcı maddeler, örneğin, inert seyrelticiler veya dolgu maddeleri (örneğin, sükröz, sorbitol, şeker, manitol, mikrokristalin selüloz, patates nişastası kapsayan nişastalar, kalsiyum karbonat,

sodyum klorür, laktoz, kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat, veya sodyum fosfat); ufalama ve dağıtma ajanları (örneğin, mikrokristalin selülozu kapsayan selüloz türevleri, patates nişastasını kapsayan nişastalar, kroskarmelloz sodyum, aljinatlar veya aljinik asit); bağlama ajanları (örneğin, sükroz, glukoz, sorbitol, akasya, aljinik asit, sodyum aljinat, jelatin, nişasta, önceden jelatinleştirilmiş nişasta, mikrokristalin selüloz, magnezyum alüminyum silikat, karboksimetilselüloz sodyum, metilselülöz hidroksipropil metilselüloz, etilselüloz, polivinilpirrolidon, veya polietilen glikol); ve yağlama ajanları, glidantlar ve yapışma önleyici maddeleri (örneğin, magnezyum stearat, çinko stearat, stearik asit, silikalar, hidrojenlenmiş bitkisel yağlar veya talk) kapsamaktadır. Diğer farmasötik olarak kabul edilebilir yardımcı maddeler renklendiriciler, lezzetlendirici ajanlar, nemlendiriciler, tamponlama ajanları ve benzeri olabilmektedir.

Tabletler kaplaması olabilmektedir veya tabletler opsiyonel olarak gastrointestinal traktta absorpsiyonun ve dağılmasını geciktirilmesi ve böylelikle daha uzun bir süre boyunca bir yavaş etkinin sağlanması için bilinen teknikler ile kaplanabilmektedir. Kaplama, önceden belirlenmiş şekilde ajanın salınması için uyarlanabilmektedir (örneğin bir kontrollü salınım formülasyonuna ulaşılmasını için) veya mideden geçmesinin sonrasında kadar (enterik kaplama) ajanın salınmaması için uyarlanabilmektedir. Kaplama, bir şeker kaplama, bir film kaplama (örneğin hidroksipropik metilselüloz, metilselülöz metil hidroksietil-selüloz, hidroksipropilselüloz, karboksimetilselülöz akrilat kopolimerler, polietilen glikoller, ve/veya polivinilpirrolidona dayanarak), veya bir enterik kaplama (örneğin, metakrilik asit kopolimer, selüloz asetat ftalat, hidroksipropil metilselüloz ftalat, hidroksipropil metilselüloz asteta süksinat, polivinil asetat ftalat, şelak ve/veya etilselüloza dayanarak) olabilmektedir. Ayrıca, örneğin, gliseril monostearat veya gliseril distearat gibi bir zaman geciktirici malzeme kullanılabilmektedir.

Katı tablet bileşimleri, istenmeyen kimyasal değişikliklerden (örneğin, aktif maddelerin salınımından önce kimyasal bozunum) bileşimin korunması için uyarlanmış bir kaplamayı kapsayabilmektedir. Kaplama, yukarıda geçen, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* eserinde açıklanan ile benzer şekilde katı dozaj formunda uygulanabilmektedir.

Oral kullanıma yönelik formülasyonlar aynı zamanda, çiğnenebilir tabletler veya aktif içeriğin bir inert taşıyıcı ile karıştırılması (örneğin patates nişastasını, laktoz, mikrokristalin selüloz, kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat veya kaolin) sert jelatin kapsüller olarak veya aktif içeriğin su veya bir yağ ortamında (örneğin yer fıstığı yağı, sıvı parafin veya zeytin yağı ile karıştırılması)

yumuşak jelatin kapsüller olarak sunulabilmektedir. Tozlar ve granülatlar, örneğin bir mikser, bir akışkan yatak aparatı veya spreyle kurutma teçhizatı kullanılarak geleneksel şekilde tabletler ve kapsüller altında yukarıda bahsedilen içerikler kullanılarak hazırlanabilmektedir.

5 Tedavi yöntemleri

Açılan, burada açılan ajanlar kullanan tedavi yöntemleridir. Burada açılan antikanser ajanlar ve konjugatlar (örneğin ANG 1005), teknikte bilinen herhangi bir kanserin tedavi edilmesi için kullanılabilmektedir. Burada açılan peptitleri kapsayan konjugatlar, BBB'yi (örneğin, AngioPep-6 aracılığıyla AngioPep-1) geçebilmektedir veya bu yüzden herhangi bir beyin veya merkezi sinir sistemi hastalığı (örneğin, gliyoblastom, astrositom, gliyoma, meduloblastyoma ve oligodendroma, nörogliyoma, ependimoma ve meningiyoma gibi bir beyin kanseri) tedavi etmek üzere kullanılabilmektedir. Bu konjugatlar aynı zamanda karaciğer, akciğere, böbreğe, dalağa veya kasa etkili bir şekilde taşılabilmektedir (örneğin, AngioPep-7 aracılığıyla AngioPep-1) ve bu yüzden, bu dokular ile ilişkilendirilen bir hastalığı (örneğin, hepatoselüler karsinom, karaciğer kanseri, küçük hücreli karsinom (örneğin, küçük hücreli kanser), karışık küçük hücreli/büyük hücreli karsinom, birleştirilmiş küçük hücreli karsinom ve metastatik tümörler gibi bir kanser) tedavi etmek üzere uygun bir terapötik ajan ile bağlantı olarak kullanılabilmektedir. Metastatik tümörler, meme kanserini, kolon kanserini, prostat kanserini, sarkomaymış mesane kanserini, nöroblastomu, Wilm tümörünü, lenfomaymış Hodgkin dâhil lenfomaymış ve belirli T-hücresi lenfomalarını kapsayan, herhangi bir doku kanserinden kaynaklanabilmektedir. Buluşun bir bileşimi ile tedavi edilebilen ek örnekleyici kanserler; hepatoselüler karsinom, meme kanseri, mantle hücreli lenfoma, Hodgkins dâhil lenfoma, adenoma, skuamöz hücreli karsinomu, larengeal karsinomu gibi çeşitli karsinomları kapsayan baş ve boyun kanserleri, retina kanserleri, özofagus kanserleri, çoklu miyelom, over kanseri, rahim kanseri, melanom, kolorektal kanser, mesane kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri (küçük olmayan hücreli akciğer karsinomunu kapsayan), pankreas kanseri, rahim ağzı kanseri, baş boyun kanseri, deri kanserleri, nazofaringeal karsinom, liposarkoma, epitelyal karsinom, ranlı hücreli karsinom, safra kesesi adenokarsinom, parotis adenokarsinom, endometriyal sarkom, çoklu ilaca dirençli kanserler; ve tümör anjiyogenez ile ilişkili neovaskülerizasyon, maküler dejenerasyon (örneğin, ıslak/kuru AMD), komeal neovaskülerizasyonu, diyabetik retinopati, neovasküler glakom, miyopik dejenerasyon gibi profileratif hastalıklar ve durumlar ve restenoz ve polikistik böbrek hastalığı gibi diğer profileratif hastalıklar ve durumları kapsamaktadır. BBB boyunca etkili bir şekilde taşınan vektör ile tedavi edilebilen beyin kanserleri, astrositom, pilositik astrositom, disembriyoplastik

nöroepitelyal tümör, oligodendrogliomalar, ependimoma, gliyoblastom multiforme, karışık gliyomalar, oligoastrositomlar, medullablastom, retinoblastom, nöroblastom germinoma ve teratomayı kapsamaktadır

- 5 Buluşa ait bir bileşim, bir süjeye teknikte bilinen herhangi bir yol ile; örneğin, oral olarak, intraarteriyel olarak, intranazal olarak, intraperitoneal olarak, intravenöz olarak, intramüsküler olarak, subkütan olarak, transdermal olarak veya *ağızdan* uygulanabilmektedir. Ajan, örneğin, bir anti-anjiyojenik bileşik olabilmektedir.

10 Dozajlar

Burada açıklanan yöntemler kullanılarak belirlenen veya burada açıklanan herhangi bir konjugat veya bileşimin dozajı birkaç unsura bağlı olup, şunları kapsamaktadır uygulama yöntemi, tedavi edilecek hastanın (örneğin, kanser), hastanın şiddeti, kanserin tedavi edileceği yoksa önleneyeceği mi, ve tedavi edilecek süjenin yaş, kilosu ve sağlığı

Açıklanan yöntemlere göre, bir süjeye bir vektörün, konjugatı veya bileşimin uygulaması, özel bir uygulama biçiminin, dozaja veya dozlama sıklığına sınırlanması amaçlanmaktadır buluş, tüm uygulama biçimlerini tasarlamaktadır Konjugat, veya bileşim, süjeye bir tek doz halinde veya çoklu dozlar halinde uygulanabilmektedir. Örneğin, tarama yöntemleri kullanılarak burada açıklanan veya belirlenen bir bileşik, haftada bir defa, örneğin 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, veya daha fazla hafta için uygulanabilmektedir. Herhangi bir belirli süjeye yönelik olarak, spesifik dozaj rejimlerinin; bireysel ihtiyaca ve bileşimleri uygulayan veya uygulamayı gözetleyen kişinin profesyonel kararına göre zaman içinde ayarlanması gerektiği anlaşılmaktadır Örneğin, bir bileşimin dozajı düşük doz burada açıklanan bir hastanın (örneğin kanser) tedavi edilmesi için yeterli etkinliği sağlamamakta ise arttırılabilmektedir. Buna karşılık olarak, bileşimin dozajı hastanın (örneğin kanser) azalması veya ortadan kalkması halinde azaltılabilmektedir.

30 Uzman doktorun sonuç olarak uygun miktar ve dozaj rejimine karar verecek olması karşın, burada açıklanan bir terapötik olarak etkili miktarda vektör, konjugat veya bileşim, örneğin, 0.0035 µg ila 20 µg/kg vücut ağırlığına veya 0.010 µg ila 140 µg/kg vücut ağırlığına hafta aralığında olabilmektedir. Arzu edilen şekilde terapötik olarak etkili miktar, günlük, iki günde bir, veya haftada iki defa uygulanan 0.025 µg ila 10 µg/kg, örneğin, en az 0.025, 0.035, 35 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, veya 9.0 µg/kg

vücut ağırlığı aralığında Ek olarak, terapötik olarak etkili miktar, haftada bir, iki haftada bir, haftada üç defa veya ayda bir defa uygulanan 0.05 µg ila 20 µg/kg, örneğin, en az 0.05, 0.7, 0.15, 0.2, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, veya 18.0 µg/kg vücut ağırlığı aralığında olabilmektedir. Ayrıca bir terapötik olarak etkili miktarda bir bileşik, örneğin, iki günde bir, haftada bir defa, iki haftada bir defa veya her üç haftada bir uygulanan 0.1 mg/m² ila 2,000 mg/m² aralığında olabilmektedir. Örneğin, ANG1005, her bir, iki, üç, dört haftada veya ayda bir veya iki ayda bir 50, 100, 200, 300, 400, 420, 500, 600, 700, 800, veya 1,000 mg/m²'de uygulanabilmektedir. Bir özel örnekte, ANG1005, her üç haftada bir 300 mg/m² veya 420 mg/m²'de uygulanmaktadır. Başka bir yapılandırılmalarda, terapötik olarak etkili miktar, günlük, iki günde bir, günde iki defa, haftada iki defa, haftalık veya iki haftada bir uygulanan bileşiğin 1000 µg/m² ila 20,000 µg/m², örneğin, en az 1000, 1500, 4000, veya 14,000 µg/m² aralığında

Aşağıdaki örneklerin, buluşu sağlamaktansa örneklerle açığaması amaçlanmaktadır

15

Örnek 1

ANG1005'in Çözünürlüğü

20 ANG1005'in çözünürlüğü, çok sayıda çözücü ve sürfaktanda test edilmiştir. Tek ajanlardan elde edilen bulgular aşağıdaki Tablo 13'te gösterilmektedir.

Çözücüler/sürfaktanlar	Çözünürlük	Konsantrasyon
Asetonitril (%100)	Hayır	
EtOH dehidre	Hayır	
Metil-tert-bütül-eter	Hayır	
Aseton	Hayır	
Etil asetat	Hayır	
Etil-bütül alkol	Hayır	
N,N-Dimetilasetamid	Evet	25 mg/ml
DMSO	Evet	120 mg/ml
Polisorbat 80 (Tween 80)	Hayır	
Cremophor EL	Hayır	
Cremophor ELP (BASF)	Hayır	
PEG 300	Hayır	

PEG	Hayır	
PEG	Hayır	
Polivinilpirrolidon (Kollidon 17)	Hayır	
Polivinilpirrolidon (Kollidon 19)	Hayır	
Siklodekstrin	Hayır	
Labrafil	Hayır	

ANG1005'in çözünürlüğü aynı zamanda çözücü/süfaktan kombinasyonlarında test edilmiştir. Bu bulgular Tablo 14'te gösterilmektedir.

4	5.25	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4,8 (± 0.2)	42°C
5	4.50	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4.0 ±	46°C
6	4.75	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4,3 (± 0.2)	46°C
7	5.00	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4.5 (± 0.2)	46°C
8	5.25	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4,8 (± 0.2)	46°C
9	4.50	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4.0 ±	50°C
10	4.75	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4,3 (± 0.2)	50°C
11	5.00	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4.5 (± 0.2)	50°C
12	5.25	4.0 (± 0.5)	Ayarlama yok	4,8 (± 0.2)	50°C
Pilot	Hedef nihai pH	DMSO pH (%5)	Solutol/tampon:80/20 (%25)	Tampon pH (%70)	Isıtma sıcaklığı
13	4.50	4.0 (± 0.5)	pH=5.0 (± 0.5)	5.0 (± 0.2)	50°C
14	4.75	4.0 (± 0.5)	pH=5.5 (± 0.5)	5.5 (± 0.2)	50°C
15	5.00	4.0 (± 0.5)	pH=6.0 (± 0.5)	5.5 (± 0.2)	50°C
16	5.25	4.0 (± 0.5)	pH=6.5 (± 0.5)	6.0 (± 0.2)	50°C
Pilot	Hedef nihai pH	DMSO pH (%5)	Solutol/su-HCl 80/20 (%25)	Tampon pH (%70)	Isıtma sıcaklığı
17	5.00	4.0 (± 0.5)	pH=6.0 (± 0.5)	5.5 (± 0.2)	50°C

5

Bu deneylerin bulguları aşağıdaki Tablo 16'da gösterilmektedir.

Tablo 16

Pilot	Hedef pH	Safılık (%)	DMSO (ppm)*	Görüşler
1	4.50	95.9	5855	hızlı berrak sulandıktan sonrasında bulanık
2	4.75	94.0	6488	hızlı berrak sulandıktan TAMAM
3	5.00	95.0	6256	hızlı berrak sulandıktan TAMAM
4	5.25	95.4	6382	hızlı berrak sulandıktan TAMAM
5	4.50	96.0	6818	hızlı berrak sulandıktan sonrasında bulanık

6	4.75	94.4	6330	hızlı berrak sulandı TAMAM
7	5.00	94.6	6806	hızlı berrak sulandı TAMAM
8	5.25	94.0	6930	hızlı berrak sulandı TAMAM
9	4.50	95.2	6235	hızlı berrak sulandı TAMAM
10	4.75	93.8	6932	hızlı berrak sulandı TAMAM
11	5.00	95.1	6302	hızlı berrak sulandı TAMAM
12 (ref.)	5.25	93.9	7846	hızlı berrak sulandı TAMAM
13	4.50	97.6	7035	bulanık sulandı (++)
14	4.75	97.4	7071	hızlı berrak sulandı sonrasında bulanık ve çökelek
15	5.00	95,4-94,3	6818	hızlı berrak sulandı TAMAM

Tablo 14: Kombinasyon halinde test edilen çözücülerin/sümfaktanların ANG1005 çözümlerleştirme Listesi

Çözücüler/sümfaktanlar	Çözünürlük	Konsantrasyon
EtOH/Tween 80	Hayır	
EtOH/Cremophor EL	Hayır	
EtOH/Cremophor ELP	Hayır	
EtOH/PEG	Hayır	
EtOH/Polivinilpirrolidon	Hayır	
Solutol HS15/Tampon (mikrodalga ile)	Evet	6 mg/ml
EtOH/Solutol HS15/Tampon (75°C)	Evet	6 mg/ml
DMSO/Solutol HS15/Tampon (50°C)	Evet	6 mg/ml
DMSO/Tween80/Tampon (65°C)	Evet	6 mg/ml
DMSO/Cremophor/Tampon (65°C)	Evet	6 mg/ml

Örnek 2

5 ANG1005 Çözümlerleştirme koşulları

ANG1005 liyofilizasyona yönelik preparasyonda birkaç çözümlerleştirme koşullarına tabi tutulmuştur. Bu bulguların bir özeti aşağıda gösterilmektedir. Yukarıda açıkladığı üzere, ANG1005 ilk olarak DMSO'da çözümlendirilmiştir. Bu karışım, Solutol veya Solutol 10 tamponu kombinasyonu eklenmiştir. Son olarak, glisin tamponu, ANG1005/DM-SO/Solutol karışımına eklenmiştir. Tablo 15'deki çözümlerleştirme koşulları bu yüzden test edilmiştir.

Tablo 15: ANG1005'in çözünürleştirilmesi

Pilot	Hedef nihai pH	DMSO (%5)	pH	Solutol (%20)	Tampon (%75)	pH	Isılama sıcaklığı
1	4.50	4.0 (± 0.5)		Ayarlama yok	4.0 (± 0.2)		42°C
2	4.75	4.0 (± 0.5)		Ayarlama yok	4,3 (± 0.2)		42°C
3	5.00	4.0 (± 0.5)		Ayarlama yok	4.5 (± 0.2)		42°C
16	5.25	95,9-96.2		7155	hızlı berrak sulandı		TAMAM
17	5.00	96.5		6163	bulanık sulandı		(++)

Bu bulgulara dayanarak, formülasyonun 40 ve 50°C arasındaki sıcaklıklarda işlenebileceğini saptadık. Çözeltinin pH'ı pH 4.5 sulandıktan sonra bulanık çözeltiler ile sonuçlanabileceği için, Solutol HS 15 ile misellerin oluşumunun sağlanması için 4.5'in üzerinde olmalıdır. ANG1005'in eklenmesinden önce Solutol HS15'in asidifikasyonu bozunumunu en aza indirmektedir.

Örnek 3

10 Liyofilizasyon Koşulları

Çözündürmeyi takiben, ANG1005 karışımını sulu tamponda (örneğin, glisin tamponu, HCl, manitol ve sodyum klorür ile 5.0'a ayarlanmış pH) seyreltilmiş, dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir. Örnekleyici koşullar yukarıdaki Tablo 4'te açıklanmaktadır.

15 -70°C ila 25°C arasındaki yük sıcaklıklar segment bir için test edilmiştir. Segment 2 için artı süresi, segmentler 1 ve 3'teki sıcaklıklar arasındaki farka göre değiştirilmiştir ve altı saat kadar olabilmektedir. Segment 3'ün, en az 12 saat gerçekleştirilmesi gerektiğini, çünkü zaman çerçevelerinin liyofilize kesin bir çökmesi ile sonuçlandırıldığı saptadık. Segmentler 8 ve 9, ürün sıcaklığının ikincil kurutma sırasında 18°C ila 21°C arasında olması için yukarıda gösterilen sıcaklıklar dahilinde ayarlanabilmektedir. Ürün, erimeden kaçınılması için 25°C'nin altında muhafaza edilmelidir. Burada açıklanan çözünürleştirme/liyofilizasyon protokolleri kullanılarak, bazı durumlarda, Tablo 17'de gösterildiği üzere %1'den daha az kalıntı DMSO ile %96'dan daha büyük saflık ile bir ürün üretebildik.

Tablo 17

Tablo 17: Enjeksiyon için ANG1005'in GMP yğınna yönelik önemli bulgular			
	C0807121	C0907124	C1007135
Safllık	%93.3	%90.9	%96.5
2:1 konjugat	%4.6	%6.4	%2.2
Tahlil	%93.8	%94.2	%100.4
Su	%0.2	%0.1	%0.05
DMSO	%8.2	%2.4	%0.6

1007135 yğınna ve diğr yğınlar ek karakterizasyonu aşığdaki Tablo 18'de gösterilmektedir.

Tablo 18

Lot Numarası	C1007135	C0108002	C0308011	C0608030	C1108062
Safllık	%96.5	%96.9	%95.5	%95.6	%96.9
2:1 konjugat	%2.2	%1.4	%2.0	%2.7	%2.3
Tahlil	%100.4	%97.2	%100.7	%102.6	%105.7
Toplam İlgili Maddeler	%3.5	%3.1	%5.0	%4.4	%3.1
Konjuge edilmemiş AngioPep-2	ND	ND	ND	ND	ND
Konjuge edilmemiş Paklitaksel	%0.9	%0.6	%1.0	%0.7	%0.5
1:1 Konjugat	ND	ND	ND	ND	ND
Bilinmeyen	%0.5	%1.0	%1.0	%1.0	%0.4
Su İçeriği	%0.05	%0.04	%0.05	%0.12	%0.03
DMSO	%0.65	%0.54	%0.37	%0.54	%0.64
ND = tespit edilemedi					

5

Örnek 4**Liyofilize ANG1005'in Yeniden Süspansiyonu**

- 10 Aşığdaki prosedür, sulu çözeltide ANG1005 liyofilize formülasyonun çözüldürülmesi ve süspansiyon halinde tutulması için geliştirilmiştir. Özetlenen prosedür, 120 mg ANG1005 barındıran bir tek flakon için uygundur.

- 15 ANG1005 flakonu oda sıcaklığında dengelenmiştir. Flakon sonrasında havalandırılmıştır. Bir 18G 1 1/2" iğnenin takıldığı bir 20 cc şırınga ile, 4 ml'lik anhidrik etanol flakonun yanından aşığıyavaşça (yani, yaklaşık 30 saniye) enjekte edilmiştir. Flakon sonrasında, 10 dakika

boyunca bir baş eğme karışımına üzerine yerleştirilmiştir, bu etanolün keki yavaşça nemlendirmesi, böylelikle bir süte benzer süspansiyonun sağlanması ile sonuçlanmıştır.

5 Flakon sonrasında karışımından çıkarılmış ve bir 18G 1.5" iğnenin takıldığı bir 20-cc plastik şırınga ile, %5 oranında dekstroza sahip 12 ml'lik Ringer flakonun yanına aşağıya enjekte edilmiştir. Flakon sonrasında 5 dakika boyunca baş eğme karışımına üzerine yerleştirilmiştir. Flakon sonrasında, 180 derece döndürülmüştür ve sonrasında 5 dakika daha baş eğme karışımında karışımına devam edilmiştir. Bu noktada, süspansiyon çok az köpüklenme ile berrak idi. Flakon sonrasında, sonraki adıma geçilmeden önce (örneğin enjeksiyon için seyreltme, analiz) beş dakika boyunca tezgah üzerinde beklemeye bırakılmıştır.

15 Alternatif seyrelticiler aynı zamanda test edilmiştir (Tablo 19). Bu seyrelticilerin kullanılması tam çözündürme ile berrak çözeltiyle sonuçlanmasına karşın, bunlar oda sıcaklığında %5 oranında dekstroza ve etanole sahip laktat Ringer'in karışımından daha büyük ANG1005 bozunum ile sonuçlanmıştır.

Tablo 19: Yeniden Süspansiyona yönelik alternatif seyrelticiler

	Miktar	Koşullar
Enjeksiyonluk su	16 ml	40 ila 50°C'ye iletilebilir
Enjeksiyona/Etanole yönelik su	12 ml + 4 ml	RT
D5W	16 ml	40 ila 50°C'ye iletilebilir
D5W/Etanol	12 ml + 4 ml	RT
Laktat Ringer-D5W	16 ml	40 ila 50°C'ye iletilebilir

Örnek 5

20

Ek tamponların ve hacim arttırıcı ajanların test edilmesi

Kalıtım DMSO'nun (%0.5) azaltılması ve liyofilizasyon döngüsünün (5 gün) kısaltılmasına yönelik hedefler ile ek çabalar gösterilmiştir.

25

Formülasyonun çeşitli yardımcı maddelerinin (özellikle glisin ve sodyum klorür), döngünün ikincil kurutmasında DMSO'nun giderilmesinin azaltılabilirliği ile sonuçlanmıştır. NaCl, Glisin, manitol ve su olmadan yapılan formülasyonlar, çok daha düşük DMSO içeriği (yaklaşık

%0.01) ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte manitol olmadan, kek mum benzeri idi (esas olarak Solutol'den oluşan). Bu düşük DMSO formülasyonları tüm, etanol ve D5W/laktat ringeri kullanılarak sulandırılma başarılmıştır. Ek olarak glisin bulunmadığında, pH kontrol edilmemiştir. Bu durum ANG1005'in bozunumu ile sonuçlanmıştır.

5

Böylelikle, ek bir testte, manitol, bir hacim artırıcı olarak tutulmuştur, glisin, sitrik asit ve laktik asit kapsayan tamponlar ile değiştirilmiştir ve sodyum klorür giderilmiştir. Bu formülasyonlar, bir daha küçük liyofilizasyon döngüsü kullanılarak, yine %0.05 oranında kalın DMSO'ya sahip kekler ile sonuçlanmıştır. Bu seviyede DMSO'da, kek çözünür değildir. Bir ek formülasyonda, soya lesitin manitolün yerine kullanılmıştır. Bu durum %0.2 oranında kalın DMSO ile sonuçlanmıştır. %0.2 oranında kalın DMSO'da, kek Etanol ve D5W/LR'de çözünürdür. Bu yüzden, minimum %0.2 ila 0.4 oranında DMSO'nun, flakonları sulandırılması ve infüzyon torbasına ek seyreltme için gerekli olabileceğini düşünmekteyiz. Liyofilizasyon süresi, bu aralıktaki DMSO konsantrasyonlarına olanak sağlanması için buna uyumlu olarak ayarlanabilmektedir.

15

Bu testlerde kullanılan bileşimler şu şekilde detaylandırılmaktadır (Tablolar 20 ila 22).

Tablo 20: Liyofilizasyondan önce bileşim

ağırlık cinsinden %	Tedarikçi	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		0.72	0.72	0.72	0.72
Solutol HS15		24.92	24.88	24.83	24.88
DMSO, USP	Gaylord	13.39	13.36	13.32	13.36
1N HCl		0.311	0.311	0.306	0.311
Sitrik asit		0.04			
Laktik asit**			0.21	0.42	0.21
Manitol		1.54	1.53	1.53	
Soya lesitin	PL90G				1.53
Enjeksiyonluk su		59.08	59.00	58.86	59.00
Toplam		100.00	100.00	100.00	100.00

**suda %85

Solutol/API oranı ANG yığılma kaydındaki ile aynıdır.

DMSO/HCl oranı ANG yığılma kaydındaki ile aynıdır.

Sitrik asit kons pH 5'in sağlanması için seçilmektedir (F-34'e dayanan)

Laktik asit kons pH 5'in (F38) ve düşük (F39) sağlanması için hesaplanmaktadır.

Sudaki manitol kons ANG yığılma kaydındaki ile aynıdır.

Soya lesitin manitolün değiştirilmesi için bir "çözünür" hacim artırıcı olarak kullanılmıştır.

20

Tablo 21: Bileşik hazırlama tablosu

Mg/tüp	Derece & Lot	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		184	184	184	184
Solutol HS15		6328	6328	6328	6328
DMSO, USP		3399	3399	3395	3399
1N HCl		79	79	78	79
Sitrik asit		10			
Laktik asit**			54	108	54
Manitol		390	390	390	
Soya lesitin					390
Enjeksiyonluk su		15000	15000	15000	15000
Toplam		25390	25434	25483	25434
Toplam Kuru ağırlık		6991	7035	7088	7035
**suda %85					

Tablo 22: Liyofilizasyon sonrası bileşim tablosu

ağırlık cinsinden %	Tedarikçi	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		2.64	2.62	2.60	2.62
Solutol HS15		90.65	89.95	89.28	89.95
DMSO, USP	Gaylord				
1N HCl		1.13	1.12	1.10	1.12
Sitrik asit		0.14			
Laktik asit**			0.77	1.52	0.77
Manitol		5.59	5.54	5.50	
Soya lesitin					5.54
Enjeksiyonluk su					
Toplam		100.0	100.0	100.0	100.0
**suda %85					

5 Bileşimler şu şekilde hazırlanmıştır. DMSO/HCl stoğu, bir 50 ml'lik Falcon tüpünün içine 0.5 g 1N HCl standart çözeltisinin tartılması ile hazırlanmıştır. 21.5 g DMSO eklenmiştir ve DMSO+1N HCl stoğunun elde edilmesi için iyice karıştırılmıştır.

Her bir bileşim için, manitol, Solutol, sitrik ve laktik asit ve WFI tartılmıştır ve bir 50 ml Falcon tüpünün içine yerleştirilmiştir. İçerikler çözündürülmek üzere iyice karıştırılmıştır. Tüpler kapatılmıştır ve 51°C'ye iletmiştir (*tampon karışımı). Başka bir 50 ml ANG 1005'in

5 tartılması için kullanılmıştır. DMSO/HCl stoğunu sonrasında eklenmiştir ve çözelti berraklaşana kadar vorteks ile iyice karıştırılmıştır. İstifan tampon karışımı vortekslenirken DMSO/ANG1005 karışımına yavaşça eklenmiştir. Karışımlar sonrasında RT'ye soğutulmuştur. 1700-1730 mg/lık çözelti sonrasında her bir flakona yerleştirilmiştir. Çözelti burada açılanan şekilde liyofilize edilmiştir. Bileşik -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çözeltiler sonrasında sulandırma yetenekleri için test edilmiştir. Çözeltilerin sulandırılması için etanol eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Ringer laktat çözeltisi sonrasında eklenmiştir. Miktarlar Tablo 23'te gösterilmektedir.

10

Tablo 23: Sulandırma Hacmi

flakon başına ağırlık	Ref Ürünü	F-37 ila F-40
API (mg)	125	12.5
Etanol (mg)	3234	323.4
D5W'e (mg) sahip Ringer laktat	12186	1218.6

Sulandırmanın başarılı olması halinde, o zaman numune görünümünü kaydedilmiştir (mikroskop altında renk, kristal veya katı PPT vb.) Bir alikuot sonrasında HPLC (örneğin tahlil ve saflık) ile analiz edilmiştir. pH aynı zamanda ölçülebilmektedir.

15

Örnek 6

Liyofilize ANG1005 ürününün stabilite testi

20 ANG1005 ürününün bir süre boyunca stabilite testi test edilmiştir. Yaklaşık -15°C'de muhafaza edilen liyofilize ürün, etkinliği, saflığı, görünümü, pH'ı ve bozunumu için izlenmiştir. Bu testlerin sonuçları aşağıdaki Tablo 24'te gösterilmektedir.

Tablo 24: Lot Numarası LC1007135 -15 ± 5°C'de Muhafaza edilmiş, Enjeksiyona yönelik Stabilite Bulguları								
Enjeksiyona yönelik ANG1005 Lot Numarası LC1007135					Kuvvet: 120 mg/flakon oranında ANG1005			
Üretim Tarihi: Ekim 2007					Stabilite Çalışması Başlangıç Tarihi: Kasım			
Paket: 15 mm Daikyo tıpasına sahip, 50 ml'lik flakon ve 15 mm'lik geçme kapak					Çalışma Süresi: 24 ay			
Testler	Başlangıç	1 Ay	2 Ay	3 Ay	6 Ay	9 Ay	12 ay	16 ay
Görünüm	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu
Çözeltinin berraklığı ve bütünlüğü	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu	Uyumlu
PH	5.2	5.9	5.5	5.5	5.5	5.8	5.8	5.7
Su İçeriği	%0.1	%0.1	%0.1	%0.1	%0.1	ND	ND	%0.1
Tahlil (ağırlık cinsinden)	%100.4	%97.6	%98.4	%97.5	%93.7	%103.3	%103.5	%101.3
Saflik	%96.5	%97.4	%97.2	%96.7	%96.2	%97.3	%97.4	%97.2
2:1 Konjugat	%2.2	%1.4	%1.5	%1.5	%1.4	%1.3	%1.2	%1.4
Paklitaksel	%0.9	%0.6	%0.7	%0.6	%1.1	%0.5	%0.5	%0.6
Bilinmeyen İlgili Maddeler	%0.5	%0.4	%0.4	%1.2	%1.3	%0.8	%0.8	%0.8
Imp RRT0.60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT0.61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT0.62	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT0.64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT0.66	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT0.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT0.83	%0.1	ND	ND	ND	%0.1	ND	ND	ND
Imp RRT0.91	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT0.93	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3
Imp RRT0.95	ND	ND	ND	%0.1	ND	ND	%0.1	%0.1
Imp RRT0.98	ND	ND	ND	%0.3	%0.2	ND	ND	%0.2
Imp RRT 1.03	ND	%0.2	%0.2	%0.2	%0.1	ND	ND	ND
Imp RRT 1.04	%0.2	ND	ND	ND	%0.2	ND	%0.2	%0.1
Imp RRT 1.06	%0.1	%0.1	%0.1	%0.2	%0.2	%0.5	%0.2	%0.1

Imp RRT 1.07	%0.1	%0.1	ND	%0.2	ND	ND	ND	ND
Sterilite	Steril	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	Steril	N/Ap
Partikülat Madde	Uyumlu	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	Uyumlu	N/Ap

Örnek 7

Sulandırılmayı takiben ANG1005 ürününün stabilitesi

- 5 Birkaç deney, çözeltiye sulandırılmayı takiben ANG1005'in stabilitesinin değerlendirilmesi için gerçekleştirilmektedir. Bu deneyler aşağıda açıklanmaktadır

Deney 1

- 10 Enjeksiyona yönelik ANG1005'in lot numarası C0108002'den ürün, burada açıklanan şekilde 1.0 ila 2.0 mg/ml'lik bir konsantrasyona sulandırılmıştır. 2.0 mg/ml'lik ANG1005'in konsantrasyonu önceden, IND'de önceden sunulduğu üzere klinik kullanım için en uygun olarak saptanmıştır. Bu preliminere deneyler cam flakonlarda küçük hacimler halinde yürütülmüştür. Numuneler oda sıcaklığında tutulmuştur ve çeşitli zaman noktalarında görsel olarak incelenmiştir. Seçilen numuneler HPLC analizinden önce filtrelenmiştir.

- Tablo 25, zaman içinde test edilen konsantrasyonlar boyunca çözeltilerin görsel berraklığını göstermektedir. Bulanık görünümün, hem konsantrasyon hem de zaman ile ilişkili olduğu görülmektedir. Seçilen numunelerin HPLC analizi, tek ANG1005 pikinin çeşitli zaman noktalarında boyunca saf olarak büyük ölçüde değişmediğini ortaya çıkarmıştır. İlgili maddelerin profilinde değişiklik gözlemlenmemiştir (Tablo 26). İki ilgili madde piki not edilmiştir ve 2:1 konjugat (RTT 0.88) ve konjuge edilmemiş paklitaksel (RTT 0.95) olarak belirlenmiştir. Bir pik, 1.15 (8.1 dakika) bir RRT ile gözlemlenmiştir; bu pik, aynı zamanda boş kromatogramlarda bulunduğu için, HPLC kolonundan bir saf olarak çıkarılmıştır.

25

Tablo 25: D5W'da seyreltilmiş sulandırılmış ANG1005'in görsel görünümü

	0sa	1sa	2sa	3sa	4sa	6sa
1.0 mg/ml	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	X
1.5 mg/ml	Berrak	Berrak	X	X	XX	XXX
2.0 mg/ml	Berrak	X	XX	XX	XXX	XXX
X: Çok az bulanık XX: Bulanık XXX: Çok bulanık						

Tablo 26: D5W'te seyreltilmiş Enjeksiyonluk sulandırılmış ANG1005'in saflığı

	0sa	1.5sa	3.5sa	6sa
1.0 mg/ml	%97.3 İlgili Maddeler: %1.3 (0.88) %1.4 (0.95)	NT	%97.1 İlgili Maddeler: %1.4 (0.88) %1.5 (0.95)	NT
1.5 mg/ml	%97.3 İlgili Maddeler: %1.3 (0.88) %1.4 (0.95)	%97.1 İlgili Maddeler: %1.4 (0.88) %1.5 (0.95)	NT	%96.8 İlgili Maddeler: %1.5 (0.88) %1.7 (0.95)
2.0 mg/ml	%97.2 İlgili Maddeler: %1.3 (0.88) %1.5 (0.95)	%97.1 İlgili Maddeler: %1.4 (0.88) %1.5 (0.95)	NT	NT

NT = Test edilmemiş

İlgili maddeler: parantez içindeki bağlanma süresi ile %0.5'ten daha büyük tek pik raporlamaktadır

RRT 0.88'de ilgili madde, 2:1 konjugat temsil etmektedir

RRT 0.95'te ilgili madde, konjuge edilmemiş paklitakseli temsil etmektedir

Not: Bir pik, 1.15 (8.1 dk) bağlanma süresi ile gözlemlenmiştir; bu pik, aynı zamanda boş kromatogramda bulunduğu üzere HPLC kolonundan bir safzıktır

Deney 2

Deney 1'de elde edilen 1.0 mg/ml'de stabilite bulgularını onaylanması için, bir ek çalışma, klinik kullanıma yönelik koşullar altında yürütülmüştür. C0108002 lot numaralı enjeksiyona yönelik ANG1005, 500 ml'lik D5W infüzyon torbasında 1.0 mg/ml'lik bir nihai konsantrasyonun hazırlanması için açılan şekilde sulandırılmış çözelti, saf veya ilgili madde profilleri bakımından önemli bir değişiklik olmadan oda sıcaklığında 6-saatlik gözlem periyodunda görsel olarak berrak kalmıştır (bakınız Tablo 27 ve Şekil 2).

10

Tablo 27: Klinik kullanıma yönelik koşullar altında 1.0 mg/ml'a D5W ile seyreltilen Enjeksiyona sulandırılmış ANG1005'in saflığı

Zaman	0sa	2sa	4sa	6sa
Saflık	%97.4 İlgili Maddeler: %1.2 (0.88) %1.4 (0.95)	%97.3 İlgili Maddeler: %1.3 (0.88) %1.4 (0.95)	%97.0 İlgili Maddeler: %1.5 (0.88) %1.5 (0.95)	%97.2 İlgili Maddeler: %1.4 (0.88) %1.4 (0.95)

İlgili maddeler: parantez içindeki bağlanma süresi ile %0.5'ten daha büyük tek pik raporlamaktadır

RRT 0.88'de ilgili madde, 2:1 konjugat temsil etmektedir

RRT 0.95'te ilgili madde, konjuge edilmemiş paklitakseli temsil etmektedir

Not: Bir pik, 1.15 (8.1 dk) bağlanma süresi ile gözlemlenmiştir; bu pik, aynı zamanda boş kromatogramda bulunduğu üzere HPLC kolonundan bir safzıktır

Deney 3

C0108002 lot numaralı enjeksiyona yönelik ANG1005, bir cam flakonda 2.0 mg/ml'lik bir nihai konsantrasyona D5W'da sulandırılmış ve seyreltilmiştir. Numune ~6sa boyunca oda sıcaklığında tutulmuştur. Çözelti bulanıklaşmış ve santrifüj edilmiştir. Sonuçta oluşan çökelti süpernatantı ayrılması ile toplanmış ve DMSO'da çözündürülmüştür ve HPLC ile analiz edilmiştir. Yeniden çözündürülen çökeltinin ana piki bir %97.2 oranında saflığa sahip ANG1005 olarak belirlenmiştir. İlgili maddelerin profilinde değişiklik gözlemlenmemiştir ve yalnızca 2 tahmin edilen pik mevcut idi (RRT 0.88'de %1.3 ve RRT 0.95'de %1.5). Bu numunenin HPLC kromatogramı Şekil 3'te gösterilmektedir. Bir pik, 1.15 (8.1 dakika) bir RRT ile gözlemlenmiştir; bu pik, HPLC kolonundan bir safsızlık ve aynı zamanda boş kromatogramlarda bulunmaktadır.

Kolektif veriler, gözlemlenen türbiditenin/bulanıklığın, muhtemelen ilaç ürününün bileşenleri ve D5W arasındaki bir etkileşimden dolayı herhangi bir bozunum olmadan çözeltiden dışarı çıkan bütün ANG1005'in bir sonucudur. Bu olayın konsantrasyon ve zaman-bağımlı olduğu görülmektedir.

Türbiditebin azaltılması için, ANG1005 >300 mg/m² dozları alan tüm hastalar için nihai konsantrasyonun ≤1 mg/ml'ye bir azalması tahmin edilmektedir.

Bu bulgunun büyük oranda ilaç ürünündeki kalıntı DMSO miktarının azaltılmasından kaynaklandığını öneren bazı veriler bulunmaktadır. C0807121 lot numaralı ilaç ürününün birinci yığının, %8.2 oranında bir kalıntı DMSO içeriğine sahipken, daha yeni bir lot, lot numarası C0108002, %0.54 oranında bir kalıntı DMSO içeriğine sahipti. Bu değişimin maddenin çözünürlüğünü etkilediği görülmektedir.

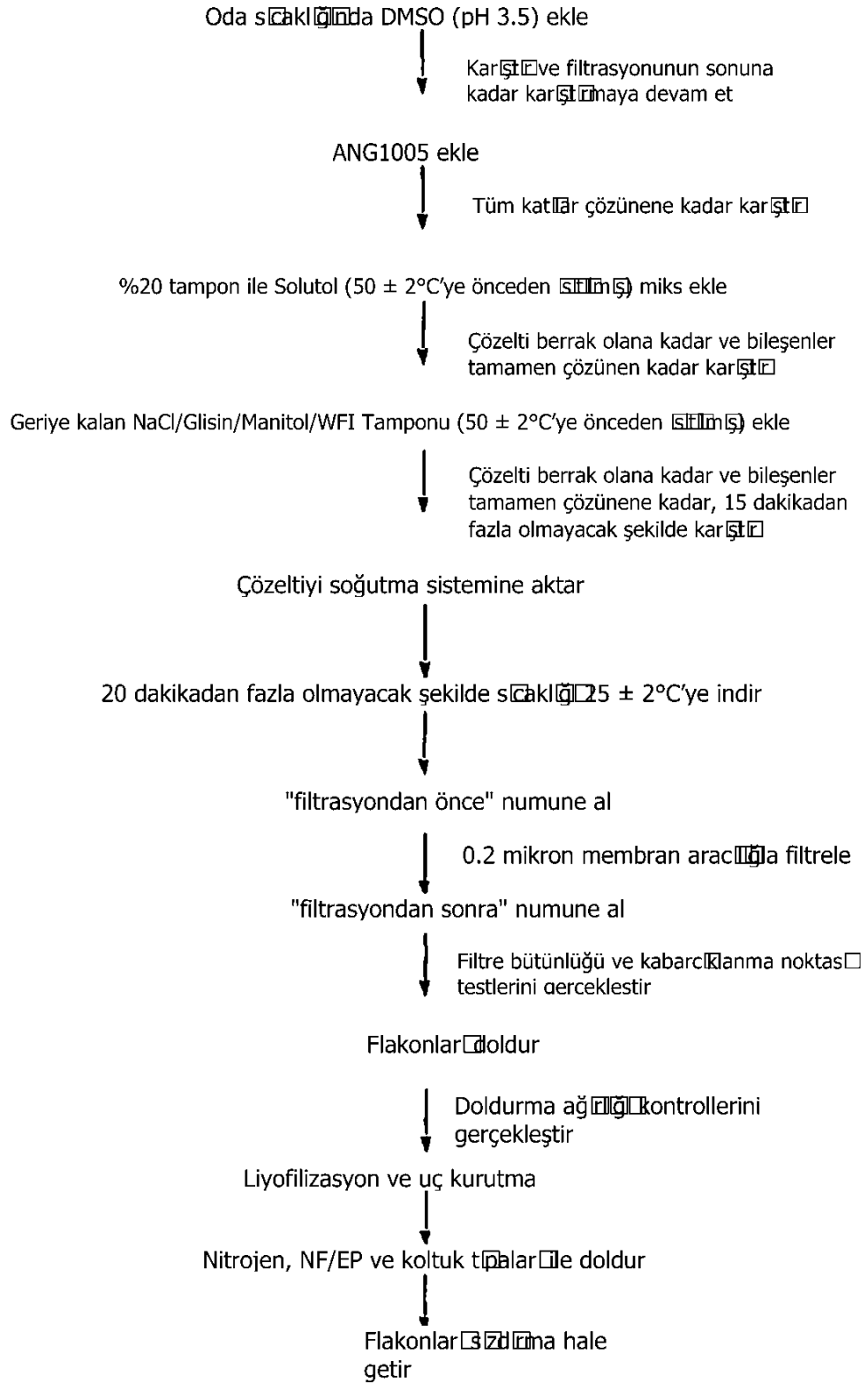
Ek deneyler, sulandırılmış ilacın stabilitesinin artırılması için seyreltme prosedürünün modifiye edilmesi için çalışma halindedir. Sulandırma prosesinin son adımı olarak %5 oranında Dekstroz Enjeksiyonunun yerine Laktat Rinde ile hazırlanan çözeltiler test edilmektedir: Enjeksiyona yönelik ANG1005'in her bir flakonu ilk olarak, 6 mg/ml'lik bir konsantrasyona ulaştırılmasından önce 4 ml'lik anhidrik etanol ve 12 ml'lik Laktat Ringer/%5 Dekstroz Enjeksiyonu ile sulandırılacaktır ve sonrasında Laktat Ringer Enjeksiyonu ile daha da seyreltilecektir. Tablo 28'de gösterilen, preliminier veriler, aynı konsantrasyon aralığında (2.0

mg/ml'ye kadar) Laktat Ringer ile D5W'nun yer değiştirmesinin, infüzyon çözeltilerinin gözlenen bulanıklığın önleyebileceğini önermektedir. Tüm çözeltiler ANG1005'in saflığını etkilemeden gözlem periyodu boyunca berrak kalmıştır.

Tablo 28: Laktat Ringer Enjeksiyonu ile seyreltilmiş Enjeksiyonluk sulandırmaları ANG1005'in saflığını

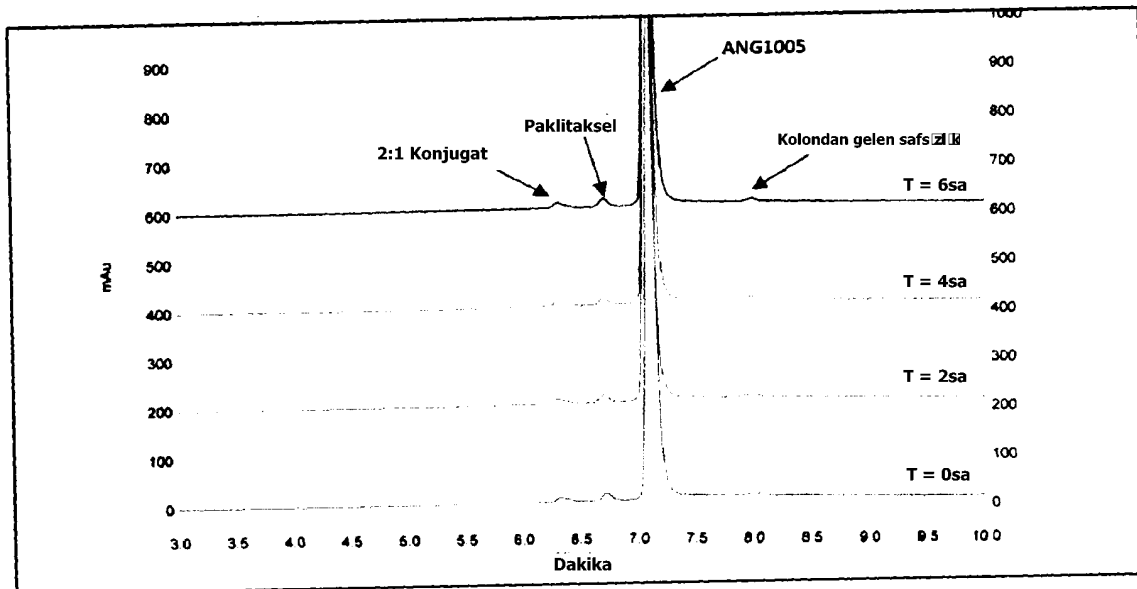
	0sa	1sa	2sa	4sa
0.5 mg/ml	%97.2 İlgili Maddeler: %1.4 (0.88) %1.4 (0.95)	%96.9 İlgili Maddeler: %1.5 (0.88) %1.6 (0.95)	%96.7 İlgili Maddeler: %1.7 (0.88) %1.6 (0.95)	%96.3 İlgili Maddeler: %2.0 (0.88) %1.7 (0.95)
1.0 mg/ml	%96.8 İlgili Maddeler: %1.6 (0.88) %1.6 (0.95)	%96.7 İlgili Maddeler: %1.7 (0.88) %1.6 (0.95)	%96.6 İlgili Maddeler: %1.8 (0.88) %1.6 (0.95)	%96.6 İlgili Maddeler: %1.8 (0.88) %1.6 (0.95)
1.5 mg/ml	%97.0 İlgili Maddeler: %1.5 (0.88) %1.5 (0.95)	%96.9 İlgili Maddeler: %1.6 (0.88) %1.5 (0.95)	%96.6 İlgili Maddeler: %1.8 (0.88) %1.6 (0.95)	%96.6 İlgili Maddeler: %1.8 (0.88) %1.6 (0.95)
2.0 mg/ml	%97.1 İlgili Maddeler: %1.4 (0.88) %1.5 (0.95)	%96.8 İlgili Maddeler: %1.6 (0.88) %1.6 (0.95)	%96.6 İlgili Maddeler: %1.8 (0.88) %1.6 (0.95)	%96.6 İlgili Maddeler: %1.8 (0.88) %1.6 (0.95)
İlgili maddeler: parantez içindeki bağlıkların süresi ile %0.5'ten daha büyük tek pik raporlamaktadır RRT 0.88'de ilgili madde, 2:1 konjugatı temsil etmektedir RRT 0.95'te ilgili madde, konjuge edilmemiş paklitakseli temsil etmektedir				

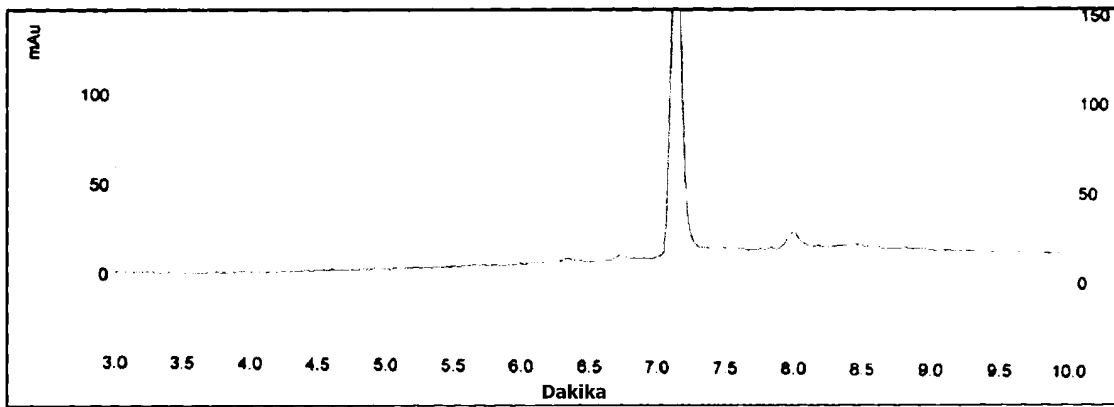
İlaç Ürünü Üretim Prosesinin Akış Diyagramı



Şekil 1

Şekil 2





Şekil 3