

ÖZET
SYN3 BİLEŞİMLERİ VE YÖNTEMLERİ

Kanserin tedavisinde yararlı olan ajanları içeren sulu ve susuz çözelti
5 formülasyonları açıklanmaktadır.

İSTEMLER

1. N-(3-kolamidopropil)-N-(3(aktobionamidopropil))-kolamid (SYN3),
hidroksipropil-beta-siklodekstrin (HP β CD) ve 5 ila 6 arasında bir pH ve
5 farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı sağlayan bir sitrat
tamponlama sistemi içeren bir liyofilize farmasötik bileşimdir.
2. İstem 1'e göre bileşimdir, burada bileşim ayrıca Polisorbat 80, BigCHAP,
Polisorbat 20, polietilenepolipropilen glikol blok kopolimerden seçilen en
10 az bir ilave ajan içerir.
3. İstem 2'ye göre bileşimdir, burada Polisorbat 80, 1 ila 36 mg/ml
konsantrasyonunda bulunur, BigCHAP, 20 ila 360 mg/ml
konsantrasyonunda bulunur ve polietilenepolipropilen glikol blok
15 kopolimeri, 1 ila 150 mg/ml konsantrasyonunda bulunur.
4. Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşimdir, burada bileşim, 50 ila
500 mg/ml konsantrasyonda HP β CD içerir.
- 20 5. Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşimdir, burada söz konusu
bileşim, ayrıca, en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir hacim arttırıcı
maddesi içerir.
6. Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşimdir, burada söz konusu
25 bileşim ayrıca askorbik asit içerir.
7. İstem 6'ya göre bileşimdir, burada askorbik asit, 0.001 ila 0.6 mg/ml
konsantrasyonunda bulunur.

8. Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşimdir, burada bileşim, 0.001 mg/ml ila 150 mg/ml N-(3-kolamidopropil)-N-(3(aktobionamidopropil))-kolamid içerir.
- 5 9. Mesane kanserinin tedavisinde kullanım için önceki istemlerden herhangi birine göre bileşimdir, burada bileşim terapötik bir genin dağıtılması için bir gen dağıtım sistemi ile birlikte kullanılır.
- 10 10. Mesane kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere terapötik bir gen dağıtımı için bir gen dağıtım sistemidir, burada sistem, istemler 1 ila 8'den herhangi birine göre bileşim ile birlikte kullanılır.
- 15 11. İstem 9'a göre kullanım için bileşim veya istem 10'a göre kullanım için sistemdir, burada gen dağıtım sistemi bir rekombinant adenoviral vektör dağıtım sistemidir.
- 20 12. İstem 11'e göre kullanım için bileşim veya istem 11'e göre kullanım için sistemdir, burada rekombinant adenoviral vektör dağıtım sistemi, interferon a2b içindir.
- 25 13. İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre olan liyofilize edilmiş bir bileşimin, bir hastada mesane kanserini tedavi etmek için bir ilacın üretiminde kullanımıdır, burada bileşim, terapötik bir geni dağıtmak için bir gen dağıtım sistemi ile birlikte kullanılır.
14. İstem 13'e göre kullanım olup, burada gen dağıtım sistemi, tercihen interferon a2b için bir rekombinant adenoviral vektör dağıtım sistemidir.

TARİFNAME

SYN3 BİLEŞİMLERİ VE YÖNTEMLERİ

BULUŞ SAHASI

5

Mevcut buluş, bir transdüksiyon arttırıcı ajan ile kombinasyon halinde bir rekombinant viral vektör dağıtım sistemi gibi bir gen dağıtım sistemi tarafından dağıtılan bir tümör baskılayıcı gen gibi terapötik bir gen kullanılarak gen terapisi ile kanser tedavisi için bileşimlere yöneliktir. Özellikle, bu buluş, bir transdüksiyonla kombinasyon halinde stabilize edilmiş bir tampon içinde formüle edilmiş bir rekombinant adenoviral vektör dağıtım sistemi kullanılarak, mesane gibi kanserli epitel dokulara ve organlara, bir tümör baskılayıcı genin (örn., örneğin, p53 veya retinoblastoma (RB)), mesane gibi kanserli epitelyal dokulara ve organlara, N-(3-kolamidopropil)-N-(3 (aktobionamidopropil))-kolamid (SYN3) olan bir transdüksiyon arttırıcı ajan ile kombinasyon halinde stabilize bir tamponda formüle edilmiş bir rekombinant adenoviral vektör dağıtım sistemi kullanılarak) dağıtılması ile ilgilidir.

BULUŞUN ALTYAPISI

20

Epitel kanseri, sinsi bir hastalıktır. Örneğin, bir tür epitel kanseri, mesanenin karsinoması, önemli bir morbidite ve mortalite kaynağını temsil eder. Mesane kanseri, bildirildiğine göre kansere bağlı ölümlerde erkeklerde 10. sırada, kadınlarda 12. sıradadır. Mesane kanseri tedavisi için mevcut olan tedaviler arasında adjuvan kemoterapi veya immünoterapi, yüzeysel hastalığın transüretal rezeksiyonu, radikal sistektomi veya radyoterapi yer alır ve bunlar genellikle sistemik kemoterapi ile birleştirilir. Bu tedavi seçeneklerine rağmen, genel sağkalım önemli ölçüde değişmemiştir. Bu nedenle, mesane kanserinin tedavisi için yeni terapötik yöntemler geliştirilmelidir.

30

Alternatif bir terapötik yaklaşım olarak gen terapisi stratejilerinin geliştirildiği

bildirilmiştir. Gen transfer yöntemlerine dayanan neoplazmaları tedavi etmek için farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Neoplastik transformasyon ve progresyona neden olan tanımlanmış genetik lokallerde spesifik lezyonları düzeltmek için yöntemler geliştirildiği bildirilmiştir. Baskın onkojenlerin aşırı ekspresyonu, 5 transforme gen veya gen ürününü inhibe etmek için teknikler kullanılarak ele alınabilir. Tümör baskılayıcı gen fonksiyon kaybının, yabani tip tümör baskılayıcı genin sulandırılması için yöntemler kullanılarak ele alınabileceği rapor edilmiştir. Mutasyon kompanzasyonu elde etmek için bu yöntemlerin yanı sıra, tümör hücrelerinin spesifik ve seçici bir şekilde yok edilmesi için genetik tekniklerin 10 geliştirildiği bildirilmiştir. Moleküler kemoterapinin bu yaklaşımlarının, neoplastik hücrelerde toksin genlerinin spesifik ekspresyonuna dayandığı bildirilmiştir. Son olarak, antitümör immünizasyonunu sağlamak için gen transfer yöntemlerinin kullanıldığı bildirilmiştir. Bu genetik immüno-güçlendirme yöntemlerinin, tümörlerin immün tanınmasını arttırmak için genetik 15 immünoregülasyon tekniklerini kullandığı bildirilmektedir. Sonuç olarak, kanserin gen tedavisini gerçekleştirmek için çeşitli farklı yaklaşımlar geliştirildiği bildirilmiştir.

Mesanein karsinomu durumunda, p53 ve RB gibi tümör baskılayıcı genlerde 20 yüksek oranda mutasyon görülmüştür. Tümör baskılayıcı genlerin bu tür genetik lezyonları için, neoplastik fenotipin ters çevrilmesi, karşılık gelen yabani tip tümör baskılayıcı genin değiştirilmesiyle gösterilebilir.

İnsan mesane dokularından türetilen hücre hatlarını kullanan *in vitro* çalışmaların, 25 rekombinant adenovirüs ile enfeksiyondan sonra etkili transgen ekspresyonu gösterdiği bildirilmiştir. Canlı olarak yapılan deneyler, intravezikal dağıtımdan sonra, kemirgen üriner mesanesinde adenovirüs transgen ekspresyonu da göstermiştir. Yabani tip adenovirüs ile yapılan *in vitro* deneyler, virüs bağlanmasının ve internalizasyonun benzil alkolden etkilenmediğini, fakat 30 virionun gelişmiş bir şekilde kaplanmadığını gösterdi. Ajanlar (örn., aseton, DMSO, prolamin sülfat) ile *in vivo* çalışmaların, mesane epitelini bakteri, virüs ve

diğer patojenlerden koruyan koruyucu "müsin" tabakasını parçalayabildiği bildirilmektedir.

US Patent No. 5,789,244'te, bir transgeni kodlayan bir nükleotit dizisinin yerleştirildiği bir viral vektör içeren bir bileşim bulunur, burada viral vektör, yaklaşık %1 ila %50 (v/v) konsantrasyon aralığında etanol içeren bir tamponda formüle edilir. US Patent No. 5,837,520, intakt bir viral partikülün, bir hücre lizatından saflaştırılması için, hem kapsüllenmemiş DNA'yı hem de RNA'yı seçici olarak parçalayan bir enzimatik ajan ile intakt viral partikülü içeren hücre lizatının işlenmesini; işlenmiş lizatı birinci adımdan bir birinci reçine üzerinde kromatografisini; ve eluantın ikinci adımdan bir ikinci reçine üzerinde kromatografisini içeren bir yöntem için koruma talep eder; burada bir reçine bir anyon değişim reçinesidir ve diğeri hareketsizleştirilmiş bir metal iyonu afinite reçinesidir. US Patent No. 5,932,210, bir rekombinant adenovirüs ekspresyon vektörü ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı içeren bir bileşimi tarif eder; vektör, aşağıdakileri içerir: (a) bir yabancı proteini kodlayan bir geni içeren bir ekzojen DNA inserti; ve (b) E1a, E1b ve protein IX'un kodlama dizilerinin ve E3'ün en azından bir kısmının silindiği adenovirüs DNA. US Patent No. 6,165,779, bir deterjan içeren bir tamponda formüle edilmiş bir rekombinant virüs vektörünü içeren bir bileşimi açıklar. US Patent No. 6,210,939, (a) yabancı bir proteini kodlayan bir geni içeren bir dışsal DNA inserti ve (b) nükleotid 357'den başlayarak ve 4020 ila 4050 nükleotidinde sona eren bir adenovirüs DNA içeren bir rekombinant adenovirüs ekspresyon vektörünü belirtir. Son olarak, US Patent No. 6,312,681, bir mesanenin epitelyal zarındaki bir kanser hücresine bir transgen içeren bir adenoviral vektörü vermek için bir yöntemi açıklar; bu yöntem, adenoviral vektöre ve %1 ila %50 (v/v) arasında etanol uygulanmasını içerir, burada adenoviral vektör hücreyi enfekte eder ve transgen enfekte olmuş hücrelerde eksprese edilir. WO 99/02191, Polisorbat 80 ve BigCHAP gibi deterjanlarla kombinasyon halinde SYN3'ü ve mesaneye gen transferini arttırmak için bir tampon sistemini açıklar.

Yukarıda belirtilenlerle, ilgisi olmaksızın transgen dağıtımının etkinliğini artıran terapötik kullanım için formülasyonlara ihtiyaç vardır. İnstabil olan vektörler, arzu edilen terapötik ajanın hastaya uygulanmasında zorluk çeker. *In vivo* instabilite nedeniyle, uygulanacak olan terapötik ajanın transdüksiyonunda bir artış olacak şekilde vektör stabilizasyonuna ihtiyaç vardır.

Mevcut buluşa göre, N-(3-kolamidopropil)-N-(3(aktobiyonamidopropil))-kolamid, hidroksipropil-beta-siklodekstrin (HP β CD) içeren bir liyofilize farmasötik bileşim ve 5 ila 6 arasında bir pH sağlayan bir sitrat tamponlama sistemi ve farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ihtiva eder.

N-(3-kolamidopropil)-N-(3(aktobionamidopropil))-kolamid, "SYN3" markasıyla da adlandırılan ticari olarak adlandırılan bileşiğin genel adıdır. Terimler birbirlerinin yerine kullanılabilir. Bu nedenle, "SYN3" ticari markası kullanıldığında, yukarıdaki jenerik isme sahip olan bileşik ile ilgilidir.

Tercihen, bileşim ayrıca Polisorbat 80, BigCHAP, Polisorbat 20, polietilenepolipropilen glikol blok kopolimerden seçilen en az bir ek ajan içerir.

Avantajlı olarak, Polisorbat 1 ila 36 mg/ml konsantrasyonunda bulunur, BigCHAP 20 ila 360 mg/ml konsantrasyonunda bulunur ve Pluronic L64 ve Pluronic L92 1 ila 150 mg/ml konsantrasyonunda bulunur.

Uygun olarak, bileşim ayrıca en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir hacim arttırıcı ajanı içerir.

Avantajlı olarak, bileşim ayrıca askorbik asit içerir.

Tercihen askorbik asit, 0.001 ila 0.6 mg/ml konsantrasyonunda bulunur.

Uygun olarak, bileşim 0.001 mg/ml ila 150 mg/ml N-(3-kolamidopropil)-N-(3(aktobionamidopropil))-kolamid içerir.

Avantajlı olarak, bileşim bir gen iletim sistemi ile birlikte kullanılmalıdır.

5

Buluş ayrıca, mesane kanserinin tedavisinde kullanım için bir gen iletim sistemi sağlar, burada sistem bileşim ile birlikte kullanılır.

10 Tercihen, gen dağıtım sistemi bir rekombinant adenoviral vektör dağıtım sistemidir.

Uygun bir şekilde, rekombinant adenoviral vektör verme sistemi, interferon $\alpha 2b$ içindir.

15 Avantajlı olarak, bileşim gen dağıtım sistemi ile karıştırılmadan önce su içinde yeniden çözülür.

20 Buluş ayrıca bir hastada mesane kanserini tedavi etmek için bir ilacın üretimi için bir liyofilize bileşim ve bir gen dağıtım sisteminin kullanılmasını sağlar; burada bileşim ve sistem hastaya uygulamadan hemen önce birlikte karıştırılır.

Tercihen, gen dağıtım sistemi, tercihen interferon $\alpha 2b$ için bir rekombinant adenoviral vektör verme sistemidir.

25 Uygun olarak, bileşim gen dağıtım sistemi ile karıştırılmadan önce suyla yeniden çözülür.

ŞEKİLLERİN AÇIKLAMASI

30 Şekil 1, SYN3'ün kimyasal yapısal formülünü göstermektedir.

Şekil 2, SYN3'ün sentezi için bir yöntemi göstermektedir.

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Buna göre, buluşun bir yönü, adenovirüs ile uyumluluğun yanı sıra çözünürlük ve stabiliteyi muhafaza etmek için eksipiyanlarla benzersiz bir sürfaktan benzeri bir molekül SYN3'ün formüle edilmesidir.

Buluşun bir başka yönü, SYN3 formülasyonlarının dokular üzerinde, örneğin terapötik seviyelerde temas ettiği mesanede dokular için toksik olmamasıdır. Aslında, geçirgenlik arttırıcı olarak işlev gören sürfaktanlar, zar tahrişine bağlı olarak sıklıkla bir miktar toksisite üretir. Böylece, SYN3 kullanımı, bu toksisiteden kaçınmak için daha fazla fayda sağlar. Connor, et al., Gene Therapy, Vol. 8, pp. 41-48 (2001).

Buluşun bir başka yönü, vektörün stabilitesinin SYN3 ile kombinasyondan etkilenmemesidir. Genellikle, transdüksiyonun iyileştirilmesi için gereken yüzey aktif madde seviyeleri vektöre instabilite verebilir. Adenovirüs ve SYN3 preparatlarının kombinasyonu, adenovirüs ile karşılaştırıldığında daha güçlü bir karışım oluşturur.

Tamponlanmış ve liyofilize edilmiş sulu formülasyonlar ve ayrıca SYN3'ün sulu olmayan çözelti formülasyonları üretilmiştir. Jenerik adla da bilinen SYN3: (N-(3-kolamidopropil)-N-(3(aktobionamidopropil))-kolamid (Şekil 1), 2127407-44-5 numaralı CAS Tesciline sahiptir. Bileşik, CAS tarafından kendisine atanan ikinci bir jenerik isme sahiptir. Ayrılan CAS'ın genel adı: NODA (N-[3-[(4-OD-galaktopiranosil-D-glukanoil)amino]propil]-3,7,12-trihidroksi-N[3-[(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3,7,12-trihidroksi-24-oksokholan-24-il]amino]propil]-, (3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-kholan-24-amid). Teknikte uzman kişilerce açıkça görüleceği gibi, SYN3 çeşitli optik, totomerik, stereoizomerik ve izomerik formlarda bulunur. Şekil 1, tercih edilen bir izomeri göstermektedir. Bununla birlikte, mevcut buluşa ait bileşimler, bu formların tümünü herhangi bir yüzde veya rasemik karışımlarında kapsar.

SYN3, epitelyal doku ve tümörlerin veya daha spesifik olarak mesane tümörlerinin tedavisi için rekombinant adeno irus/terapötik gen vektörlerinin transdüksiyonunu artıran bir sübstrata benzer bir moleküldür. SYN3, yaklaşık 0.001 mg/ml ila yaklaşık 150 mg/ml arasında bir konsantrasyonda bulunabilir.

5

"Terapötik transgen" terimi, ekspresyonu hedef hücrede terapötik bir etki üreten bir nükleotid dizisi anlamına gelir. Terapötik transgen terimi, bunlarla sınırlı olmamak üzere, tümör baskılayıcı genleri, antijenik genleri, sitotoksik genleri, sitostatik genleri, ön ilaç aktiveleştirici genleri, apoptotik genleri, farmasötik genleri veya anti-anjiyojenik genleri içerir. Bu buluşun vektörleri, IRES elementlerinin kullanımıyla veya bağımsız olarak düzenlenmiş promotörlerin kullanımıyla birlikte veya bir veya daha fazla terapötik transgen üretmek için kullanılabilir.

10

"Tümör baskılayıcı gen" terimi, hedef hücrede ekspresyonu neoplastik fenotipi baskılayabildiği ve/veya apoptozu indükleyebildiği bir nükleotid dizisi anlamına gelir. Mevcut buluşun uygulamasında yararlı olan tümör baskılayıcı genlerin örnekleri arasında p53 geni, APC geni, DPC-4 geni, BRCA-1 geni, BRCA-2 geni, WT-1 geni, retinoblastoma geni (Lee, et al, Nature, 329: 642 (1987)), MMAC-1 geni, adenomatous poliposis koli proteini (Albertsen, et al, 21 Temmuz 1998 tarihinde yayınlanan US Patenti 5,783,666); kolon karsinomunda (DCC) silinmiş gen, MMSC-2 geni, NF-1 geni, 3p21.3 kromozomunu eşleştiren nazofaringeal karsinom tümör baskılayıcı geni (Cheng et al., Proc. Nat. Acad. Sci, 95: 3042-3047 (1998)), MTS1 geni, CDK4 geni, NF-1 geni, NF2 geni ve VHL geni bulunur.

20

25

"Antijenik genler" terimi, hedef hücrelerde ekspresyonu, immün sistem tarafından tanınabilen bir hücre yüzeyi antijenik proteininin üretilmesine yol açan bir nükleotid dizisi anlamına gelir. Antijenik genlerin örnekleri arasında karsinoembriyonik antijen (CEA), p53 (Levine'de tarif edildiği gibi, 3 Şubat 1994'te yayınlanan A. PCT Uluslararası Yayın No. WO94/02167'de açıklandığı

30

gibi). İmmün tanımayı kolaylaştırmak için antijenik gen, MHC sınıf I antijenine kaynaşabilir.

5 "Sitotoksik gen" terimi, bir hücrede ekspresyonu toksik etki oluşturan nükleotid dizi anlamına gelir. Bu sitotoksik genlerin örnekleri arasında psödomonas ekzotoksinini kodlayan nükleotid dizileri, risin toksini, diperia toksini ve benzerleri bulunur.

10 "Sitostatik gen" terimi, bir hücrede ekspresyonunun hücre döngüsünde bir tutuklama ürettiği nükleotid dizisini belirtir. Bu tür sitostatik genlerin örnekleri arasında p21, retinoblastoma geni, E2F-Rb geni, P16, p15, p18 ve p19 gibi sikline bağımlı kinaz inhibitörlerini kodlayan genler, Branellec, et al.'da tarif edilen büyüme durdurma spesifik homeobox (GAX) geni bulunur. (9 Mayıs 1997 tarihinde yayınlanan PCT Yayını WO97/16459 ve 3 Ekim 1996 tarihinde yayınlanmış PCT Yayını WO96/30385).

20 "Sitokin geni" terimi, bir hücrede ekspresyonu bir sitokin üreten bir nükleotid dizisi anlamına gelir. Bu sitokinlerin örnekleri arasında GM-CSF, interlökinler, özellikle IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-10, IL-19, IL-20, alfa, beta ve gama alt tiplerinin interferonları, özellikle interferon α -2b ve interferon α -2 α -1 gibi füzyonlar bulunur.

25 "Kemokin geni" terimi, bir hücrede ekspresyonu bir sitokin üreten bir nükleotid dizisi anlamına gelir. Kemokin terimi, hücreler tarafından salgılanan yapısal olarak ilişkili düşük moleküler sitokinlerin ağırlık faktörleri grubunu mitojenik, kemotaktik veya enflamatuar aktivitelere sahip yapısal olarak ilişkilidir. Öncelikle dört korunan sisteini paylaşan 70 ila 100 amino asit rezidü katyonik proteinleridir. Bu proteinler, iki amino-terminal sisteinin aralığına dayalı olarak iki gruba ayrılabilir. Birinci grupta, iki sistein tek bir rezidü (C-x-C) ile ayrılır, ikinci grupta ise bitişiktir (C-C). 'C-x-C' kemokinlerinin üye örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, trombosit faktörü 4 (PF4); trombosit bazik proteini (PBP),

interlökin-8 (IL-8), melanom büyüme uyarıcı aktivite proteini (MGSA), makrofaj enflamatuar protein 2 (MIP-2), fare Mig (ml19), tavuk 9E3 (veya pCEF-4), domuz alveoler makrofaj kemotaktik faktörler I ve I (AMCF-I ve-II), B öncesi hücre büyümesini uyarıcı faktör (PBSF) ve IP10. C-C' grubunun üyelerinin

5 örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1), monosit kemotaktik protein 2 (MCP-2), monosit kemotaktik protein 3 (MCP-3), monosit kemotaktik protein 4 (MCP-4), makrofaj inflammatuar protein 1 alfa (MIP-1-alfa), makrofaj enflamatuar protein 1 beta (MIP-1-beta), makrofaj enflamatuar protein 1 gama (MIP-1-gama), makrofaj inflammatuar protein 3 alfa

10 (MIP-3-alfa), makrofaj inflammatuar protein 3 beta (MIP-3-beta), kemokin (ELC), makrofaj enflamatuar protein 4 (MIP-4), makrofaj enflamatuar protein 5 (MIP-5), LD78 beta, RANTES, SIS-epsilon (p500), timus ve aktivasyon-düzenlenmiş kemokin (TARC), eotaksin, 1 -309, insan proteini HCC-1/NCC-2, insan proteini HCC-3, fare proteini C10 bulunur.

15

"Farmasötik protein geni" terimi, ekspresyonunun protein üretimiyle sonuçlanan bunun hedef hücrede farmasötik olarak etkili olduğu nükleotid dizisini belirtir. Bu tür farmasötik genlerin örnekleri arasında proinsulin geni ve analogları (W098/31397 numaralı PCT Uluslararası Patent Başvurusunda tarif edildiği gibi,

20 büyüme hormonu geni, dopamin, serotonin, epidermal büyüme faktörü, GABA, ACTH, NGF, VEGF (hedef dokuya kan perfüzyonunu arttırmak, anjiyogenez indüklemek, 30 Temmuz 1998'de yayınlanan PCT yayını WO98/32859.), trombospondin vb. bulunur.

25 "Pro-apoptotik gen" terimi bir nükleotid dizisini belirtir, bunun ekspresyonu hücrenin programlanmış hücre ölümüyle sonuçlanır. Pro-apoptotik genlerin örnekleri arasında p53, adenovirüs E3-11.6K, adenovirüs E4orf4 geni, p53 yolu genleri ve kaspazları kodlayan genler bulunur.

30 "Ön ilaç aktifleştirici genler" terimi, ekspresyonu, terapötik olmayan bir bileşiği terapötik bir bileşiğe dönüştürebilen protein üretimi ile sonuçlanan nükleotid

dizilerini belirtir, hücrenin dış etkenler tarafından öldürülmeye yatkın hale gelmesini veya hücrede toksik bir duruma neden olmasını sağlar. Bir ön ilaç aktifleştirici gen örneği, sitozin deaminaz genidir. Sitozin deaminaz, 5-flüositozini, güçlü bir antitümör ajan olan 5 flüorourasile dönüştürür. Tümör

5 hücrelerinin erimesi, tümörün lokalize edilmiş noktasında 5FC'yi 5FU'ya dönüştürebilen lokal bir sitosin deaminaz patlaması sağlar ve bunun sonucunda çevresindeki birçok tümör hücrelerinin öldürülmesi sağlanır. Bu, çok sayıda tümör hücrelerinin, bu hücrelere bir adenovirüs ile enfekte edilmesine gerek kalmadan öldürülmesiyle sonuçlanır (buna "seyirci kalma etkisi" denir). Bunlara ek olarak,

10 timidin kinaz (TK) geni (bakınız, örn. Woo, et al. Birleşik Devletler Patent No. 5,631,236 20 Mayıs 1997 ve Freeman, et al. Birleşik Devletler Patent No. 5,601,818 11 Şubat 1997) TK gen ürününü eksprese eden hücrelerin, gansiklovir uygulaması ile seçici öldürmeye duyarlı olduğu durumlarda kullanılabilir.

15

"Anti-anjiyojenik" genler terimi, ekspresyonu anti-anjiyojenik faktörlerin hücre dışı salgılanmasıyla sonuçlanan bir nükleotid dizisi anlamına gelir. Anti-anjiyogenez faktörleri arasında anjiyostatin, Tie 2 (PNAS (ABD) (1998) 95:8795-8800'de tarif edildiği gibi), endostatin gibi vasküler endotel büyüme faktörü

20 inhibitörleri (VEGF) bulunur.

Teknikte uzman kişilerce, yabani tip proteinin fonksiyonel alt fantezilerini şifrelemek üzere yukarıda belirtilen genlerde modifikasyonların ve/veya delesyonların, mevcut buluşun uygulamasında kullanım için kolayca adapte

25 edilebilecekleri açıkça görülecektir. Örneğin, p53 genine yapılan referans sadece yabani tip proteini değil aynı zamanda modifiye p53 proteinlerini de içerir. Bu gibi modifiye edilmiş p53 proteinlerinin örnekleri arasında tarif edildiği gibi nükleer tutumu arttırmak için p53'e yapılan modifikasyonlar, Wahl, et al., Nat. Cell Biol., 3(12): E277-86 (2001), kalpain konsensüs bölünme bölgesini elimine

30 etmek için delta13-9 amino asitleri gibi delesyonlar, oligomerizasyon bölgelerinde

modifikasyonlar bulunur (PCT, WO97/0492 başvurusunu ya da US Patent No 5,573,925'te yayımlanan Bracco et al.'da tarif edildiği gibi.).

5 Teknikte uzman kişilerce, yukarıdaki terapötik genlerin, ortam içine salgılanabileceği veya bir sinyal peptidi veya nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) gibi bir hedefleme molekül bölümünün dahil edilmesi yoluyla belirli hücre içi bölgelere lokalize edilebileceği açıkça görülecektir. Ayrıca terapötik transgen tanımına dahil edilen, herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1) yapısal protein, VP22 ile terapötik transgenin füzyon proteinleridir. VP22 sinyalini içeren füzyon

10 proteinleri, enfekte bir hücrede sentezlendiklerinde, enfekte olmuş hücreden dışa aktarılır ve etrafta enfekte olmayan hücrelere etkili bir şekilde yaklaşık 16 hücrelik bir çapa girerler. Bu sistem, füzyon proteinleri, çevredeki hücrelerin çekirdeğine verimli bir şekilde taşındığından, transkripsiyonel olarak aktif proteinlerle (örneğin, p53) birlikte kullanıldığında faydalıdır. Bakınız,

15 örneğin Elliott, G. & O'Hare, P. Cell., 88:223-233 (1997); Marshall, A. & Castellino, A. Research News Briefs., Nature Biotechnology, 15: 205 (1997); O'Hare, et al. PCT yayını WO97/05265 13 Şubat,1997. HIV Tat proteininden türetilen benzer bir hedefleme molekül bölümü ayrıca Vives et al., J. Biol. Chem .. 272: 16010-16017 (1997)'de açıklanmaktadır.

20

Burada kullanıldığı şekliyle "bir gen dağıtım sistemi", örneğin rekombinant viral vektörler ve viral olmayan vektör sistemleri dahil olmak üzere terapötik bir genin belirli bir epitel dokuya veya organa dağıtılmasının herhangi bir yolunu ifade eder. Vektör olmayan sistemlerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, lipit bazlı, lipit kapsüllenmiş DNA veya katyonik lipit/DNA kompleksleri

25 bulunur. Rekombinant viral vektörlerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, herpes virüsü, retrovirüs, aşı virüsü, adenovirüs ve adeno-bağılantılı virüsler bulunur.

30 "Rekombinant", nükleik asitlerin "genetik mühendislik" olarak da adlandırılan rekombinant DNA teknolojisinin yöntemleri ile üretildiği nükleik asitleri ve onlar

tarafından kodlanan proteini belirtir. Tercih edilen bir rekombinant viral vektör, protein IX geninin delesyonu olan adenoviral vektör dağıtım sistemidir. Bakınız WO 95/11984 sayılı Uluslararası patent başvurusu. Bir tümör baskılayıcı gen gibi bir terapötik gen içeren rekombinant vektör dağıtım sistemi, vektörü stabilize eden bir tamponda formüle edilir ve vektör ile uyumlu bir dağıtım arttırıcı ajan ile

5 birleştirilir.

Bir "dağıtım arttırıcı ajan", bir tümör baskılayıcı gen gibi terapötik bir genin, kanserli bir doku veya organa dağıtımını arttıran herhangi bir ajanı belirtir. Bu tür gelişmiş dağıtım, çeşitli mekanizmalar ile sağlanabilir. Bu tür bir mekanizma, mesanenin epitel yüzeyi üzerindeki koruyucu glikosaminoglikan tabakasının bozulmasını içerebilir.

10

Bu tür dağıtım arttırıcı ajanların örnekleri deterjanlar, alkoller, glikoller, sürfaktanlar, safra tuzları, heparin antagonistleri, siklooksijenaz inhibitörleri, hipertonic tuz çözeltileri ve asetatlardır. Alkoller, örneğin, etanol, N-propanol, izopropanol, bütül alkol, asetil alkol gibi alifatik alkollerini içerir. Glikoller arasında örneğin gliserol, propilenglikol, polietilenglikol ve tiyogliserol bulunur. Asetik asit, glukonol asetat ve sodyum asetat gibi asetatlar, dağıtım arttırıcı ajanların başka örnekleridir. 1M NaCl gibi hipertonic tuz çözeltileri ayrıca dağıtım arttırıcı ajanların örnekleridir. Sürfaktanların örnekleri, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve lisolesitin, polisorbata 80, nonilfenoksipolioksietilen, lisofosfatidilkolin, polietilenglikol 400, polisorbata 20, polioksietilen eterler ve poliglikol eter sürfaktanlardır. Taurokolat, sodyum tauro-deoksikolat, deoksikolat, kenodeoksikolat, glikokolik asit, glikokenodeoksikolik asit ve gümüş nitrat gibi diğer kan durdurucu maddeler gibi safra tuzları kullanılabilir. Protamin sülfat gibi heparin-antagonistler benzeri dörtlü aminler de kullanılabilir. Sodyum salisilat, salisilik asit ve indometasin, naproksen, diklofenak gibi nonsidoidal antiinflamatuvar ilaç (NSAIDS) gibi siklooksijenaz inhibitörleri kullanılabilir.

15

20

25

30

"Arttırıcı" terimi, bir tümör baskılayıcı gen gibi terapötik genin kanserli doku

veya organa artan dağıtımı tarif eder. Terapötik bir genin artan dağıtımı, bir tümör baskılayıcı gen gibi, çeşitli yollarla, örneğin, tümör baskılayıcı gen, dağıtım arttırıcı maddeden yoksun bir tampondaki bir adenoviral vektör dağıtım sisteminde verildiğinde, ekspresyon seviyelerine kıyasla tümör baskılayıcı gen ekspresyonunun ölçülmesiyle ölçülebilir. Terapötik genlerin örnekleri, tümör baskılayıcı genler ve intihar geni timidin kinazıdır. Tümör baskılayıcı genlerin örnekleri arasında, ancak, bunlarla sınırlı olmamak üzere, p53, retinoblastoma geni, p110B gibi tam uzunlukta veya p94RB veya p56RB, Rb56 gibi fragmanları, Rb geninin fonksiyonel bir varyantı, p53 geninin fonksiyonel bir varyantı, p53 ile sınırlı değildir. Diğer terapötik genler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, CFTR, sitokinleri kodlayan genler (örneğin, interferonlar alfa, beta, gama, delta, interleokinler (örneğin, IL-4, IL-10, IL-2), GM-CSF ve sistit gibi mesanenin kanserli olmayan hastalıklarının tedavisinde terapötik potansiyele sahip olan proteinleri kodlayan diğer genler bulunur. Açıklamanın bazı yönlerinde, terapötik gen antisens RNA'yı kodlar.

Bazı yönleriyle, tarifnemenin bileşimleri, bir dağıtım arttırıcı ajan içeren bir tamponda bir rekombinant viral vektör verme sisteminde bulunan bir tümör baskılayıcı gen gibi terapötik olarak etkili bir miktarda bir terapötik gen içerir. Burada kullanıldığı şekliyle "terapötik olarak etkili", bir hastalık durumu ile bağlantılı semptomların önlenmesi, azaltılması veya iyileştirilmesi anlamına gelir.

P53 gibi bir terapötik gen içeren farmasötik bileşimin terapötik olarak etkili miktarları, veya bir dağıtım arttırıcı ajan içeren bir tamponda formüle edilmiş bir rekombinant viral vektör dağıtım sisteminde, retinoblastom tümör baskılayıcı gen, bu tarifnemenin öğretisine uygun olarak uygulanacaktır. Örneğin, bir dağıtım arttırıcı ajan içeren bir tamponda formüle edilen rekombinant adenoviral vektör dağıtım sisteminde p53 tümör baskılayıcı genin terapötik olarak etkili miktarları, yaklaşık 1×10^8 parçacık/ml ile 2×10^{12} parçacık/ml aralığında, daha fazlası tipik olarak yaklaşık 1×10^8 parçacık/ml ile 9×10^{11} parçacık/ml, en tipik olarak 1×10^{10} parçacık/ml ile 9×10^{11} parçacık/ml'dir.

ACN53 olarak da bilinen P53, yabani tip p53 tümör baskılayıcı proteinini şifreleyen bir rekombinant adenovirüs tip 5'tir ve örneğin PCT patent başvurusu W095/11984'te tarif edilir. Açıklamanın bir yönünde, formüle edilmiş SYN3, p53 enjeksiyonu ile birleştirilir ve karışım, mesanenin içine yerleştirilir. Bu preparat, 5 epitelyal karsinomları tedavi etmeye yöneliktir. Tercihen, p53 yaklaşık 5 ila yaklaşık 8×10^{13} parçacık miktarında mevcut olacaktır.

Bu açıklama kapsamında kullanılacak deterjanlar örneğin anyonik, katyonik, zitteriyonik ve iyonik olmayan deterjanları içerir. Örnek deterjanlar arasında, 10 bunlarla sınırlı olmamak üzere, taurokolat, deoksikolat, taurodeoksikolat, setilpirodyum, benalkonyum klorür, ZWITTERGENT 3-14 deterjan, CHAPS (3 - [(3-Kolamidopropil) dimetilammoniol] -1-propanesülfonat hidrat, Aldrich'ten temin edilebilir, Big CHAP, Deoxy Big CHAP, TRITON-X-100 deterjan Union Carbide'dan temin edilebilir, C12E8, Octyl-B-D-Glucopyranoside, PLURONIC- 15 F64, PLURONIC-F68, PLURONIC-F69 deterjanları, BASF, TWEEN20 deterjan ve TWEEN80 deterjan ICI'den temin edilebilir.

Bir uygulamada, dağıtım arttırıcı ajan, rekombinant adenoviral vektör dağıtım sisteminin formüle edildiği tamponda bulunur. Dağıtım arttırıcı ajan, rekombinant 20 virüsten önce veya virüsle birlikte verilebilir, bazı uygulamalarda, dağıtım arttırıcı ajan hastaya uygulamadan hemen önce bir virüs preparatını dağıtım arttırıcı ajan formülasyonu ile karıştırmak suretiyle virüsle sağlanır. Başka uygulamalarda, dağıtım arttırıcı ajan ve virüs, uygulama için sağlık yetkilisine tek bir şişe içinde sağlanır.

25

Bir tampon içinde formüle edilmiş bir rekombinant adenoviral vektör dağıtım sisteminde bulunan ve ayrıca bir dağıtım arttırıcı ajan içeren bir tümör baskılayıcı gen içeren bir farmasötik bileşim durumunda, farmasötik bileşim zamanla yaklaşık 5 dakika ila 3 saat, tercihen yaklaşık 10 dakika ila 120 dakika ve tercihen 30 yaklaşık 15 dakika ila 90 dakika arasında uygulanabilir. Başka bir uygulamada dağıtım arttırıcı ajan, tümör baskılayıcı geni içeren rekombinant adenoviral vektör

dağıtım sisteminin uygulanmasından önce uygulanabilir. Dağıtım arttırıcı ajanın önceden tatbik edilmesi, yaklaşık 30 saniye ile 1 saat arasında olabilir, tümör baskılayıcı geni içeren adenoviral vektör dağıtım sisteminin uygulanmasından önce tercihen yaklaşık 1 dakika ile 10 dakika ve tercihen yaklaşık 1 dakika ile 5 dakika arasında değişir.

Mevcut buluşun formülasyonları için kullanılabilecek çözücüler, örneğin enjeksiyon için su gibi sulu çözücüler ve/veya DMA olarak da bilinen DMSO ve N, N-Dimetilasetamid gibi sulu olmayan çözücüler; ve tercihen USP standartlarına uygun olarak hazırlanan gliserol ve su gibi yardımcı çözücü karışımları içerir.

Formülasyonlar HP β CD içerir ve ayrıca tercihen polisorbitatlar veya polioksietilen sorbitan esterler, örn., diğerleri arasında polisorbitat 80 ve polisorbitat 20 içeren bir noniyonik sürfaktan sınıfı, Plüronik veya polietilen-polipropilen glikol blok kopolimerleri, örn., diğerleri arasında Pluronic L68 ve L92TM içeren noniyonik bir sürfaktan sınıfı; ve hidrokispropil-beta-siklodekstrin, bir HP-CD ve BigCHAPTM içeren, non-iyonik bir kompleks yapıcı ajan sınıfı olan örn. HP[®]CD ve BigCHAPTM içeren bir polisüstitüe edilmiş hidroksialkil-beta-siklodekstrin içerir. Tercih edilenler, çözündürücü maddeler olarak, Polisorbitat 80TM, Polisorbitat 20TM, Pluronic L64TM ve Pluronic L92TMdir. Çözündürücü ajanlar, örneğin ayrı ayrı veya kombinasyon halinde kullanılabilir. Çözündürücü ajanların konsantrasyonları, aşağıda ortaya konmuştur. HP β CD, yaklaşık 50 ile 500 mg/ml konsantrasyonda mevcut olabilir, BigCHAPTM yaklaşık 20 ile yaklaşık 360 mg/ml konsantrasyonunda bulunabilir, Polisorbitat 80TM, yaklaşık 1 ile yaklaşık 150 mg/ml bir konsantrasyonunda bulunabilir, ve diğer içerikler, aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda mevcut olabilir.

Dağıtım arttırıcı ajanının konsantrasyonu, kullanılan dağıtım arttırıcı ajanının tampon, pH, hedef doku veya organ ve uygulama şekli gibi teknikte sıradan uzmanlığa sahip biri tarafından bilinen bir dizi faktöre bağlı olacaktır. Dağıtım

arttırıcı ajanının konsantrasyonu, %0.01 ila %50 (w/v), tercihen %10 ila %40 (w/v), tercihen %14 ila %19 (w/v), ve tercihen %0.01 ila %30 (w/v) arasındadır. Tercihen, deterjan konsantrasyonu, karışımdan önce formülasyonda %1 ila %12 (w/v) ve tercihen karışımdayken formülasyonda %0.1 (w/v) olacaktır. Tercihen, hastaya uygulanan nihai formülasyondaki deterjan konsantrasyonu, kritik mikellizasyon konsantrasyonunun (CMC) yaklaşık 0.5-2 katıdır. Rekombinant adenovirüs formülasyonunda CMC, 0.001 mg/ml'ye eşittir.

SYN3'ün liyofilize edilmiş formülasyonları bir sitrat tamponlama sistemi içerir. Tercihen, sitrat tamponlama sistemi, sitrik asit monohidrat USP veya sodyum sitrat dihidrat USP gibi en az bir sitrik tampon içerebilir. Daha tercihen, sitrat tamponlama sistemi, bir sitrik asit monohidrat USP ve sodyum sitrat dihidrat USP'nin bir kombinasyonunu içerir. Kombinasyon halinde kullanıldığında, sitrik asit monohidrat USP miktarı, yaklaşık 0.005 ila yaklaşık 2 mg/ml, daha çok tercih edilen şekliyle 0.016 ila yaklaşık 1.35 mg/ml konsantrasyonunda bulunabilir, tercihen 0.016 ila yaklaşık 0.72 mg/ml, tercihen yaklaşık 0.005 ila yaklaşık 1.35, ve sodyum sitrat dihidrat USP, yaklaşık 0.02 ila yaklaşık 5.37 mg/ml, tercihen 0.05 ila 3.00 mg/ml, tercihen 0.05 ila 2.31 mg/ml konsantrasyonunda bulunabilir. Uygun olan diğer uygun tamponlama sistemleri, örneğin sitrat tamponlama sisteminin yerine veya bununla kombinasyon halinde fosfat, glisin ve yukarıdakilerin hepsinin değişken kombinasyonlarını içerir.

Tamponlama sistemi, iyileştirilmiş stabilite olacak şekilde liyofilize edilmiş bir formülasyonun pH değerini sağlayacaktır. pH değeri 5 ila 6 aralığında olacaktır. SYN3'ün karışım sulu formülasyonları tercihen yaklaşık 7 ila yaklaşık 8,5, tercihen yaklaşık 7,4'lük bir pH'ta tamponlanır ve SYN3 dehidrate tozda 40 °C'de en az 3 ay boyunca stabil kalır.

Liyofilize edilmiş formülasyonlar tercihen, dondurarak kurutma hacim arttırıcı ajanları olarak glisin veya mannitol içerir. Diğer uygun dondurarak kurutma

hacim arttırıcı ajan, madde manitol olduğunda yaklaşık 5 ila 100 mg/ml, madde ise glisin olduğunda yaklaşık 10 ila 200 mg/ml konsantrasyonda mevcut olabilir.

5 Liyofilize edilmiş formülasyonlar tercihen bir antioksidan olarak askorbik asit içerir. Kullanılabilecek diğer uygun antioksidanlar, örneğin sitrik asidi içerir. Askorbik asitler antioksidan olduğunda, yaklaşık 0.001 ila yaklaşık 0.6 mg/ml konsantrasyonunda mevcut olabilir.

10 Bu buluşun bileşimleri ek olarak, örneğin, bir stabilizör, arttırıcı veya diğer farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar veya vehiküller içerebilir. Farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, örneğin, tümör baskılayıcı genini içeren rekombinant adenoviral vektör dağıtım sistemini stabilize etmek için etkili olan fizyolojik olarak kabul edilebilir bir bileşik; örneğin, glukoz, sukroz veya dekstranlar gibi karbonhidratlar, Hidroksipropil-j8-Siklodekstrin, askorbik asit
15 veya glutatyon gibi antioksidanlar, şelatlama ajanları, düşük moleküler ağırlıklı proteinler veya diğer stabilizatörler veya ekspanyanlar içerebilir.

Diğer fizyolojik olarak kabul edilebilir bileşikler arasında, örneğin mikroorganizmaların büyümesini veya etkisinin önlenmesi için faydalı olan
20 ıslatıcı maddeler, emülsifiye edici maddeler, dağıtıcı maddeler veya koruyucular bulunur. Çeşitli koruyucular iyi bilinmektedir ve örneğin fenol ve askorbik asit içerir. Teknikte uzman bir kişi, farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı seçiminin, uygulama yoluna ve rekombinant adenoviral vektör verme sisteminin ve burada bulunan belirli tümör baskılayıcı genin özel fizyokimyasal özelliklerine
25 bağlı olduğunu bilecektir. Taşıyıcı, dengeleyici veya adjuvan örnekleri Gennaro, Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed.'de (Mack Publishing. Co., Easton, Pa. 1995) bulunabilir.

30 Bir dağıtım arttırıcı ajan içeren bir tampon içinde formüle edilmiş bir terapötik gen içeren rekombinant viral vektör dağıtım sistemi, normal olarak uzman kişilerce bilinen herhangi bir dağıtım yöntemi, örneğin, intratumoral veya

intravezikal uygulama kullanılarak herhangi bir kanserli dokuya veya organa dağıtılabilir. Kanserli dokular ve organlar, örneğin, gastrointestinal sistem, mesane, solunum yolu ve akciğer gibi bir epitelyal membranı olan herhangi bir doku veya organı içerir. Örnekler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, mesane ve üst solunum yolu kanseri, vulva, serviks, vajina veya bronşlar; peritonun lokal metastatik tümörleri; bronko-alveoler karsinom; plevral metastatik karsinom; ağız ve bademcikler karsinoması; nazofarenks, burun, gırtlak, yemek borusu, mide, kolon ve rektum, safra kesesi veya cilt karsinoması; veya melanom bulunur.

10

Açıklamanın dağıtım arttırıcı ajanları ayrıca, epitelyal bir zarı olan herhangi bir doku veya organa tatbik etmek için proteinler, nükleik asitler, antisens RNA, küçük moleküller vb. gibi diğer farmasötik ajanları formüle etmek için de kullanılabilir.

15

Formülasyonların Uygulanması

Bazı yönlerde, dağıtım arttırıcı ajan, ekspresyon vektörünün formüle edildiği tamponda bulunur. Dağıtım arttırıcı ajan ekspresyon vektöründen önce veya ekspresyon vektörü ile birlikte uygulanabilir. Bazı yönlerde, dağıtım arttırıcı ajan, bir ekspresyon vektörünü hastaya uygulamadan hemen önce bir dağıtım arttırıcı ajan formülasyonu ile karıştırmak suretiyle ekspresyon vektörüyle sağlanır. Diğer yönlerde dağıtım arttırıcı ajan ve ekspresyon vektörü, uygulama için sağlık yetkilisine tek bir şişe içinde sağlanır.

25

Bir tampon içinde formüle edilmiş bir rekombinant adenoviral vektör dağıtım sisteminde bulunan ve ayrıca bir dağıtım arttırıcı ajan içeren bir tümör baskılayıcı gen içeren bir farmasötik bileşim durumunda, farmasötik bileşim zamanla yaklaşık 5 dakika ila 3 saat, tercihen yaklaşık 10 dakika ila 120 dakika ve en çok tercihen yaklaşık 15 dakika ila 90 dakika arasında uygulanabilir. Başka bir yönden, dağıtım arttırıcı ajan, tümör baskılayıcı geni içeren rekombinant

adenoviral vektör dağıtım sisteminin uygulanmasından önce uygulanabilir. Dağıtım arttırıcı ajanın önceden uygulanması, tümör baskılayıcı geni içeren adenoviral vektör dağıtım sisteminin uygulanmasından önce yaklaşık 30 saniye ile 1 saat, tercihen yaklaşık 1 dakika ile 10 dakika ve en çok tercihen yaklaşık 1 dakika ile 5 dakika arasında değişebilir.

Bir dağıtım arttırıcı ajan içeren bir tampon içinde formüle edilen ekspresyon vektörü, normal olarak uzman kişilerce bilinen herhangi bir dağıtım yöntemi, örneğin intratumoral veya intravezikal uygulama kullanılarak, kanser dokusu gibi neoplastik dokular dahil olmak üzere herhangi bir doku veya organa verilebilir. Dokular ve organlar, gastrointestinal sistem, mesane, solunum yolu ve akciğer gibi bir epitel membranına sahip herhangi bir doku veya organı içerir. Örnekler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, mesane ve üst solunum yolu kanseri, vulva, serviks, vajina veya bronşlar; peritonun lokal metastatik tümörleri; bronko-alveoler karsinom; plevral metastatik karsinom; ağız ve bademcikler karsinomu; nazofarenks, burun, gırtlak, yemek borusu, mide, kolon ve rektum, safra kesesi veya cilt karsinomu; veya melanom bulunur.

Buluşun bazı uygulamalarında, bir ekspresyon vektörü, mukozal, topikal ve/veya bukkal formülasyonlarda, özellikle de muko yapışkan jel ve topikal jel formülasyonlarında formüle edilir. Örnek permeasyon arttırıcı bileşimler, polimer matrisleri ve transdermal uygulama için muko-yapışkan jel preparatları US Patent No. 5,346,701'de açıklanmaktadır. Bu tür formülasyonlar özellikle, ağız kanserleri, baş ve boyun kanserleri (örn., trakeobronşiyal epitel kanserleri), deri kanserleri (örn., melanom, bazal ve skuamöz hücreli karsinomlar), bağırsak mukozası, vajinal mukoza ve rahim ağzı kanseri kanserlerinin tedavisi için yararlıdır.

Buluşun bazı uygulamalarında, göze uygulama için oftalmik formülasyonlarda terapötik bir ajan formüle edilir. Bu tür formülasyonlar, isteğe bağlı olarak p53'ün

verilmesiyle bağlantılı olarak retinoblastoma (RB) geninin göze uygulanmasında faydalıdır.

Tedavi Yöntemlerinde Kullanım İçin Bileşimler

5

Buluşun bileşimi tipik olarak genin bir hücreye transferini arttırmak için uygulanır. Hücre, bir epitel membran gibi bir dokunun parçası olarak veya doku kültüründe olduğu gibi izole edilmiş bir hücre olarak sağlanabilir. Hücre in vivo, ex vivo veya in vitro olarak sağlanabilir.

10

Bileşimler, ilgilenilen dokuya in vivo veya ex vivo olarak çeşitli yöntemlerle dahil edilebilir. Modüle edici ajan, hücrelere mikroyenjeksiyon, kalsiyum fosfat çökeltmesi, lipozom füzyonu veya biyolojik özellikler gibi yöntemlerle verilir. Terapötik madde, doğrudan ilgilenilen doku tarafından alınabilir.

15

Buluşun bazı uygulamalarında, buluşa ait bileşimler, bir hastadan eksplante edilen hücrelere veya dokulara ex vivo olarak uygulanır, daha sonra hastaya geri döndürülür. Terapötik gen yapılarının ex vivo uygulamasının örnekleri arasında Arteaga et al., Cancer Research 56(5):1098-1103 (1996); Nolta et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 93(6):2414-9 (1996); Koc et al., Seminars in Oncology 23 (1):46-65 (1996); Raper et al., Annals of Surgery 223(2):116-26 (1996); Dalesandro et al., J. Thorac. Cardi. Surg., 11(2):416-22 (1996); ve Makarov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(1):402-6 (1996) bulunur.

20

25

Örnekler

Aşağıdaki örnekler bu buluşu daha fazla açıklayacaktır. SYN3, HPBCD ve 5 ila 6 arasında bir pH sağlayan bir sitrat tamponlama sistemi içeren bileşimleri gösteren tüm örnekler buluşa göredir.

30

ÖRNEK 1

- Aşağıdaki tablo, mevcut buluşun sulu olmayan sıvı formülasyonları için içerik aralıklarını temsil eder. Uygulamadan önce (mesane kanseri için), SYN3 çözeltisi, hastaya uygulanan bir karışım oluşturmak için 1:50 v/v oranında rekombinant adenovirüs preparatı ile birleştirilir.

İçerik	İçerik Konsantrasyonları Aralığı			
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
SYN3	0.001 - 150	0.001 - 150	0.001 - 150	0.001 - 150
Polisorbat 20	0.001 - 150			
Polisorbat 80		0.001 - 150		
Pluronic L64			0.001 - 100	
Pluronic L92				0.001 - 100
N, N-Dimetilasetamid qs ad	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

- Hazırlamak için DMA'nın yaklaşık %75'i bir cam beherin içine tartılır. Ayrı bir behere sürfaktanı (Polisorbat 80, Polisorbat 20, Pluronic L64 veya Pluronic L92) 10 şarj edin ve DMA'nın küçük bir hacminde (nihai hacmin yaklaşık %10'u) çözün. Sürekli karıştırmayla DMA/sürfaktan çözeltisini DMA'ya yükleyin. Ayrı bir kaptaki SYN3'ü önceden tartın. Karıştırırken SYN3'ü yavaşça solüsyona doldurun. SYN3 15 çözündükten sonra, ağırlıkça son hacme yeterli DMA ekleyin (25 °C'de yoğunluk = 0.962 g/ml). Solüsyonu, lateks olmayan bir piston ile donatılmış bir şırıngaya bağlı 0.22 filtreden geçirin ve solüsyonu 4 °C'de sıkıca kapatılmış cam bir kaptaki saklayın.

Devamındaki örnekler, Örnek 1'e göre hazırlanabilir.

ÖRNEK 2

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	51
Polisorbat 20	50
N, N-Dimetilasetamid qs ad	1 ml

ÖRNEK 3

5

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	51
Polisorbat 80	50
N, N-Dimetilasetamid qs ad	1 ml

ÖRNEK 4

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	51
Pluronik L64	25
N, N-Dimetilasetamid qs ad	1 ml

10

ÖRNEK 5

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	51
Pluronik L92	25

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
N, N-Dimetilasetamid qs ad	1 ml

Aşağıdaki 25 ml'lik gruplar aynı prosedüre göre hazırlanmıştır.

ÖRNEK 6

5

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	1.275
Polisorbat 20	1.250
N, N-Dimetilasetamid qs ad	25 ml

ÖRNEK 7

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	1.275
Polisorbat 80	1.250
N, N-Dimetilasetamid qs ad	25 ml

10 **ÖRNEK 8**

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	1.275
Pluronik L64	0.625
N, N-Dimetilasetamid qs ad	25ml

ÖRNEK 9

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	1.275
Pluronik L92	0.625
N, N-Dimetilasetamid qs ad	25 ml

Aşağıdaki Örnek 2, 3, 4 ve 5'in bir stabilite analizidir.

5

ÖRNEK 10

T°		-20°C	4°C	25°C	55°C	-80°C
Ör. No. 2	1 hafta	52.22	52.15	52.38	51.36	52.31
	2 hafta	52.16	52.14	52.38	52.68	
	3 hafta	51.92	52.38	51.98	51.46	
	4 hafta	52.1	52.63	52.28	51.15	
Ör. No. 3	1 hafta	51.9	53.75	53.09	52.98	53.33
	2 hafta	53.46	52.9	51.98	51.75	
	3 hafta	52.64	53.35	53.41	50.6	
	4 hafta	53.41	52.96	53.85	55.81	
Ör. No. 4	1 hafta	51.34	53.94	53.68	53.76	53.98
	2 hafta	53.3	53.43	53.76	52.23	

T°		-20°C	4°C	25°C	55°C	-80°C
	3 hafta		53.14	52.56	52.35	
	4 hafta	53.72	53.67	54.2	53.42	
Ör. No. 5	1 hafta	52.34	52.16	52.43	51.48	52.33
	2 hafta	51.64	51.5	51.39	52.18	
	3 hafta	52.28	52.56	53.73	53.01	
	4 hafta	53.49	53.49	53.67	53.73	

Stabilite testi HPLC ile yapıldı. Solüsyon formülasyonları belirtilen sıcaklık koşullarında yerleştirilmiş, belirtilen zamanlar için inkübe edilmiş ve konsantrasyonlar HPLC ile belirlenmiş ve başlangıçtaki konsantrasyonlarla (-80 °C) karşılaştırılmıştır. SYN3'ün sulu olmayan çözelti formülasyonları, SYN3, N, N-Dimetilasetamid (DMA) içinde çözündüğünde 55 °C'de en az 1 ay boyunca stabil kalır.

10 **ÖRNEK 11**

Aşağıdaki tablo, mevcut buluşun liyofilize edilmiş formülasyonları için bileşen aralıklarını temsil etmektedir. Bileşik çözelti, 20 ml kapasiteli Tip II bir cam şişeye gösterildiği gibi doldurulur ve liyofilize edilir. Uygulama hazırlığı, SYN3'ü tekrar eritmek için dondurularak kurutulmuş küspeyi içeren şişeye 20 ml WFI eklenmesini gerektirir. SYN3 çözeltisi, 1:5'lik bir v/v oranında p53 veya herhangi bir rekombinant adenovirüs preparatı ile birleştirilir. Karışım daha sonra hastaya örneğin mesane kanseri için uygulanır.

İÇERİK**Konsantrasyon Aralığı**

	mg/ml	mg/ml	mg/ml
SYN3	0.001 - 150	0.001 - 150	0.001 - 150
Sitrik asit monohidrat	0.016 - 0.72	0.016 - 0.96	0.005 - 1.35
Sodyum Sitrat Dihidrat	0.05 - 2.31	0.05 - 3	0.02 - 5.37
Hidroksipropil-β-siklodekstrin	-	50 - 500	-
BigCHAP	20 - 360	-	-
Glisin	10 - 200	-	-
Mannitol	-	-	5 - 100
Polisorbat 80	-	1.0 - 36.0	10 - 200
Askorbik asit ^a	0.001 - 0.6	0.001 - 0.6	-
Enjeksiyon için Su (WFI) qs ad	1 ml	1 ml	1 ml
PH Aralığı	5 - 6	5 - 6	5 - 6
ml-20 ml'lik şişeye ^b doldurulur	5.3	5.3	5.3
WFI ^c 'nin Sulandırma Hacmi	20 ml	20 ml	20 ml

Aşağıdaki örnekler, liyofilize edilmiş formülasyonları hazırlama yöntemleridir.

5 **ÖRNEK 12**

<u>İçerik</u>	<u>Gram/Litre</u>
SYN3	24
Sitrik Asit Monohidrat USP	0.24
Sodyum Sitrat Dihidrat USP	0.77

<u>İçerik</u>	<u>Gram/Litre</u>
Big CHAP	120
Glycine USP	50
Askorbik Asit USP	0.25
Enjeksiyon İçin Su USP qs ad	1000 ml

Yüklenecek gerçek SYN3 miktarı, aşağıdaki formülü kullanarak ilaç maddesi kümesinin saflığına göre ayarlanacaktır:

$$5 \text{ gram SYN3} = 24.0 \times 100 / (\% \text{Saflık}).$$

Örneğin:

$$\text{SYN3 ilaç maddesi} = \%97.0 \text{ saf.}$$

$$24.0 \times 100 / 97.0 = 24.7 \text{ gram SYN3, 1 litre parti için yüklenecek.}$$

- 10 Buna göre, aşağıdaki formüle göre partiye yüklenecek SYN3 miktarını belirlemek için:

$$\text{g SYN3/Litre} = 24.0 \text{ g/Litre} \times [100 / (\% \text{SYN3 Parti Saflığı})]$$

- 15 Partiye yüklenecek Enjeksiyon için Su hacmi aşağıdaki formüle göre belirlenmelidir:

$$\text{Enjeksiyon için Su Hacmi (Litre)} = \text{Parti Hacmi (Litre)} \times 0.5$$

- 20 Yukarıdaki formülü kullanarak hesaplanan enjeksiyon için su hacmini, bir karıştırıcı ile donatılmış darası alınmış bir bileşik hazırlama kabına doldurun. BigCHAP'ı çalkalayarak yükleyin ve çözün. Enjeksiyon için Steril Su, tüm malzemenin alınması için tartı kabının durulanması için kullanılabilir. BigCHAP'in tamamen çözünmesi, ortalama bir karıştırma hızında yaklaşık 30 ila 60 dakika sürekli çalkalama gerektirebilir. SYN3'ü BigCHAP çözeltisine yükleyin ve karıştırın (orta karıştırma hızı) ile çözün. Enjeksiyon için su, tüm malzemenin

- alınması için tartım kabının durulanması için kullanılabilir. SYN3'ün tamamen çözünmesi 1 saate kadar karıştırmayı gerektirebilir. Çalkalayarak ve sırayla şarj edin ve çözün: Glisin, Askorbik Asit, Sitrik Asit Monohidrat ve Sodyum Sitrat Dihidrat, hem Büyük CHAP hem de SYN3 içeren çözeltiye eklenir. Enjeksiyon
- 5 için su, tüm malzemenin alınması için tartı teknelerinin durulanması için kullanılabilir. Partiyi nihai hacme getirmek için Enjeksiyon için Su ekleyin (çözeltinin yoğunluğu 25 °C'de yaklaşık 1.051 g/ml'dir). Çözeltiyi en az 15 dakika boyunca karıştırın.
- 10 pH değeri ölçümü için çözeltiden küçük bir (<5 ml) numune çıkarın. pH 5.0 ile 6.0 arasında olmalıdır. pH ayarlaması gerekmez. Teknikte sıradan uzmanlığa sahip olan bir kişi, ortaya çıkan ürünün pH değerini kolayca belirleyebilir.
- Bileşimi tamamlamak için, çözeltiyi aseptik olarak süzün. Gerekirse, bileşik parti,
- 15 şişelere doldurulmadan önce kapalı, sterilize edilmiş, paslanmaz çelik bir basınçlı kapta 24 saat boyunca 2 °C ila 8 °C'de saklanabilir. Parti, sterilitiyi sağlamak için bir kereden fazla filtrelenebilir.
- Aseptik olarak 5.3 ± 0.1 ml solüsyonu yıkanıp sterilize edilen 20 ml Tip 1 kristal
- 20 cam şişelere doldurun. Aseptik olarak, yıkanmış, silikonize edilmiş ve liyofilizasyon pozisyonunda şişelere sterilize edilmiş 20 mm West 4416/50 lyo-şekilli kauçuk tıpalari yerleştirin.
- Liyofilizatör raflarını 4 ± 2 °C'ye önceden soğutun. Aseptik olarak doldurulmuş
- 25 şişelerin tepsilerini liyofilizatör raflarına yükleyin. Tüm tepsiler yüklendikten sonra, rafları 1 saatte - 40 °C'ye soğutun ve devam etmeden önce ürünü en az 4 saat boyunca -35 °C'de veya altında tutun. Kondenseri soğutmaya başlayın. Kondenser sıcaklığı -45 °C veya altında olduğunda, hazneyi tahliye etmeye başlayın. 50-70 mm Hg vakum basıncına ulaşıldığında, raf sıcaklığını 0.5 saat
- 30 boyunca -20 °C'ye ısıtın. Raf sıcaklığını -20 °C'de 36 saat boyunca yaklaşık 150 mm Hg basınçta (100 ila 200 mm Hg basınç) tutun. Ürün sıcaklığı, devam

etmeden önce en az 6 saat boyunca -20 °C'de veya üzerinde kalmalıdır. Rafı 1 saat içinde 25 °C'ye ısıtın ve basıncı yaklaşık 50 mm Hg basınca düşürün. Raf sıcaklığını 25 °C'de 14 saat boyunca yaklaşık 50 mm Hg basınçta tutun. Steril filtrelenmiş azot ile hazneyi yaklaşık 950 mm Hg'ye kadar havalandırın.

- 5 Liyofilizatörün içindeki şişeleri durdurun. Şişeleri liyofilizörden çıkarın ve şişeleri 20 mm alüminyumla kapatın. Şişeler, inceleme tamamlanıncaya kadar 2 °C ila 8 °C arasında saklanmalıdır.

- 10 Ürün beyaz, kirli beyaz bir küspedir. Şişeler incelemekten sonra 2 °C ila 8 °C arasında saklanmalıdır. Etiketleme ve inceleme amacıyla, şişeler 6 saate kadar 19 °C-25 °C'ye maruz bırakılabilir.

Aşağıdaki örnekler, yukarıda Örnek 12'de belirtilen parti preparatına uygun olarak hazırlanmıştır.

15

ÖRNEK 13

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	24
Sitrik Asit Monohidrat USP	0.24
Sodyum Sitrat Dihidrat USP	0.77
Big CHAP	120
Glisin USP	50
Askorbik Asit USP	0.25
Enjeksiyon İçin Su USP qs ad	1 Ml

Oluşan ürünün pH değeri 5.34 idi.

20

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	24
Sitrik Asit Monohidrat USP	0.32
Sodyum Sitrat Dihidrat USP	1.02
HPβCD	200
Polisorbat 80	12
Askorbik Asit USP	0.25
Enjeksiyon İçin Su USP qs ad	1 ml

Elde edilen ürünün pH değeri 5.45 idi.

ÖRNEK 15

5

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	24.
Sitrik Asit Monohidrat USP	0.45
Sodyum Sitrat Dihidrat USP	1.79
Mannitol	30
Polisorbat 80	72
Enjeksiyon İçin Su USP qs ad	1000 ml

Elde edilen ürünün pH değeri 5.76 idi.

Örnek 13, 14 ve 15'teki sonuçtaki liyofilize edilmiş ürünlerin stabilite testi
aşağıdaki sonuçları vermiştir:

10

ÖRNEK 16

KOŞUL	ÖRNEKLER		
	13	14	15
	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Başlangıç	6.05	5.89	6.06
2 hafta -20°C	6.02	6.04	6.28
2 hafta 4°C	6.17	5.98	6.17
2 hafta 25°C	6.14	5.91	6.62
2 hafta 40°C	5.87	5.78	6.32
4 hafta -20°C	6.81	5.71	6.11
4 hafta 4°C	6.75	6.63	6.75
4 hafta 25°C	6.81	6.40	6.92
4 hafta 40°C	6.73	6.66	6.58
12 hafta 4°C	6.74	6.66	6.74
12 hafta 25°C	6.74	6.45	6.72
12 hafta 40°C	6.61	6.52	6.71

Stabilite testi HPLC ile yapıldı. Liyofilize edilmiş formülasyonlar, 19.5 ml WFI
5 ile sulandırıldı (yeniden çözüldü). Örnekler belirtilen sıcaklık koşullarında yerleştirildi, belirtilen süreler için inkübe edildi ve konsantrasyonlar HPLC ile belirlendi ve başlangıçtaki konsantrasyonlarla karşılaştırıldı.

ÖRNEK 17

<u>İçerik</u>	<u>mg/ml</u>
SYN3	24.0
Sitrik Asit Monohidrat USP	0.32
Sodyum Sitrat Dihidrat USP	1.02
Hidroksipropil-β-siklodekstrin	200
Polisorbat 80	12.0
Askorbik Asit USP	0.25
Enjeksiyon İçin Su USP qs ad	1000 ml

- 5 Yüklenecek fiili SYN3 miktarı, aşağıdaki formülü kullanarak ilaç maddesi kümesinin saflığına göre ayarlanacaktır:
gram SYN3 = $24.0 \times 100 / (\% \text{Saflık})$.

Numune Hesaplama:

10

SYN3 ilaç maddesi = %97.0 saf.

$24.0 \times 100 / 97.0 = 24.7$ gram SYN3, 1 litre parti için yüklenecek.

- Aşağıdaki Örnek şöyle hazırlanmıştır: Başlangıçta, aşağıdaki formüle göre partiye
15 yüklenecek SYN3 miktarını belirleyin:

$\text{g SYN3/Litre} = 24.0 \text{ g/Litre} \times [100 / (\% \text{SYN3 Parti Saflığı})]$

Ardından, aşağıdaki formüle göre partiye yüklenecek Enjeksiyon için Su hacmini belirleyin:

- 20 Enjeksiyon için Su Hacmi (Litre) = Parti Hacmi (Litre) x 0.5

- Enjeksiyon için su hacmini, bir karıştırıcı ile donatılmış darası alınmış bir bileşik hazırlama kabına doldurun. Hidroksipropil- β -siklodekstrin'i çalkalayarak yükleyin ve çözün. Not, Hidroksipropil- γ -siklodekstrin'in tamamen çözünmesi, orta derecede karıştırma hızında yaklaşık 30 ila 45 dakika sürekli çalkalama gerektirebilir. Enjeksiyon için su, tüm malzemenin alınması için tartı kabının durulanması için kullanılabilir. Polisorbat 80'i yükleyin ve çözeltiye çözündürün. Polisorbat 80, 0.1 x toplam parti hacminde Su Enjeksiyon (Litre) hacminde önceden çözünebilir ve çözeltiye yüklenebilir.
- 5
- 10 SYN3 çalkalanarak yüklenir ve çözelti içinde çözünür. SYN3'ün tamamen çözünmesi 1 saate kadar karıştırmayı gerektirebilir. Enjeksiyon için su, tüm malzemenin alınması için tartı kabının durulanması için kullanılabilir.
- Çalkalayarak ve sırayla yükleyin ve çözündürün: Askorbik Asit, Sitrik Asit monohidrat ve Sodyum Sitrat dihidrat çözeltiye eklenir. Enjeksiyon için su, tüm malzemenin alınması için tartı teknelerinin durulanması için kullanılabilir. Partiyi nihai hacme getirmek için Enjeksiyon Suyu ekleyin (çözeltinin yoğunluğu 25 °C'de 1.058 g/ml'dir). Çözeltiyi en az 15 dakika boyunca karıştırın.
- 15
- 20 pH ölçümü için çözeltiden küçük bir (<5 ml) numune çıkarın. PH 5.0 ile 6.0 arasında olmalıdır. pH ayarlaması gerekmez. Astarik olarak yıkanmış ve bütünlüğü test edilmiş olan çözeltiyi sterilize edilmiş, paslanmaz çelik bir basınçlı kap veya eşdeğeri olarak kullanmanız gerekir. Gerekirse, bileşik parti doldurmadan önce kapalı, sterilize edilmiş, paslanmaz bir çelik basınçlı kap içinde
- 25
- 2 ila 8 °C'de 24 saate kadar saklanabilir. Parti, sterilitiyi sağlamak için bir kereden fazla filtrelenebilir.
- Aseptik olarak 5.3 ± 0.1 ml solüsyonu yıkanıp sterilize edilen 20 ml Tip 1 kristal cam şişelere doldurun. Aseptik olarak yıkanmış, silikonlanmış ve liyofilizasyon pozisyonunda şişelere sterilize edilmiş lyo şeklindeki kauçuğu yerleştirin.
- 30

Liyofilize etmek için, liyofilizatör raflarını 4 ± 2 °C'ye önceden soğutun. Aseptik olarak doldurulmuş şişelerin tepsilerini liyofilizatör raflarına yükleyin. Tüm tepsiler yüklendikten sonra, rafları 1 saatte -40 °C'ye soğutun ve devam etmeden önce ürünü en az 4 saat -35 °C'de veya altında tutun. Kondenseri soğutmaya
5 başlayın. Kondenser sıcaklığı -45 °C veya altında olduğunda, hazneyi tahliye etmeye başlayın. 50-70 mm Hg vakum basıncına ulaşıldığında, raf sıcaklığını 0.5 saat boyunca -20 °C'ye ısıtın. Raf sıcaklığını -20 °C'de 36 saat boyunca yaklaşık 150 mm Hg basınçta (100 ila 200 mm Hg basınç) tutun. Ürün sıcaklığı, devam etmeden önce en az 6 saat boyunca -20 °C'de veya üzerinde kalmalıdır. Rafı 1 saat
10 içinde 25 °C'ye ısıtın ve basıncı yaklaşık 50 mm Hg basınca düşürün. Raf sıcaklığını 25 °C'de 14 saat boyunca yaklaşık 50 mm Hg basınçta tutun. Steril filtrelenmiş azot ile hazneyi yaklaşık 950 mm Hg'ye kadar havalandırın. Liyofilizatörün içindeki şişeleri durdurun. Şişeleri liyofilizörden çıkarın ve şişeleri 20 mm alüminyumla kapatın. Şişeler, inceleme tamamlanıncaya kadar 2 °C ila 8
15 °C arasında saklanmalıdır.

Ürün, beyaz, kirli beyaz bir küspedir. Şişeler incelemenden sonra 2 °C ila 8 °C arasında saklanmalıdır. Etiketleme ve inceleme amacıyla, şişeler 6 saate kadar 19 °C-25 °C'ye maruz bırakılabilir.

20

p53 (rAD/p53), SYN3'ün liyofilize edilmiş formülasyonları ile birleştirildiğinde 37 °C'de en az 2 saat ve 25 °C'de 24 saat stabil kalır. p53, SYN3'ün sulu çözelti formülasyonları ile birleştirildiğinde 37 °C'de en az 4 saat ve 25 °C'de 24 saat stabil kalır.

25

ÖRNEK 18

Bu örnek, SYN3'ün sentezini göstermektedir.

30

Bölüm 1: Bileşik III'ün Sentezi

SYN3 için sentetik şema, US Patent No 6,392,069'den uyarlanan Şekil 2'de gösterilmiştir. Laktobiyonik asit (II)'nin laktonu, bir g (2.8 mmol) laktobiyonik asit (I) in 50 ml metanol içerisinde çözündürülmesi, döner bir buharlaştırıcı üzerinde kuruyana kadar buharlaştırılması ve bu prosesin altı kez tekrarlanmasıyla sentezlendi. Bileşik III'ü elde etmek için, ortaya çıkan rezidü (II) 50 °C'ye ısıtılarak 50 ml izopropanol içinde çözülmüştür. Bu çözeltiye, 1.2 ml (8.4 mmol) N-3-aminopropil) -1,2-propandiamen ilave edildi. Sıcaklık 100 °C'ye yükseltildi ve çözelti üç saat karıştırıldı. Çözücü döner buharlaştırma yoluyla çıkarılmış ve ortaya çıkan rezidü, reaksiyona girmemiş fazla N- (3-aminopropil)-1,3-propandiameni çıkarmak için birkaç kez kloroform ile yıkanmıştır. Kalan rezidü (III), aşağıdaki Bölüm 3'teki gibi kullanılmıştır.

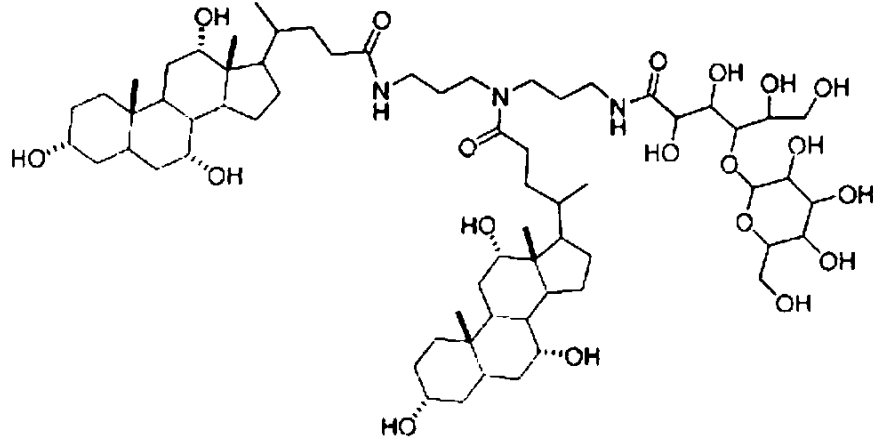
Bölüm 2: Bileşik IV'ün Sentezi

Bileşik IV, 2.28 g kolik asit (5.6 mmol) N, N-dimetilformamid içerisinde 60 °C'ye ısıtılarak eritilerek sentezlendi. Trietilamin (0.78 ml (5.6 mmol)) eklendi ve çözelti bir buz banyosunda soğutuldu. İzobütil kloroformat (0.73 ml (5.6 mmol)) daha sonra ilave edildi ve karıştırma sırasında on dakika boyunca beyaz bir çökelti oluştu.

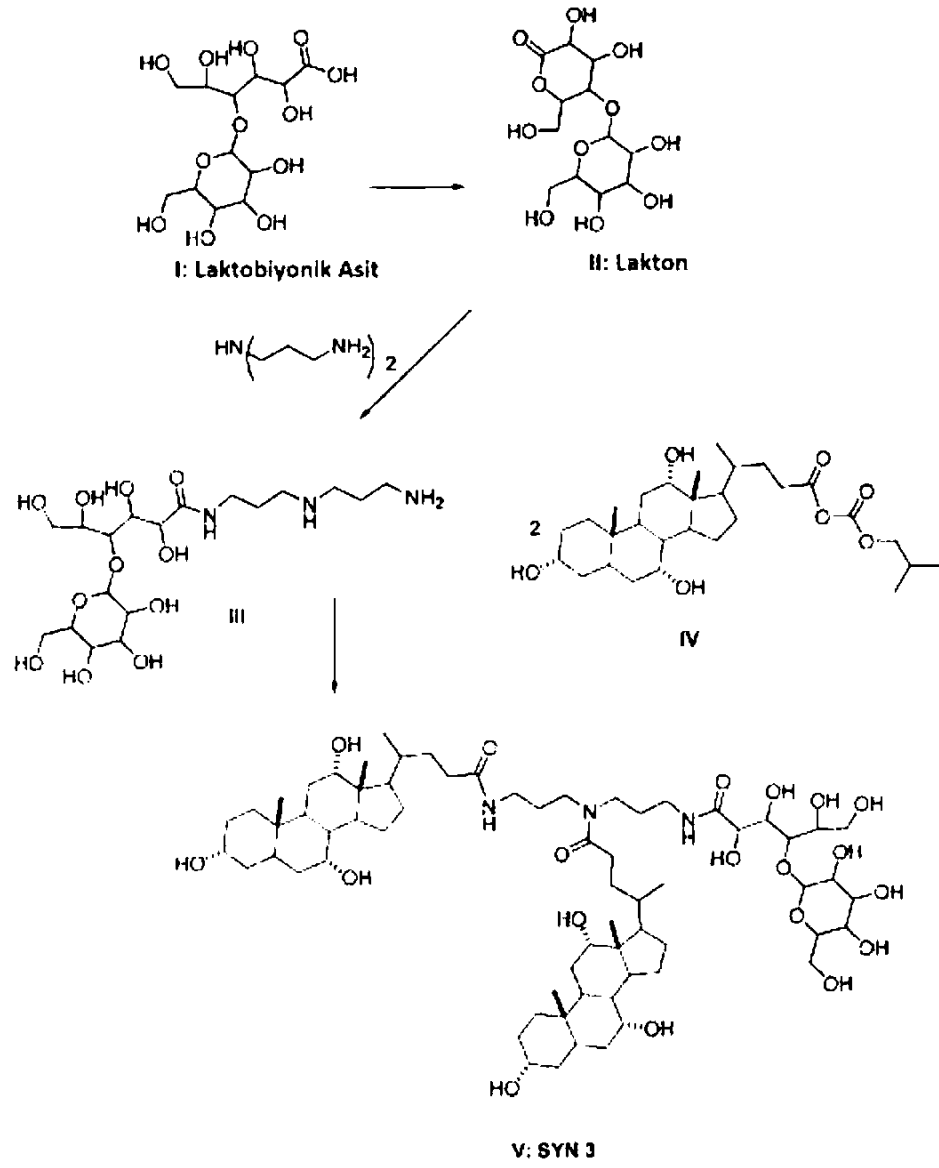
Bölüm 3: SYN3'ün Sentezi (Bileşik V)

Bileşik III, N, N-dimetilformamid içerisinde çözündürüldü, bir buz banyosunda soğutuldu ve karıştırıldı. Bileşik IV'ün sentezinden kaynaklanan süspansiyon Bileşik III içeren çözeltiye süzüldü. Oluşan çözelti oda sıcaklığında 6 saat karıştırıldı. Çözücü yüksek vakumlu döner buharlaştırma kullanılarak uzaklaştırıldı ve rezidü, 100 ml kloroform/metanol (50/50) içinde çözüldü. Bu çözeltinin yirmi beş ml'si, elüsyon çözücüsü olarak kloroform/metanol (60/40) kullanılarak silika jel flaş kromatografisiyle saflaştırıldı. Kolondan elite edilen fraksiyonların analizi, kloroform/metanol/su/konsantre amonyum hidroksitten

- (100/80/10/5) oluşan bir mobil faz kullanılarak silika jel ince tabaka kromatografisi ile gerçekleştirildi. Bileşikler, etanolik sülfürik asit ile püskürtmeden sonra kömürleşerek görselleştirildi. Ürünü içeren fraksiyonlar birleştirildi ve elüsyon çözücüsü olarak flaş kromatografi ve
- 5 kloroform/metanol/su/konsantre amonyum hidroksit (100/80/10/5) kullanılarak tekrar elde edildi. Ürünü içeren fraksiyonlar birleştirildi ve beyaz bir toz halinde buharlaştırıldı (300 mg Bileşik V). Ürünün ¹H-NMR ve MALDI kütle spektrometrik analizi gösterilen yapı ile tutarlıydı.
- 10 Yukarıda tarif edilen buluşun özel uygulamaları, açıklayıcı olarak kabul edilir ve kısıtlayıcı değildir. Mevcut buluşun kapsamı, yukarıdaki açıklamada yer alan Örneklerle sınırlı olmak yerine, ekteki istemlerde belirtildiği gibidir.



ŞEKİL 1



ŞEKİL 2