

ÖZET

İLAÇ KOMBİNASYONLARININ SALIMI

Hücrelerin öldürülmesinde aktiviteye, genellikle sinerjistik
5 sahip tamamlayıcı, iki farklı farmasötik aktif maddeye sahip
olan bir polimer matrisin mikro küreciklerini içeren bir
bileşimdir. Bileşimler, tümörlerin tedavisi için özel
kullanıma sahiptir. Yararlı kombinasyonlar rapamisin ile
doksorubisin, ibuprofen ile irinotekan, doksorubisin ile
10 ibuprofen ve doksorubisin ile irinotekandır. Polimer matrisi
tercihen çapraz bağlı bir polivinil alkoldür. İlaçlar aynı
mikro küreye dahil edilebilir veya her biri ayrı bir
farmasötik ajan ile mikro kürecikler birlikte
karıştırılabilir. Mikroküreler tercihen tümörlerin kemo-
15 embolizasyonunda kullanılır.

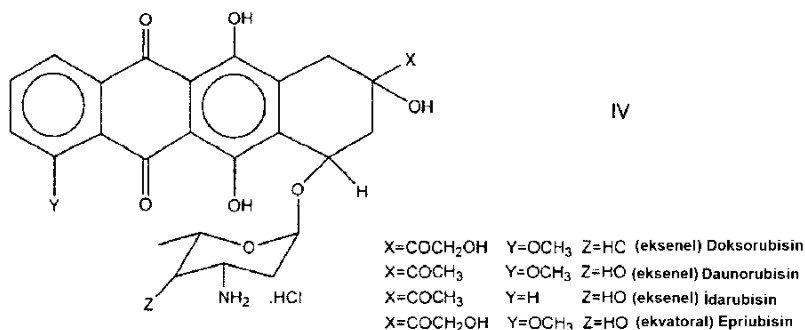
İSTEMLER

1. Her biri bir polimer matrisine sahip olan ve birlikte matrisle birleştirilen bir mikrokürecik popülasyonu, bir birinci ve ikinci farmasötik olarak aktif bileşik içeren bir bileşim olup, özelliği polimerin anyonik olarak yüklü suda çözünebilen suda şişebilen bir polimer olmasıdır, Burada birinci aktif, katyonik olarak yüklüdür ve ikinci aktif, elektrostatik olarak nötraldir ve Burada aktiflerden biri, sitotoksik bir bileşiktir ve diğer aktif, tümör tedavisinde sitotoksik bileşiğe tamamlayıcı olan aktiviteye sahiptir.

- 2.İstem 1'e göre bileşim olup özelliği, birinci katyonik olarak yüklü bileşiğin sitotoksik bir bileşik olmasıdır.

3. İstem 1'e göre bileşik olup özelliği, ikinci aktif maddenin oda sıcaklığında 10 g/l'den daha az derecede suda çözünebilir özellikte olmasıdır.

- 4.Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşim olup özeliği, sitotoksik maddenin genel formül IV'e ait bir amin grubuna sahip bir mitoksantron veya antrasiklin bileşiği olmasıdır:



5. İstem 4'e göre bileşim olup özelliği, antrasiklinin doksorubisin olmasıdır.

6.Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşim olup özelliği, katyonik aktif maddenin genel formül I'e ait bir bileşik olmasıdır

5

burada R^1 isteğe bağlı olarak bir hidroksil, amin, alkoksi, halojen, asil ve asiloksi gruplarıyla değiştirilen H, halojen, hidroksil ve düşük (C_{1-6})alkilden seçilmektedir;

A $C(O)O$ veya CH_2 'dir; ve

R NR^2R^3 'dür; burada R^2 ve R^3 aynı veya farklıdır ve her biri bir hidrojen atomu, değiştirilmiş veya değiştirilmemiş C_{1-4} alkil grubu veya değiştirilmiş veya değiştirilmemiş karbosiklik veya heterosiklik grubu temsil etmektedir veya R^2 ve R^3 bağlı oldukları nitrojen atomuyla birlikte $-O-$, $-S-$ veya $>NR^4$ ile kesilen isteğe bağlı olarak değiştirilmiş bir heterosiklik halkası oluşturmaktadır; burada R^4 bir hidrojen atomu, değiştirilmiş veya değiştirilmemiş C_{1-4} alkil grubu veya değiştirilmiş veya değiştirilmemiş fenil grubudur;

ve burada $-A-R$ gruplaması kamptotesin bileşiğinin A halkasında 9, 10 veya 11 pozisyonlarının herhangi birine yerleştirilen bir karbon atomuna bağlanmaktadır ve R^1 tuzları dahil olmak üzere A veya B halkasında değiştirilmektedir.

25

7.İstem 6'ya göre bileşim olup özelliği, katyonik aktif maddenin irinotekan olmasıdır.

8.İstem 3'e göre bileşik olup özelliği, düşük suda çözünürlüklü bileşiğin rapamisin veya bir rapamisin

30

benzeri, tercihen rapamisin olmasıdır.

- 5 9. Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşim olup özelliği, bu veya her polimerin biyolojik olarak çözünmeyen polimer olmasıdır.
- 10 10. Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşim olup özelliği, bu veya her polimerin 37°C'de şişirildiğinde %40-99 aralığında, tercihen %75-95 aralığında olacak şekilde dengeli su içeriğinde suda şişebilmesidir.
- 15 11. Önceki istemlerden herhangi birine göre bileşim olup özelliği, bu veya her polimerin tamamen sentetik olmasıdır.
- 20 12. İstem 11'e göre bileşim olup özelliği, bu veya her polimerin çapraz bağlanmış polivinil alkol olmasıdır.
- 25 13. İstem 12'ye göre bileşim olup özelliği, polimer matrisinin etilenik grupların radikal polimerizasyonu ile molekül başına birden fazla etilenik olarak doymamış asılı gruba sahip bir polivinil alkol makromerinden oluşturulmasıdır.
- 30 14. İstem 13'e göre bileşim olup özelliği, makromerin isteğe bağlı olarak anyonik monomer içeren iyonik olmayan ve/veya iyonik monomer içeren etilenik olarak doymamış monomerlerle birlikte polimerleştirilmesidir.
15. İstem 14'e göre bileşim olup özelliği, etilenik olarak doymamış monomerlerin genel formül III'e sahip iyonik monomeri içermesidir

Y¹BQ¹ III

burada Y¹ aşağıdakilerden seçilmektedir

5

$\text{CH}_2=\text{C}(\text{R}^{10})-\text{CH}_2-\text{O}-$, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R}^{10})-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R}^{10})\text{OC}(\text{O})-$,
 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R}^{10})-\text{O}-$, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R}^{10})\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{11})$, $\text{R}^{12}\text{OCCCR}^{10}=\text{CR}^{10}\text{C}(\text{O})-$
 $\text{O}-$, $\text{R}^{10}\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{R}^{10}\text{CH}=\text{C}(\text{COOR}^{12})\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$,



burada:

10

R¹⁰ hidrojen veya bir C₁-C₄ alkil grubudur;

R¹¹ hidrojen veya bir C₁-C₄ alkil grubudur;

R¹² hidrojen veya bir C₁₋₄ alkil grubu veya BQ¹'dir; burada B ve Q¹ aşağıda tanımlandığı gibidir:

15

A¹ -O- veya -NR¹¹-'dir;

K¹ bir $-(\text{CH}_2)_r\text{OC}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{OC}(\text{O})\text{O}-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{NR}^{13}-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{13}-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}-$

20

(burada R¹³ grupları aynı veya farklıdır), $-(\text{CH}_2)_r\text{O}-$, $-(\text{CH}_2)_r\text{SO}_3-$ grubudur veya isteğe bağlı olarak B ile birlikte; değer bağı ve r 1 ila 12 arasındadır ve R¹³ hidrojen veya bir C₁-C₄ alkil grubudur;

25

B Q¹ veya Y¹ B değer bağına bağlı bir uç karbon atomu içeriyorsa, isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla florin atomu ve perflorinatlı zincirler içeren düz veya branşlı bir alkanedil, oksaalkilen, alkanediloksaalkandeil veya alkandiiloligo(oksaalkandiil) zinciridir; ve Q¹ anyonik bir gruptur.

16. İstem 15'e göre bileşim olup özelliği, Q¹'in anyonik bir grup, tercihen bir karboksilat, karbonat, sülfonat, sülfat, nitrat, fosfonat veya fosfat grubu olmasıdır.

5 17. Aşağıdaki adımları içeren iki aktif maddenin birlikte mikroküreciklere yüklenmesiyle ilgili yöntem:

10 esasen kuru formda suda çözünmeyen suda şişebilen anyonik olarak yüklü çapraz bağlanmış bir polimer matrisi içeren mikroküreciklerin bir birinci organik çözücü içerisinde oda sıcaklığında 10 g/l'den daha az suda çözünme özelliğine sahip bir ilaç solüsyonuyla temas ettirilmesi; böylelikle çözücü içerisindeki ilaç solüsyonu mikroküreciklere emdirilmiş hale gelmektedir;

15 mikroküreciklere emdirilmeyen ilaç solüsyonunun ayrılması;

emdirilen mikroküreciklerin sulu sıvıyla temas ettirilmesi; böylelikle ilaç mikroküreciklerin çekirdeğine çökeltelebilmektedir;

20 çökeltilen ilacı içeren mikroküreciklerin iyon değişimi yüklemesini sağlamak için polimerin yüküne karşıt yüke sahip sulu iyonik bir ilaç solüsyonuyla temas ettirilmesi; ve çift yüklü mikroküreciklerin iyileştirilmesi; burada ilaçlar istemler 1 ila 10'dan herhangi birindeki gibi seçilmektedir.

25

18. Aşağıdaki adımları içeren iki farmasötik aktif maddenin birlikte bir ilaç salım matrisine yüklenmesiyle ilgili yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları içermesidir:

30

polimer artı suya dayanarak %40-99 ağırlık aralığında dengeli su içeriğinde oda sıcaklığında şişebilen suda çözünmeyen suda şişebilen iyonik olarak yüklü bir polimer içeren ilaç salım matrisi polimeri şişirebilen organik

35

bir çözücüde oda sıcaklığında 10 g/l'den daha az suda çözünürlüğe sahip bir ilaç solüsyonuyla temas ettirilmektedir; böylelikle solüsyon matrise emdirilmiş hale gelmektedir;

5 polimer matrisine emdirilmeyen herhangi bir ilaç solüsyonu ayrılmaktadır;

emdirilen matris suyla temas ettirilmektedir, böylelikle ilaç matriste çökeltilebilmektedir;

10 düşük suda çözünürlüğe sahip çökeltilen ilacı içeren matris iyonik olarak yüklü ilaca ait sulu solüsyonla temas ettirilmektedir, böylelikle matris şişmektedir ve polimerle birleştirilen karışık iyonlarla iyon değişimi yer almaktadır ve yüklenen ilaç polimer matrisine elektrostatik olarak bağlanmaktadır.

15

19. İstem 17 veya 18'e göre yöntem olup özelliği, 10 g/l'den daha az suda çözünürlüğe sahip aktif maddenin rapamisin veya benzeri olmasıdır.

20

20. İstem 18'e göre yöntem olup özelliği, iyonik olarak yüklü aktif maddenin bir amin grubuna, tercihen doksorubine sahip bir mitoksantron veya antrasiklin bileşiği olmasıdır.

25

21. İstemler 1 ila 16'dan herhangi birine göre bileşim olup özelliği, birinci ve ikinci aktif maddenin her biri hedef tümöre salınacak şekilde tümör dolayısıyla sıkıntı çeken bir hayvana uygulanarak katı tümörün tedavisinde kullanılmasıdır.

30

22. İstem 21'e göre olan yöntemde kullanmak üzere bileşim olup özelliği, tümör içi enjeksiyon veya ameliyatla tümör çıkarıldıktan sonra veya matrisin mikrokürecikler formunda olduğu yerde, tümörü besleyen kan damarının

embolizasyonu için 37°C'de damıtılmış suda şiştiğinde 100-1500 um çapa sahip bir reseksiyon sınırında enjeksiyon için olmasıdır.

- 5 23. İstem 22'ye göre olan yöntemde kullanmak üzere bileşim olup özelliği, tümörün hepatik tümör olmasıdır.

TARİFNAME

İLAÇ KOMBİNASYONLARININ SALIMI

5 Mevcut buluş genellikle bir polimer matrisinden ve en az iki ilaçtan oluşan mikroküreler olan ilaç salım maddeleriyle ilgilidir; ilaçlar polimer matristen salınabilmektedir. İlaçlar kanserin ve özellikle katı tümörlerin tedavisi içindir.

10

Birleşik tedavi kanser tedavisiyle çoğu başarı hikayesine temel olmaktadır; bir bileşen kombinasyonunun uygun farmakolojik etkileşime sahip olduğunda (aynı hedef, ancak farklı büyük organ toksiklikleri) bu anlaşılabilir. 15

Çoklu ilaçlar içeren birleşik tedavi tümör tedavisinde klinik olarak yaygın bir prosedürdür. Yumurtalık, prostat veya rahim kanseri için en yaygın terapötik rejimler iki tümör önleyici ilaç kombinasyonuna dayandırılmaktadır. Bu tip tedavi tümörisidal etkinliğin arttırılması ve yüksek dozdaki tek bir 20

ilacın neden olduğu yan etkilerin azaltılması avantajını önerebilmektedir. İrinotekan ileri kalın bağırsak kanserine sahip hastaların tedavisi için 5-FU ile birlikte belirtilmektedir ve sırasıyla meme kanseri (Becerra 2004, Onkoloji, 18, 46-48), yumurtalık kanseri (Nishino et al, 2005, 25 Gynecol Oncol, 97, 893-897) veya mide kanseri (Baek et al. 2006, Br J Cancer, 25, 312-320) epirubisin, mitomisin veya kapesitabin gibi diğer maddelerle birlikte başarıyla kullanılmaktadır.

30 Bazı kanser tedavilerinin başarısı için daha yeni bir altyapı mekanik bir temel içermektedir; bu temel altında bir ilaç kombinasyonu dirence üstün gelmek için farklı moleküler hedefleri etkilemek için kullanılmaktadır. Birleşik tedavideki başlıca ilerlemelerle ilgili bir engel bununla birlikte kritik 35 sinyalizasyon yollarının kesişmesi hakkındaki anlayış

eksikliğidir. Sinergi paralel yollarla aynı olan ilaç etkisi sayesinde indüklenebilmektedir. İlaç kombinasyonu sayısı sınırsız olduğu için, çoğu ümit verici kombinasyonun belirlenmesiyle ve değerlendirmelerinin öncelikli hale getirilmesiyle ilgili strateji çok önemlidir.

Matematiksel modelleme ve bilgisayar simülasyonları kemoterapötik kombinasyonların klinik olarak nasıl kullanılabildiğini daha iyi anlama çabasında farklı ilaç kombinasyonlarının beklenmedik etkisini hesaplamak amacıyla kullanılmaktadır. Canlı organizmada uygun sinerjistik ilaç kombinasyonları artan etkinlik, düşürülen doz, azaltılan toksiklik ve en aza indirilmiş direnç gelişimiyle sonuçlanabilmektedir. Medyan Etki Denklemi (Chou J.Biol.Chem. 1977, 252(18), 6438-6442) ve Kombinasyon İndeks Denklemi (Chou-Talalay T.I.P.S. Nov. 1983 450-454), içerisinde oluşan izobologram eğrilerinin farklı ilaç kombinasyonlarının neden olduğu ek, sinerjistik veya antagonistik etkileşimleri temsil ettiği bu türdeki iki işlemdir. Yüzey tepki modelleriyle ilgili uygulamalar ve arkasındaki konsept üç boyutlu tepki yüzeyi olarak görülebilen iki aktif maddenin birleşik etkisini kapsamaktadır. Birleşme hareketini değerlendirilmesiyle ilgili bu modellerin en kapsamlı modeller olmasına karşın, bunlar ayrıca oldukça karmaşıktır ve yaratılması zordur. Aslında deneysel sinerji ile altta yatan biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik mekanizmalar arasındaki doğru bağlantının keşfedilmesi oldukça zor olmaktadır.

Dijital görüntü mikroskopi bazlı sitotoksisite deneyi (DIMSCAN) olarak adlandırılan floresan bazlı yüksek çıktılı sistem sitostatik veya sitotoksik ilaç kombinasyonlarının laboratuvar ortamında test edilmesi amacıyla bulunmaktadır. Bu tip bir test için beş prensip bulunmaktadır: (a) deney sistemi ideal olarak 3-4 log hücre ölümü olarak geniş dinamik bir aralığa sahip olmalıdır; (b) hücre çizgisi paneli ilaca

dirençli çizgiler dahil olmak üzere çoklu hücre çizgilerini kullanmalıdır; (c) temel direnç mekanizmaları tanımlanmalıdır ve hücre çizgisi panelini yapılandırmak için kullanılmalıdır; (d) ilaca maruz kalma durumu klinik olarak ulaşılabilir seviyelerde ve programda olmalıdır; ve (e) hipoksi ilaç hareketini kışkırttığı için, hipoksik koşullar altında test edilmesi gereklidir. Değerlendirme için ilaç kombinasyonlarının seçilmesiyle ilgili en iyi yaklaşım moleküler hedeflere dayanan yaklaşımdır; çalışmaların öncelikle laboratuvar ortamında gerçekleştirilmesi ve daha sonra ilaç kombinasyonunun klinik olarak test edilmesinden önce canlı organizma modelleriyle onaylanması gerekmektedir. İlaç antagonizmi ayrıca çoğunlukla ilaç kombinasyonlarını hariç tutmak için kullanılmaktadır.

Yeni sinyal transdüksiyon modülatörleri ile yapılandırılan sitotoksik maddeler, hücre döngü inhibitörleri ve ayrıştırma indükleyicileri arasında sinerjistik etkileşimler olduğu bilinmektedir. Birinci tipteki ilaç kombinasyonunun laboratuvar ortamında makul potansiyel artışı üretmek üzere toksik yoğunluklarda sitotoksik madde içermesine karşın, ikinci ve üçüncü tipler bireysel olarak verildiğinde toksik olmayan (etkisiz) her iki maddenin oluşturduğu konsantrelerde yüksek derecede sinerji indüklemektedir. Hücre çevrim inhibitörleri veya bu maddeler ile ayrıştırma indükleyicileri arasındaki ilaç kombinasyonlarının ayrıca laboratuvar ortamında belirgin sinerjistik aktivite ürettiği gösterilmektedir. Hücre ölümünün sinerjistik etkileşimleriyle bağlantılı sinyal transdüksiyon modülatör kombinasyonlarının sayısı sanal olarak sınırsızdır. Bu kombinasyonların terapötik olarak geleneksel sitotoksik maddelerden veya geleneksel ile yeni maddeler arasındaki kombinasyonlardan üstün olup olmadığı ve bunların kombinasyon kemoterapisi için yeni bir paradigmayı temsil edip etmediği belirlenmiş şekilde kalmaktadır.

Kanada'daki Celator Technologies, Inc. kliniğe etkin ilaç kombinasyonlarının getirilmesiyle ilgili ticari çözümler bildirmektedir. Celator, damar yoluyla enjeksiyonu takiben tümörleri hedefleyecek şekilde tasarlanan lipozom bazlı salım aracındaki (CombiPlex) bu sinerjistik oranları sabitleme amacıyla ilaç kombinasyonlarının sinerjistik olarak tümör hücrelerini öldürmek üzere hareket ettiği kritik tanımlama oranları üzerinde çalışmaktadır. Burada laboratuvar ortamındaki sinerjistik aktivite spesifik ilaç oranlarına bağlıyken, canlı organizmadaki aktivite bu sinerjistik oranların korunmasına bağlıdır. İlaçlar birlikte lipozomlarla birleştirilmektedir. Sistemleri WO 2003028696, WO 2004087115, , WO 2004087105, WO 2004093795, WO 2006055903 ve P.G. Tardi et al (2007) Biochim. Biophys. Acta 1768, 678-587 gibi patent ilanlarında açıklanmaktadır.

Mikroküreler ilaç kombinasyonlarının salımı için özellikle çok yönlü bir platform önermektedir. Sharma ve arkadaşları tüberkülozu tedavi etmek üzere ilaç kombinasyonlarının inhalasyonu için mikroküreleri incelemektedir (R. Sharma et al, 2001, Pharm Research, 18, 1405-1410). Tüberkülozun (TB) ilaç tedavisi çoklu ilaca direncin engellenmesinin ve/veya bununla mücadele edilmesinin yanı sıra iyileştirme için çoklu ilaçların uzun süreli oral uygulamasını gerektirmektedir. Uzatılmış oral anti-TB ilaçlarından oluşan antitüberküler ilaçların kalıcı yüksek kan seviyeleri makrofajlarda (Mφ) bulunan gerekli veya yeterli olmayabilmektedir. Birinci çizgideki anti-TB ilaçları, izoniazid (H) ve rifamfisinden (R) ikisini içeren solunabilen biyolojik olarak ayrışabilen mikro parçacıklar hazırlanmaktadır ve (i) fare Mφ kaynaklı fagositoz, (ii) sıçanlarda kuru toz inhalasyonu olarak uygulama ve (iii) sıçanlara uygulandığında yüksek ilaç dozlarıyla alveolar Mφ'nin hedeflenmesi açısından test edilmektedir. Sonuçlar çoklu ilaçlarla bu tür mikrokürelerin

doz ve doz-frekans azalması, toksisite azalması ve Mp-kalıcı sürekli mikrobakterilerin hedeflenmesi konusunda söz verdiğini göstermektedir.

- 5 Başka bir çalışmada (A. Gupte & K. Ciftci, 2004, Int. J. Pharm., 276(1-2): 93-106), kombinasyon (Paklitaksel + 5-FU mikroküreler) metastatik meme kanseri hücre çizgisine (MDA-MB 435 S) karşı tek bir ilaç kemoterapisiyle (Paklitaksel ve 5-FU mikroküreler) karşılaştırılmaktadır. Mikrokürelerin
- 10 fizyokimyasal özellikleri (başka bir deyişle enkapsülasyon etkinliği, parçacık boyut dağılımı, laboratuvar ortamında salım, termal özellikler) çalışılmaktadır. Sonuçlar, 5-florourasil (5-FU) veya 5-florourasil olmadan poli(laktikoglikolik asit) (PLGA) mikro parçacıkların içine koyulduğunda
- 15 Paklitaksel ile ilgili enkapsülasyon etkinliği yüksek (%90) olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte 5-FU'nun enkapsülasyon etkinliği düşüktür (%19) ve ilaç Paklitaksel ile kapsüllendiğinde %30'a arttırılmaktadır. Mikrokürelerin ortalama parçacık büyüklüğü 2.5 µm'dir ve küre şeklindedir. Hem
- 20 5-FU hem de Paklitakselin mikrokürelerden laboratuvar ortamında salımı öncelikle daha yavaş ve daha kontrollü salımla izlenecek şekilde nispeten hızlıdır. Paklitaksel mikrokürelerin sitotoksik aktivitesi t 5-FU + Paklitaksel veya tek başına 5-FU içeren mikroküreler nispeten hızlıdır.
- 25 Sonuçların tamamı, mikrokürelerde Paklitaksel veya 5-FU'nun birleştirilmesinin serbest ilaçlarla karşılaştırıldığında daha kontrollü bir şekilde sitotoksisiteyi arttırdığını ve ayrıca hücre döngüsünün farklı aşamalarında hareket eden ilaçlar birleştirildiğine dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir.

30

Diğerleri restenozu hedeflemek üzere mikrokürelerdeki ilaç kombinasyonlarını incelemektedir (Chandy et al, 2001, Development of Poly(Lactic Acid)/Chitosan Co-Matrix Microspheres: Controlled Release of Taxol-Heparin for

Preventing Restenosis, Drug delivery, 8, 77-86). Düz kas hücre çoğalması anjiyoplasti veya damar yaralanması sonrasında restenozun oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Uygun ilaçların tek başına ve kombinasyonlar halinde kontrollü salımı damar tıkanmaları, balon anjiyoplasti, tromboz kaynaklı restenoz ve kireçlenmenin tedavisiyle ilgili bir yaklaşımdır. Chady ve arkadaşları uzatılmış salımlı birleşik-matris formunu geliştirmek için heparin-kitosan kürelerin içerisine taksol yüklü polilaktik asidin kapsüllenmesi olasılığını göstermektedir. Bu birleşik-matris sisteminden taksol ve heparinle ilgili laboratuvar ortamında salım profili bir ultraviyole spektrofotometre kullanılarak 7.4 pH değerindeki fosfat tamponlu tuzlu suda izlenmektedir. Uzatılmış bir süre boyunca sabit yavaş salım profiliyle izlenen taksol/heparin salım miktarı öncelikle oldukça fazladır. Birleşik-matrinden taksol (%15.8) ve heparinin (%32.7) ilk patlayan salım polietilen glikol kaplamalarla değiştirilmektedir (sırasıyla 24 saat için %13.5 ve %25.4). Taramalı elektron mikroskopi çalışmalarından, bu ilaçların birleşik matrisin mikro gözenekleri sayesinde çözünme aracına yavaşça yayıldığı görülmektedir. Bununla birlikte, yüzey mikro gözenekleri sabit bir yavaş salım profili için polietilen glikol (PEG) kaplamalarla değiştirilmektedir. Bunlar, bu PEG-kaplı PLA/kitosan birleşik-matrisinin restenozu tedavi etmek için uzatılmış süreler için sinerjistik etkilere sahip ilaç kombinasyonlarını hedefleyebildiği sonucunu getirmektedir.

Bir ilaç kombinasyonu ile kaplanan kardiyovasküler stentler restenoz hızını azaltmak için açıklanmaktadır. Restenoz bir hiper proliferatif hastalıktır. Örneğin EP-A-551162 rapamisin ve mikofenolik asit, anti-proliferatif madde kombinasyonu açıklamaktadır; ancak stentin aktif maddelerle nasıl aşılandığıyla ilgili detayları vermemektedir. EP-A-0568130'da rapamisin ve heparin örneğin aşılanan bir stentten dağıtılarak düz kas hiperplaziyi engellemek için uygulanmaktadır. Aşılama

yöntemleriyle ilgili herhangi bir detay verilmemektedir.

- WO-A-2003022807 bir polimerle kaplı bir stentten bir rapamisin benzerinin uygulanmasını açıklamaktadır. İlaç polimer kaplı stentin bir ilaç solüsyonuna daldırılmasıyla ve kurutulmasıyla yüklenmektedir. Anti-miyotik gibi başka bir ilaca ek olarak, anti-proliferatif veya anti-inflamatuvar madde stentten uygulanabilmektedir. Polimerler diğer birçoğu arasında polivinil alkol, hiyaluronik asit ve fosforilkolin metakrilat kopolimerleri (MPC), iyonik olmayan komonomerler ve çapraz bağlanma monomerlerini içermektedir ve son belirtilen bu kopolimerler tek başına bir rapamisin benzeriyle laboratuvar testlerinde örneklenmektedir. WO 2004/022124'de rapamisin benzeri ve deksametazon birlikte bir stent üzerindeki iyonik olmayan komonomerle birlikte çapraz bağlanan bir MPC kopolimerine yüklenmektedir. Bu tarifnamelerde kullanılan polimer yaklaşık %50 oranında suda şişebilme özelliğine sahiptir.
- Lökovorin (LV) ile birlikte 5-florourasil (5-FU) günümüzde kolon kanserinde standart bir tedavidir. Lamprecht ve arkadaşları (Eur J Pharm ve Biopharm, 2005, 59, 367-371) eş zamanlı olarak 5-Fu ve LV'yi hapseden bir yağ/yağ emülsiyonu haline getirme işlemiyle mikroküreler hazırlamak için ayrı olarak Eudragit P-4135F veya Eudragit RS100 kullanmaktadır. Taramalı elektron mikroskopisi yapısal analize izin vermektedir, işlem parametreleri analiz edilmektedir ve ilaç yükleme ve salım profilleri kaydedilmektedir. Parçacık boyutu 123 (RS100) ve 146 µm (P-4135F) arasında değişmektedir.
- Genellikle P-4135F (5-FU, %48.3±2.0; LV, %55.4±2.7) ile karşılaştırıldığında RS100 (5-FU, %60.3±9.7; LV, %81.4±8.6) ile daha yüksek enkapsülasyon oranları saptanmaktadır. Bu Eudragit polimerleri alkil metakrilat monomerleri içeren dörtlü amonyum grubuna sahip akrilik kopolimerleridir. Bunlar çapraz

bağlanmamaktadır. Mikro parçacıklar 8 saat içerisinde birleştirilen ilaç kombinasyonunu salan Eudragit RS100'den yapılmaktadır. P-4135F'nin pH değeri 7.4 iken 4 saat içerisinde %25'den daha düşük 6.8 pH değerinde istenmeyen 5-FU salımını koruduğu bulunmuştur, neredeyse ani bir salım (15 dakika içinde) gözlemlenmektedir. Salım 7.4 pH değerinde benzer olmasına rağmen, 6.8 pH değerinde LV yaklaşık olarak %60 oranında ayrı başlangıç ilacı ve 2 saat içerisinde tam bir salım sergilemektedir. SEM analizleri LV'nin ayrı patlama etkisini tahrik ederek LV kristallerinin parçacık yüzeyinde temel varlığını açığa çıkarmaktadır. Bu gözlemler hazırlama işlemi süresince P-4135F ile LV arasındaki ayrımı tahrik ederek P-4135F'nin yüksek lipofilitesiyle ilgili sonuçlandırılmaktadır.

15

Liu vd. (J.Pharm.Pharmacol., 55, 1063-1073, 2003) ve WO 9850018 tümör içi enjeksiyon için biyolojik olarak çözünebilir sülfopropil dekstran mikro kürelerinin kullanımını açıklamaktadır. Yöntemde doksorubisin içeren mikro küreler verapamil içeren mikro kürelerle birlikte uygulanmaktadır. Tek başına veya verapamil yüklü mikro kürelerle birlikte doksorubisin yüklü mikrokürelerin farelerde tümör içi enjeksiyonundan sonra, tümör çapı seri şekilde terapötik etkinin işareti olarak ölçülmektedir; buna karşın farelerin kilosu, görünüşü ve davranışı genel toksikliğin işareti olarak izlenmektedir. Doksorubisin yüklü mikro kürelerin tümör içi enjeksiyonu eşdeğer ilaç yoğunluklarının sistemik uygulamasından çok daha iyi tolere edilmektedir. Hiç işlem görmeyen veya boi mikroküreleri alan grupla karşılaştırıldığında tümör büyümesinde az miktarda gecikme (%34'e kadar) olmaktadır. Verapamil mikrokürelerinin doksorubisin mikrokürelerle birlikte enjeksiyonu toksiklikte az miktarda artış üretmektedir, ancak tümör büyümesinde herhangi bir gecikme olmamaktadır. Tümör içine uygulanan kanser önleyici maddelere ait kontrollü salımlı mikroküre

formülasyonları az sistemik toksiklikle tümöre yüksek ilaç dozları vermek için etkili bir yol olarak açıklanmaktadır. Kullanılan sülfo-propilatlanmış dekstran mikroküreler iyon-değişim aracı (Sephadex SP25) olarak sağlanmaktadır. Bunlar biyolojik olarak çözünebilmektedir. Bunlar yaklaşık olarak 12 oranındaki şişmiş konumdaki mikrokürelerin kuru konumdaki mikrokürelere yoğunluk oranını vermek için damıtılmış suda şişirilebilmektedir. Mikroküreler 7 pH değerinde yaklaşık 2.5 meq/gr iyon-değişim kapasitesine sahiptir.

10

Liu vd. ((2000) J. Pharm. Sci: 8-9(6) 807-817 ayrıca hidrofobik parçalarla veya katyonik polimerlerle sülfo-propilatlanmış mikrokürelerin yüzeylerinin değiştirilmesiyle ilgili yolları açıklamaktadır. Katyonik polimer modifikasyonu şişebilme hızını ve iyon-değişim kapasitesini azaltmaktadır. Hidrofobik grupların yüzey konjugasyonu suda şişme hızını etkilemektedir, ancak polimerle işlem gören mikrokürelerde daha hızlı oranda yüklenen dengeli verapamilde şişme hacmini azaltmamaktadır.

20

Doksorubisin ayrıştırıcı küreciklerin kemoembolizasyon yoluyla HCC tedavisinde etkili olduğu gösterilmektedir (Varela et al., 2007, J Hepatology, 46, 474-81). Kemoembolizasyon yoluyla doksorubisinin katı tümörlere verilmesini sağlayan mikroküreler WO 2004071495'de açıklanmaktadır. Mikroküreler suda şişebilen anyonik olarak yüklü çapraz bağlanmış polivinil alkol matrisi olarak oluşturulmaktadır ve 40-1500 µm aralığında suda şiştiğinde çapa sahiptir.

30

İbuprofen ayrıştırıcı kürecikler hayvan modellerinde embolizasyon sonrası anti-inflamatuvar etkileri göstermektedir (T Borovac et al, 2006, J Control Release, 115, 266-74). İbuprofen yüklenen uterin fibroidlerinin tedavisinde kullanmak üzere mikroküreler WO 2004073688'de açıklanmaktadır.

Geliştirilmiş yükleme yöntemleri WO 2007085615'de açıklanmaktadır.

İbuprofen enzimler siklooksigenaz I ve II'nin engellenmesiyle
5 harekete geçen steroidal olmayan anti-inflamatuvar bir ilaçtır
(NSAID). Birçok yazar kanser riskinin engellenmesi ve tedavisi
için NSAID'lerin kullanılması konusunu çalışmaktadır (Sawaoka
et al, J Clin Gastroenterol, 27, 47-52; Shen et al 1998,
Cancer Research, 58, 362-366). COX-2 seçici NSAID'ler ayrıca
10 kanser hücresi invazyonunda azalma ve karaciğer metastazında
(Yamauchi et al, 2003, Anticancer Res, 23, 245-249; Yao et al.
2004, Br J Cancer, 90, 712-719) ve azalan tümör büyüklüğü ve
artan hayatta kalma oranıyla sonuçlanan COX-2 inhibisyonunda
azalma sergilemektedir (Cui et al. 2005, Clin Cancer Res, 11,
15 8213-8221; Murata et al. 2005, Dig Dis Sci, 50, 70-75).
İbuprofen çeşitli tümörlerin önlenmesinde ve tedavisinde
incelenmektedir. WO 2006013376'de ayrışma hızı sergileyen
embolizasyon ve tümör oluşumu üzerinde etkili olma
beklentisine yol açan lokalizasyon için çeşitli COX
20 inhibitörleriyle yüklenen mikrokürelerin kullanılmasını
açıklamaktayız.

WO 2007090897'de oldukça düşük çözünürlüğe sahip olan ancak
organik bir çözücüde çözünebilen ilaçlarla mikroküreler gibi
25 suda şişebilen polimerlerin yüklenmesiyle ilgili yöntemleri
açıklamaktayız; burada ilacın çözücü bazlı solüsyonu esasen
kuru polimer matrisiyle temas ettirilmektedir, böylelikle
genellikle su olan bir çökeltici maddeyle temas ederek ilacın
polimer matrisinde çökeltilmesi işlemiyle izlenen, matrisin
30 ilaç solüsyonunda şişmesi durumu yer almaktadır. Yöntem
paklitaksel, deksametazon veya rapamisini yüklemek için
uygundur. Polimer matrisi genellikle sülfonat grupları gibi
asılı anyonik gruplara sahip çapraz bağlanmış polivinil alkol
bazlı bir malzemedir.

WO 2006027567'de 7 pH değerinde anyonik olarak yüklenen ve irinotekan gibi katyonik olarak yüklü kamfotesin bileşiği olan salınabilir formdaki polimerle elektrostatik olarak birleştirilen suda şişebilen bir polimer içeren katı tümörlerin kemoembolizasyonu için mikroküreleri açıklamaktayız. Kalın bağırsak kanserinden karaciğer metastazının tedavisi için bu kürecikleri kullanan kemoembolizasyonun tümör yoğunluğunda azalmaya yol açtığını göstermekteyiz.

10

WO 2004/071495'de suda çözünmeyen, suda şişebilen sentetik anyonik polimer parçacıklarını içeren ve buraya bir antrasiklinle emilen katı tümörlerin kemoemboterapisi için bir bileşimi açıklamaktayız. Tercihen polimer poli (vinil alkol) bazlı bir polimerdir ve ilaç doksorubisindir.

15

Mevcut buluşun birinci açısına göre, ilk katyonik yüklü aktif madde sitotoksik bileşik olabilmektedir. Alternatif olarak ikinci aktif madde sitotoksik bileşik olabilmektedir, buna karşın ilk katyonik aktif madde tümör tedavisinde sitotoksik bileşiği tamamlayan aktiviteye sahiptir. İyonik yüklü aktif maddeler nispeten yüksek seviyede, örneğin en az 50 gr/l, tercihen en az 100 gr/l seviyesinde suda çözünme eğilimine sahiptir. Elektrostatik açıdan nötr olan ikinci aktif madde örneğin oda sıcaklığında 10 gr/l'den daha az ölçüde suda düşük çözünürlüğe sahip olacak şekilde suda daha az çözünebilmektedir. Katyonik ve iyonik olmayan ilaçlara ait bir kombinasyon için, her aktif maddenin yükleme ve salım hızıyla diğerinininki arasında karşılıklı etkileşim bulunmadığını veya çok az bulunduğunu saptamaktayız. Bu sonuç şaşırtıcıdır ve etkinlik açısından en uygun hale getirilen uygun bileşim dozlarının ve oranlarının hzır biçimde belirlenmesini sağlamaktadır. Bileşim doz belirsizliğine neden olan ayrışma problemlerinde kaçınan tek tipte parçacıkları içerecektir.

35

İkinci aktif madde tümör tedavisinde sitotoksik bileşiği tamamlayan bir aktiviteye sahiptir. Bileşiğin kendisi tümörlerin tedavisinde etkili olabilmektedir, örneğin lokal veya sistemik olarak verildiğinde tümörün büyümesini
5 önleyebilmektedir veya tümörün boyutunu azaltabilmektedir. Aktif madde alternatif olarak birinci aktif maddeyle tümörü aktiviteye karşı duyarlı hale getiren bir bileşik olabilmektedir. Genelde bileşik kombinasyonu 0.90'dan daha az, daha tercihen 0.5'den daha az, örneğin 0.3'den daha az, hatta
10 0.1 kadar az veya daha az Chou-Talalay indeksine (1983, adı geçen kitapta) dayanan bir kombinasyon indeksine sahip olan kombinasyon olarak tanımlanabilmektedir.

Kombinasyon indeksiyle ilgili değerler uygun şekilde yazılım
15 paketi Calculusyn (Biosoft) kullanılarak belirlenmektedir, bu Chou ile türetilen doz etki bağıntıları için genel denklemi kullanan bir doz etkisi analiz programıdır:

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m \quad \text{Denklem 1}$$

20

burada D: ilaç dozu

D_m : etkiyi belirten medyan-etki dozu. Bu medyan-etki grafiğinin x-kesme noktasından belirlenmektedir.

f_a : dozdan etkilenen fraksiyon

25 f_u : etkilenmeyen fraksiyon, $f_u=1-f_a$

m : doz etki eğrisinin sigmoiditini (şeklini) belirleyen bir örnek. Bu medyan etki grafiğinin eğrisiyle belirlenmektedir.

Medyan-etki denklemiyle ilgili alternatif formlar şunlardır:

30

$$f_a = 1/[1 + (D_m/D)^m] \quad \text{Denklem 2}$$

$$D = D_m[f_a/(1-f_a)]^{1/m} \quad \text{Denklem 3}$$

Denklem 2'den D_m ve m biliniyorsa, etki (f_a) herhangi bir dozla

(D) belirlenebilmektedir.

Denklem 3'den D_m ve m biliniyorsa, doz (D) veya (D_x) herhangi bir etki (f_a) için belirlenebilmektedir. Buna bağlı olarak, sırasıyla etkiyi ve şekli temsil eden D_m ve m parametreleri tam doz-etki eğrisini belirlemektedir.

Medyan-etki grafiği 1976'da Chou tarafından sunulan bir $x = \log (D)$ vs $y = \log (f_a/f_u)$ grafiğidir (J. Chou Th.Biol. 59, 253-276). Bu Chou'nun medyan etki denklemine [Denk.1] logaritmik formuna dayandırılmaktadır:

$$\log (f_a/f_u) = m \log (D) - m \log (D_m) \quad \text{Denklem 4}$$

Denklem 4 düz bir çizgi formuna sahiptir, $y = mx + b$.

Buna bağlı olarak, eğri m değerini vermektedir ve x -kesme noktası $\log (D_m)$ değerini vermektedir ve dolayısıyla D_m değerini vermektedir. D_m ayrıca $D_m = 10^{-(y\text{-kesme noktası})/m}$ ile belirlenebilmektedir. $f_a/f_u = f_a/(1-f_a) = (f_u)^{-1} - 1 = [(f_a)^{-1} - 1]^{-1}$ dikkate alınmaktadır. Verilerin medyan-etki denklemine uymasının iyi tarafı medyan-etki grafiğindeki lineer korelasyon katsayısıyla (r) temsil edilmektedir. Genellikle enzimle veya reseptör sistemleriyle ilgili deneysel veriler $r > 0.96$ 'ya sahiptir, doku kültüründe $r > 0.90$ 'a sahiptir ve hayvan sistemlerinde $r > 0.85$ 'e sahiptir.

Kombinasyon indeksi (CI) denklemi enzim kinetik modellerinden türetilen Chou-Talalay'ın çoklu ilaç-etki denklemine dayandırılmaktadır. Denklem sadece sinerji veya karşıt etkinlikten çok ek etkiyi belirlemektedir. Bununla birlikte, sinerjiyi beklenen ek etkiden daha fazlası olarak ve karşıt etkinliği beklenen ek etkiden daha azı olarak tanımlamaktayız. Chou ve Talalay 1983'de (adı geçen kitapta) ek etki olarak CI

= 1'in gösterilmesini önermektedir; buna bağlı olarak iki ilacın çoklu ilaç etkisinden aşağıdakileri elde etmekteyiz:

5 Klasik: aynı veya benzer etki şekillerine sahip karşılıklı olarak özel ilaçlar için:

$$Cl = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 \quad \text{Denklem 5}$$

Koruyucu: tamamen bağımsız etki şekilleri için:

10

$$Cl = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1 (D)_2 / (D)_2 (D^*)_1 (D_x)_2$$

Denklem 6

Denklem 5 veya Denklem 6 ilaç 1 $(D)_1$ ve ilaç 2 $(D)_2$ (paylarda)
15 birlikte gerçek deneyde %x önlediğini belirtmektedir. Dolayısıyla deneysel olarak gözlemlenen %x önleme sayıya dayanmayabilmektedir, ancak en sıklıkla ondalık kesre sahiptir. Denklem 5 veya Denklem 6'daki $(D_x)_1$ ve $(D_x)_2$ (paydalarda) sırasıyla %x önleyecek şekilde tek başına ilaç 1
20 ve ilaç 2 dozlarıdır. D_x hali hazırda Denklem 3'den hesaplanabilmektedir.

Tek başına her ilacın bir doz-etki bağıntısına sahip olması gerektiği belirtilmeye değer bir konudur. Hem etki (D_m) hem de
25 şekil (m) parametreleri sinerji ve karşıt etkinliğin belirlenmesinde çok önemlidir. İki ilaçtan birinin kendisi hiç etkiye sahip değilse, sinerji/karşıt etkinlik belirlenememektedir. Bunun yerine, potansiyel (destekleme, arttırma) veya inhibisyon (baskılama) belirlenebilmektedir.

30

Kalkusin her ilaç için ve daha sonra her kombinasyon için doz-etki bağıntısı gerektirmektedir. Birleşik çalışmayla ilgili deneysel verilerin tercihen sabit bir oran kullanılarak toplanmasına rağmen, kombinasyon indeksleri yine de iki
35 bileşenin sabit olmayan oranlarından belirlenebilmektedir.

Kombinasyon indeksi herhangi bir laboratuvar ortamı veya canlı organizma test yöntemi için belirlenebilmektedir. Mevcut buluşta kombinasyon indeksinin örneğin canlı organizma etkinliğini belirlemek için laboratuvar ortamı testinde faydalı olduğu gösterilen hücrelere ait bir hücre çizgisi üzerinde hücre kültürü bazlı bir test kullanılarak laboratuvar ortamında belirlenmesi için en uygun olandır. Örneğin test bireysel ilaçların sitotoksitesini belirleyebilmektedir ve ardından kombinasyonun sitotoksitesini belirleyebilmektedir ve bu veriler kombinasyon indeksini hesaplamak için kullanılmaktadır. Testte ilaçlar solüsyondaki veya herhangi başka bir formdaki hücrelerle temas edebilmektedir. Ölçülecek olan etki 24 veya 48 saat gibi verilen bir süreden sonra kontrolle karşılaştırıldığında yaşayabilir hücrede %50 azalma benzeri sitotoksitedir. İlaçların testi gerçekleştirmek için örneğin mikroküreler formunda bir polimer matrisiyle birleştirilmesi gerekli değildir. Bununla birlikte ilaçlar örneğin mevcut istemlerde açıklandığı gibi mikroküreler formunda bir polimer matrisinden salınması durumunda, kombinasyon indeksinin 1'den daha az olarak belirlenmektedir. Bu durumda test edilen ilaç kombinasyonu ayır parçacıklar içerebilmektedir, bunların her biri ilaçlardan biriyle yüklenmektedir veya her parçacık birlikte her iki ilaçla yüklenebilmektedir. Uygun bir test aşağıdaki Örnekler 6 ve 7'de açıklanmaktadır. Ayrı parçacıkların her birinin ilaçlardan biriyle yüklendiği yerde, belirlenen CI değerinin birlikte yüklenen ürüne uygulanacağı varsayılırsa birlikte yüklenen parçacıklar için her ilaca ait elüsyon oranının belirgin şekilde diğerinden etkilenip etkilenmediği kontrol edilmelidir. Buluşun bu açısından farmasötik olarak aktif bileşik kombinasyonu bileşimde 5'in katı olan (her şekilde) bir oranda bir tümör hücre çizgisiyle ilgili laboratuvar ortamındaki sitotoksite testinde 1.0'dan daha az CI'ye sahip bir kombinasyondur. Bileşimin hepatoselüler karsinomun

tedavisi için kullanıldığı yerde, Cl'yi belirlemek için kullanılan hücre çizgisi tercihen bir hepatoselüler karsinom hücre çizgisidir. Bileşimin pankreatik karsinomun tedavisi için kullanıldığı yerde, hücre çizgisi tercihen bir pankreatik karsinom hücre çizgisidir. Aktif bileşikler bileşimde her şekilde 2'nin katı olan bir oranda test edildiğinde, Cl tercihen tanımlanan düşük değer olmalıdır.

Sitotoksik madde yeniden üretilmelerini veya büyümelerini engelleyerek doğrudan hücreler için toksik bir maddedir. Uygun sitotoksik maddeler örneğin doksorubisin gibi antrasiklin bileşikler veya WO 04071495'te açıklanan diğer bileşikler, WO 2006027567'de açıklandığı gibi kamptotesin türevlerin, taksanlar, 5-FU, mersaptopurin, kapesitabin gibi platin bazlı neoplastik anti-metabolitler, aktinomisin D gibi diğer sitotoksik antibiyotikler ve vinblastin, vinkristin, vindesin ve vinorelbin dahil olmak üzere vinka alkaloidlerdir. Örnekler sitarabin, gemsitabin, siklofosfamid, fludaribin, topotekan ve irinotekan gibi kamptotesin bileşikleri, klorambusil, busülfan, mitoksantron, retinoidler, anagrelid ve benzerleridir.

Tamamlayıcı aktivite sağlayan aktif madde sitostatik bir bileşik olabilmektedir. Sitostatik bileşikler hücresel büyümeyi veya yeniden üretimi önleyen veya baskılayan bileşikler olarak tanımlanabilmektedir. İlaçların sitotoksik ve sitostatik etkileri hücre çizgilerine dayanan testler gibi uygun olan testler kullanılarak bu alanda uzman olan kişiler tarafından belirlenebilmektedir.

Uygun sitostatik bileşikler rapamisin ve benzerleridir.

Uygun katyonik olarak yüklü bileşikler doksorubisin ve WO 04071495'de açıklandığı gibi diğer antrasiklin bileşikleri veya mitoksantron, WO 2006027567'de açıklandığı gibi

irinotekan benzeri katyonik kamptotesin türevleri veya topotekan veya verapamildir.

5 Kullanılabilen bir sitotoksik veya sitostatik bileşik sınıfı mTOR'u hedefleyen rapamisin ve rapamisin benzerlerini içermektedir. Bu tür bileşikler sirolimus, temsirolimus, everolimus, biyolimus, ABT-578 ve AP23573'ü içermektedir. WO-A-2003022807'de açıklanan rapamisin benzerleri kapsamına dahil edilen bileşiklerden herhangi biri rapamisin benzeri olarak 10 kullanılabilir.

Sitotoksik aktif maddenin rapamisin veya rapamisin türevi/benzeri olduğu yerde, diğer aktif madde tercih edilen bir düzenlemede doksorubisin veya WO 04071495'de açıklandığı 15 gibi bir amin grubuna sahip olan başka bir antrasiklin bileşiğidir.

Kanser önleyici ilaç rapamisin ve doksorubisin kombinasyonu rapamisin sensitizasyonu ile lenfomalarda kemorezistansın 20 tersine döndürülmesi ve doksorubisinle apoptozun indüksiyonu sayesinde B-hücre lenfomalı fare modelinde tam gerileme göstermektedir (H-G Wendel et al, 2004, Nature 428, 332-337). Löseminin tedavisinde, rapamisin doksorubisin-indüklenmiş apoptoz gelişimi göstermektedir (R.Avellino et al, 2005, Blood 25 106(4), 1400-1406). Rapamisin ve bir benzerinin en az bir amin grubuna sahip bir antrasiklin bileşiğiyle kombinasyonları düşük kombinasyon indeksi sergilemektedir ve mevcut buluşta oldukça etkindir.

30 Mevcut buluşun bu açısıyla ilgili başka bir uygulamada, sitotoksik bileşik rapamisin veya bir benzeridir ve katyonik aktif madde WO 2006027567 veya EP-A-0321122'de açıklandığı gibi katyonik bir değişkene sahip kamptotesin türevidir. Tercihen aktif madde istem 6'da tanımlanmaktadır. Tercihen A 35 COO'dur. Tercihen AR 10 pozisyonunda değiştirilmektedir.

Mevcut buluşun birinci açısına göre, iki ilaç birlikte aynı mikrokürelere yüklenmektedir. Sitotoksik bileşiğin rapamisin veya bir benzeri olduğu yerde, tamamlayıcı aktiviteye sahip aktif madde alternatif olarak sisplatinden veya diğer platin bazlı kanser önleyici ilaç, gemsitabin, tamoksifen veya başka anti-estrogen, interferon alfa, epitelyal büyüme faktörü reseptör inhibitörü, hem VEGFR hem de EGFR inhibitörleri ve Glivec'den seçilebilmektedir. Diğer ilaç alternatif olarak paksitaksel veya bir benzeri veya diğer mikrotubulus inhibitörü, bir topoizomeraaz inhibitörü olabilmektedir.

Rapamisinin diğer kanser önleyici maddelerle kombinasyonları ayrıca bilinmektedir ve aşağıda açıklanan bilinen kombinasyon buluşun bir açısında kullanılabilmektedir. Sisplatin, gemsitabin, tamoksifen, interferon alfa, EGFR inhibitörü, VEGFR/EGFR inhibitörü ve Gleevec'in tümü ön klinik veya klinik çalışmalarda rapamisin benzerleriyle birleştirilmektedir ve bu kombinasyonlar buluşun diğer bir açısında kullanılabilmektedir.

Rapamisin ile meme kanserine karşı birinci ve ikinci çizgi maddeleri olarak kullanılan kemoterapötik maddeler arasındaki etkileşimler araştırılmaktadır. Laboratuvar ortamında paklitaksel, karboplatin ve vinorelbin kombinasyonlarında sinerjistik etkileşimler gözlemlenmektedir. Doksorubisin ve gemsitabin kombinasyonlarında ek etkiler gözlemlenmektedir. Rapamisin paklitaksel- ve karboplatin-indüklenmiş apoptozu önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu etki dizinden bağımsızdır ve kaspaz aktivasyonu en azından kısmen aracı olmaktadır. Bunun yanında rapamisin bu zayıf ölçüde davranan tümörlerle ilgili potansiyel bir yaklaşım önererek, HER2/neu-aşırı üreten hücrelerde paklitaksele ve karboplatine olan kemosensitizasyonu arttırmaktadır. Canlı organizmada, paklitakselle birleştirilen rapamisin rapamisine karşı duyarlı

tümörlerde tek başına diğer maddeyle karşılaştırıldığında tümör yoğunluğunda belirgin bir azalmayla sonuçlanmaktadır (WH. Mondesire et al, 2004, Clinical Cancer Research, 10, 7031-7042). Rapamisin veya bir benzerinin taksanla
5 kombinasyonu buluşun diğer bir açısında kullanılabilmektedir.

RAD001 wt p53'de sisplatin-indüklenmiş apoptozu önemli ölçüde arttırmaktadır, ancak mutant p53 tümör hücrelerinde arttırmamaktadır. RAD001 p53-indüklenmiş p21 ekspresyonunun
10 önleyerek hücreleri sisplatine karşı duyarlı hale getirmektedir. Bu bulgular RAD001 içeren platin sitotoksik gibi DNA hasar verici maddeleri birleştirmek için moleküler temeli desteklemektedir, genel ana anabolik işlemin katı tümörlü hastaların tedavisinde yapılandırılan ilaç
15 protokolünün etkinliğini arttırabildiğini göstermektedir (I. Beuvink et al, 2005, Cell, 120: 747-759). Rapamisin veya benzerlerinin bir platin anti-neoplastik bileşikle kombinasyonu buluşun diğer açılarında kullanılabilmektedir.

CCI-779 ve tamoksifen veya başka bir anti-östrojen birlikte uygulandığında faydalı olabilmektedir. PI3K/AKY/mTOR yolu meme kanserinde tamoksifen direncinin gelişmesinde önemli bir rol oynayabilmektedir. Östrojen reseptörünün aktivasyonu PI3K yolunu harekete geçirebilmektedir. Erb-1 ile ER arasındaki
25 çapraz karışmanın yolu aktif duruma getirdiği gösterilmektedir, bu östrojen-bağımsız transkripsiyonel aktiviteyle birleştirilmektedir ve aktive edilen AKT içeren meme kanseri hücresi tamoksifenin büyüme önleyici etkilerine karşı dirençlidir. Rapamisin veya bir benzerinin anti-
30 östrojenle kombinasyonu buluşun bu diğer açısında kullanılabilmektedir.

İleri meme kanserine sahip yaklaşık olarak 1200 postmenopozal kadın arasında başlangıç tedavisi olarak tek başına letrozole
35 karşı oral yoldan uygulanan temsirolimus (CCI-779) artı

letrozolü (bir aromataz inhibitör) karşılaştıran süregelen bir aşama III deneyi bulunmaktadır. Rapamisin veya bir benzerinin aromataz inhibitörüyle kombinasyonu buluşun bu diğer açısında kullanılabilmektedir.

5

CCI-779 ve interferon alfa renal hücre karsinomunun (RCC) tedavisiyle birlikte kullanılmaktadır. Büyük bir aşama 3 deneyi devam etmektedir. Rapamisin veya bir benzerinin alfa interferonla kombinasyonu buluşun bu diğer açısında kullanılabilmektedir.

10

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörü EKI-785'e sahip rapamisin sinerjistik büyümenin önlenmesiyle sonuçlanmaktadır. RAD-001 ve VEGFR/EGFR inhibitörü AEE788 ile benzer sonuçlara ulaşılmaktadır. Glivec içeren rapamisin CML hücre çizgilerinde sinerjistik büyümenin önlenmesiyle sonuçlanmaktadır. Rapamisin veya bir benzerinin bir büyüme faktörü reseptörüyle veya Glivec ile kombinasyonu buluşun diğer bir açısında kullanılabilmektedir.

20

Buluşun diğer açısında kullanılan diğer kombinasyonlar P-glikoprotein inhibitörlerine sahip sitotoksik maddeleri içermektedir. Kanseri hastalarının yaklaşık olarak %50'si kemoterapi almaktadır ve bu hastaların %75 kadarı geniş kemoterapötik madde spektrumunda içsel veya edinilmiş direnç deneyimlemektedir. Çoklu ilaç direnci (MDR) olarak adlandırılan bu fenomen kemoterapi başarısızlığının en yaygın nedenidir. Tümörlerin büyük çoğunluğunun ilaç akış pompası P-glikoprotein (P-gp) aşırı ekspresyonu sayesinde MDR geliştirdiği iyi tespit edilmektedir. P-gp'nin önlenmesi tersine çevrilen MDR'nin uygulanabilir bir aracı olarak kabul edilmektedir; bununla birlikte mevcut P-gp inhibitörleri şimdiye kadar etki ve özgüllük ile ilgili sınırlamalar nedeniyle sınırlı klinik başarı sergilemektedir. Bir kalsiyum kanal bloke edici olan verapamil çoğunlukla supraventriküler aritmi,

35

- koroner kalp hastalığı ve arteriyel hipertansiyon tedavisi için kullanılmaktadır. Bunun yanında, verapamil etkili bir P-glikoprotein-aracılı aktarım inhibitörüdür ve laboratuvar ortamında yapılan deneylerde kanser kemoterapisiyle MDR'yi
- 5 değiştirdiği kanıtlanmaktadır (G. Toffoli et al, 1995, Biochem Pharmacol, 50, 1245-55; C. Pauli-Magnus et al, 2000, J Pharmacol Exp Ther, 293, 376-82). Doksorubisin ve verapamilin birlikte yüklenen ilaç ayırıştırıcı küreciklerden lokal salımı bu sebeple herhangi bir MDR etkisinin üstesinden gelmek için
- 10 P-gp'nn önlenmesini ve yüksek lokal sitotoksik madde dozlarını sağlayan sinerjistik faydalar önerebilmektedir. Buna bağlı olarak sitotoksik antibiyotik ile P-gp inhibitörünün kombinasyonu bu buluşun diğer açısında kullanılabilmektedir.
- 15 Diğer kombinasyonlar düşük kombinasyon indeksine sahip diğer aktif maddeler içeren tekanlar gibi topoizomeras inhibitörlerini içermektedir.
- İçerikleri burada referansla birleştirilen WO 2003028696, WO
- 20 2004087115, WO 2004087105, WO 2004093795, WO 2006055903 ve P.G. Tardi et al (2007) Biochim. Biophys. Acta 1768, 678-587'den herhangi birinde Celator ile açıklandığı gibi diğer kombinasyonlar buluşun diğer açısında kullanılabilmektedir.
- 25 Taksanlar ve paklitaksel ve 5-FU gibi anti-metabolitler birlikte kullanılabilmektedir. 5-FU ve lökovorin kullanılabilmektedir.
- Aktif maddelerin bir kamptotesin türevini içerdiği yerde,
- 30 aşağıdaki genel formül I'e ait bileşikler gibi katyonik değişkenlere sahip bir türevin kullanılması özellikle etkilidir

burada R^1 isteğe bağlı olarak bir hidroksil, amin, alkoksi, halojen, asil ve asiloksi gruplarıyla değiştirilen H, halojen, hidroksil ve düşük (C_{1-6})alkilden seçilmektedir;

A $C(O)O$ veya CH_2 'dir; ve

R NR^2R^3 'dür; burada R^2 ve R^3 aynı veya farklıdır ve her biri bir hidrojen atomu, değiştirilmiş veya değiştirilmemiş C_{1-4} alkil grubu veya değiştirilmiş veya değiştirilmemiş karbosiklik veya heterosiklik grubu temsil etmektedir veya R^2 ve R^3 bağlı oldukları nitrojen atomuyla birlikte -O-, -S- veya $>NR^4$ ile kesilen isteğe bağlı olarak değiştirilmiş bir heterosiklik halkası oluşturmaktadır; burada R^4 bir hidrojen atomu, değiştirilmiş veya değiştirilmemiş C_{1-4} alkil grubu veya değiştirilmiş veya değiştirilmemiş fenil grubudur;

ve burada -A-R gruplaması kamptotesin bileşiğinin A halkasında 9, 10 veya 11 pozisyonlarının herhangi birine yerleştirilen bir karbon atomuna bağlanmaktadır ve R^1 tuzları dahil olmak üzere A veya B halkasında değiştirilmektedir.

Bir düzenlemede kamptotesin türevleri formül IA'ya sahiptir



burada R^1 isteğe bağlı olarak bir hidroksil, amin, alkoksi, halojen, asil veya asiloksi grubu veya halojenle değiştirilmiş H, düşük (C_{1-6}) alkildir; ve

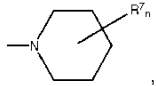
- R NR²R³'dür; burada R² ve R³ aynı veya farklıdır ve her biri bir hidrojen atomu, değiştirilmiş veya değiştirilmemiş C₁₋₄ alkil grubu veya değiştirilmiş veya değiştirilmemiş karbosiklik veya heterosiklik grubunu temsil etmektedir veya R² ve R³ bağlı oldukları nitrojen atomuyla birlikte -O-, -S- veya >NR⁴ ile kesilebilen isteğe bağlı olarak değiştirilmiş bir heterosiklik halkasını oluşturmaktadır; burada R⁴ bir hidrojen atomu, değiştirilmiş veya değiştirilmemiş C₁₋₄ alkil grubu veya değiştirilmiş veya değiştirilmemiş fenil grubudur;
- ve burada -O-CO-R gruplaması tuzları dahil olmak üzere kamptotesin bileşiğinin A halkasında 9, 10 veya 11 pozisyonlarından herhangi birine yerleştirilen bir karbon atomuna bağlanmaktadır.
- O-CO-R gruplamasının 10 pozisyonunda bağlanması tercih edilmektedir.

R¹ tercihen C₁₋₄ alkil, en çok tercihen etildir ve m tercihen 1'dir.

20

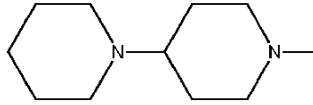
Halojen atomu R örneğin F, Cl, Br veya I, tercihen F veya Cl'dir. R¹-R⁴ metil, etil, propil, izopropil, in-butyl, izobutyl ve t-butyl, tercihen metil olabilmektedir.

- 25 R ve R¹'deki değişkenler tercihen halojen atomları, hidroksi, C₁₋₄ alkoksi, fenoksi, COOR⁶, SO₃R⁶ ve PO₃(R⁶)₂, aril,



- NR⁸R⁹ ve CONR⁸R⁹, QAOR⁵, QANR⁸R⁹ ve QAQR⁵'den seçilmektedir; burada R⁵ C₁₋₄ alkil veya arildir; R⁶ hidrojen, halojen C₁₋₄ alkil veya C₁₋₄ alkoksidir; R⁷ hidrojen, halojen veya C₁₋₄ alkildir; R⁸ ve R⁹ aynı veya farklıdır ve her biri H veya C₁₋₄ alkildir veya R⁸ ve R⁹ birlikte C₃₋₆ alkanedili temsil etmektedir;
- Q OCO veya -COO-'dur ve A C₂₋₄ alkanedildir.
- 30

Tercihen R NR^3R^3' 'dür; burada R^2 ve R^3 nitrojen atomuyla birlikte isteğe bağlı değişkenlerle 5 veya 6 üyeli bir halkayı, tercihen doymuş bir halkayı oluşturmaktadır. Değişken tercihen $-NR^8R^9'$ 'dur. Bu tür bir değişkende R^8 ve R^9 birlikte tercihen C_{4-5} alkenedildir. Bu tür gruplar asaldır ve 7 pH değerinde katyonik olarak yüklenme eğilimindedir. En çok tercihen R aşağıdaki gibidir



- 10 Uygun bileşiklere ait başka bir familya genel formül II'ye sahiptir

burada R^{20} ve R^{23} 'ün her biri hidroksi veya hidrojendir veya birlikte CH_2OCH_2 'dir; R^{21} ve R^{22} 'den biri H 'dir ve diğeri $CH_2NR^{24}R^{25}$ 'dir; burada R^{23} ve R^{24} aynı veya farklıdır ve her biri bir hidrojen atomu, değiştirilmiş veya değiştirilmemiş C_{1-4} alkil grubu veya değiştirilmiş veya değiştirilmemiş karbosiklik veya heterosiklik grubunu temsil etmektedir veya R^{23} ve R^{24} bağlı oldukları nitrojen atomuyla birlikte isteğe bağlı olarak $-O-$, $-S-$ veya $>NR^4$ ile kesilebilen değiştirilmiş heterosiklik halkayı oluşturmaktadır; burada R^4 tuzları ve dörtlü türevleri dahil olmak üzere bir hidrojen atomu, değiştirilmiş veya değiştirilmemiş C_{1-4} alkil grubu veya değiştirilmiş veya değiştirilmemiş fenil grubudur. Bu istemdeki uygun bileşiklerle ilgili bir örnek topotekandır; burada R^{20} hidroksildir; R^{22} ve R^{23} hidrojendir; R^{21} $CH_2NR^{24}R^{25}$ 'dir ve R^{24} ile R^{25} 'in her ikisi de metildir.

Birinci aktif maddenin ikinci aktif maddeye oranı tercihen 100:1-1:100 aralığındadır, tercihen 5:1-1:5 aralığındadır. Uygun oranlar örneğin kombinasyon indeks saptamalarından elde edilen bilgiler kullanılarak bu alanda uzman olan kişiler tarafından belirlenebilmektedir. Genellikle oranlar sinerjistik etkiyi optimize edecek şekilde seçilmelidir.

Tercihen birinci aktif maddedeki polimerde anyon eşdeğerlerinin katyon eşdeğerlerine oranı 2:1-1:1 civarında ve tercihen 1:1 civarında olmalıdır. Bu oranların seçilmesiyle ilk uygulamanın birinci etkisi en aza indirilirken ve optimize edilen uzatılmış salım sağlarken, optimum yüklemeye ulaşılabilmektedir.

Buluştaki kullanılan ikinci aktif madde alternatif olarak bir COX-inhibitörü olabilmektedir. COX-inhibitörleri örneğin NSAID'ler kemoembolizasyon prosedürüyle bağlantılı inflamasyonu ve ağrıyı hedefleyen anti-inflamatuvar ve analjezik maddeler olarak davranabilmektedir. Bunun yanında, tümördeki hücrelerin %50'si inflamatuvar hücreler olabilmektedir. Ayrıca anjiyogenez ve tümör ilerlemesiyle bağlantılı inflamasyonla ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Buna göre COX-inhibitörüyle birlikte doksorubisin gibi sitotoksik bir madde kombinasyonu oldukça istenen etkilere sahip olabilmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, ibuprofen kanser hücre invazyonu ve karaciğer metastazı üzerinde faydalı etkilere sahip olduğu için önerilmektedir.

Polimer suda çözünebilen bir malzemedir. Biyolojik olarak çözünemesine rağmen, ilaç esasen ilacı yüzeyden salmak için polimer matrisin erozyonuyla salınabilmektedir, tercihen polimer esasen biyolojik kararlılığa sahiptir (başka bir deyişle biyolojik olarak çözünmemektedir).

Polimer suda şişebilmektedir. Buluşta faydalı olan suda

şışabilen polimer 37°C'de suda şişirildiğinde gravimetrik analiz yoluyla ölçülen ağırlık olarak %40-99, tercihen %75-95 aralığında dengeli su içeriğine sahiptir.

- 5 Polimerin en azından kısmen iyonik olarak çapraz bağlanması veya hidrofobik olarak çapraz bağlanması uygun olmasına rağmen, genellikle polimer kovalent olarak çapraz bağlanmaktadır. Bazı düzenlemelerde albümin, alginat, jelatin, nişasta, kitosan veya kolajen gibi doğal kaynaklardan
- 10 türetilen polimerlerin kullanılması uygun olabilmektedir; bunların tümü embolik maddeler olarak kullanılmaktadır. Diğer düzenlemelerde polimer esasen doğal olarak meydana gelen polimeri veya türevlerini içermemektedir. Bu tercihen iki veya daha fazla işlevli çapraz bağlanan monomerin varlığında
- 15 etilenik olarak doymamış monomerlerin polimerleştirilmesiyle oluşturulmaktadır. Etilenik olarak doymamış monomerler iyonik (çift kutuplu dahil olmak üzere) bir monomer içerebilmektedir.

- 20 Etafilkon A bazlı kontak lenslerde kullanıldığı gibi hidroksietil metakrilat kopolimerleri, akrilik asit ve etilen glikol dimetakrilat veya metilen bisakrilamid gibi çapraz bağlanma monomeri kullanılabilmektedir. N-akriloil-2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol ve N,N-bisakrilamid kopolimerleri ayrıca kullanılabilmektedir.

- 25 Uygun olan diğer sentetik polimerler ayırma aracı veya iyon değişim aracı olarak kullanılan tipteki iyonik değişkenlere sahip çapraz bağlanmış stirenik polimerlerdir.

- 30 Suda şişabilen suda çözünebilen matrisi oluşturmak için kullanılabilen başka tipteki sentetik polimer glutaraldehid gibi aldehid-tipli çapraz bağlanma maddelerini kullanarak çapraz bağlanan polivinil alkoldür. Bu tür ürünler için, polivinil alkol (PVA) bileşiği içeren işlevsel iyonik grubun
- 35 hidroksil gruplarla reaksiyona sokulmasıyla asılı iyonik

gruplar sağlanarak iyonik olarak verilebilmektedir. Hidroksil gruplarla reaksiyon için uygun olan işlevsel grup örnekleri karboksilik asitler veya türevleri gibi asilasyon maddeleridir veya esterleri oluşturabilen diğer asidik gruplardır.

5

Buluş polimer matrisin etilenik grupların radikal polimerizasyonu ile molekül başına birden fazla etilenik olarak doymamış asılı gruba sahip bir polivinil alkol makromerden oluşturulduğu belirli değere sahiptir. Tercihen PVA makromeri

10 örneğin anyonik monomer içeren iyonik olmayan ve/veya iyonik monomer içeren etilenik olarak doymamış monomerlerle kopolimerleştirilebilmektedir.

15

PVA makromeri örneğin asılı vinilik veya akrilik gruplarla 1000-500,000 D, tercihen 10,000-100,000 D aralığında uygun moleküler ağırlıkta PVA polimerinin sağlanmasıyla oluşturulabilmektedir. Asılı akrilik gruplar hidroksil gruplarının bazılarıyla ester bağlantıları oluşturmak için örneğin akrilik veya metakrilik asidin PVA ile reaksiyona

20 sokulmasıyla sağlanabilmektedir. Polimerizasyonu gerçekleştirilebilen vinilik grupların polivinil alkole bağlanmasıyla ilgili diğer yöntemler örneğin US 4,978,713 ve tercihen US 5,508,317 ve 5,583,163'de açıklanmaktadır. Buna

20

bağlı olarak tercih edilen makromer sıklıkla asetal bağlantı

25

aracılığıyla bir (alk)akrilaminoalkil parçasına bağlanan bir polivinil alkol omurgası içermektedir. Örnek 1 onaylı marka nelfilcon B ile bu türde bilinen bir makromer örneğinin sentezini açıklamaktadır. Tercihen PVA makromerleri örneğin 5-10 gibi molekül başına yaklaşık olarak 2-20 asılı etilenik

30 gruba sahiptir.

30

PVA makromerlerin iyonik bir monomer içeren etilenik olarak doymamış monomerlere kopolimerleştirildiği yerde, iyonik monomer tercihen genel formül II'ye sahiptir

35

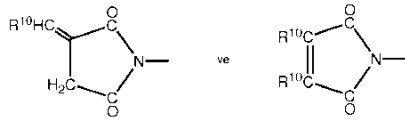
burada Y¹ aşağıdakilerden seçilmektedir

5



CH₂=C(R¹⁰)-CH₂-O-, CH₂=C(R¹⁰)-CH₂OC(O)-, CH₂=C(R¹⁰)OC(O)-,
 CH₂=C(R¹⁰)-O-, CH₂=C(R¹⁰)CH₂OC(O)N(R¹¹)-, R¹²OOCC(R¹⁰)=C(R¹⁰)C(O)-O-,
 R¹⁰CH=CHC(O)O-, R¹⁰CH=C(COOR¹²)CH₂-C(O)-O-,

10



burada:

R¹⁰ hidrojen veya bir C₁-C₄ alkil grubudur;

R¹¹ hidrojen veya bir C₁-C₄ alkil grubudur;

15 R¹² hidrojen veya bir C₁₋₄ alkil grubu veya BQ¹'dir; burada B ve Q¹ aşağıda tanımlandığı gibidir:

A¹ -O- veya -NR¹¹-'dir;

K¹ bir -(CH₂)_rOC(O)-, -(CH₂)_rC(O)O-, -(CH₂)_rOC(O)O-,
 -(CH₂)_rNR¹³-, -(CH₂)_rNR¹³C(O)-, -(CH₂)_rC(O)NR¹³-, -(CH₂)_rNR¹³C(O)O-,
 20 -(CH₂)_rOC(O)NR¹³-, -(CH₂)_rNR¹³C(O)NR¹³- (burada R¹³ grupları aynı veya farklıdır), -(CH₂)_rO-, -(CH₂)_rSO₃- grubudur veya isteğe bağlı olarak B ile birlikte; değer bağı ve r 1-12 arasındadır ve R¹³ hidrojen veya bir C₁-C₄ alkil grubudur;

B Q¹ veya Y¹ B değer bağın bağlı bir uç karbon atomu
 25 içeriyorsa, isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla florin atomu ve perflorinatlı zincirler içeren düz veya banyalı bir alkanedil, oksaalkilen, alkanediloksaalkandeil veya alkandiiloligo(oksaalkandiil) zinciridir; ve
 Q¹ anyonik bir gruptur.

30

Anyonik grup Q¹ örneğin bir karboksilat, karbonat, sülfonat,

sülfat, nitrat, fosfonat veya fosfat grubu olabilmektedir. Monomer serbest asit veya tuz formunda polimerleştirilebilmektedir. Tercihen konjugat aside ait pK_a 5'den daha azdır.

5

Uygun katyonik grup Q^1 tercihen bir $N^+R^{14}_3$, $P^+R^{15}_3$ veya $S^+R^{15}_2$ grubudur; burada R^{14} grupları aynı veya farklıdır ve her biri hidrojen, C_{1-4} alkil veya arildir (tercihen fenil) veya R^{14} gruplarından ikisi 5-7 atom içeren bağlı oldukları doymuş veya

10 doymamış heterosiklik halkasındandır, R^{15} gruplarının her biri OR^{14} veya R^{14} 'dür. Tercihen katyonik grup sürekli katyoniktir, yani her R^{14} hidrojenden başkadır. Tercihen katyonik grubu Q $N^+R^{14}_3$ 'dür, burada her R^{14} C_{1-4} alkil, tercihen metildir.

15 Çift kutuplu grup Q^1 örneğin anyonik yükün iki değerli merkezine ve katyonik yükün tek değerli merkezine veya tam tersine sahip olarak veya katyonik yükün iki merkezine ve anyonik yükün tek merkezine veya tam tersine sahip olarak yükün tamamına sahip olabilmektedir. Tercihen bununla

20 birlikte, çift kutuplu iyon yükün tamamına sahip değildir ve en çok tercihen tek değerli katyonik yükün merkezine ve tek değerli anyonik yükün merkezine sahiptir.

Mevcut buluşta Q^1 olarak kullanılabilen çift kutuplu gruplarla

25 ilgili örnekler WO-A-0029481'de açıklanmaktadır.

Etilenik olarak doymamış monomerin örneğin çift kutuplu monomer içerdiği yerde, bu parçacıkların hidrofilisitesini, yağlılığını, biyolojik olarak uyumluluğunu ve/veya kan

30 uyumluluğunu arttırabilmektedir. Uygun çift kutuplu monomerler önceki ilanlarımız WO-A-9207885, WO-A-9416748, WO-A-9416749 ve WO-A-9520407'de açıklanmaktadır. Tercihen çift kutuplu monomer 2-metakrioksiloksi-2'-trimetilamonyum etil fosfat iç tuzudur (MPC) .

35

Genel formül I'in monomerinde tercihen Y^1 bir $CH^2=CR^{10}COA-$ grubudur; burada R^{10} H veya metil, tercihen metildir ve burada A^1 tercihen NH' 'dir. B tercihen 1-12 tercihen 2-6 karbon atomundan oluşan bir alkanedil grubudur. Bu tür monomerler 5 akrilik monomerlerdir.

Etilenik olarak doymamış monomere seyreltici monomer, örneğin iyonik olmayan monomer dahil edilebilmektedir. Bu tür bir monomer asit gruplarının pK_a 'sını kontrol etmek, ürünün 10 hidrofilitesi veya hidrofobitesini kontrol etmek, polimerdeki hidrofobik bölgeleri sağlamak veya sadece atıl seyreltici olarak işlev görmek üzere faydalı olabilmektedir. İyonik olmayan seyreltici örnekleri örneğin alkil (alk) akrilatlar ve (alk) akrilamidler, özellikle 1-12 karbon atomu 15 içeren alkil gruplarına sahip bu tür bileşikler, hidroksi ve di-hidroksi-değiştirilmiş alkil(alk) akrilatlar ve -(alk) akrilamidler, vinil laktamlar, stiren ve diğer aromatik monomerlerdir.

20 Polimer matrisinde anyon seviyesi tercihen $0.1-10 \text{ meq g}^{-1}$ aralığındadır, tercihen en az 1.0 meq g^{-1} 'dir. Tercih edilen anyonlar sülfatlar, sülfonatlar, fosfatlar ve fosfonatlar gibi güçlü asitlerden türetilmektedir.

25 PVA makromerinin etilenik olarak doymamış monomerlerle birlikte polimerleştirildiği yerde, PVA makromerin diğer monomere ağırlık oranı tercihen 50:1-1:5 aralığında, tercihen 20:1-1:2 aralığındadır. Etilenik olarak doymamış monomerde, anyonik monomer tercihen %10-100 mol, tercihen en az %25 mol 30 miktarında bulunmaktadır.

Çapraz bağlanan polimer örneğin sürekli karışmayan bir taşıyıcıda dağıtma fazındaki monomer damlacıklarında polimerleştirme işlemiyle aslında mikroküre formunda 35 oluşturulmaktadır. Şiştiğinde istenilen büyüklüğe sahip

parçacıkları üretmek için uygun yağ içinde su polimerizasyonlarıyla ilgili örnekler bilinmektedir. Örneğin US 4,224,427 suda çözünebilen monomerlerin süspansiyon maddelerinin varlığında sürekli çözücü fazında dağıtılmasıyla 5 mm çapında düzgün küre biçimli kürecikleri (mikroküreler) oluşturma yöntemlerini açıklamaktadır. Sabitleyiciler ve yüzey aktif maddeler dağıtılan faz parçacıklarının boyutu üzerinde kontrol sağlamak üzere bulunabilmektedir. Polimerizasyon işleminden sonra, çapraz bağlanan mikroküreler bilinen yollarla iyileştirilmektedir ve yıkanmaktadır ve isteğe bağlı olarak sterilize edilmektedir. Tercihen mikroküreler gibi parçacıklar sulu bir sıvıda şişirilmektedir ve büyüklüklerine göre sınıflandırılmaktadır.

İki aktif maddenin bir mikroküreye yüklenmesiyle ilgili yöntemler aktif maddelerin yapısına ve gerekli yükleme seviyelerine göre seçilmektedir. Bunların aynı zamanda yüklenmesi durumunda, her iki aktif maddeyi birleştirilmiş halde içeren bir solüsyon uygundur. Ardışık yükleme yöntemleri bir seviyede veya bir süre polimerli sulu solüsyondaki aktif maddelerden biriyle teması içerebilmektedir; böylelikle polimerdeki anyonik grupların oranı katyonik aktif maddeyle birleşmemiş halde kalmaktadır. İkinci adımda, isteğe bağlı olarak emilmemiş birinci aktif madde çıkarıldıktan sonra genellikle su içerisindeki ikinci aktif madde solüsyonu iyon değişimi işleminin gerçekleşmesini sağlayarak belirli bir süre için kısmen yüklenen mikrokürelerle ve polimere yüklü duruma getirmek için ikinci ilaçla temas ettirilmektedir.

Aktif maddelerden birinin düşük ölçüde suda çözünürlüğe sahip bir bileşik olduğu yerde, farklı bir teknik kullanılmaktadır. Örneğin aktif maddenin polimer matriste şişmesi ve emilmesi için mikroküreler sağlanarak, mikrokürelerin uygun çözücülerdeki her ilaca ait solüsyonlarla temas ettirilmesiyle aktif maddelerin ardışık olarak yüklenmesi mümkün

olabilmektedir. Bir düzenlemede, düşük ölçüde suda çözünebilen aktif madde önce polimere yüklenmektedir. Başka bir düzenlemede, katyonik olarak yüklü aktif madde önce yüklenmektedir.

5

İçerisinde düşük ölçüde suda çözünürlüğe sahip olan hem katyonik olarak yüklü aktif maddenin hem de nötr aktif maddenin çözünbildiği bir çözücünün veya çözücü sisteminin seçilmesi mümkün olabilmektedir; çözücü polimeri şişirme işlevi görmektedir. Örneğin aktif maddelerden her ikisinin de seçilen alkolde çözünbildiği yerde, alkol aktif maddeleri birlikte çözmek için ve seçilen alkolde şişebilen polimer matrisini şişirmek için kullanılabilmektedir.

10

15

Tercihen yükleme işlemi aşağıdaki adımları içermektedir: esasen kuru formdaki suda çözünen suda şişebilen anyonik olarak yüklü çapraz bağlanmış bir polimer matrisi içeren mikrokürelerin birinci organik çözücüde oda sıcaklığında 10 gr/l'den daha az suda çözünürlüğe sahip bir ilaç solüsyonuyla temas ettirilmesi, böylelikle çözücüdeki ilaç solüsyonu mikrokürelere emdirilmiş hale gelmektedir;

20

mikrokürelere emdirilmeyen ilaç solüsyonunun ayrılması; emdirilen mikrokürelerin sulu sıvıyla temas ettirilmesi, böylelikle ilaç mikrokürelerin çekirdeğinde çökeltilmektedir;

25

çökeltilen ilacı içeren mikrokürelerin iyon değişiminin yüklenmesini sağlamak için polimerinkinin karşıtı yüke sahip sulu iyonik ilaç solüsyonuyla temas ettirilmesi; ve yüklenen ikili mikrokürelerin iyileştirilmesi, burada ilaçlar yukarıda açıklandığı gibi seçilmektedir.

30

Bu yöntemde, hem suda çözünen ilaç için hem de katyonik ilaç için yüksek seviyelerde yüklemeye ulaşabildiğimizi saptamaktayız. Katyonik ilacın yükleme seviyesi düzenli mikroküreler kadar yüksektir. Yükleme yönteminin önce yüklenen iyonik ilaçla gerçekleştirildiği ve suda çözünebilen nötr

35

ilacın ikinci olarak yüklendiği yerde, olası yükleme seviyelerine ikinci olarak ulaşılmaktadır; nötr ilaç düzenli mikrokürelerden daha azdır. Bu etki ayrıca aşağıdaki Örnek 4'de gösterilmektedir.

5

İlk kez suda şişebilen iyonik olarak yüklü ilaç salım polimerine suda çözünebilen bir ilaç ile polimerin karşıt yüküne sahip bir ilaca bir kombinasyon yüklendiğine inanmaktayız. Buluşun diğer bir açısına göre (buradan itibaren

10

ikinci açı olarak adlandırılmaktadır), polimer artı suya dayanan ağırlık olarak %40-99 aralığında dengeli su içeriğinde oda sıcaklığında suda şişebilen suda çözünebilen, suda şişen iyonik olarak yüklü bir polimer içeren ilaç salım matrisi polimeri şişirebilen organik bir çözücüde oda sıcaklığında 10

15

gr/l'den daha az suda çözünme özelliğine sahip bir ilaç solüsyonuyla temas ettirilmektedir; böylelikle solüsyon matrise emdirilmiş hale gelmektedir;

polimer matrisini emmeyen herhangi bir ilaç solüsyonu ayrılmaktadır;

20

emdirilen matris suyla temas ettirilmektedir, böylelikle ilaç matriste çökeltilmektedir;

çökeltilen suda çözünebilen ilaca sahip matris iyonik olarak yüklü sulu ilaç solüsyonuyla temas ettirilmektedir, böylelikle matris şişmektedir ve polimerle birleştirilen ters yükün

25

içeren iyon değişimi yer almaktadır ve ilaç elektrostatik olarak polimer matrisine bağlıdır.

İsteğe bağlı olarak düşük çözünürlüklü ilaçla yüklenen matris ardından durulanmaktadır ve/veya kurutulmaktadır. İyonik

30

olarak yüklü ilaca ait sulu solüsyonla temasla ilgili ardışık adımlar WO 2007090897'de açıklandığı gibi olabilmektedir ve bu tarifnamede açıklanan tercih edilen bileşenler ve koşullar ilaçlar dahil olmak üzere bu düzenlemedeki yöntemdeki ilk adımlar için kullanılabilir. Matris buluşun birinci

35

açısına göre mikroküre formunda olabilmektedir. Alternatif

olarak bu bir iğne, tabaka, disk, ince tel veya polimer film formundaki implant gibi bir ilaç salım cihazı malzemesi olabilmektedir. Alternatif olarak bir stent, kateter, iğne, tübaj, graft, valf, tel ve benzerleri gibi nakledilen cihazın 5 üzerindeki kaplamadır.

Polimer yukarıda açıklanan buluşun birinci açısında kullanıldığı gibi anyonik bir polimer olabilmektedir. Alternatif olarak bu örneğin ayrıca WO 0152915'de açıklandığı 10 gibi çift kutuplu asılı gruplara sahip katyonik bir polimer olabilmektedir. Alternatif olarak Liu ev arkadaşlarına ait adı geçen kitapta (2003) açıklandığı gibi bu dekstran sülfat bazlı malzeme gibi ilaç salım cihazında kullanılan başka bir iyonik hidrojel polimeri olabilmektedir.

15 Alternatif olarak kolajen, hiyarulonik asit, dekstran sülfat, aljinat, selülozik polimer veya albümin gibi bir proteine veya polisakaride dayanan doğal bazlı bir polimer olabilmesine rağmen, bu tercihen sentetiktir.

20 Buluşun ikinci açısındaki yöntemde, birinci ilaçla yüklenen matris ikinci ilacın sulu solüsyonuyla temas etmeden önce kurutulabilmektedir. İkinci ilaçla iyon değişiminden sonra fazla ilaç solüsyonu durulanmadan önce çıkarılabilmektedir. 25 Buluşun bu açısı belirli bir değere sahiptir, burada suda çözünebilen ilaç yukarıda açıklandığı gibi rapamisin veya bir benzeridir veya paklitaksel veya deksametazon gibi bir taksandır.

30 Buluşun birinci açısındaki ürünü üretmek için yükleme yöntemiyle ilgili alternatif bir düzenlemede, yüklü olmayan aktif madde oda sıcaklığında kristalli olan bir malzeme olabilmektedir; ancak kristalli formda olması durumundan kaçınmak istenmektedir. Bu tür ilaçlar örneğin ibuprofeni 35 içermektedir. Bu ilaçlar için, ilacın kristalleşmesi yağ gibi,

örneğin mineral yağ veya bitkisel yağ gibi, isteğe bağlı olarak örneğin lipiodol veya başka iyodinatlı bir yağ gibi bir görüntüleme maddesi işlevini gören bir yağ gibi bir kristalizasyon inhibitörünün birleştirilmesiyle
5 önlenebilmektedir. Uygun olarak işlem suda çözünebilen suda şişebilen iyonik olarak yüklü çapraz bağlanmış bir polimer matrisini içeren mikrokürelerin mikrokürelere nüfuz edebilen organik bir çözücüdeki kristalleşebilen ilaç solüsyonuyla temas ettirilmesini içermektedir; solüsyon ayrıca ilacın
10 kristalleşmesini önleyen kristal bir değiştiriciyi içermektedir ve müteakip adımda kristalleşebilen ilacın yüklendiği mikroküreler iyon değişimiyle ilacı yüklemek için uygun olan sürede ve miktarda polimer matrisinin karşıtı yüke sahip sulu iyonik ilaç solüsyonuyla temas ettirilmektedir.
15 Tercihen yöntemde, kristalleştirilebilen ilacın yüklenmesini takiben kürecikler emilmeyen kristalleştirilebilen ilacı çıkarmak için suyla veya sulu bir solüsyonla yıkanmaktadır.

Buluşun birinci ve ikinci açılarının bulunmasında,
20 mikroküreler embolizasyon yönteminde uygulamak için uygun olabilmektedir. Mikroküreler bu sebeple tedavi edilen hayvana ve tümörün yerine ve dolayısıyla besleyici kan damarlarının boyutuna bağlı olarak embolizasyonda kullanmak için uygun olacak büyüklüktedir. Örneğin embolik mikroküreler tercihen
25 aralığında oda sıcaklığında iyonu giderilmiş suda şişirildiğinde 40 µm -1500 µm aralığında ve tercihen 100 µm - 1200 µm aralığında (düzgün) büyüklüğe sahiptir. Alternatif olarak mikroküreler ilacı uzun süre boyunca çevreleyen dokuya ve isteğe bağlı olarak dolaşıma salabilen bir ilaç deposu
30 olarak uygulamak için uygun olabilmektedir. Başka bir düzenlemede, mikroküreler tümör içi uygulama için uygundur. Embolizasyon için yukarıda belirtilen aralıkta büyüklüğe sahip mikroküreler ayrıca tümör içi uygulama için veya tümör rezeksiyonunun ardından rezeksiyon marjlarıyla ilgili uygulama

için uygun olabilmektedir.

5 Mikrokürelerle birlikte kullanmak üzere yukarıda açıklandığı gibi katyonik olarak yüklü ve suda çözünebilen aktif maddelerin anyonik matris polimerlerine yüklenme yöntemleri ayrıca ilaç salım maddelerine dayanan diğer hidrojele bu tür ilaç tiplerini yüklemek için uygulanabilmektedir. Buluşun ikinci açısında, iki ilaç tercihen tümör tedavisinde terapötik olarak etkin olacak şekilde seçilmektedir ve tercihen burada 10 daha önce tanımlandığı gibi 0.9'dan daha az, tercihen 0.7'den daha az, örneğin 0.5'den daha az, tercihen 0.3'den daha az ve en çok tercihen 0.1'den daha az kombinasyon indeksine sahiptir.

15 Buluşun ikinci açısındaki iyonik ilaç WO 04071495'de açıklandığı gibi katyonik antrasiklin olabilmektedir veya WO 2006027567'de açıklandığı gibi kamptotesin türevi olabilmektedir. Alternatif olarak ilaç, WO0152915'te açıklandığı gibi anyonik olabilir.

20

Mevcut buluş eşlik eden örneklerde gösterilmektedir. Örnekler kısaca aşağıdaki sonuçlarla ilgili çeşitli şekillere gönderme yapmaktadır:

25 Şekil 1 Örnek 2'de açıklandığı gibi doyma seviyesinde ($n=1$) ikinci ilacın yüklenmesinden sonra 25 mg.ml⁻¹ kürecik seviyesinde doksorubisin (Örnek 1) ve irinotekanla (Örnek 2) yüklenen küreciklerin yükleme profilini göstermektedir;

30 Şekil 2 kürecikler halinde birleştirilen irinotekan ve doksorubisine ait yükleme profilini göstermektedir. Küreciklerin yükleme profili 1 saat için 25 mg irinotekanla ve daha sonra 1 saat için 25 mg doksorubisinle (Örnek 3) veya 1 saat için 25 mg doksorubisinle ve daha sonra 25 mg irinotekanla (Örnek 4) yüklenmektedir ve küreciklerin yükleme 35 profili Örnek 2'de açıklandığı gibi 25 mg doksorubisin ve 25

mg irinotekana (Örnek 5) (n=1) ait bir karışımla yüklenmektedir;

Şekil 3 Örnek 2'de açıklandığı gibi farklı yöntemlerle bir doksorubisin ve irinotekan kombinasyonu ile yüklenen örneklerin

5 boyutunu göstermektedir (n=1);

Şekil 4 aynı küreciklerden oda sıcaklığında PBS'ye ayrıştırılan doksorubisin ve irinotekana ait elüsyon profilini göstermektedir. Örnek 1 doyma seviyesinde irinotekanla yüklendikten sonra 25 mg.ml⁻¹ seviyesinde doksorubisinle

10 yüklenen küreciklerdir; Örnek 2 doyma seviyesinde doksorubisinle yüklendikten sonra 25 mg.ml⁻¹ seviyesinde irinotekanla yüklenen küreciklerdir. Örnek 3 1 saat için 25 mg irinotekanla ve daha sonra 25 mg doksorubisinle yüklenen küreciklerdir; Örnek 4 1 saat için 25 mg doksorubisinle ve
15 daha sonra 25 mg irinotekanla yüklenmiş küreciklerdir ve Örnek 5 Örnek 2'de açıklandığı gibi 25 mg doksorubisin ve 25 mg irinotekana ait karışımla (n=1) yüklenen küreciklerdir;

Şekil 5 Örnek 3'de açıklandığı gibi 24 saat için (n=1) döner bir mikserde oda sıcaklığında 200 ml PBS içerisine doksorubisin
20 ve irinotekanla yüklenen mikrokürelerin salım profillerini göstermektedir;

Şekil 6 Örnek 4'de açıklandığı gibi rapamisin ve doksorubisinin küreciklere yüklenmesiyle ilgili iki yöntemi gösteren bir akış diyagramıdır;

25 Şekil 7 Örnek 4'de açıklandığı gibi yüklenmemiş ve ilaç yüklenmiş küreciklerin boyut dağılımını göstermektedir;

Şekiller 8A-D 25°C'de 200 mL PBS'ye yüklenen küreciklerden doksorubisin ve rapamisin ayrışmasını göstermektedir. (A)

Küreciklerden ilaç elüsyonu Yöntem 1 ile yapılmaktadır. (B)

30 (A) ile ilgili elüsyon verileri yüzde olarak sunulmaktadır.

(C) Küreciklerden ilaç elüsyonu Yöntem 2 ile yapılmaktadır.

(D) (C) ile ilgili elüsyon verileri yüzde olarak

sunulmaktadır. (A) ve (C)'de ayrıştırılan ilaç miktarı Örnek 4'de açıklandığı gibi ilaçsız olarak kürecik yoğunluğu başına

düzeltilmektedir;

Şekil 9 Örnek 5’de açıklandığı gibi ibuprofen-irinotekan küreciğini hazırlama yöntemini göstermektedir;

5 Şekil 10 Örnek 5’de açıklandığı gibi ibuprofen- ve ibuprofen-irinotekan yüklü küreciklerin boyut dağılımını göstermektedir; Şekil 11 ibuprofen ve irinotekan kombinasyonu ile irinotekanın küreciklerden ayrıştırılmasını göstermektedir. Elüsyon koşulu: Örnek 5’de açıklandığı gibi 0.24 ml kürecik (yüklü), 200 mL PBS, 25°C;

10 Şekil 12 ibuprofen ve irinotekan kombinasyonu ile ibuprofenin küreciklerden ayrıştırılmasını göstermektedir. Elüsyon koşulu: Örnek 5’de açıklandığı gibi 0.24 ml kürecik (yüklü), 200 mL PBS, 25°C;

Şekil 13 Örnek 6’da açıklandığı gibi küreciklerden 15 doksorubisinin ayrışmasına karşı elüsyon süresini göstermektedir (Hata çubukları: 1SD, n=6);

Şekil 14 Örnek 6’da açıklandığı gibi LDH deneyinden (Hata çubukları: 1SD, n=6) elde edilen kürecik sayısı ile ve maruziyet süresi ile ilgili olarak işlem görmemiş hücrelerle 20 karşılaştırıldığında yaşayabilen HepG2 hücrelerinin yüzdesini göstermektedir;

Şekil 15 Örnek 7’de açıklandığı gibi LDH deneyine ait sonuçlar olan rapamisin, doksorubisin ve kombinasyon için (Hata çubukları: 1SD, n=5) yaşayabilen HepG2 hücrelerinin yüzdesini 25 göstermektedir;

Şekil 16 Örnek 7’de açıklandığı gibi LDH deneyine ait sonuçlar olan rapamisin, doksorubisin ve kombinasyon - ölçekli açılım için (Hata çubukları: 1SD, n=5) yaşayabilen HepG2 hücrelerinin yüzdesini göstermektedir;

30 Şekil 17 Örnek 7’de açıklandığı gibi MTS deneyine ait sonuçlar olan rapamisin, doksorubisin ve kombinasyon için (Hata çubukları: 1SEM, n=3) yaşayabilen HepG2 hücrelerinin yüzdesini göstermektedir;

Şekil 18 Örnek 7’de açıklandığı gibi MTS deneyine ait sonuçlar

olan rapamisin, doksorubisin ve kombinasyon - ölçekli açılım için (Hata çubukları: 1SEM, n=3) yaşayabilen HepG2 hücrelerinin yüzdesini göstermektedir;

Şekil 19 Örnek 8'de açıklandığı gibi ilaç yüklü mikroküre

5 kombinasyonlarına (MTS deneyi, n=6, $\pm$ SD) maruz kaldıktan 72 saat sonra HepG2 hücrelerinin hücre yaşayabilme %'sini (log ölçeği) göstermektedir;

Şekiller 20-22 Örnek 9'da açıklandığı gibi tekli veya ikili yüklenmiş ilaç ayrıştırma küreciklerine (sırasıyla) 24, 48 ve

10 72 saat maruz kaldıktan sonra (n=7 $\pm$ SD) yaşayabilen PSN1 hücrelerinin yüzdesini göstermektedir;

Şekiller 23-25 Örnek 9'da açıklandığı gibi tekli veya ikili yüklenmiş ilaç ayrıştırma küreciklerine (sırasıyla) 24, 48 ve

15 72 saat maruz kaldıktan sonra (n=4 $\pm$ SD) yaşayabilen HepG2 hücrelerinin yüzdesini göstermektedir;

Şekiller 26-28 Örnek 10'da açıklandığı gibi tekli veya ikili yüklenmiş ilaç ayrıştırma küreciklerine (sırasıyla) 24, 48 ve

72 saat maruz kaldıktan sonra (n=4 $\pm$ SD) yaşayabilen HepG2 hücrelerinin yüzdesini göstermektedir.

20

Örnek 1: İlaç Ayrıştırma Küreciklerinin Hazırlanması

Mikroküreler düşük AMPS ve yüksek AMPS formülasyonlarını üretmek için WO 2006027567'deki Referans Örneğinde açıklandığı

25 gibi sentezlenmektedir.

Örnek 2: İrinotekan Ve Doksorubisin Kombinasyonlarının Yüklenmesi Ve Ayrıştırılması

30 Örnek 1'deki 500-700 μ m Yüksek AMPS kürecikleriyle ilgili beş örnek aşağıdaki farklı yaklaşımları izleyerek doksorubisin ve irinotekanla yüklenmektedir:

Örnek 1: 3.5 mL irinotekan solüsyonu (Kampto, Pfizer, 20 mg.mL⁻¹ = 70 mg) tüm sülfonat gruplarını doyurmak için 48 saat

süreyle 1 mL küreciklere yüklenmektedir. Daha sonra, tükenen solüsyon çıkarılmaktadır ve yüklenen kürecikler bağlanmayan ilacı çıkarmak için bilinen yoğunluktaki iyonu giderilmiş suyla yıkanmaktadır. Küreciklere yüklenen irinotekan miktarı azaltılan solüsyondaki ilk ve son miktarlar arasındaki fark olarak azaltılarak hesaplanmaktadır ve tüm yıkamalar 369 nm dalga uzunluğunda UV ile ölçülmektedir. Bir mL doksorubisin (Dabur onkoloji-25 mg.mL⁻¹) daha sonra aynı küreciklere eklenmektedir ve yükleme profili belirlenmektedir.

Örnek 2: Örnek 1'e benzer olarak, ancak 2.8 mL doksorubisin (25 mg.mL⁻¹ = 70 mg) solüsyonu tüm sülfonat gruplarını doyurmak için birinci adımda irinotekan solüsyonunun yerine küreciklere eklenmektedir. Tüm solüsyonlar 483 nm dalga uzunluğunda UV ile ölçülmektedir ve küreciklere yüklenen ilaç miktarı azaltılarak belirlenmektedir. Kürecikler yüklendikten ve ikinci adımda iyonu giderilmiş suyla yıkandıktan sonra, 1.25 ml irinotekan solüsyonu (20 mg.mL⁻¹) = 25 mg) aynı küreciklere eklenmektedir ve yükleme profili belirlenmektedir.

Örnek 3: 1.25 mL irinotekan solüsyonu (20 mg.mL⁻¹ = 25 mg) 1 ml küreciğe yüklenmektedir ve 1 saat sonra 1 ml doksorubisin (25 mg.mL⁻¹) aynı küreciklere eklenmektedir. Bunda ve aşağıdaki örneklerde hiç ara yıkama gerçekleştirilmemektedir.

Örnek 4: 1 ml doksorubisin (25 mg.mL⁻¹) 1 ml küreciğe eklenmektedir ve 1 saat sonra 1.25 mL irinotekan solüsyonu (20 mg.mL⁻¹ = 25 mg) aynı küreciklere eklenmektedir.

Örnek 5: 1.25 ml irinotekan solüsyonu (20 mg.mL⁻¹ = 25 mg) 1 ml doksorubisinle (25 mg.mL⁻¹) karıştırılmaktadır ve daha sonra 1 ml küreciğe eklenmektedir.

Tüm örneklerdeki yükleme profillerini belirlemek için, 50 µl sıvı bölüntü her ilacın eklenmesinden 5, 15, 30, 45 dakika sonra her şişeden çıkarılmaktadır, gerektiği gibi seyreltilmektedir ve 483 ve 369 nm'de UV ile okunmaktadır. Her zaman noktasına yüklenen miktar karşılık gelen standart

eğriler kullanılarak azaltılarak belirlenmektedir.

Her iki ilacın da yüklenmesinden sonra, tüm örnekler Colorview
III kaydedici kamera kullanılarak kendi yükleme
5 solüsyonlarında boyutlandırılmaktadır ve resimler
çekilmektedir. Bunun için en az 100 kürecik ölçülmektedir. Bu
veriler normalleştirilebilmektedir ve karşılık gelen
histogramlar oluşturulmaktadır.

10 Boyutlandırıldıktan sonra tüm örnekler ayrıştırılmaktadır.
Burada kalan yükleme solüsyonları bir Pasteur pipeti
kullanılarak çıkarılmaktadır ve yüklenen kürecikler 200 ml PBS
içeren kahverengi şişelere aktarılmaktadır (Inverclyde
Biologicals). 5, 15, 30, 45, 60, 90. dakikalarda, 2. saatte,
15 4. saatte ve 24. saatte, ayrıştırma aracına ait sıvı bölüntü
(4 ml) çıkarılmaktadır ve yoğunluğu korumak için 4 ml taze PBS
ile değiştirilmektedir. Tüm örnekler her zaman noktasında
ayrıştırılan miktarı hesaplamak için karşılık gelen standart
eğriler kullanılarak 483 ve 368 nm'de UV ile okunmaktadır.

20

Hesaplamalar:

Aynı küreciklerden her iki ilacın da yüklemesini ve
ayrışmasını hesaplamak için aşağıdaki tahminler yapılmaktadır:

25 483 nm'de emilim = 483 nm'de doksorubisin emilimi

İrinotekan solüsyonunun UV taramasında bu ilacın bu dalga
uzunluğunda emilmediği gözlemlenmektedir.

369 nm'de emilim = 369 nm'de doksorubisin emilim + 369 nm'de
30 irinotekan emilim

Doksorubisin taraması 369 nm dalga uzunluğunda bir miktar
emilim sergilemektedir ve burada aynı zamanda ölçüldüğünde
irinotekan ile doksorubisin emilimi arasında etkileşim
35 olmadığı düşünülmektedir. Karışımla ilgili tarama her iki

ilacın emilim spektrumları arasında kayda değer herhangi bir etkileşim sergilememektedir.

5 Bu iki tahmin tüm hesaplamalar için yapılmaktadır. Tüm örnekler hem 483 nm hem de 369 nm dalga uzunluğunda okunmaktadır. 483 nm'de doksorubisinin emilim ve standart eğrisi kullanılarak, her örnekteki doksorubisin yoğunluğu hesaplanmaktadır ve bu yoğunluklar ve 369 nm'de doksorubinin standart eğrisi kullanılarak bu dalga uzunluğundaki doksorubin 10 emilimi hesaplanmaktadır. Daha sonra bu değer 369 nm'deki toplam emilimden çıkarılmasıyla, 369 nm'de emilim ve dolayısıyla irinotekan yoğunluğu hesaplanmaktadır.

İrinotekan Ve Doksorubinin Aynı Küreciklere Yüklenmesi

15 Bu deneylerin amacı küreciklerin etkileşim mekanizmalarını belirlemek ve ilaçlar arasındaki olası etkileşimleri değerlendirmek amacıyla farklı doksorubisin ve irinotekan kombinasyonlarının yükleme ve ayrıştırma davranışlarını 20 değerlendirmek ve karşılaştırmaktır. Her iki ilacın da başarılı şekilde aynı küreciklerle birleştirilmesi durumunda, gerektiğinde eş zamanlı olarak her iki tümör önleyici ilacın lokal salımına ulaşmak kolay olmaktadır.

25 Doksorubisin ve irinotekan yukarıda detaylandırılan farklı yaklaşımlar izlenerek yüklenmektedir ve sonuçlar aşağıdaki gibi sunulmaktadır:

Şekil 1'de görüldüğü gibi irinotekan önce maksimum bağlanma kapasitesinde yüklenirse ve daha sonra doksorubisin sisteme 30 eklenirse (Örnek 1), bir miktar irinotekan (~ %17) değiştirilmektedir; ancak ilacın büyük bir kısmı kürecikler tarafından tutulmaktadır. Doksorubisin önce maksimum bağlanma kapasitesinde yüklenirse ve daha sonra doksorubisin sisteme eklenirse (Örnek 2), daha az yüzde miktarına sahip

doksorubisin (< %8) irinotekanla değiştirilmektedir. Bu veriler, doksorubinle ilgili K_b değerlerinin irinotekan için hesaplanan değerlerden biraz daha yüksek olduğu (Gonzalez ve arkadaşları 2006) ve doksorubisinin aynı solüsyon yoğunluğunda irinotekandan daha az ve daha yavaş salındığı gerçeğiyle uyumludur. Her iki durumda da, bununla birlikte değiştirilen ilaç miktarı azdır ve her iki etkileşimin de ikinci ilacın eklenmesinden sonra sabit olduğunu belirtmektedir. Bu yükleme işleminde kolaylıkla doyurulan az yoğunlukta solüsyonun kullanılması ve Na^+ veya K^+ gibi küçük iyonlar tarafından deneyimlenmeyen bir fenomen olan ikinci ilaç yaklaşımının bağlanma alanlarını yapısal olarak engelleyen öncelikle bağlanan hacimli ilaç molekülünün bir sonucu olarak açıklanabilmektedir. Bu iki faktör eklenen ikinci ilaçla değiştirilen ilacın az yüzde miktarına katkıda bulunmaktadır.

Şekil 2'deki Örnek 3 ve 4, küreciklerin öncelikle 25 gr bir ilaçla yüklenmesi ve daha sonra 25 mg diğer ilacın eklenmesi durumunda oldukça az miktarda bağlı ilaç (<%5) sıradan bağımsız olarak ikinci ilacın eklenmesiyle değiştirildiğini göstermektedir. Küreciklerin maksimum yükleme kapasitesi sırasıyla doksorubisin ve irinotekan için ~ 40 mg ve 52 mg olduğu ve ikinci ilaç eklendiğinde (öncelikle 25 mg ilaç küreciklere eklenmektedir ve ardından 25 mg diğer ilaç eklenmektedir) küreciklerin bağlanma alanları doyurulmadığı için bu sonuçlar beklenmektedir.

Şekil 2'deki Örnek 5, her iki ilacın da aynı zaman yüklenmesi durumunda yükleme hızının ve yüklenen toplam miktarın doksorubisin için irinotekandan biraz daha yüksek olduğunu (eklenen toplam %94 oranında doksorubisin (25 mg) yüklenmektedir, buna karşın eklenen toplam %91 oranında irinotekan (25 mg) 2 saat sonra eklenmektedir) göstermektedir. Bu küçük fark kendi K_b değerlerinin bir sonucu olarak

açıklanabilmektedir; burada doksorubisin Kb değeri ($5.58 \cdot 10^8 - 1.02 \cdot 10^9$) irinotekandan biraz daha yüksektir ($8.73 \cdot 10^7 - 3.62 \cdot 10^8$).

5 Aynı Küreciklere Yüklenen İrinotekan Ve Doksorubisinin Boyutlandırılması

10 Farklı yaklaşımlarla her iki ilacın yüklendiği kürecikler arasında kayda değer herhangi bir fark saptanmamaktadır (Şekil 3).

Aynı Küreciklere Yüklenen İrinotekanın Ve Doksorubisinin Ayırıştırılması

15 Şekil 4 tüm örneklerin benzer ayırıştırma yöntemlerini izlediğini ve doksorubisinin 200 ml PBS içerisinde ayırıştırıldığında irinotekanla (<4 saatte > %99 mg) karşılaştırıldığında oldukça yavaş (24 saatte < %25) şekilde salınmaktadır.

20

Örnekler 1 ve 2'de diğer ilacın eklenmesinden önce bir ilacın doyma seviyesine kadar yüklendiği yerde, yüklenecek olan ikinci ilaç örnek 3 ve 4'dekinden daha hızlı salınmaktadır; burada her iki ilaç da aynı zamanda doyma seviyesinin altındaki küreciklere yüklenmektedir. Bu doymuş olan tüm sülfonat gruplarının neden olduğu yüklenecek olan ikinci ilacın kısmen bağlı yapısıyla açıklanabilmektedir (örnek 1 ve 2). Az miktarda yüklenen ikinci ilaç öncelikle ve çoğunlukla bağlı ilacın değiştirilmesiyle küreciklere bağlanmaktadır.

25

30

Yüklenen ilacın büyük bir kısmı küreciklerin içerisinde serbest (bağısız) olabilmektedir ve bağlı ilaçtan daha hızlı ayrılmaktadır.

Sonuçta doksorubisin ve irinotekan küreciklere aynı zamanda

veya ardışık olarak yüklendiğinde, diğer ilacın salım davranışında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemektedir. Ek ilaçların varlığı yüklemeye müdahale etmemektedir ve diğer ilacın salım davranışını değiştirmemektedir. Her ilaç tek başına her ilaç için oluşturulan bireysel ilaç ayrıştırma profillerinden beklendiği gibi ayrışmaktadır.

Ayrıştırılan solüsyonların UV profilleri gerçekleştirilmektedir ve yüklenmemiş doksorubisin ve irinotekan karışımıyla karşılaştırılmaktadır. Küreciklerin içinde ilaçlardan herhangi biriyle ilgili belirgin bir etkileşim veya değişim meydana gelmediğini onaylayarak uç noktaların şekli ve maksimum değerler değişmemektedir.

Bu deneyler her iki ilacın aynı küreciklerden aynı zamanda yüklenmesinin ve ayrıştırılmasının mümkün olduğunu göstermektedir. İki ilacın sürekli salımı bu üründen beklenmektedir. Bu iki tümör önleyici ilaç kombinasyonunun yüksek dozlu tek ilaçla tedaviden daha fazla terapötik etkisine ulaşması ve her iki ilacın yan etkilerini azaltması beklenmektedir. Bu potansiyel ürün canlı organizmada etkilerini sinerjistik, ek veya antagonistik olarak belirlemek üzere değerlendirilmektedir. Bu etki bireysel kemoterapi maddelerinin moleküler oranlarına ve uygulama programlarına bağlıdır (Aschele ve arkadaşları, 1998). Canlı organizma çalışmaları en iyi oranı belirlemek amacıyla farklı dozlardaki iki maddeyi değerlendirmek için gerçekleştirilmektedir. Bu deneyler her iki ilacın başarılı şekilde yüklenebildiğini ve bireysel olarak ilaçların salım profillerini değiştirmeden ve küreciklere birden fazla katyonik ilacın yüklenme olasılığını öneren aynı küreciklerin içerisinde ayrıştırılabildiğini ortaya çıkarmaktadır.

Örnek 3: Aynı Küreciklerde İbuprofen Ve Doksorubisinin Kombinasyonu

- İbuprofen ve doksorubisin solüsyonları eş zamanlı olarak düşük AMPS küreciklerilklerine yüklenmektedir. Buna ulaşmak amacıyla, 1 ml 500-700 µm küreciklerine ait bir örneğe
- 5 ibuprofen yüklenmektedir (WO 2004073688'deki örneklere göre). Fazla paketleme solüsyonu Pasteur pipeti kullanılarak çıkarılmaktadır ve 2 ml doksorubisin solüsyonu (5 mg.ml⁻¹) eklenmektedir. 24 Saat sonra, 50 µl sıvı bölüntü tüketilen solüsyondan çıkarılmaktadır ve 263 nm ve 483 nm'de UV yoluyla
- 10 ölçülmektedir. Küreciklere yüklenen doksorubisinin miktarı azaltılarak azaltılan solüsyondaki ilk ve son miktarlar arasındaki fark olarak hesaplanmaktadır (hesaplamalar aşağıda açıklanmaktadır).
- 15 Her iki ilaçla yüklendikten sonra, tüketilen yükleme solüsyonu çıkarılmaktadır ve yüklenen kürecikler 200 mL PBS içeren kahverengi şişelere aktarılmaktadır. 5, 45, 90. dakikalarda, 3, 5 ve 24. saatlerde, 2 ml elüsyon aracı çıkarılmaktadır ve yoğunluğu korumak için 2 ml taze PBS ile değiştirilmektedir.
- 20 Tüm örnekler 263 ve 483 nm'de UV yoluyla okunmaktadır ve her zaman noktasında ayrıştırılan her ilaç miktarı karşılık gelen standart eğriler kullanılarak hesaplanmaktadır.

Hesaplamalar:

- 25 Aynı küreciklerden her iki ilacın yüklemesini ve ayrıştırılmasını hesaplamak için, aşağıdaki tahminler yapılmaktadır:

483 nm'de emilm = 483 nm'de doksorubisin emilimi.

- 30 İbuprofen ve doksorubisinle ilgili UV taramaları, sadece doksorubisinin bu dalga uzunluğunda emildiğini göstermektedir. 263 nm'de emilim = 263 nm'de doksorubisin emilimi + 263 nm'de ibuprofen emilimi.

Doksorubisin UV taraması 263 nm dalga uzunluğunda bir miktar emilim göstermektedir. Aynı zamanda ölçüldüğünde doksorubisin ile ibuprofen emilimi arasında herhangi bir etkileşim
5 olmamasıyla ilgili tahminde bulunmaktadır.

Bu iki tahmin tüm hesaplamalar için yapılmaktadır. Tüm örnekler her iki dalga uzunluğunda (263 nm ve 483 nm) okunmaktadır. 483 nm'de emilim kullanılarak, her örnekteki
10 doksorubisin yoğunluğu hesaplanmaktadır; daha sonra 263 nm'de bu yoğunlukları ve standart doksorubisin eğrisi kullanılarak 263 nm'de doksorubisin emilimi hesaplanmaktadır. Bu değer 263 nm'de toplam emilimden çıkarılmasıyla, ibuprofen yoğunluğu ibuprofen standart eğrisi kullanılarak hesaplanmaktadır.

15

Küreciklerde Doksorubisin Ve İbuprofen Kombinasyonlarının Yükleneş ve Salımı

Birinci deney dizisinde, doksorubisin ve ibuprofen aynı
20 küreciklerle birleştirilmektedir ve salım davranışları değerlendirilmektedir.

Öncelikle, WO 2004073688'de açıklandığı gibi liyofilize kürecikler çözücü buharlaştırılmasıyla ibuprofen/etanol
25 solüsyonuyla yüklenmektedir ve daha sonra 121°C'de 15 dakika süreyle suyu tekrar kazandırılmaktadır ve basınçlı kapta kürlenmektedir. Suyu yeniden kazandırılan ibuprofen yüklü kürecikler daha sonra 24 saat süreyle doksorubisin solüsyonuna (5 mg.ml⁻¹) daldırılarak doksorubisinle yüklenmektedir. Bu
30 deneyde, maksimum miktardaki 8.3 mg doksorubisin yükleme solüsyonunun yoğunluğunun azaltılmasıyla hesaplanan küreciklere yüklenmektedir. Düşük AMPS kürecikleri tek başına bu ilaç yüklendiğinde -14 mg.ml⁻¹ doksorubisin için maksimum kapasiteye sahiptir. Bu maksimum miktar küreciklerde bulunan

bağlanma alanı sayısı ile sınırlandırılmaktadır. Örneğe daha fazla miktarda ilaç eklenirse, küreciklerdeki tüm sülfonat grupları doyurulduğu için bu yüklenmemektedir.

5 Aynı küreciklerden her iki ilacın salınması aynı zamanda UV spektrofotometriyle izlenmektedir, salınan her iki ilaç için elüsyon profili Şekil 5'de gösterilmektedir. Her iki ilaç sadece ilaçlardan biriyle yüklenen küreciklerde gözlemlenen aynı salım profillerine sahiptir ve iki ilaç arasında hiç etkileşim gözlemlenmemektedir. Bu deney eş zamanlı olarak iki 10 ilacın sürekli salımı için bir platform önererek, her iki ilacın aynı küreciğe yüklenebildiğini ve salınabildiğini göstermektedir. Bir ilacın uygulanmasıyla her iki ilacın terapötik etkisi eklenerek bu bir ilaç salım cihazı olarak 15 faydalı olabilmektedir. Bu tedavi prosedürlerin izlenmesiyle analjezik ilaç gereksinimlerini azaltabilmektedir ve her iki ilaç kombinasyonu ile sinerjistik tümör önleyici sonuçlar gösterildiğinde daha toksik ilacın dozunu azaltabilmektedir.

20 **Örnek 4: Aynı Küreciklerdeki Doksorubisin Ve Rapamisin Kombinasyonu**

Yükleme yöntemleri: İki yükleme yöntemi Şekil 6'da gösterildiği gibi test edilmektedir.

25

Yöntem 1

1 ml yüklenmemiş yüksek AMPS kürecik solüsyonuna gece boyunca doksorubisin solüsyonu (5 ml 10.07 mg/ml, hedef yüklem 50 30 mg/ml kürecik) yüklenmektedir. Doksorubisin yüklü kürecikler ekstra suyu çıkarmak için 1 ml DMSO ile beş kez yıkanmaktadır ve 1 ml 60 mg/mL rapamisin DMSO solüsyonu yaklaşık olarak 30 dakika süreyle doksorubisin kürecikleriyle karıştırılmaktadır. Ardından ekstra rapamisin DMSO solüsyonunun çıkarılmasını 35 takiben, kürecikler hiç beyaz ilaç parçacığı gözlemlenmeyene

kadar 5 ml tuzlu suyla yıkanmaktadır.

Yöntem 2

5 1 ml kürecik solüsyonu beş kez 1 mL DMSO ile yıkanmaktadır ve
30 dakika süreyle 1 ml 60 mg/ml rapamisin DMSO solüsyonuyla
karıştırılmaktadır. Yüklenen kürecikler daha sonra hiç başka
beyaz ilaç parçacığı gözlemlenmeyene kadar 5 ml tuzlu suyla
yıkanmaktadır. 0.5 ml rapamisin yüklü kürecik bulamacı gece
10 boyunca 2.5 ml 10.07 mg/ml doksorubisin solüsyonuyla
döndürülerek karıştırılmaktadır; hedef doksorubisin yükleme 50
mg/ml'dir.

Doksorubisin yükleme testi: Doksorubisin yüklemesi suda veya
DMSO solüsyonunda tüketme yöntemiyle ölçülmektedir. Yükleme
15 solüsyonu alınmaktadır ve 10 kez seyreltilmektedir ve
solüsyondaki doksorubisin kalıntısının yoğunluğunu belirlemek
için 483 nm'de UV yoluyla ölçülmektedir.

Rapamisin yükleme testi: Tek başına rapamisinli kürecikler
için, 0.5 ml rapamisin yüklü kürecikler (1.adımdan, Yöntem 1)
20 1 ml DMSO ile 5 kez ekstrakte edilmektedir ve solüsyon 10 ml
volümetrik şişede toplanmaktadır. Rapamisin yoğunluğu 279
nm'de UV yoluyla belirlenmektedir.

Doksorubisin ve rapamisin kombinasyonlu kürecikler için, 0.26
25 ml ilaç yüklü kürecikler (2.adımdan, Yöntem 2) 1 ml DMSO ile 4
kez ekstrakte edilmektedir ve özüt 5 ml volümetrik şişede
toplanmaktadır ve DMSO işaretin olduğu solüsyonun üstüne kadar
eklenmektedir. Rapamisinin yoğunluğu 279 nm'de doksorubisin
emiliminin 279 nm'de toplam emilimden çıkarılmasıyla
30 belirlenmektedir; burada 279 nm'de doksorubisin Emilimi
yoğunluğu bilinen solüsyonların taramasına göre 483 nm'de
hesaplanmaktadır.

Doksorubisin kaybının belirlenmesi: Diğer rapamisin
eklemesinden önce (Yöntem 2) yüklenen küreciklerin DMSO ile
35 yıkanması işlemi süresince oluşan doksorubisin kaybı 483 nm'de

volümetrik şişede biriken DMSO yıkama solüsyonunun ölçülmesiyle belirlenmektedir.

İlaç yüklü küreciklerin ayrıştırılması: İlaç yüklü küreciklerin ayrıştırılması 200 ml PBS ile küreciklerin 5 karıştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir (Inverclyde, bellshill, UK) ve döner bir mikserde döndürülerek karıştırılmaktadır. Belirli bir zaman noktasında, solüsyon (10 ml veya 150 ml) UV yoluyla yoğunluk saptaması için alınmaktadır ve aynı yoğunluktaki taze PBS batma durumunu 10 korumak için eklenmektedir. Rapamisin yoğunluğunun belirlenmesini işlemini Rapamisin Yükleme Testinin bir bölümündeki aynı prensip izlemektedir.

Görüntü analizi ve boyutlandırma: Yüklenen kürecikler Olympus mikroskopuna yerleştirilmektedir, yaklaşık 200 kürecik 15 yazılımla (AnalySIS 5.0 Soft Image System GmbH) boyut dağılımı çalışması açısından sayılmaktadır ve morfoloji çalışması için farklı ışık/kontrast arka planı altında fotoğraflar çekilmektedir.

Rapamisin ve doksorubisin standart eğrisi: Maksimum rapamisin 20 Emilimi 279 nm dalga uzunluğundadır, bu doksorubisin Emilimiyle örtüşmektedir. Doksorubisinin maksimum emilim dalga uzunluğu olan 483 nm'de rapamisin hiç emilime sahip değildir. Bu sebeple, biyo-bileşen sistemindeki (doksorubisin ve rapamisin) rapamisin yoğunluğu her iki dalga uzunluğunda 25 standart doksorubisin solüsyonlarının ilk ölçümüyle belirlenebilmektedir; daha sonra karışım emiliminden doksorubisin Emilimi çıkarılmaktadır. Standart eğriler suda ve DMSO'da 279 ve 483 nm'de doksorubinden yaratılmaktadır.

Doksorubisin Emiliminin çıkarılmasından sonra rapamisin 30 yoğunluğu 279 nm altında verilen bağıntıyla belirlenebilmektedir:

$$\text{Emilim} = 56.18 \times \text{Yoğunluk (mg/ml)} \quad [\text{DMSO'da}]$$

$$\text{Emilim} = 44.64 \times \text{Yoğunluk (mg/ml)} \quad [\text{suda}]$$

İki yükleme prosedüründeki ilaç yükleme karşılaştırması

Yöntem 1'deki 1. adımda, rapamisin 28.48 mg/ml'de
5 yüklenmektedir; yükleme etkinliği yaklaşık olarak %47.5'dir
(Tablo 1). Yöntem 2'deki 2. adımdaki rapamisin yüklemesiyle
karşılaştırıldığında, 37.22 mg/ml rapamisin yüklenmektedir;
yükleme etkinliği %62.0'dir. Bu belirgin ölçüde yüksek
etkinlik, doksorubisin yüklü küreciklerin daha fazla şiştiği
10 ve rapamisin yükleme solüsyonunun çoğunun küreciklere emilmesi
gözlemiyle tutarlıdır. Mekanizma bakış açısından, doksorubisin
yüklü kürecikler daha küçük boyuta sahiptir ve doksorubisin
yükleme solüsyonunda veya tuzlu suda gözlemlenen azaltılmış
tuz etkisi nedeniyle su ve DMSO gibi polar çözücülerde daha
15 fazla şişme eğilimi göstermektedir.

Rapamisin yüklenen kürecikler için (28.48 mg/ml), doksorubisin
yükleme özelliğinin rapamisin içermeyen küreciklere benzer
şekilde 46.02 mg/ml olduğu bulunmaktadır. Doksorubisin yükleme
20 işlemi süresince, hiç rapamisin sızıntısı gözlemlenmemektedir.
Bu deney, ön rapamisin yüklemesinin sonraki doksorubisin
yüklemesini etkilemediğini öner sürmektedir; bu iki ilacın
küreciklerin içinde farklı alanlar işgal ettiği anlamına
gelmektedir. Doksorubisin molekülleri iyonik etkileşimle
25 sülfonat gruplarının alanına bağlanma eğilimi göstermektedir;
bununla birlikte rapamisin suyun dışarı atılmasıyla ve küçük
ilaç kristallerinin oluşturulmasıyla hidrojen içindeki dokular
arası alanda kalmaktadır.

30 Tablo 1. İki yöntemle rapamisin ve doksorubisin yüklemesi^a

Örnek listesi	Doksorubisin yüklemesi (mg/ml ^b)	Rapamisin yüklemesi (mg/ml ^b)
1.adım, Yöntem	-	28.48

1'deki rapamisin yüklemesi		
1.adım, Yöntem 2'deki doksorubisin yüklemesi	45.88	-
2.adım, Yöntem 1'deki doksorubisin yüklemesi	46.02	28.48 ^c
2.adım, Yöntem 2'deki rapamisin yüklemesi	39.17 ^d	37.22
^aTabloda gösterilen veriler iki kopyanın ortalama değerleridir. ^bTüm ilaç yükleme verileri ilaç yükleme olmadan küreciklerin yoğunluğunu normalleştirmektedir. ^cDoksorubisin yüklemesi süresince hiç rapamisin kaybı gözlemlenmemektedir, bu sebeple 1.adımdakiyle aynı veriler kullanılmaktadır. ^dRapamisinin ön yüklemesinde DMSO yıkama işlemi süresince doksorubisin kaybı 6.71 mg/ml'dir. Rapamisin yüklemesi süresince diğer doksorubisin kaybı önemsizlenmemektedir.		

Yöntem 2'de bu yöntemin daha fazla rapamisin yüklemesine sahip olmasına rağmen, rapamisin yüklemesinden önce doksorubisin yüklü küreciklerin DMSO ile yıkanması yaklaşık olarak 6.71 mg/ml doksorubisin kaybına neden olmaktadır. Son doksorubisin-rapamisin oranı Yöntem 1'deki kürecikler için 1.62'dir ve Yöntem 2'deki kürecikler için 1.05'dir.

İşlevsel bakış açısından, Yöntem 1 nispeten temiz bir prosedürdür ve sadece rapamisin atık solüsyonu üretmektedir.

Yöntem 2 hem doksorubisin-DMSO hem de rapamisin atık solüsyonunu üretmektedir. Yöntem 1'deki doksorubisin yüklemesi neredeyse tamamlanmaktadır ve Yöntem 1 ayrıca nispeten işlenmesi kolay bir prosedürdür. Yöntem 2'deki yüksek rapamisin yüklemesine rağmen, Yöntem 1 önerilmektedir.

İlaç yüklü küreciklerin görüntü analizi ve boyut dağılımı

Yöntem 1'deki rapamisin ve rapamisin-doksorubisin yüklemesinden sonra fotoğraflar çekilmektedir. Bu küreciklerin yüklemeden sonra kendi düzgün yüzeylerini ve küresel şekillerini iyi koruduğu görülmektedir. Bazı küçük rapamisin parçacıkları gözlemlenmektedir, bunlar 1.adımdan kalıntılardır. Doksorubisin yüklü kürecikler az miktarda küresel şekil kaybını deneyimlemektedir. Rapamisinle ek yüklemeden sonra, şekil oldukça iyileştirilmektedir ve yüzeyleri düzgündür. Yöntem 1'deki son küreciklerle karşılaştırıldığında, Yöntem 2'deki kürecikler hafif kırmızı renge sahiptir, bu DMSO ile yıkama işlemi sonrasında doksorubisin kaybı nedeniyle veya daha sonra yüklenen rapamisin kaplaması nedeniyle olabilmektedir.

DC kürecik ve ilaç yüklü küreciklerin boyut özellikleri Tablo 2'de listelenmektedir ve boyut dağılımı Şekil 7'de gösterilmektedir. Tablo 2'den, Yöntem 1'deki rapamisin yüklü kürecikler yüklenmeyen küreciklerle karşılaştırıldığında az artan büyüklüğe sahiptir. Doksorubisinle bir kez yüklendiğinde, ortalama büyüklük yaklaşık olarak 100 µm azaltılmaktadır. Yöntem 2'de, doksorubisin yüklü kürecikler en küçük ortalama büyüklüğü sergilemektedir. Rapamisinle yüklendikten sonra boyut, Yöntem 1'deki son kürecik büyüklüğüne yakın olan yaklaşık 479 µm artmaktadır. Bu sırada Tablo 2'deki standart sapma, boyut dağılımı aralığının ilaç yükleme işlemi süresince neredeyse hiç değişme göstermediğini

belirtmektedir. Bu sebeple, iki yöntem neredeyse aynı boyut aralığına sahip son kürecikler verilmektedir (Şekil 7).

Tablo 2. Yüksüz ve ilaç yüklü küreciklerin boyut özellikleri

Örnek listesi	Maksimum boyut (µm)	Minimum boyut (µm)	Ortalama boyut (µm)	Standart sapma (µm)
Yüksüz kürecikler	645	451	546	46
1.adım, Yöntem 1'de rapamisin yüklendikten sonra	662	471	560	48
1.adım, Yöntem 2'de doksorubisin yüklendikten sonra	518	365	444	39
2.adım, Yöntem 1'de doksorubisin yüklendikten sonra	532	360	466	36
2.adım, Yöntem 2'de rapamisin yüklendikten sonra	562	402	479	40

5

Yüklenen küreciklerden ilaç ayrıştırılması

Şekil 8 PBS'ye yüklenen küreciklerden doksorubisin ve rapamisinle ilgili verilerin ayrıştırılmasını göstermektedir.

Bu deneyde ayrıştırma aracı batma koşullarını taklit etmek için belirli bir süre sonra tazelenmektedir. Şekil 8 (B) ve (D)'den, farklı yöntemlerle yapılan küreciklerin ilaç ayrıştırma profilleri oldukça benzerdir: rapamisin 30 saatlik ayrıştırma işleminden sonra yaklaşık olarak %33 salınmaktadır ve doksorubisin yaklaşık olarak %41-46 salınmaktadır.

Şekil 8 (A) ile (C) karşılaştırıldığında, Yöntem 1'de yapılan küreciklerdeki doksorubisin Yöntem 2'de yapılan küreciklerdekinden az miktarda daha hızlıdır. Rapamisin ayrıştırma için, ters fenomen gözlemlenmektedir. Bu birinci ilacın yolunu kaplayan veya bloke eden daha sonra yüklenen ilaç nedeniyle olabilmektedir, bu ayrıca birinci ilaç ayrıştırma işlemi için kullanılmaktadır.

Örnek 5: Aynı Kürecikteki İrinotekan Ve İbuprofen Kombinasyonu

İlaç yükleme: İlaç yükleme prosedürü Şekil 9'da gösterilmektedir, burada yüksüz yüksek AMPS kürecikleri hidrojelde hapsedilen suyu çıkarmak için DMSO ile yıkanmaktadır. DMSO'da çözölen ibuprofen ve kristalizasyon inhibitörü olarak hint yağına ait karışım ardından kürecik bulamacıyla karıştırılmaktadır ve yaklaşık olarak 10 dakika tutulmaktadır. Yükleme solüsyonunun çıkarılmasını takiben, hiç ilaç parçacığı kalmayana veya büyük yağ damlacığı gözlemlenmeyene kadar yüklü küreleri yıkamak için tuzlu su kullanılmaktadır. İrinotekan yükleme işlemine gece boyunca döner-mikserde ibuprofen yüklü küreciklerin irinotekan solüsyonuyla (10 mg/mL) basit şekilde karıştırılmasıyla ulaşılmaktadır. Son yüklenen kürecikler ürün olarak su solüsyonunda tutulmaktadır.

İbuprofen-irinotekan küreciklerine ait örnek matris Tablo 3'de listelenmektedir.

Tablo 3. İbuprofen-irinotekan yüklemeyle ilgili örnek matris

Örnek	İbuprofen yükleme solüsyonu bileşimi			İrinotekan yükleme solüsyonu (10.07 mg/mL)
	İbuprofen (gr)	DMSO (ml)	Hint yağı (gr)	İrinotekan solüsyonu yoğunluğu (ml)
Örnek 5-1	0.8	5	5	4
Örnek 5-2	0.4	5	5	4
Örnek 5-3	0.2	5	5	4
Örnek 5-4	0.8	2.5	7.5	4

Küreciklerdeki ilaç içeriğinin belirlenmesi:

- 5 1)İbuprofen. Yüklene ibuprofen içeriği HPLC yöntemiyle belirlenmektedir. Bilinen yoğunluğa sahip ilaç yüklü küreciklere ait bulamaç beş-altı kez DMSO (1 ml) ile ekstrakte edilmektedir. Toplanan DMSO solüsyonu 10 ml volümetrik şişede işarete çıkarılmaktadır ve ibuprofen yoğunluğu HPLC yoluyla
- 10 ölçülmektedir.
- 2)İrinotekan. Yüklene küreciklerdeki irinotekan içeriği tüketme yöntemiyle ölçülmektedir. 1-1.1 ml ibuprofen yüklü kürecikler 40 mg/ml küreciklerdeki yükü hedeflemek için 4 mL 10 mg/ml irinotekan solüsyonuyla gece boyunca döndürülerek
- 15 karıştırılmaktadır. Yükleme solüsyonu suyla seyreltilmektedir ve 369 nm'de UV ile ölçülmektedir. Standart eğriyle karşılaştırıldığında, yükleme solüsyonunda kalan irinotekan yoğunluğu hesaplanabilmektedir.

İlaç yüklü küreciklerin ayrıştırılması:

İbuprofen-irinotekan yüklü küreciklerin ayrıştırılması işlemi 200 ml PBS ile (Inverclyde, Bellshill, İngiltere) 0.24 ml küreciklerin karıştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir ve döner bir mikserle döndürülerek karıştırılmaktadır. Belirli bir zaman noktasında, solüsyon (5 ml) UV yoluyla yoğunluğu belirlemek için gerçekleştirilmektedir ve aynı yoğunluktaki taze PBS batma koşulunu korumak üzere eklenmektedir.

Görüntü analizi ve boyutlandırma:

Yüklenen kürecikler bir Olympus mikroskopuna yerleştirilmektedir, yaklaşık 200 kürecik yazılımla (AnalySIS 5.0 Soft Image System GmbH) ile boyut dağılımı açısından sayılmaktadır ve morfoloji çalışması için farklı ışık/kontrast arka planı altında fotoğraflar çekilmektedir.

İbuprofen ve irinotekan kombinasyonunun yoğunluğunun belirlenmesi:

Birleşik ilaç solüsyonundaki her bileşenin yoğunluğunu belirlemek için, su içerisinde 263, 272 ve 369 nm'de önceden belirlenen ibuprofen ve irinotekan yoğunluklarının emilimiyle ilgili standart eğriler ölçülmektedir. Prensip, önce ibuprofenin hiç emilime sahip olmadığı 369 nm'de emilimden irinotekan yoğunluğunu belirlemektir. Daha sonra ibuprofen yoğunluğu 272 nm'de irinotekan emiliminin ilaç karışımına ait spektrumdan çıkarılmasıyla hesaplanabilmektedir. Yaygın olarak kullanılan 263 nm yerine 272 nm kullanılması ilaç yüklemede DMSO kalıntısının olası karışması durumunun azaltılmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte, ibuprofen emiliminin ibuprofenin düşük suda çözünürlüğü nedeniyle irinotekanla karşılaştırıldığında çok daha azdır ve ibuprofenin uç noktası tamamen irinotekanla kaplanmaktadır. Bu sebeple ibuprofen-

irinotekan karışımındaki ibuprofen yoğunluğunu belirlemek için UV'nin kullanım şekli doğru değildir. Bu çalışmada, irinotekan yoğunluğu UV ile ölçülmektedir ve ibuprofen yoğunluğu HPLC ile ölçülmektedir.

5

İbuprofen ve irinotekanın küreciklere yüklenmesi

Birinci adımda ibuprofenle yüklü tüm örnekler kendi küresel şeklinde kalmaktadır ve herhangi bir ibuprofen kristalinin oluştuğu görülmemektedir. İrinotekan yüklemesinden sonra, Yüksek ibuprofen yüklemesine sahip Örnek 5-1 kürecik yüzeyinde görülen fazla miktarda ibuprofen kristallerine sahiptir. Karşılaştırmalı olarak, aynı miktarda ibuprofene sahip Örnek 5-4 gözlemlenen herhangi bir kristale sahip değildir; bu küreciklerde bulunan yüksek hint yağı kristalizasyon inhibitörü içeriğinin etkisi nedeniyle olmaktadır. Bu sebeple, hint yağı kristal oluşumunun önlenmesiyle ibuprofen kristallerinin oluşumunu engellemek için bir ekspiyan olarak işlev görmektedir.

20

Tablo 4 her örnekteki ilaç yüklemesini listelemektedir. Tüm örneklerdeki irinotekan yüklemesi %100'e yakındır, yüklenmemiş küreciklerle ilgili maksimum irinotekan yükleme kapasitesi 50-60 mg/ml'ye yakındır ve bunun altındaki yükleme etkinliği %98'in üzerindedir.

25

Tablo 4. Yüksüz Küreciklerde İlaç Yükleme

Örnek	Hedef ibuprofen yüklemesi* (mg/ml)	Gerçek ibuprofen yüklemesi (mg/ml)	Hedef irinotekan yüklemesi (mg/ml)	Gerçek irinotekan yüklemesi (mg/ml)
Örnek 5-1	40	14.34**	40.28	40.28
Örnek 5-2	20	10.41	40.28	40.28
Örnek 5-3	10	5.79	40.28	40.28

Örnek 5-4	40	11.68	40.28	40.28
*Veriler yaklaşık 10 ml olarak işlem gören hint yağının ve DMSO'nun toplam yoğunluğuna göre tahmin edilmektedir.				
**Kürecik yüzeyindeki ibuprofen kristalini içermektedir.				

İbuprofen yüklemesi nispeten düşüktür ve tahmin edilen yükleme etkinliği %29 ile %58 arasındadır. İbuprofen yüklemesinin düşük hedefi nispeten yüksek yükleme etkinliği vermektedir.

- 5 Nispeten düşük ibuprofen yüklemesinin nedeni, kürecikler hint yağı açısından zengin solüsyonla temas ettiğinde meydana gelen kürecik boyutunda çekmeye dayanmaktadır. Dolayısıyla ilaç yüklemesi daha az kürecik yoğunluğuyla azalmaktadır.

10 İlaç yüklü küreciklerin boyut dağılımı

İlaç yüklü küreciklerin boyut dağılımı Şekil 10'da gösterilmektedir. Karşılık gelen parametreler Tablo 5'de listelenmektedir. İbuprofen yüklü kürecikler ilaç yükleme olmadan 500 ila 700 μm arasında DC Küreciğiyle aynı büyüklüğü neredeyse korumaktadır. Bununla birlikte boyut ilaç yüklü küreciklerin artan hidrofobisitesi nedeniyle irinotekan yüklemesiyle belirgin olarak azalmaktadır, ortalama boyut azalması yaklaşık 140-150 μm 'dir. İbuprofen yüklemesine bağlı 20 değişikliğe sahip küreciklerin neredeyse aynı ortalama büyüklüğe ve boyut dağılımına sahip olduğu belirtilmektedir.

Tablo 5. İlaç yüklü kürecikler için boyut dağılımı karşılaştırması

Örnek	Yüklenen ilaç	Boyut _{maks} (μm)	Boyut _{min} (μm)	Boyut _{ortalama} (μm)	SD (μm)
849BB/20-1	IBU*	690	476	589	53.5
849BB/20-1	IBU- IRI**	549	340	448	41.7

849BB/20- 2	IBU	688	470	592	47.4
849BB/20- 2	IBU-IRI	510	354	432	33.6
849BB/20- 3	IBU	670	474	585	56.0
849BB/20- 3	IBU-IRI	532	371	444	43.7
849BB/20- 4	IBU-IRI	527	362	446	36.1
*IBU: ibuprofen **IRI: irinotekan					

İlaç yüklü küreciklerin morfolojisi

Örnek 5.1'deki ibuprofen yüklü küreciklere ait mikrograf, 5 yüklenen kürecik yapısının ibuprofen ve hint yağı içeren büyük bir çekirdek alanından ve ilaç ve yağ içermeyen kürecik yüzeyine ait bir katmandan oluştuğunu göstermektedir. Küreciklerin içine hapsedilen hint yağı ibuprofeni tutmak ve ibuprofen kristallerinin oluşmasını engellemek için hidrofobik 10 fazı sağlamaktadır. Birinci yükleme adımında ibuprofenli diğer Örnekler 5*2, 5.3 ve 5.4 burada gösterilen aynı yapıya sahiptir. Buna ek olarak, küreciklerin arasında bazı küçük yağ damlacıkları gözlemlenmektedir; bunlar solüsyondaki hint yağına ve ibuprofene ait karışımın kalıntılarıdır.

15

İrinotekan gece boyunca dönerek karıştırma yoluyla yüklendiğinde, Örnek 5.1'deki küreciklerin yüzeyinde ibuprofen kristalleri gözlemlenmektedir ve kristal oluşması sonucunda kürecik toplanması meydana gelmektedir. Kristalleşme diğer 20 örneklerde bulunmamaktadır. Fenomen küreciklerdeki yüksek ibuprofen içeriğinden kaynaklanmaktadır ve irinotekan yüklendiğinde kristal oluşumunu engellemek için yeterli hint

yağı bulunmamaktadır. İrinotekanın küreciklerdeki AMPS grubuyla etkileşimde olmasına rağmen, hali hazırda hidrofobiktir ve hint yağında kısmen çözünme eğilimi gösterebilmektedir; bu ibuprofenin çözünürlüğünü azaltabilmektedir. Örnek 5.4'deki üründe, irinotekan yüklemesinden sonra yüksek hint yağı seviyesiyle ve yüksek ibuprofen yüklemesiyle hiç ibuprofen kristali gözlemlenmemektedir.

10 İlaç yüklü küreciklerin ayrıştırılması

Şekiller 11 ve 12 25 °C'de PBS içerisindeki küreciklerden irinotekanın ve ibuprofenin ayrışma profilini göstermektedir. Şekil 11'de, farklı hint yağı içeriği ve ibuprofen yüklemesi altında irinotekan ayrışma oranı neredeyse aynıdır. İrinotekanın ayrışma hızı ayrıca tek başına irinotekanın ayrışma hızıyla karşılaştırılabilmektedir; burada ilacın neredeyse %100'ü 5 saat sonra ayrıştırılmaktadır. Bu, hint yağı ve ibuprofen yüklemesinin irinotekan solüsyonu üzerinde hiç etkisi olmadığını ve ibuprofen ile irinotekan arasında hiç etkileşim olmadığını belirtmektedir. Şekil 12'de ibuprofen ayrışması PBS içerisinde 1-2 saat sonra tamamlanmaktadır. Tek ilaç yüklü küreciklerden ibuprofen ayrışmasıyla karşılaştırıldığında, ayrışma tekrar hiç ilaç etkileşiminin oluşmadığının belirtildiği durumla aynıdır.

Örnek 6: İnsan HCC Hücreleri (Referans) Kullanılarak Doksorubisin Yüklü Küreciklerin Laboratuvar Ortamında Sitotoksosite Değerlendirmesi

Doksorubisin kürecikleri (500-700 µm) WO 04071495'deki Örnek 2'de anahatları çizilen yöntemlere göre hazırlanmaktadır. İnsan hepatoselüler karaciğer karsinom (HepG2) hücre çizgisine sahip hücre kültür aracındaki doksorubisin yüklü küreciklerin

ayrışması izlenmektedir. 24, 48 ve 72. saat zaman noktalarında HepG2 hücre çizgisi üzerindeki sitotoksisite etkilerini değerlendirmek için Promega laktat dehidrogenaz (LDH) deneyi kullanılmaktadır.

5

Deney hazırlama

Aseptik koşullar kullanılarak, üç steril düz tabanlı 96 çukurlu plakalar (Cellstar® 655180) 200 µl araca 20,000 HepG2 hücreleri ekilmektedir ve 20 saat süreyle inkübatörde bırakılmaktadır (37°C, %5 CO₂). İnkübasyon işleminden sonra, araç çukurların hepsinden dikkatli biçimde emilmektedir ve 200 µl PRF aracı çukurlara eklenmektedir. Bir, üç ve on adet önceden yüklenmiş doksorubisin kürecikleri (kürecik ml başına 37.5 mg) 96 çukurlu bir plakada 200 µl fenol kırmızısı hücre aracında aseptik koşullar altında sayılmaktadır.

10
15

Doksorubisin ayrıştırma deneyi

Plaka 37°C'de %5 CO₂ ile inkübe edilmektedir. 24, 48, ve 72. saat zaman noktalarında, 100 µl her çukur 490 nm'de taranmaktadır (Biotek, ELX800). Ayrışma standart bir kalibrasyon eğrisiyle ilgili soğurumun karşılaştırılmasıyla hesaplanmaktadır.

25

Daha uzun sürelerde ve daha fazla kürecik sayısında, daha fazla doksorubisin hücre kültür aracına salınmaktadır (Şekil 13). Ayrıştırma profili farklı kürecik sayıları için farklıdır; daha sonraki bir zaman diliminde 10 kürecik için platolar hücre kültür aracının doksorubisinle doyurulması nedeniyle oluşabilmektedir.

30

Hücre canlılığı deneyi

Bu deney ölü hücre debisi suyla çıkarıldıktan sonra kalan canlı hücrelerden salınan LDH miktarını ölçmektedir. Canlı hücre zarlarının hücrelerin dondurulmasıyla uyuşmasından sonra LDH salınmaktadır.

5

Her zaman noktasında, araç ve kürecikler orijinal plakadan dikkatli biçimde emilmektedir ve 200 µl steril PBS eklenmektedir ve herhangi bir artık doksorubisin hücrelerini yıkamak için üç kez çıkarılmaktadır ve debrisin üzerinde

10

bırakılmaktadır. 200 µl PRF aracı plaka bir saat süreyle -80°C'ye maruz bırakılmadan önce eklenmektedir; bu kasıtlı olarak hücre zarlarının tümünü kapsamaktadır, tüm laktat dehidrogenaz enzimini kalan canlı hücrelerden salmaktadır. Dondurucudan çıkarılarak, plaka otuz dakika süreyle standart

15

koşullar altında (37°C, %5 CO₂) bir inkübatöre hızlı şekilde yerleştirilmektedir. 50 µl süzüntü tüm çukurlardan ilgili taze çukurlara çıkarılmaktadır, ardından 50 µl LDH deney substrat karışımıyla (Promega) izlenmektedir. Hücreleri içeren orijinal plaka ayrıca analiz için tutulmaktadır. Taze plaka karanlıkta

20

oda sıcaklığında bırakılmaktadır. 30 Dakika sonra, 50 µl durdurma solüsyonu (asetik asit (1M)) reaksiyonu sonlandırmak için eklenmektedir. Plaka daha sonra 490 nm'de bir plaka okuyucu kullanılarak okunmaktadır; okuma değeri çok yüksekse (>3), solüsyon 75 µl süzüntü ve 75 µl PRF aracının alınmasıyla

25

seyreltilmektedir. Uyuşan hücrelerin yüzdesi hesaplanmaktadır.

Canlı hücre sayısı azalmaktadır, çünkü önceden yüklenen doksorubisin DC küreciklerine maruziyet durumu ve sayısı artmaktadır (Şekil 14).

30

Örnek 7: Laboratuvar ortamında doksorubisin küreciklerine ve rapamisin küreciklerine ait kombinasyonun sitotoksitesisi

Farklı rapamisin/doksorubisin kürecik kombinasyonlarıyla 24,

48 ve 72. saat zaman noktalarında HepG2 hücre çizgisi üzerindeki sitotoksosite etkilerini değerlendirmek için LDH deneyi kullanılmaktadır.

Rapamisin kürecikleri (500-700 µm) yüklenmektedir ve PCT/EP2007/50690'da açıklanan şekilde analiz edilmektedir. Oluşan yükleme 21.4 mg/ml'dir.

Doksorubisin küreciklerine (500-700 µm) WO 04071495'de açıklandığı gibi kürecik ml başına 37.5 mg yüklenmektedir.

Deney hazırlığı

Aseptik koşullar kullanılarak, üç steril düz tabanlı 96 çukurlu plaka (Cellstar®, 655180) 200 µl araçta 20,000 HepG2 hücrelerine ekilmektedir ve 20 saat süreyle inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bırakılmaktadır.

İnkübasyon işleminden sonra, araç tüm çukurlardan dikkatli biçimde emilmektedir ve çukurlara 200 µl PRF aracı eklenmektedir.

Önceden yüklenen doksorubisin kürecikleri ve önceden yüklenen rapamisin kürecikleri 96 çukurlu bir plakada 200 µl fenol kırmızısı kültür aracında aseptik koşullar altında sayılmaktadır. Her çukura yerleştirilen her kürecik sayısı Tablo 5'de görülebilmektedir (n=6). Her ilaç tipinin kontrolü deney boyunca gerçekleştirilmektedir (sadece bir ilaç tipine ait 1-5 kürecik).

Tablo 6: Kürecik oranlarını gösteren matris

	Çukur başına kürecik sayısı						
Rapamisin kürecikleri	1	1	1	1	2	3	4
Doksorubisin	1	2	3	4	1	1	1

kürecikleri							
-------------	--	--	--	--	--	--	--

Hücrelere 72 saat maruz kaldıktan sonra, Örnek 6'da açıklandığı gibi LDH deneyi Tablo 6'daki kontroller ve 5 örneklerde gerçekleştirilmektedir.

MTS deneyi ayrıca çukurlarda yönetilmektedir. 72. Saatte, tüm çukurlardan araç dikkatli biçimde çıkarılmaktadır ve her çukur 200 µl steril PBS ile üç kez iyice yıkanmaktadır. Her çukura 10 100 µl PRF aracının eklenmesinden sonra, 20 µl hazırlanan MTS solüsyonu (Promega) ayrıca eklenmektedir. İki saatlik inkübasyon işleminden sonra (37°C, %5 CO₂) plaka, plaka okuyucu kullanılarak ve LDH deneyi gibi 490 nm'de okunmaktadır; okuma değeri çok yüksekse, örnekler seyreltilmektedir (75 µl PRF 15 aracı: 75 µl örnekler).

Rapamisin ve doksorubisin sinerjisi

Farklı oranlardaki rapamisin kürecikleri ve doksorubisin 20 kürecikleriyle yapılan hücre canlılığı deneyi her tür ilaç sinerjisinin yapılandırılmasını sağlamaktadır. Bir çukurda birlikte bulunan tek rapamisin küreciği ve tek doksorubisin küreciği tek ilaç tipindeki iki küreciken daha az canlı hücre bırakmaktadır. Bu eğilim test edilen kürecik 25 kombinasyonlarında görülmektedir (Şekil 15 & 16). Benzer bir eğilim MTS deneyinde bildirilmektedir (Şekiller 17 & 18).

Calculus v2.1 (Biosoft) kullanılarak, kombinasyon indeks değeri LDH deneyinden verileri kullanarak her kombinasyon için 30 yapılandırılabilir (Tablo 7). Kombinasyon indeksinin değeri bir ölçekle ilgilidir (Tablo 7). Bu açıklamalar kullanılarak, bu koşullar altında güçlü bir sinerji bildirilmektedir.

Tablo 6: Kombinasyon İndeks (Cl) Değerleri ve açıklaması (Fa = Dozdan etkilenen fraksiyon, 1=%100 ölüm, 0=Ölüm yok)

Rapamisin (kürecikler)	Doksorubisin (kürecikler)	Fa	Cl
1	1	0.984	0.007
1	2	0.991	0.002
1	3	0.998	1.06e-5
1	4	0.994	0.001
2	1	0.997	1.52e- 0.005
3	1	0.988	0.002

5 Tablo 7: Kombinasyon İndeks Değerleri ve açıklaması

Cl Aralığı	Açıklama
<0.1	+++++ Çok güçlü sinerji
0.1-0.3	++++ Güçlü sinerji
0.3-0.7	+++ Sinerji
0.7-0.85	++ Orta derecede sinerji
0.85-0.90	+ Az derecede sinerji
0.90-1.10	± Yaklaşık katkı
1.10-1.20	- Az derecede antagonizm
1.20-1.45	- - Orta derecede antagonizm

10 Tüm doksorubisin-rapamisin kombinasyonlarından görülebildiği gibi iki ilaç arasında oldukça güçlü bir sinerji belirtilen Cl verilmektedir. Her iki deney de iki ilaç arasındaki sinerjiyi göstermektedir. Veriler tercih edilen bir oranı göstermemektedir, ancak sinerji tüm kombinasyonlar için gösterilmektedir.

15 **Örnek 8: Laboratuvar Ortamında Bireysel Olarak Veya Kombinasyon Halinde Rapamisin Ve Doksorubisin Yüklü Küreciklerin Sitotoksitesisi**

Örnek 7 arttırılmış sayıda küreciğe sahip ilaçlardan biriyle esasen açıklandığı gibi tekrar edilmektedir. MTS deneyinin sonuçları, başka bir deyişle 6 örneğin ortalaması olarak 72 saat maruz kaldıktan sonra HepG2 hücrelerinin hücre canlılığı yüzdesini gösteren sonuçlar Şekil 19'da gösterilmektedir.

Sonuçlar

Bireysel olarak ayrıştırıldığında, doksorubisin hücrelere karşı rapamisininden daha sitotoksiktir (Şekil 1). Bununla birlikte birlikte kullanıldığında, hücre canlılığında ayrıca azalma gözlemlenmektedir. Tüm kürecik kombinasyonları için kombinasyon indeksleri <0.1 'dir; bu ayrıştırılan iki ilaç arasında ki güçlü pozitif sinerjiyi belirtmektedir.

Örnek 9: Laboratuvar Ortamında İnsan Pankreas Karsinomu (PSN1) ve İnsan Hepatoselüler Karsinom (HepG2) Hücre Çizgileri Üzerinde Rapamisin Ve Doksorubisin Sinerjisi

MTS deneyi HepG2 ve PSN1 hücreleri üzerine yüklenen ikili küreciklerin sinerjistik sitotoksik etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. Rapamisin yüklü kürecikler ve doksorubisin yüklü kürecikler Örnek 7'de açıklananlarla aynıdır. İkili olarak yüklenen doksorubisin ve rapamisin yüklü kürecikler yüklenmektedir ve 1 ml 60 mg/ml rapamisin solüsyonu ve 1 ml 37.5 mg/ml doksorubisin solüsyonu kullanılarak Örnek 4 Yöntem 2'de açıklandığı gibi analiz edilmektedir. Yüklenen ikili küreciklerde oluşan yükleme 21.4 mg/ml rapamisin ve 35.5 mg/ml doksorubisindir.

Deney hazırlama

Deney analiz için HepG2 hücreleri ve PSN1 hücrelerine ait ek

plakalar kullanılarak Örnek 7'de açıklandığı gibi hazırlanmaktadır.

Hücre canlılığı

5

Önceden yüklenen doksorubisin kürecikleri, önceden yüklenmiş rapamisin kürecikleri ve önceden yüklenmiş ikili rapamisin ve doksorubisin kürecikleri sayılmaktadır (1, 2 veya 3) ve hücre kültürü aracında hazırlanan 20,000 PSN1 veya HepG2 hücrelerine eklenmektedir ve bir inkübatöre yerleştirilmektedir (37°C, %5 CO₂).

10

Maruz kalma durumundan 24, 48 ve 72 saat sonra MTS deneyi yönetilmektedir (Örnek 7'de açıklanmaktadır).

15

Yüklenen ikili kürecik kombinasyonu PSN1 hücreleri (Şekil 20-22) ve HepG2 hücreleri (Şekil 23-25) için tüm zaman noktalarında tek yüklü kürecikten daha fazla hücre ölümü sergilemektedir.

20

Örnek 10: İki tek-yüklü küreciklerle karşılaştırıldığında çift yüklü kürecik

MTS deneyi, iki tek-yüklü kürecikle karşılaştırıldığında (biri doksorubisin yüklü ve biri rapamisin yüklü) bir doksorubisin ile çift yüklü rapamisin küreciğinin sitotoksik etkileri arasında bir fark bulunmamaktadır.

25

Kullanılan ilaç yüklü kürecikler Örnek 9'da açıklananlarla aynı gruplardır.

30

Deney HepG2 hücreleri kullanılarak Örnek 7'de açıklandığı gibi düzenlenmektedir. Bir-dört çift yüklü kürecik 200 µl araçta hazırlanan 20,000 HepG2 hücrelerine eklenmektedir ve tek-yüklü

kürecikler kullanılarak eşdeğer doz aynı yoğunluktaki araçtaki başka bir çukura eklenmektedir. Plakalar bir inkübatöre yerleştirilmektedir (37°C, %5 CO₂).

- 5 MTS deneyi (Örnek 7'de açıklanan) maruz kalma durumunda 24, 48 ve 72 saat sonra yönetilmektedir.

İlaç ayrıştırma küreciklerinin sitotoksik etkisi bir küreciğe veya iki ayrı küreciğe yüklenen ilaçları dikkate almaksızın benzerdir (Şekil 26-28), hücre kültür aracında hazırlanan 10 20,000 PSN1 veya HepG2 hücrelerine eklenmektedir ve bir inkübatöre yerleştirilmektedir (37°C, %5 CO₂).

15 MTS deneyi (Örnek 7'de açıklanan) maruz kalma durumunda 24, 48 ve 72 saat sonra yönetilmektedir.

Çift yüklü kürecik kombinasyonu PSN1 hücreleri (Şekil 20-22) ve HepG2 hücreleri (Şekil 23-25) için tüm zaman noktalarında tek-yüklü kürecikten daha fazla hücre ölümü sergilemektedir.

20

Örnek 10: İki tek-yüklü küreciklerle karşılaştırıldığında çift yüklü kürecik

25 MTS deneyi, iki tek-yüklü kürecikle karşılaştırıldığında (biri doksorubisin yüklü ve biri rapamisin yüklü) bir doksorubisin ile çift yüklü rapamisin küreciğinin sitotoksik etkileri arasında bir fark bulunmamaktadır.

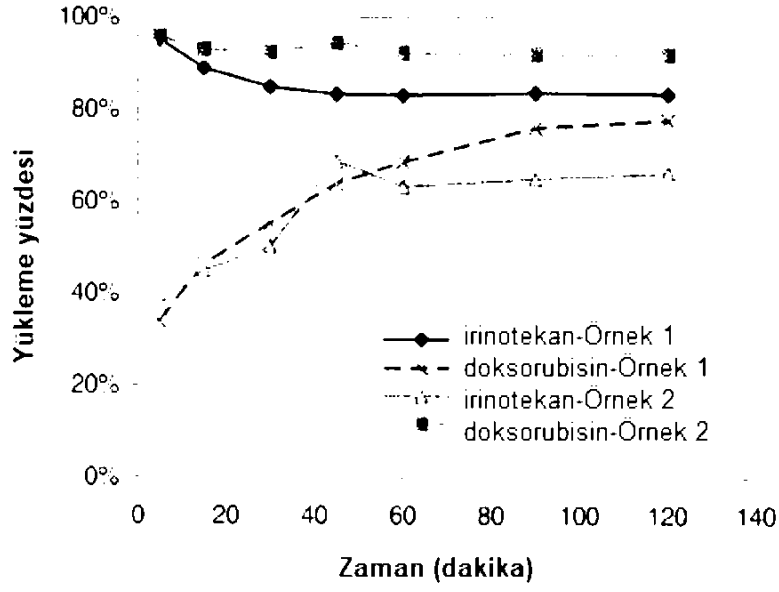
30 Kullanılan ilaç yüklü kürecikler Örnek 9'da açıklananlarla aynı gruplardır.

Deney HepG2 hücreleri kullanılarak Örnek 7'de açıklandığı gibi düzenlenmektedir. Bir-dört çift yüklü kürecik 200 µl araçta hazırlanan 20,000 HepG2 hücrelerine eklenmektedir ve tek-yüklü

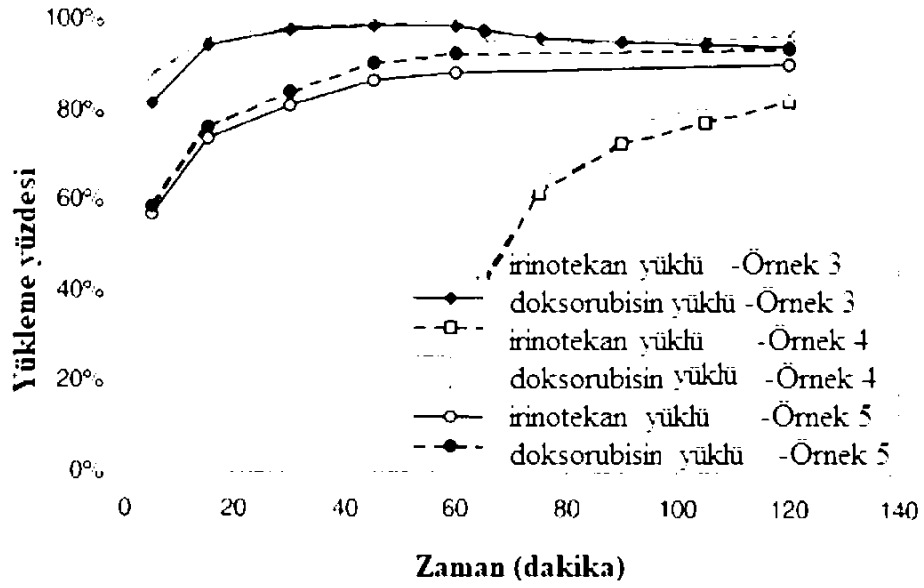
kürecikler kullanılarak eşdeğer doz aynı yoğunluktaki araçtaki başka bir çukura eklenmektedir. Plakalar bir inkübatöre yerleştirilmektedir (37°C, %5 CO₂).

- 5 MTS deneyi (Örnek 7'de açıklanan) maruz kalma durumunda 24, 48 ve 72 saat sonra yönetilmektedir.

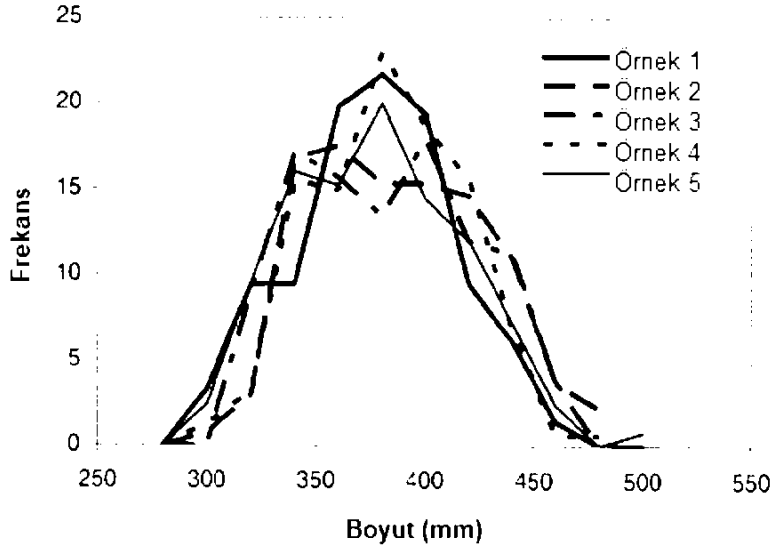
İlaç ayrıştırma küreciklerinin sitotoksik etkisi bir küreciğe veya iki ayrı küreciğe yüklenen ilaçları dikkate almaksızın benzerdir (Şekil 26-28).



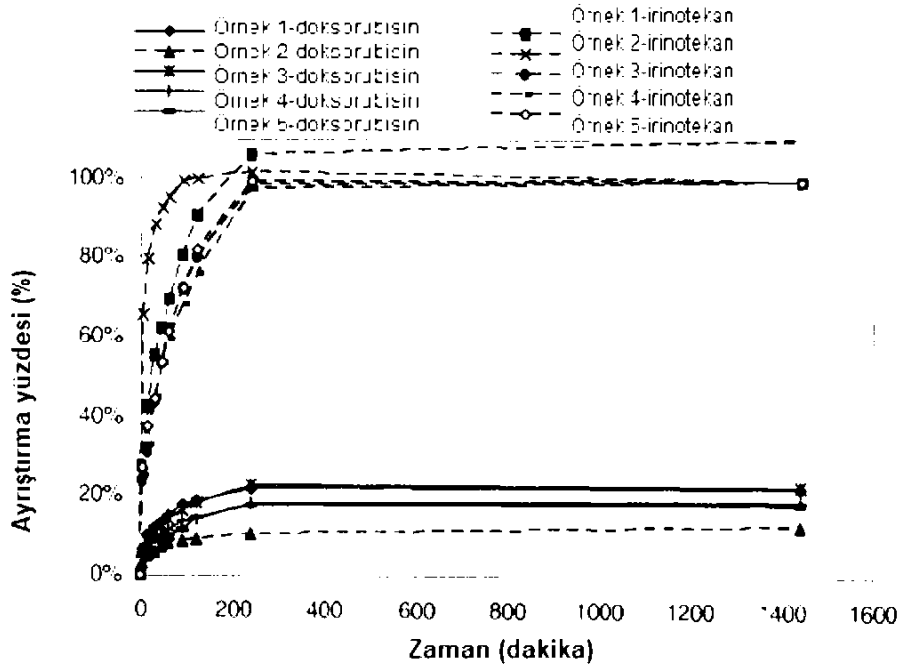
Şekil 1



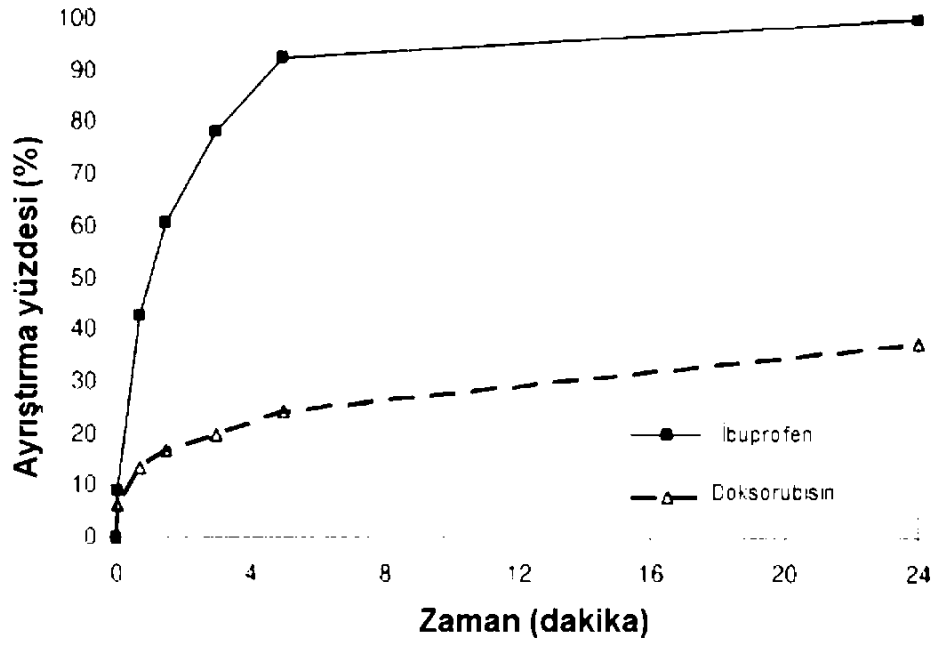
Şekil 2



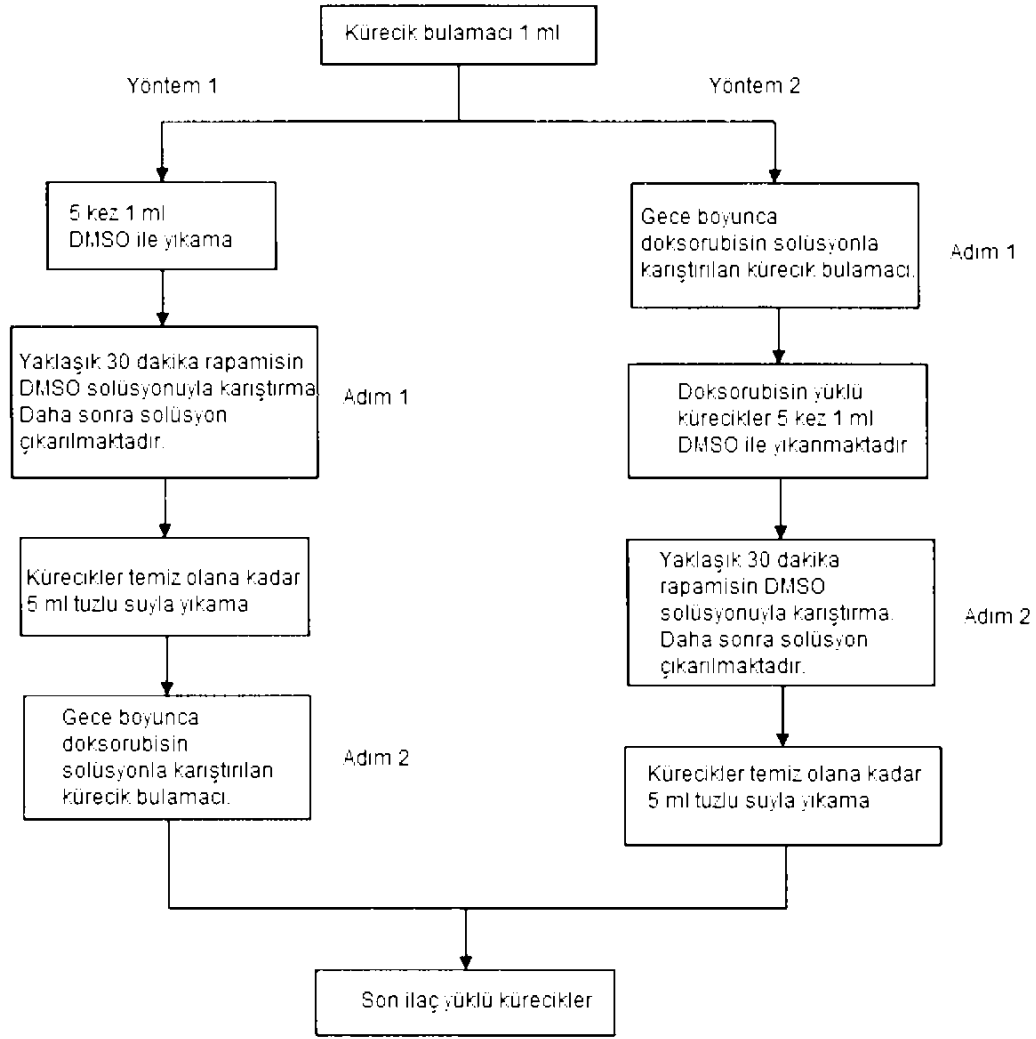
Şekil 3



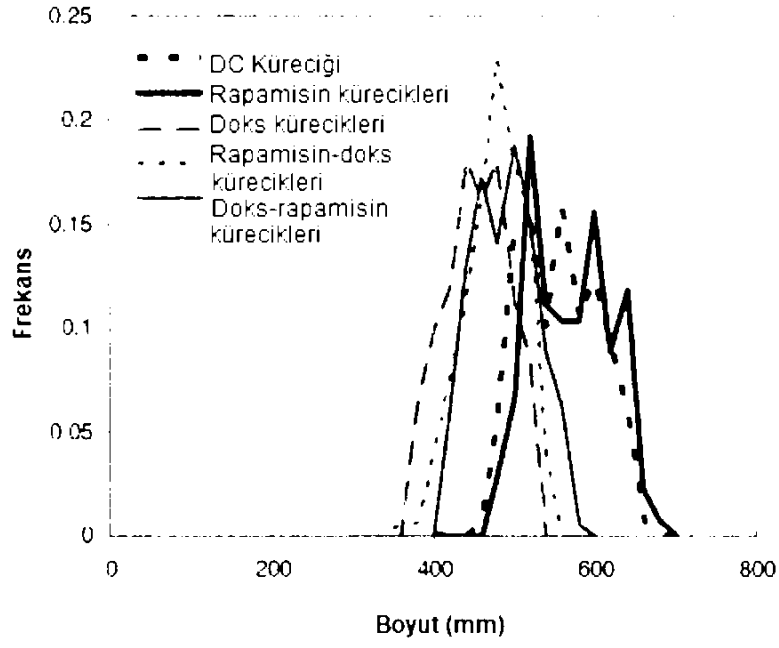
Şekil 4



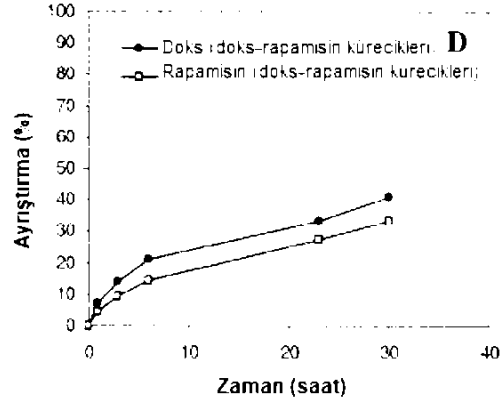
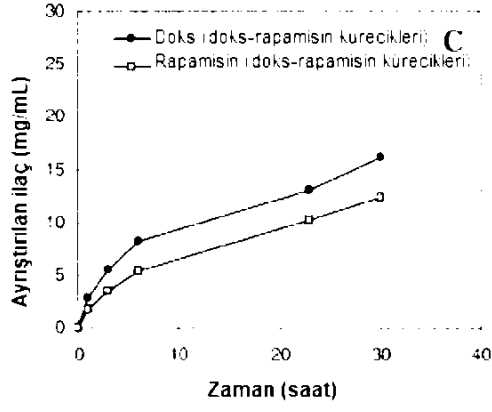
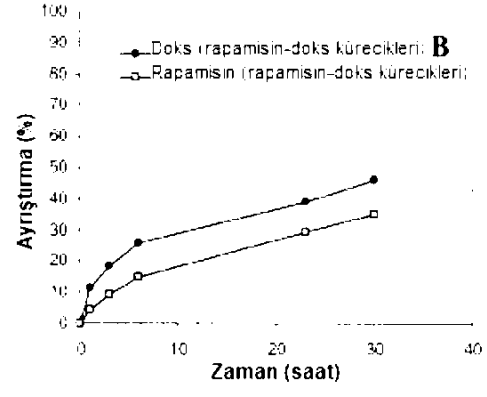
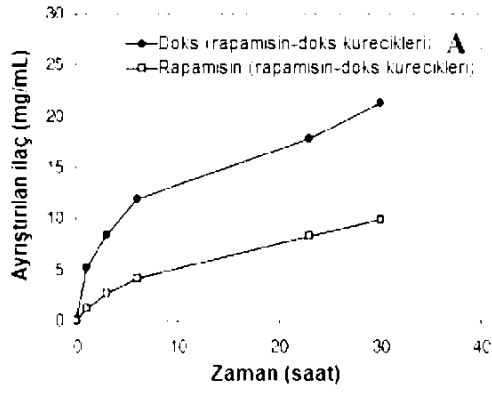
Şekil 5



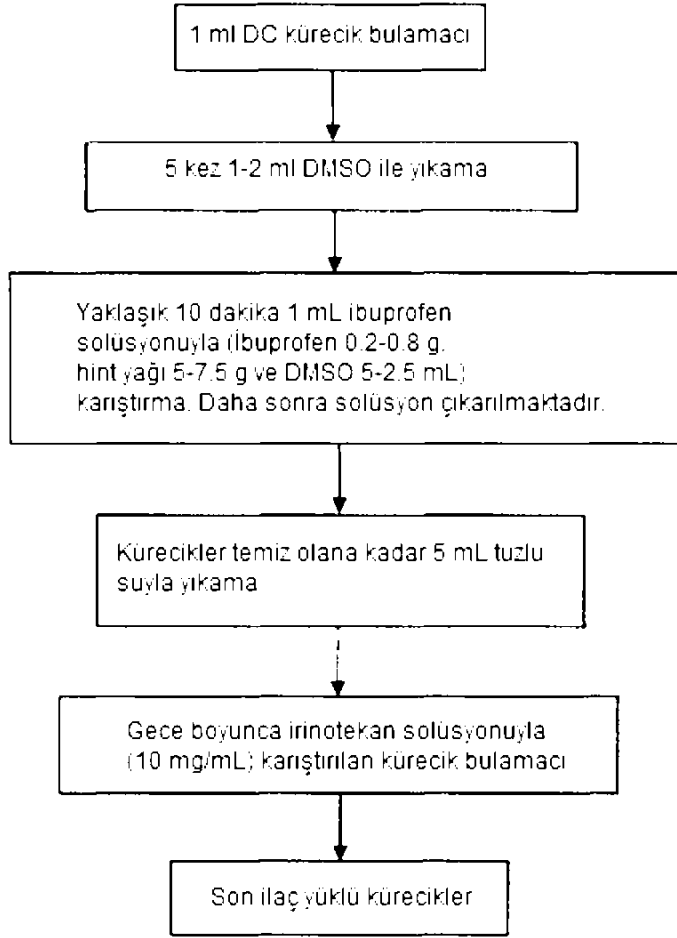
Şekil 6



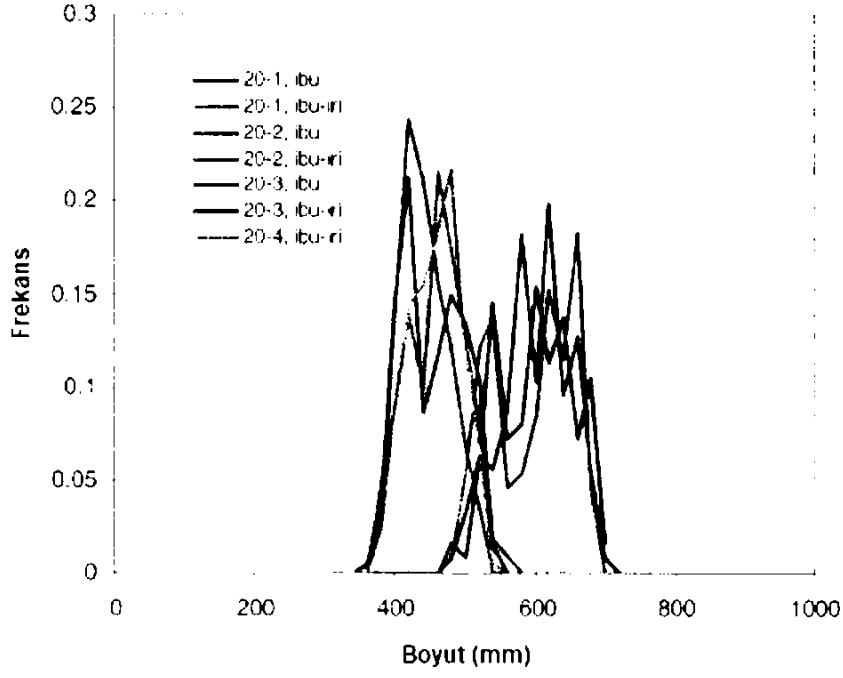
Şekil 7



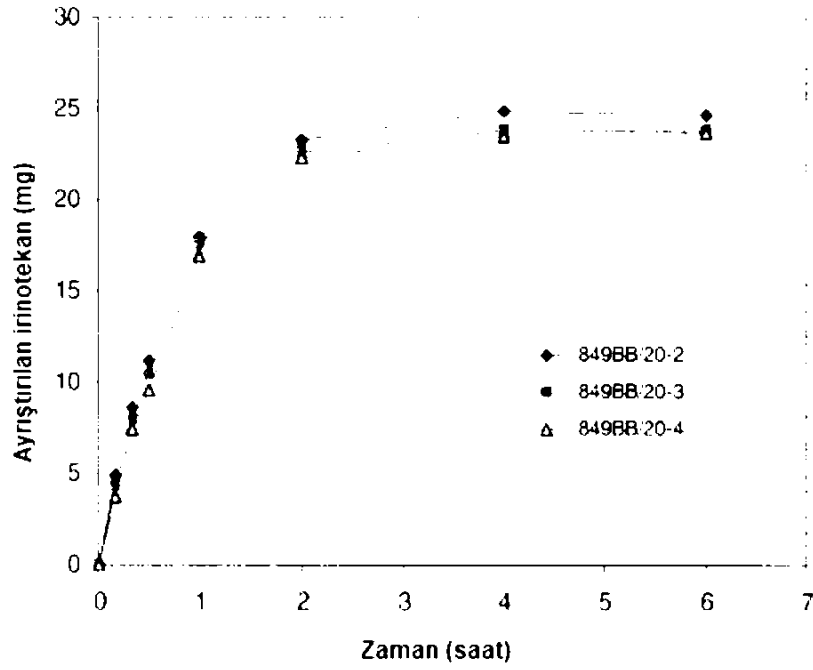
Şekiller 8 A-D



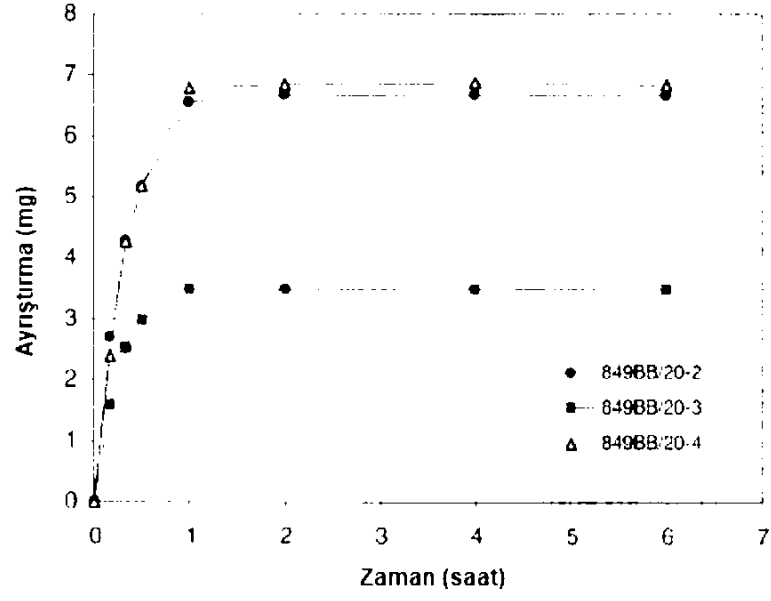
Şekil 9



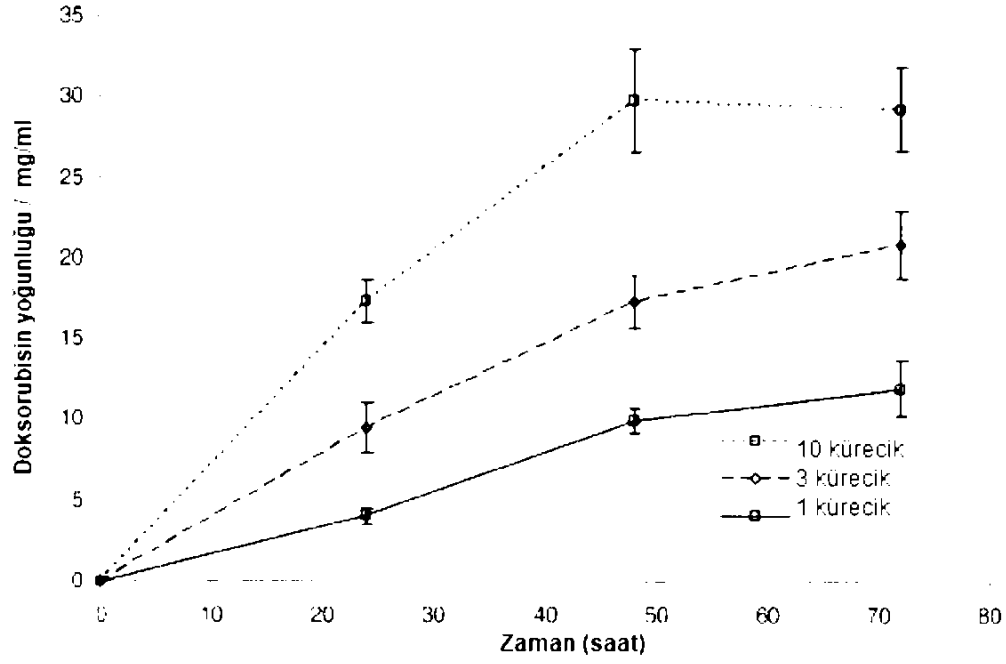
Şekil 10



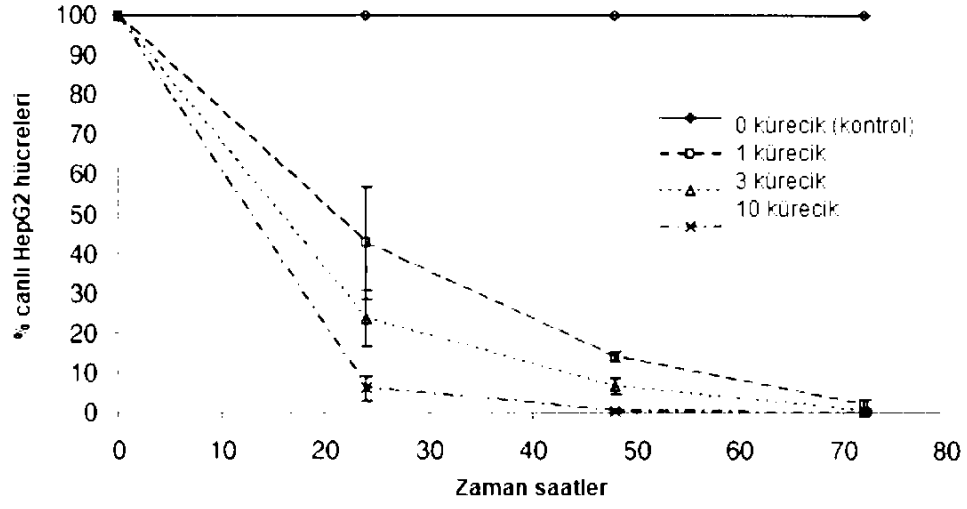
Şekil 11



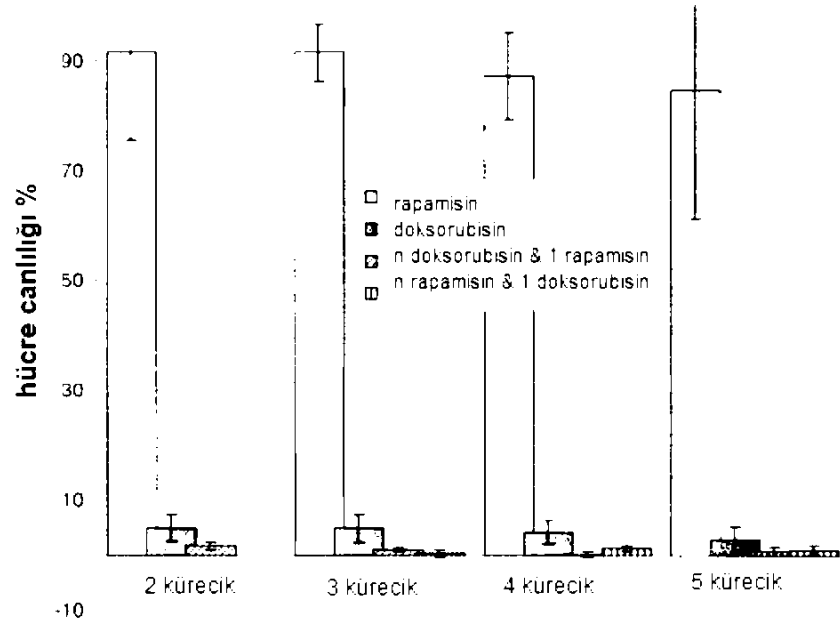
Şekil 12



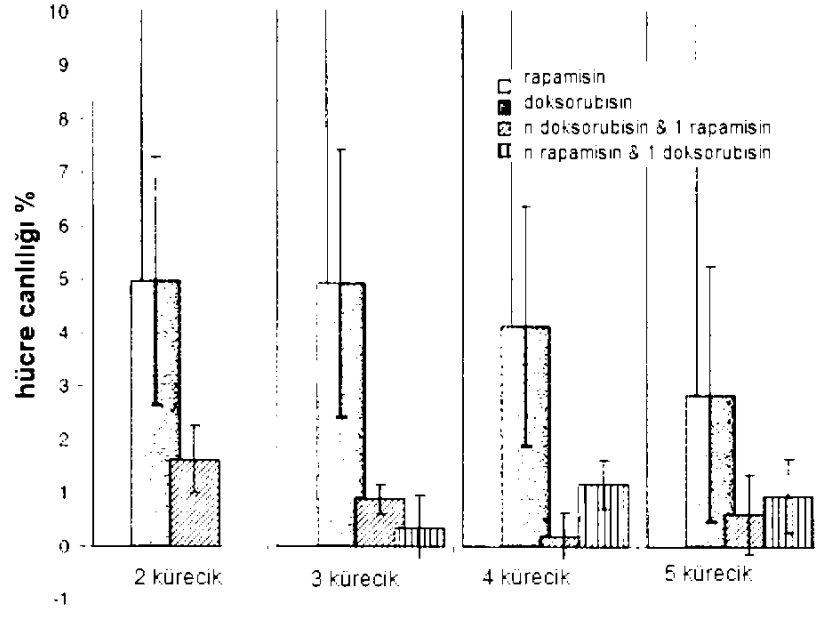
Şekil 13



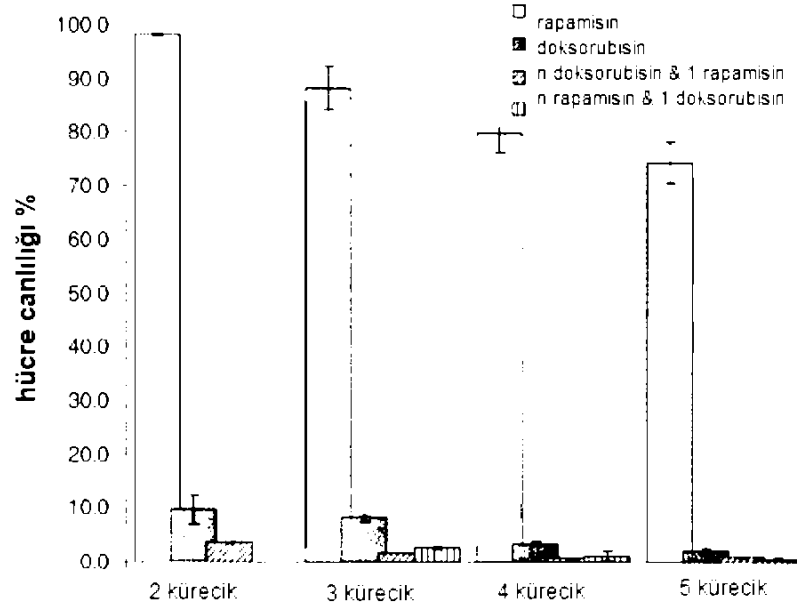
Şekil 14



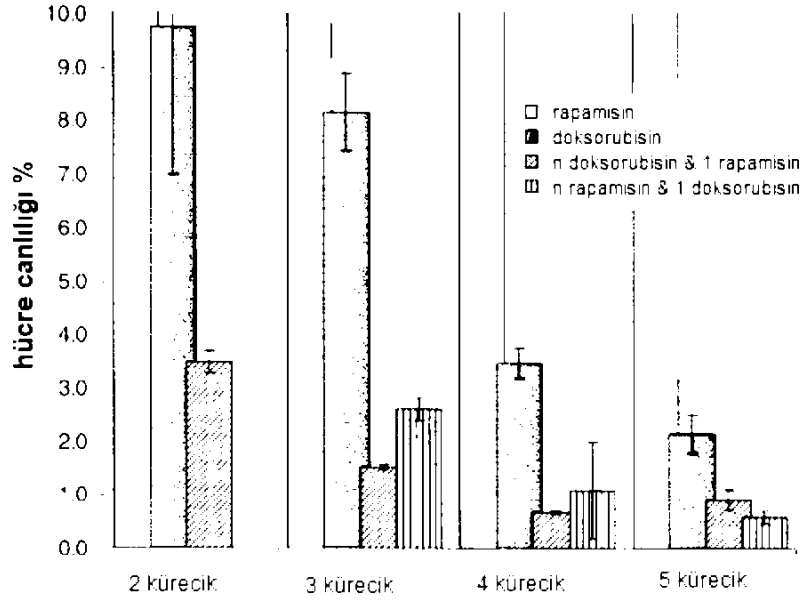
Şekil 15



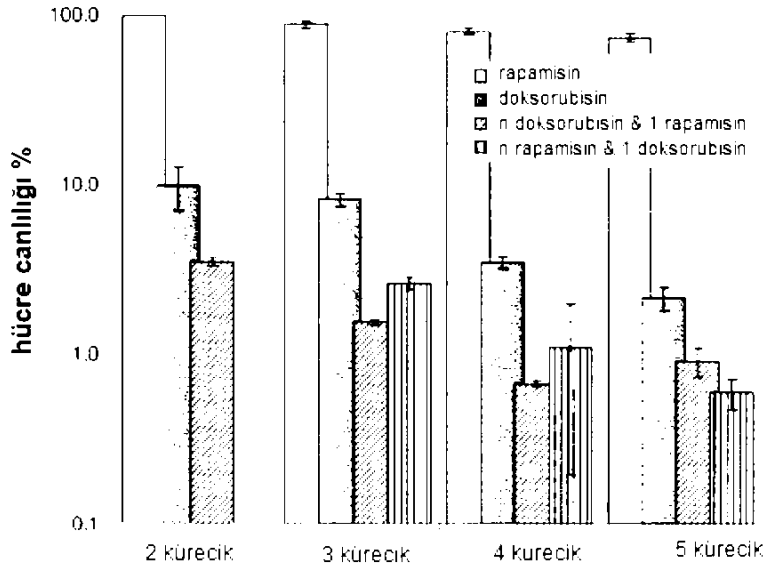
Şekil 16



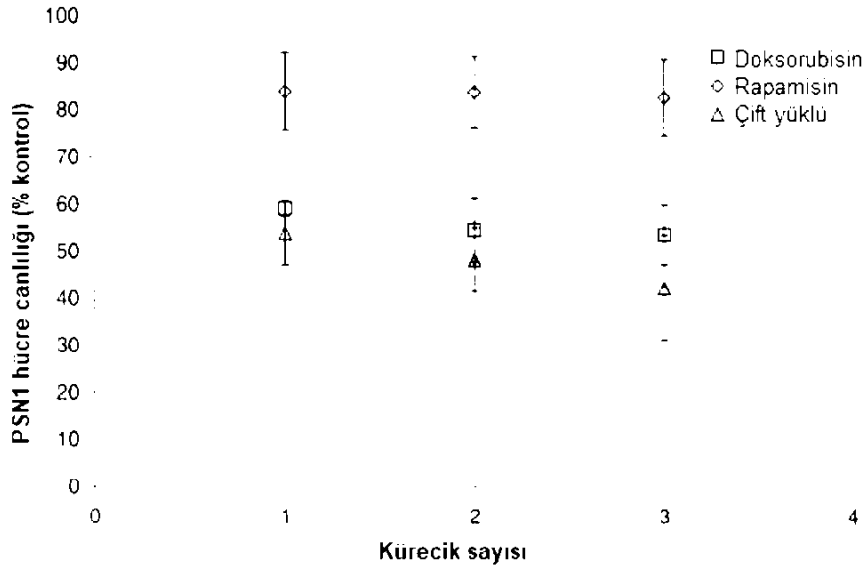
Şekil 17



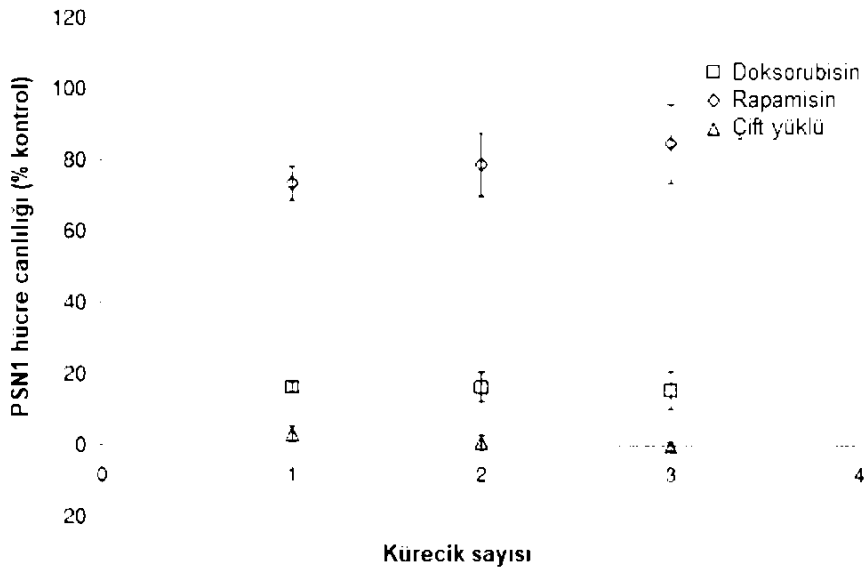
Şekil 18



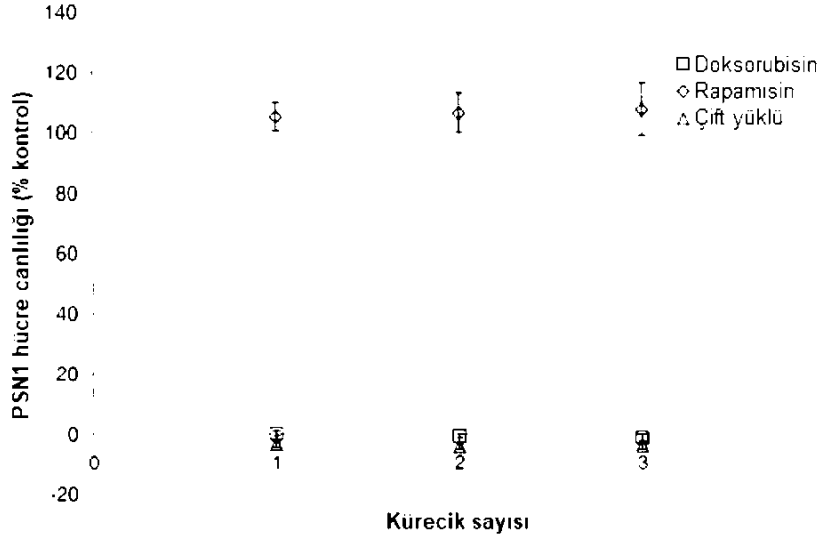
Şekil 19



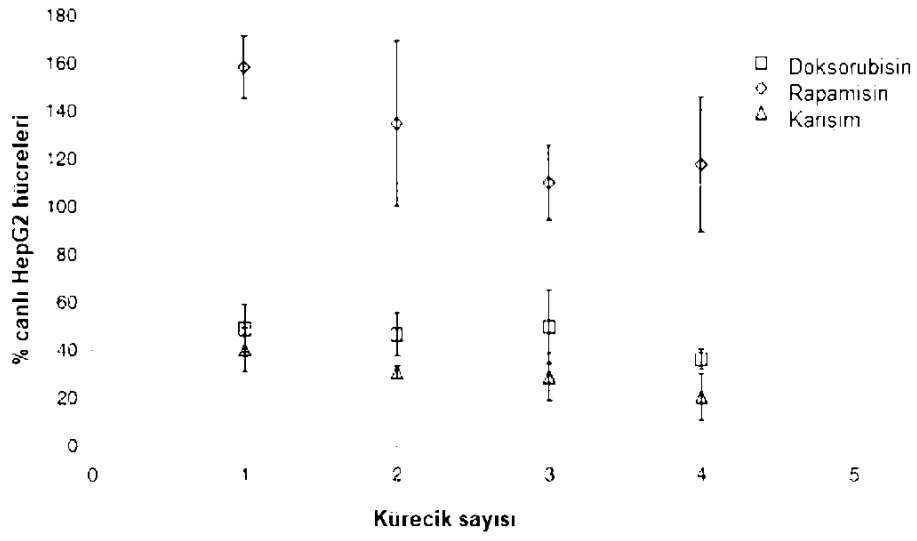
Şekil 20



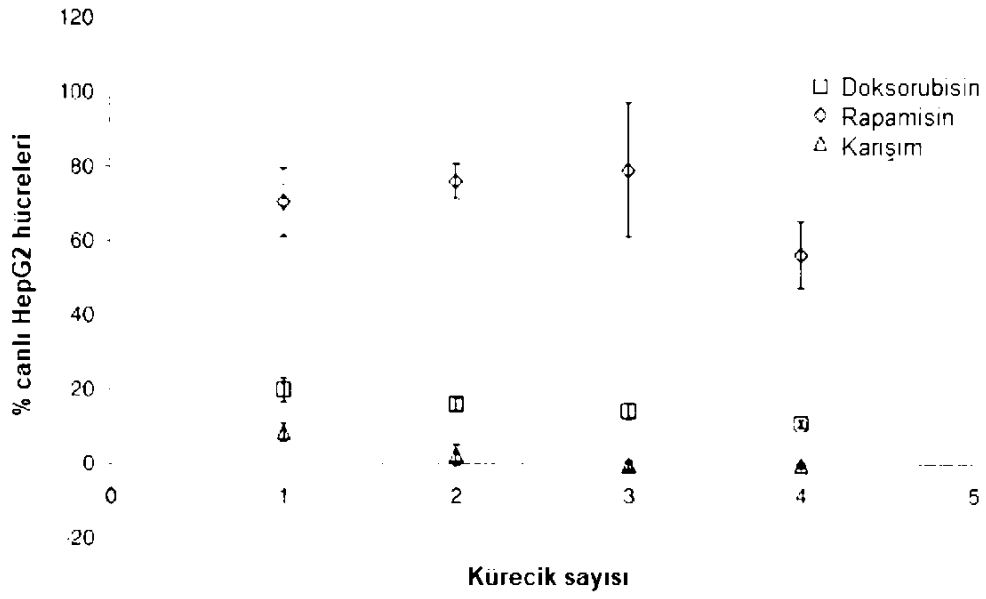
Şekil 21



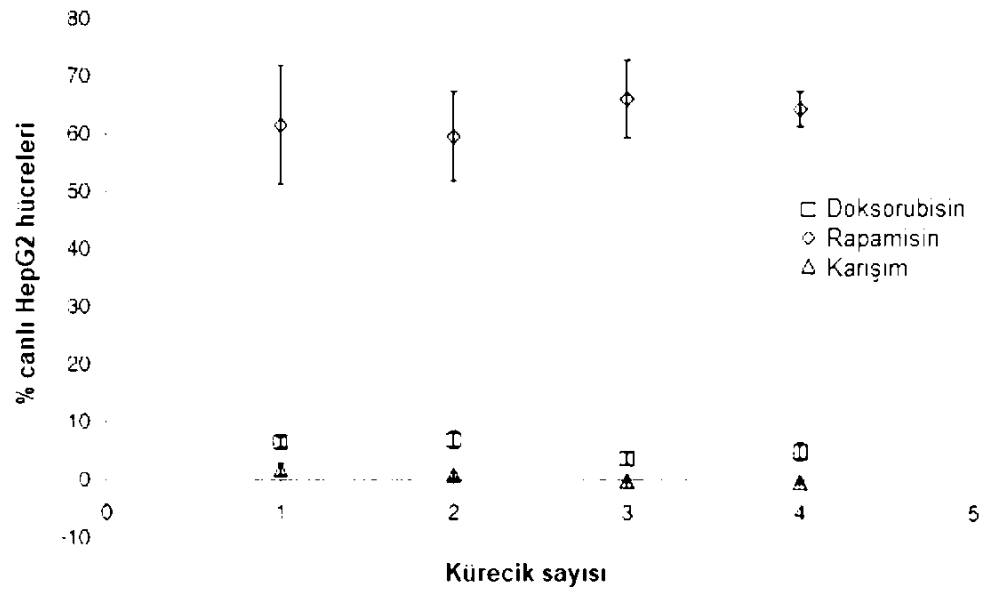
Şekil 22



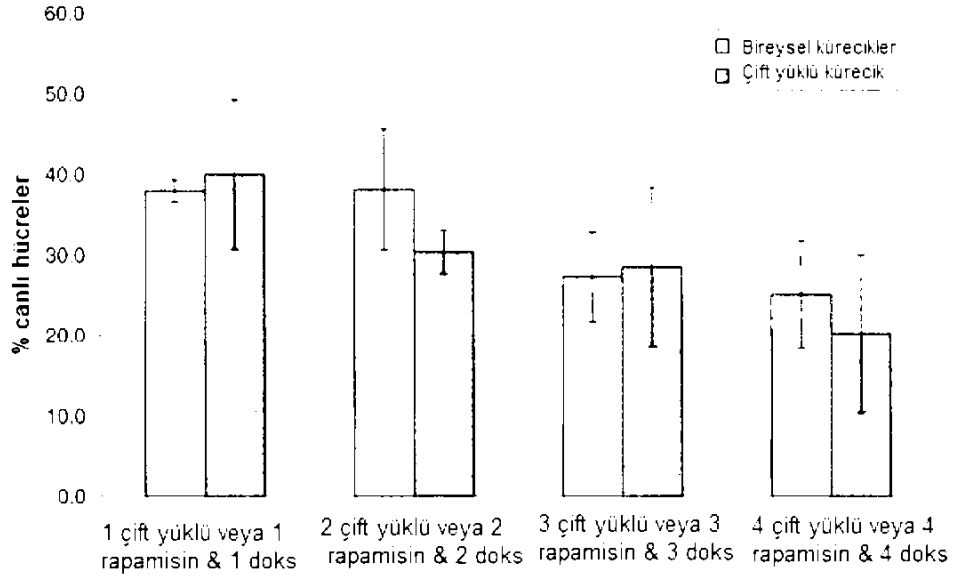
Şekil 23



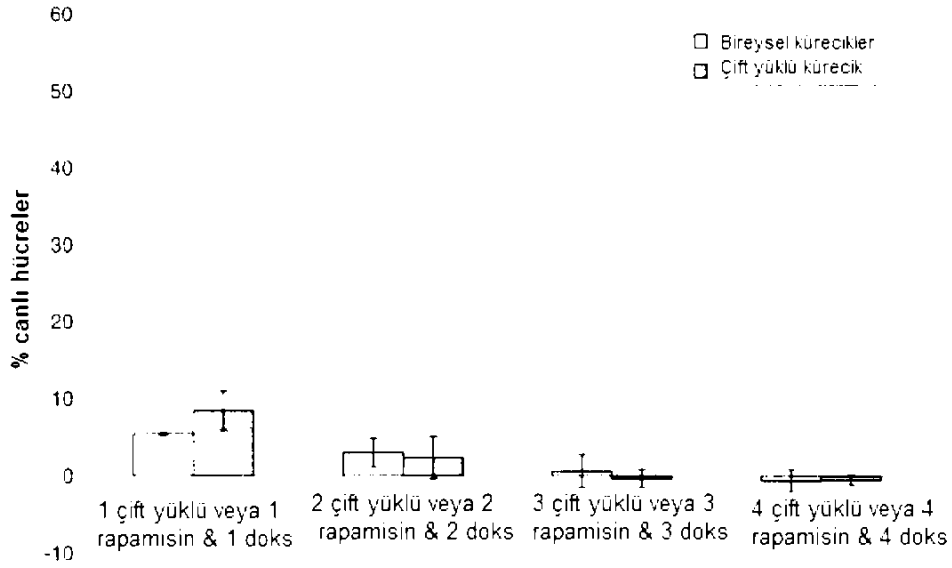
Şekil 24



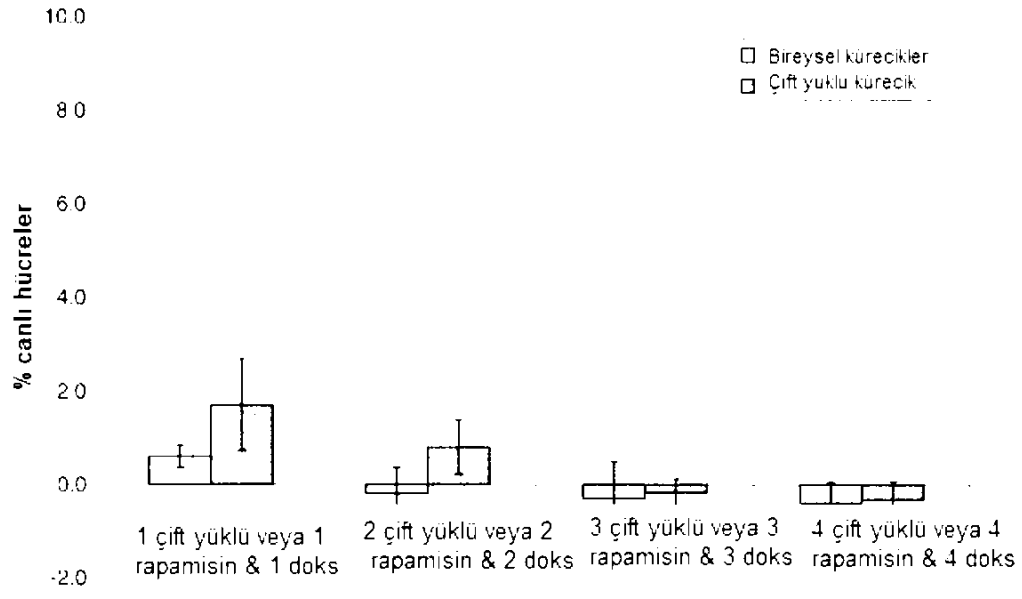
Şekil 25



Şekil 26



Şekil 27



Şekil 28