

ÖZET**YENİDEN YAPILANDIRILAN YÜKSEK YOĞUNLUĞA SAHİP BİR LİPOPROTEİN
FORMÜLASYONU VE BUNUN ÜRETİM YÖNTEMİ**

- 5 Nispeten daha düşük toksisitesi bulunan yeniden yapılandırılan yüksek yoğunluğa sahip bir lipoprotein formülasyonu, ApoA1 veya bunun parçası gibi bir apolipoprotein, bir lipid veya bir insana uygulandığında normalde karaciğer toksisitesine neden olan miktarının yaklaşık %5-50'si olan bir seviyede bir temizleyici içerir. Lipid, yaklaşık 30-50g/L şeklinde optimal olarak fosfatidilkolindir ve apolipoprotein:lipidin molar oranı, 10 optimal olarak 1:40 ila 1:75 aralığındadır. Formülasyon, kardiyovasküler hastalık, akut koroner sendroma (ACS) dahil hiperkolesterolemi ve hipokolesterolemi, ateroskleroz ve miyokard enfarktüsü gibi hastalıkların veya durumların tedavi edilmesine yönelik kullanışlıdır.

İSTEMLER

1. Bir apolipoprotein veya bunun bir parçası; bir fosfolipid; ve yaklaşık 0.015-0.030 g/g apolipoprotein olan bir seviyede temizleyici içeren, yeniden yapılandırılan bir yüksek yoğunluğa sahip lipoprotein (rHDL) formülasyonu olup, özelliği apolipoprotein:fosfolipid molar oranının, 1:20 ila 1:100 aralığında olmasıdır.
2. İstem 1'in rHDL formülasyonu olup, özelliği temizleyicinin bir safta tuzu veya safra asidi olmasıdır.
3. İstem 2'nin rHDL formülasyonu olup, özelliği temizleyicinin sodyum kolat olmasıdır.
4. Önceki istemlerden herhangi birinin rHDL formülasyonu olup, özelliği apolipoprotein Apo-A1 veya bunun bir parçası olmasıdır.
5. Önceki istemlerden herhangi birinin rHDL formülasyonu olup, özelliği fosfolipidin fosfatidilkolin olmasıdır.
6. Önceki istemlerden herhangi birinin rHDL formülasyonu olup, özelliği formülasyonun ayrıca bir stabilizör içermesidir.
7. Bir apolipoprotein; bir fosfolipid ve bir temizleyici içeren bir rHDL formülasyonunun üretilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği söz konusu yöntemin yaklaşık 0.015-0.030 g/g apolipoprotein olan bir seviyede temizleyici sağlanmasına yönelik adımı içermesidir.
8. İstem 7'nin yöntemi olup, özelliği temizleyicinin bir safta tuzu veya safra asidi olmasıdır.
9. İstem 8'in yöntemi olup, özelliği temizleyicinin sodyum kolat olmasıdır.
10. İstemler 7-9'dan herhangi birine göre yöntem olup, özelliği apolipoprotein Apo-A1 veya bunun bir parçası olmasıdır.

11. İstemler 7-10'dan herhangi birine göre yöntem olup, özelliği fosfolipidin fosfatidilkolin olmasıdır.
- 5 12. İstemler 7-11'den herhangi birine göre yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları içermesidir:
 (A) bir Apo-A1 solüsyonuna organik solvent olmadan fosfatidilkolin ve bir kolat temizleyicinin eklenmesi;
 (B) adımda (I) üretilen solüsyonun içindeki kolat temizleyicinin seviyesinin yaklaşık 0.03g/g Apo-A1'e azaltılması;
 10 (C) adımda (B) solüsyona bir stabilizörün eklenmesi.
13. İstemler 7-12'den herhangi birinin yöntemine göre elde edilebilen bir rHDL formülasyonudur.
- 15 14. İstemler 1-6 veya İstem 13'ten herhangi birine göre, bir insanda bir hastalık, rahatsızlık veya durumun tedavi edilmesinde kullanıma yönelik bir rHDL formülasyonudur.
- 20 15. İstem 14'e göre kullanıma yönelik bir rHDL formülasyonu olup, özelliği hastalık, rahatsızlık veya durumun kardiyovasküler hastalık, hiperkolesterolemi veya hipokolesterolemi içermesidir.
- 25 16. İstem 15'e göre kullanıma yönelik bir rHDL formülasyonu olup, özelliği hastalık, rahatsızlık veya durumun akut koroner sendromu (ACS), ateroskleroz ve miyokard enfarktüsü içermesidir.

TARİFNAME
YENİDEN YAPILANDIRILAN YÜKSEK YOĞUNLUĞA SAHİP BİR LİPOPROTEİN
FORMÜLASYONU VE BUNUN ÜRETİM YÖNTEMİ

5 **TEKNİK SAHA**

BU BULUŞ, yeniden yapılandırılan yüksek yoğunluğa sahip lipoprotein formülasyonları ile ilgilidir. Daha çok özellikle, bu buluş azaltılan bir toksisiteye sahip yeniden yapılandırılan yüksek yoğunluğa sahip lipoprotein formülasyonları ile ilgilidir.

10

ALT YAPI

Yüksek yoğunluğa sahip protein (HDL), yüksek yoğunluk (>1.063 g/mL) ve küçük boyut (Stoke'un çapı = 5 ila 17 nm) ile karakterize edilen lipid ve protein içeren heterojen lipoproteinlerin bir sınıfıdır. Çeşitli HDL alt sınıfları şekil, yoğunluk, boyut, yük ve antijenlik bakımından farklara neden olarak lipidler, apolipoproteinler, enzimler ve lipid transfer proteinlerinin nicel ve nitel içeriği bakımından değişir. Apolipoprotein A-I (Apo-AI), baskın HDL proteindir, öte yandan Apo-AII ve Apo-V gibi diğer apolipoproteinler mevcut olabilir.

20

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, yüksek yoğunluğa sahip lipoprotein kolesterol (HDL-C) seviyeleri ve kardiyovasküler hastalık (Assmann et al., 2004, Circulation 109 III-8'de incelenen) arasında ters bir bağlantı kurmuştur. Daha çok özellikle, yeniden yapılandırılan HDL formülasyonlarının klinik uygulamasının mevcut akut koroner sendromlardan (ACS) şikayetçi olan hiperkolesterolemik hastalara yararlı etkiler sunduğu gösterilmiştir.

25

Tipik olarak, bu tür yeniden yapılandırılan HDL formülasyonları Apo-AI gibi bir protein, fosfatidilkolin gibi bir lipid ve kolat veya deoksikolat gibi bir temizleyici içerir. Ek olarak, kolesterol dahil edilebilir. US patent 5,652,339'da tartışıldığı üzere, yeniden yapılandırılan HDL formülasyonları üretilirken, bazı durumlarda lipid bileşenin (örneğin, fosfatidilkolin) çözülmesine yönelik kullanılan organik solventleri kullanmadan yeniden yapılandırılan HDL formülasyonlarının üretilmesi avantajlı olabilir. Bu tür yeniden yapılandırılan HDL formülasyonları, CSL-111 olarak belirlenen, klinik olarak denenmiştir, ancak daha yüksek dozaj tedavisi karaciğer fonksiyon testlerindeki

35

anormallikleri takiben erken bir şekilde durdurulmuştur. CSL111 ile tedavi edilen hastalar plak yükünün belirtilerinde yararlı yönelimler göstermiştir. Ancak, istatistiksel önem aterom hacminde yüzde değişimi veya plasebo ile kıyaslandığında plak hacminde nominal değişimde elde edilmemiştir (Tardif et al., 2007, JAMA-Exp. 297 E1).

KISA AÇIKLAMA

Önceki teknik yeniden yapılandırılan HDL formülasyonlarının bir veya daha fazla eksikliğini hafifleten veya durduran yeniden yapılandırılan bir HDL formülasyonunun sağlanması buluşun bir amacıdır.

Azaltılan veya minimal toksisiteyle yeniden yapılandırılan bir HDL formülasyonunun sağlanması buluşun tercih edilen bir amacıdır.

Koroner ateroskleroz dahil olmak, ancak bununla sınırlı olmamak, üzere hastalıkların veya durumların profilaktik ve/veya terapötik tedavisinde etkili olan yeniden yapılandırılan bir HDL formülasyonunun sağlanması buluşun diğer bir tercih edilen amacıdır.

Buluş genel olarak bir apolipoprotein, bir fosfolipid ve toksik olmayan veya en azından nispeten daha az toksisite gösteren bir seviyede bir temizleyici içeren bir lipoprotein formülasyonuna yönlendirilir. Belirli düzenlemelerde, temizleyici ve lipid seviyesi karaciğer toksisitesine neden olan, bununla sonuçlanan veya bağlantılı olandan daha az bir seviyededir.

Bir açıda, buluş bir apolipoprotein veya bunun bir parçası; bir fosfolipid ve yaklaşık 0,015-0,030 g/g apolipoprotein olan bir seviyede bir temizleyici içeren yeniden yapılandırılan yüksek yoğunluğa sahip bir lipoprotein (rHDL) formülasyonu sağlar. Temizleyici seviyesi, bir insana uygulandığında karaciğer toksisitesi gösteren bir rHDL formülasyonunda var olanın yaklaşık %5-50'si olan bir seviyededir.

Diğer bir açıda, buluş bir apolipoprotein; bir fosfolipid ve bir temizleyici içeren bir rHDL formülasyonunun üretilmesine yönelik bir yöntem sağlar, söz konusu yöntem, 0,015-

0,030 g/g apolipoprotein olan bir seviyede söz konusu temizleyicinin sağlanması adımını içerir.

5 Yine diğer bir açıda, kişilerde böylelikle söz konusu hastalığı, rahatsızlığı veya durumu tedavi etmek üzere birinci açıya göre veya ikinci açının yöntemine göre üretilen bir rHDL'nin bir insana uygulanması adımı dahil olmak üzere bir insanda bir hastalığın, rahatsızlığın veya durumun tedavi edilmesine yönelik bir yöntem sağlar.

10 Yine diğer bir açıda, bir insanda bir hastalığın, rahatsızlığın veya durumun tedavi edilmesinde kullanıma yönelik buluş birinci açıya göre veya ikinci açının yöntemine göre üretilen bir rHDL formülasyonu sağlar.

15 Tercihen, temizleyicinin seviyesi karaciğer toksisitesi gösterenin yaklaşık olarak %5-10'u kadardır. Belirli düzenlemelerde, bu yaklaşık 0.03 g/g apolipoproteine eşittir. Tercihen temizleyici bir safra tuzu veya safra asididir. Daha çok tercihen, temizleyici bir sodyum kolattır.

20 Apolipoprotein, yüksek yoğunluğa sahip lipoprotein (HDL) normal be/veya fonksiyonel bileşeni olan herhangi bir apolipoprotein olabilir. Apolipoprotein tercihen yaklaşık 20-50 g/L olan bir konsantrasyondadır. Tercihen, apolipoprotein Apo-A1 veya bunun bir parçasıdır.

25 Uygun bir şekilde, lipid seviyesi karaciğer toksisitesine neden olan veya bununla ilişkilendirilenin yaklaşık %20-70'i kadardır. Tercihen, lipid yaklaşık 30-60 g/L olan bir konsantrasyondadır. Lipidin özellikle avantajlı konsantrasyonu yaklaşık 30-50g/L veya belirli düzenlemelerde yaklaşık 34 veya 47g/L'dir.

Tercihen fosfolipid, fosfatidilkolindir (PC) veya bunu içerir.

30 Apolipoprotein:lipidin molar oranı 1:20 ila 1:100 aralığındadır. Daha çok tercihen, apolipoprotein:lipidin molar oranı 1:40 ila 1:75 aralığındadır. Apolipoprotein:lipidin özellikle avantajlı bir oranı yaklaşık 1:40 veya 1:55'tir.

Uygun bir şekilde, rHDL formülasyonu ayrıca bir stabilizör içerir. Tercihen, stabilizör

sükroz gibi bir şekerdir. Tercih edilen bir konsantrasyon yaklaşık 65-85 g/L rHDL formülasyonudur.

- 5 Bu tarifname boyunca, içerik bakımından aksi gerekli olmadıkça, “içermek”, “içerir” ve “içeren” kelimelerinin belirli bir tam sayı veya tam sayılar grubunun dahil edilmesini belirttiği, ancak herhangi bir diğer tam sayı veya tam sayılar grubunun çıkarılmasını belirtmediği anlaşılabacaktır.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

10

Bundan sonra detaylı olarak açıklanan buluşun sınırlandırıcı olmayan düzenlemelerinin anlaşılmasına yardımcı olan aşağıdaki Şekillere referans yapılır, burada:

- 15 Şekil 1 hem kolat hem de fosfatidilkolinin eşzamanlı azalımının karaciğer toksisitesini azalttığını belirten akut sıçan çalışmalarının sonuçlarını gösterir;
- Şekil 2 kolatın seçici azalımının karaciğer toksisitesini azalttığını belirten akut sıçan çalışmalarının sonuçlarını gösterir;
- Şekil 3, kolatın farklı konsantrasyonlarının varlığında CSL111'in türbidite analizinin sonuçlarını gösterir;
- 20 Şekil 4, liyofilizasyon ve yeniden oluşturmada sonra kolatın farklı konsantrasyonlarının varlığında CSL111'in türbidite sonuçlarını gösterir;
- Şekil 5, oda sıcaklığında (RT) yeniden yapılandırılan HDL 1:50 PC'nin türbidite analizinin sonuçlarını gösterir;
- Şekil 6, 37°C'de yeniden yapılandırılan HDL 1:50 PC'nin türbidite analizinin sonuçlarını gösterir;
- 25 Şekil 7, RT'de yeniden yapılandırılan HDL 1:75 PC'nin türbidite analizinin sonuçlarını gösterir;
- Şekil 8, 37°C'de yeniden yapılandırılan HDL 1:75 PC'nin türbidite analizinin sonuçlarını gösterir; ve
- 30 Şekil 9, bir rHDL formülasyonu üretim prosesinin bir düzenlemesinin genel bir değerlendirmesini sağlar.

DETAYLI AÇIKLAMA

Buluş en azından kısmen, önceki teknikte açıklanan CSL111 yeniden yapılandırılan HDL (rHDL) formülasyonu tarafından gösterilen karaciğer toksisitesinin aşırı temizleyiciden, özellikle formülasyondaki temizleyicinin Apo-A1'e oranı bakımından düşünüldüğünde, kaynaklandığına yönelik beklenmeyen keşiften kaynaklanır. Bu

5 bakımdan, sodyum kolat seviyesi yaklaşık 0.3g/g Apo-A1 olmuştur. Ancak, buluşçular aynı zamanda temizleyicinin tamamen ortadan kaldırılamayacağını ve rHDL formülasyonunun yeterli stabilite ve terapötik aktivite gösterdiği bir seviyede tutulması gerektiğini keşfetmiştir.

10 İlaveten, CSL111'de mevcut olanla karşılaştırıldığında lipidin konsantrasyonundaki bir azalmanın, beklenmedik bir şekilde rHDL formülasyonunun terapötik aktivitesinden büyük ölçüde ödün verilmeden karaciğer toksisitesini azalttığı bulunmuştur.

Yine diğer bir keşifte, apolipoprotein:lipidin molar bir oranı rHDL formülasyonuna uygun

15 olarak tanımlanmıştır.

Buna göre, bir açıda mevcut buluş bir apolipoprotein veya bunun bir parçası; bir fosfolipid ve bir insana uygulandığında karaciğer toksisitesi gösterebilen bir rHDL formülasyonunda mevcut olanın yaklaşık %5-50'si olan bir seviyede bir temizleyici

20 içeren bir rHDL formülasyonu sağlar. Temizleyici seviyesi, 0,015-0,030 g/g apolipoproteindir.

Burada kullanıldığı üzere, "yeniden yapılandırılan bir HDL (rHDL)" formülasyonu, kan plazmasında tipik olarak bulunan işlevsel olarak yüksek yoğunluğa sahip lipoproteine

25 (HDL) benzer, analog, bununla ilişkili, bunun bir taklidi olan herhangi bir yapay olarak üretilen lipoprotein formülasyonu veya bileşimi olabilir. rHDL formülasyonları "HDL taklitlerini" ve "sentetik HDL partiküllerini" kapsamları dahilinde içerir.

Bu bağlamda, "rHDL formülasyonunun bir insana uygulanmasının üzerine karaciğer toksisitesi gösterir" ifadesi, bir insana uygulandığında sonrasında ters bir duruma neden olan, bununla sonuçlanan veya en azından bununla bağlantılı olan bir rHDL formülasyonunun içinde bir temizleyici seviyesi anlamına gelir. Tipik olarak, ters durum anormal veya bozulmuş karaciğer fonksiyonu tarafından belirtildiği üzere karaciğer toksisitesidir. Anormal veya bozulmuş olabilen karaciğer fonksiyonlarının sınırlandırıcı

30

35 olmayan örnekleri, yüksek alanin aminotransferaz aktivitesi (ALT), yüksek aspartat

aminotransferaz (AST) aktivitesi ve/veya yüksek bilirubin seviyelerini içerir. Buluşa göre, uygun bir temizleyici seviyesi burada önceden açıklandığı üzere olumsuz bir duruma neden olmayan, bununla sonuçlanmayan veya bağlantılı olmayan seviyedir. Tipik olarak bu, infüzyonun sonunda ölçülebilir

5

Tercihen, temizleyici seviyesi karaciğer toksisitesi gösterenin yaklaşık %5-35'i kadardır. Bu aralık, örneğin %5, %10, %15, %20, %25, %30 ve %35'i içerir. Daha çok tercihen, temizleyicinin seviyesi karaciğer toksisitesi gösterenin yaklaşık %5-20'si kadardır. Avantajlı olarak, seviye karaciğer toksisitesi gösterenin yaklaşık %5-10'u kadardır.

10 Tercihen, bu seviyeler karaciğer toksisitesi gösteren temizleyicinin minimum veya eşik seviyesi bakımından açıklanır.

Mevcut buluşun akciğer toksisitesine neden olmasına, bununla sonuçlanmasına veya en azından ilişkilendirilmesine yol açan çalışmada gösterilen bir temizleyici seviyesi, 15 0.3g/g Apo-AI veya 6g/L rHDL formülasyonudur (20g/L Apo-AI'de). Buna göre, bu temizleyici seviyesinin %5-10'u, 0.015-0.03 g/g Apo-AI veya 0.5-0.9 g/L rHDL formülasyonudur (30g/L Apo-AI'de).

20 Temizleyicinin "seviyesi" temizleyicinin mutlak bir miktarı, temizleyicinin bir konsantrasyonu (*örneğin*, rHDL formülasyonunun birim hacmi başına kütle) ve/veya rHDL formülasyonunun bir bileşeninin diğer bir konsantrasyonuna veya miktarına göre temizleyicinin konsantrasyonunun veya miktarının bir oranı olabilir. Sadece örnek yoluyla, temizleyicinin seviyesi rHDL formülasyonunda mevcut olan apolipoprotein (örneğin, Apo-AI) toplam kütlesi bakımından ifade edilebilir.

25

Karaciğer toksisitesinden kaçınma ve güvenlik buluşun bir amacı iken, buluş aynı zamanda rHDL formülasyon stabilitesini muhafaza etmek üzere yeterli bir temizleyici seviyesi gerektirir. Örneklerde detaylı olarak açıklanacağı üzere, 30 g/L apolipoprotein ile rHDL formülasyonunun yaklaşık 0.45 g/L'sinden daha az olmayan bir temizleyici 30 konsantrasyonu, hem stabilize hem de toksisite olmama durumu bakımından uygundur. rHDL formülasyonunun türbiditesi tercih edilen bir ölçüm olmasına rağmen, stabilize avantajlı olarak teknikte bilinen herhangi bir araç tarafından ölçülebilir.

35 Temizleyici, herhangi bir iyonik (örneğin katyonik, anyonik, Zwitteriyonik) temizleyici veya rHDL formülasyonlarında kullanıma uygun safra asitleri ve tuzları dahil olmak

üzere iyonik olmayan bir temizleyici olabilir. İyonik temizleyiciler, safra asitleri ve tuzlarını, polisorbitatları (örneğin PS80), CHAPS, CHAPSO, setil trimetil-amonyum bromid, lauroilsarkozin, tert-oktil fenil propansülfonik asit ve 4'-amino-7-benzamido-taurocholic asidi içerebilir.

5

Safra asitleri tipik olarak kolik asit, deoksikolik asit, kenodezoksikolik asit veya ursodeoksikolik asit dahil olmak üzere 24 karbon ile dihidroksile veya trihidroksile edilmiş steroidlerdir. Tercihen, temizleyici bir kolat, deoksikolat, kenodeoksikolat veya ursodeoksikolat tuzu gibi bir safra tuzudur. Belirli bir tercih edilen temizleyici sodyum kolattır.

10

Apolipoprotein, doğal olarak meydana gelen HDL'nin veya yeniden yapılandırılan yüksek yoğunluğa sahip bir lipoprotein (rHDL) fonksiyonel, biyolojik olarak aktif bir bileşeni olan herhangi bir apolipoprotein olabilir. Tipik olarak, apolipoprotein Apo-AI, Apo-AII veya Apo-AV, pro-apo-A1 veya Apo-AI Milano olarak bir varyant gibi plazma-derivesi veya rekombinant bir apolipoproteindir. Tercihen, apolipoprotein Apo-AI'dir. Aynı zamanda dikkate alınan apolipoprotein biyolojik olarak aktif parçalarıdır. Parçalar doğal olarak meydana gelebilir, kimyasal olarak sentetik veya rekombinant olabilir. Sadece örnek yoluyla, Apo-AI'nin biyolojik olarak aktif bir parçası tercihen en az %50, %60, %70, %80, %90 veya %95-100 veya %100'den bile daha büyük Apo-AI lesitin-kolesterol asiltransferaz (LCAT) uyarıcı aktivitesine sahip olabilir.

15

20

Uygun bir şekilde, apolipoprotein yaklaşık 20-50 g/L olan bir konsantrasyondadır. Bu, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 g/L ve bu miktarların arasındaki herhangi bir aralığı içerir. Apolipoprotein tercihen yaklaşık 30g/L bir konsantrasyondadır.

25

rHDL formülasyonu, karaciğer toksisitesine neden olmayan bir seviyede bir lipid (fosfolipid) içerir. Uygun bir şekilde, lipid seviyesi karaciğer toksisitesine neden olan veya bununla ilişkili olanın yaklaşık olarak %20-70'i kadardır. Belirli düzenlemelerde, lipid seviyesi tercihen karaciğer toksisitesine neden olan veya bununla ilişkili olanın yaklaşık olarak %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55, %60 veya %65'i kadardır veya bu miktarlar arasında herhangi bir aralıktadır. Tercihen, bu seviyeler karaciğer toksisitesi gösteren lipidin minimum veya eşik seviyesi bakımından ifade edilir.

30

35

Örnek yoluyla, mevcut buluşun karaciğer toksisitesine neden olması, bununla

sonuçlanması veya en azından bununla ilişkili olmasına yol açan bir çalışmada gösterilen bir lipid seviyesi 84 g/L'dir. Buna göre, lipid tercihen yaklaşık 30-60 g/L olan bir konsantrasyondadır. Bu, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 g/L ve bu miktarlar arasında herhangi bir aralığı içerir. Lipidin özellikle avantajlı bir konsantrasyonu yaklaşık 30-50g/L veya belirli düzenlemelerde yaklaşık 34 veya 47g/L'dir.

Lipid "seviyesi" mutlak bir lipid miktarı, bir lipid konsantrasyonu (*örneğin*, rHDL formülasyonunun birim hacmi başına kütle) ve/veya rHDL formülasyonunun bir bileşeninin diğer bir miktarına veya konsantrasyonuna göre lipid miktarının veya konsantrasyonunun bir oranı olabilir. Sadece örnek yoluyla, lipid seviyesi rHDL formülasyonunda bulunan apolipoproteinin (*örneğin*, Apo-AI) bir molar oranı açısından ifade edilebilir.

Apolipoprotein:lipidin molar oranı 1:20 ila 1:100 aralığındadır. Bu aralık, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80 ve 1:90 gibi molar oranları içerir. Daha çok tercihen, apolipoprotein:lipidin molar oranı 1:40 ila 1:75 aralığındadır. Apolipoprotein:lipidin özellikle avantajlı bir oranı yaklaşık 1:40 veya 1:55'tir.

Lipid bir fosfolipiddir. Fosfolipidlerin sınırlandırıcı olmayan özellikleri fosfatidilkolin (PC) (lesitin), fosfatidik asit, fosfatidiletanolamin (PE) (sefalin), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilserin (PS), fosfatidilinositol (PI) ve sfingomyelin (SM) veya bunların doğal veya sentetik derivelerini içerir. Doğal deriveler yumurta PC, yumurta PG, soya fasülyesi PC, hidrojenize edilmiş soya fasülyesi PC, soya fasülyesi PG, beyin PS, sfingolipidler, beyin SM, galaktoserebrosid, gangliosidler, serebrosidler, sefalin, kardiyolipin ve disetilfosfatı içerir. Sentetik deriveler dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), didekanoilfosfatidilkolin (DDPC), dierukoilfosfatidilkolin (DEPC), dimiristoilfosfatidilkolin (DMPC), distearoilfosfatidilkolin (DSPC), dilaurilfosfatidilkolin (DLPC), palmitoiloleoilfosfatidilkolin (POPC), palmitoilmiristoilfosfatidilkolin (PMPC), palmitoilstearoilfosfatidilkolin (PSPC), dioleoilfosfatidilkolin (DOPC), dioleoilfosfatidiletanolamin (DOPE), dilauoilfosfatidilgliserol (DLPG), distearoilfosfatidilgliserol (DSPG), dimiristoilfosfatidilgliserol (DMPG), dipalmitoilfosfatidilgliserol (DPPG), distearoilfosfatidilgliserol (DSPG), dioleoilfosfatidilgliserol (DOPG), palmitoiloleoilfosfatidilgliserol (POPG), dimiristoilfosfatidik asit (DMPA), dipalmitoilfosfatidik asit (DPPA), distearoilfosfatidik asit (DSPA), dimiristoilfosfatidiletanolamin (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamin (DPPE),

dimiristoilfosfatidilserin (DMPS), dipalmitoilfosfatidilserin (DPPS), distearoilfosfatidiletanolamin (DSPE), dioleoilfosfatidiletanolamin (DOPE) dioleoilfosfatidilserin (DOPS), dipalmitoilsfingomyelin (DPSM) ve distearoilsfingomyelin (DSSM) içerir. Fosfolipid aynı zamanda yukarıdaki fosfolipidlerden herhangi birinin bir
5 derivesi veya analogu olabilir.

Tercihen fosfolipid, tek başına veya bir veya daha fazla fosfolipid ile kombinasyon halinde fosfatidilkolindir veya bunu içerir. Diğer bir fosfolipid örneği, sfingomyelindir.

10 Uygun bir şekilde, rHDL formülasyonu ayrıca bir stabilizör içerir. Özellikle, stabilizör liyofilizasyon sırasında rHDL formülasyonunun stabilitesini muhafaza eder. Uygun bir şekilde, stabilizör bir şeker veya şeker alkolü gibi bir karbohidrattır. Şeker alkollerinin uygun örnekleri, manitol ve sorbitoldür. Tercihen, stabilizör sükroz gibi bir disakkarit şekeridir. Sükrozun tercih edilen bir konsantrasyonu yaklaşık 65-85 g/L (yaklaşık %6.5-
15 8.5 w/v'ye eşdeğer) rHDL formülasyonudur. Tercihen, sükroz konsantrasyonu yaklaşık 75 g/L'dir (yaklaşık %7.5 w/w'ya eşdeğer). Bu, hem mutlak bakımdan hem de CSL111 ile karşılaştırıldığında lipoprotein konsantrasyonuna göre azaltılmış bir sükroz konsantrasyonudur. Bu nispeten azaltılmış sükrozun, buluşun rHDL formülasyonuna yönelik daha hızlı bir infüzyon oranına izin verebileceği önerilir. Diğer stabilizörler,
20 burada sınırlama yapılmadan, amino asitler (*örneğin*, glisin, prolin), antioksidanlar, emülsiyonlaştırıcılar, sürfaktanlar, şelatlayıcı ajanlar, jelatin, sentetik yağlar, poliyağlar, aljinat veya farmasötik olarak kabul edilebilir herhangi bir taşıyıcı ve/veya ekspiyen olabilir veya bunları içerebilir. Bu bağlamda, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000), "Handbook of
25 Pharmaceutical Excipients", 3rd edition, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000) ve Uluslararası Yayın WO2009/025754'e örnek yoluyla referans yapılır.

Özellikle tercih edilen bir düzenlemede; rHDL formülasyonu aşağıdaki unsurları içerir:

- (i) yaklaşık 30g/L Apo-AI;
- 30 (ii) Apo-AI gramı başına yaklaşık 0.03g sodyum kolat;
- (iii) yaklaşık 34 veya 47g/L fosfatidilkolin; ve
- (iv) yaklaşık 75g/L sükroz;

burada Apo-AI: fosfatidilkolin molar oranı yaklaşık 1:40 veya 1:55'tir.

35 Diğer bir açıda, buluş bir apolipoprotein, bir fosfolipid lipid ve bir temizleyici içeren bir

rHDL formülasyonunun üretilmesine yönelik bir yöntem sağlar, söz konusu yöntem 0,015-0,030 g/g apolipoprotein olan bir seviyede söz konusu temizleyicinin sağlanmasının adımını içerir.

- 5 Tercihen, söz konusu yöntem bir insana uygulandığında karaciğer toksisitesi gösterenin yaklaşık %5-10'u kadar bir seviyede söz konusu temizleyicinin sağlanmasının adımını içerir.

- 10 Yöntemin tercih edilen bir düzenlemesinde, temizleyicinin ilk veya başlangıç seviyesi, rHDL formülü bir insana uygulandığında karaciğer toksisitesi göstermeyen bir seviyeye azaltılır veya çıkarılır.

- 15 Temizleyicinin azaltılması veya çıkarılması, örneğin filtrasyon, hidrofobik adsorpsiyon veya hidrofobik etkileşim kromatografisi, diyaliz, iyon-değişim adsorpsiyonu ve iyon-değişim kromatografisi dahil olmak üzere teknikte bilinen herhangi bir yol tarafından gerçekleştirilebilir.

- 20 Bazı düzenlemelerde, polar-olmayan polistiren reçineler temizleyici seviyelerinin azaltılmasına yönelik uygun olabilir. Bu tür reçineler tercihen çapraz-bağlantılı bir kopolimer formundadır (örneğin, çapraz-bağlantılı bir stiren veya divinilbenzen kopolimer). Sınırlandırıcı olmayan örnekler, Amberlit XAD-2 ve Bio Beads SM'yi içerir.

- 25 Filtrasyon, bunlarla sınırlı olmamak üzere, teknikte iyi anlaşıldığı üzere jel filtrasyonu, jel geçirimi, diafiltrasyonu ve ultrafiltrasyonu içerir. Jel geçiriminin sınırlandırıcı olmayan bir örneği, gözenek, Sefadeks reçineleri gibi çapraz-bağlantılı dekstran kullanabilir.

Büyük ölçekli üretime yönelik özellikle uygun ve özellikle tercih edilen bir düzenlemede, temizleyici seviyesi diafiltrasyon yoluyla azaltılır.

- 30 Uygun bir şekilde, yöntem organik solvent varlığında lipid ve apolipoprotein kombinasyonunun adımını içerir.

Buna göre, tercih edilen bir düzenlemede, buluş aşağıdaki adımlar dahil olmak üzere bir rHDL formülasyonunun üretilmesine yönelik bir yöntem sağlar:

- (I) bir Apo-A1 solüsyonuna organik solvent olmadan fosfatidilkolin ve bir kolat temizleyicinin eklenmesi;
- (II) yaklaşık 0.03 g/g Apo-A1 olarak adımda (I) üretilen solüsyondaki kolat temizleyicinin seviyesinin azaltılması;
- 5 (III) adımda (II) solüsyona bir stabilizörün, tercihen sükroz, eklenmesi.

Tercihen, adımda (I), fosfatidilkolin eklenir, böylece Apo-AI: fosfatidilkolin oranı yaklaşık 1:40 veya 1:55 olur.

- 10 Tercihen, adımda (III) sükrozun nihai konsantrasyonu yaklaşık 75 g/L'dir.

Uygun bir şekilde, yöntem ayrıca adımda (III) üretilen rHDL formülasyonunu iyofilize etmenin adımını (IV) içerir.

- 15 Belirli bir düzenlemede, bir rHDL formülasyonu üretiminin insanlara uygulanmasına yönelik bir güven ve kalitede bir rHDL formülasyonunun büyük ölçekli, ticari üretimine yönelik uygun olduğu anlaşılabacaktır. Büyük ölçekli, ticari üretim prosesinin sınırlandırıcı olmayan bir örneği ŞEKİL 9'da özetlenir.

- 20 Yine diğer bir açıda, buluş bir insanda söz konusu hastalığı, rahatsızlığı veya durumu böylece tedavi etmek üzere burada daha önceden açıklandığı ve burada daha önceden açıklanan yönteme göre üretildiği üzere bir rHDL'nin bir insana uygulanması dahil olmak üzere bir insanda bir hastalığın, rahatsızlığın veya durumun tedavi edilmesine yönelik bir yöntem sağlar.

25

Buluş aynı zamanda bir insanda bir hastalığın, rahatsızlığın veya durumun tedavi edilmesinde kullanıma yönelik burada daha önceden açıklandığı üzere ve burada daha önceden açıklandığı üzere yönteme göre üretildiği üzere bir rHDL formülasyonu sağlar.

- 30 Uygun bir şekilde, hastalık, rahatsızlık veya durum söz konusu rHDL formülasyonunun profilaktik veya terapötik olarak uygulanmasına duyarlıdır. Bu tür hastalıklar, rahatsızlıklar veya durumların sınırlandırıcı-olmayan örnekleri, kardiyovasküler hastalık (örneğin, akut koroner sendromu (ACS, ateroskleroz ve miyokard enfarktüsü) veya Tangier hastalığının semptomatığı gibi ACS, hiperkolesterolemi (örneğin, yüksek serum
- 35 kolesterol veya yüksek LDL kolesterol) ve yüksek yoğunluğa sahip lipoprotein (HDL)

azalan seviyelerinden kaynaklanan hipokolesterolemiye yatkınlığı olan diyabet, felç veya miyokard enfarktüs gibi hastalıklar, rahatsızlıklar veya durumları içerir.

5 rHDL formülasyonları teknikte bilinen herhangi bir uygulama yoluyla uygulanabilir. Tipik olarak, rHDL formülasyonları intravenöz infüzyon veya enjeksiyon gibi parenteral olarak uygulanır.

10 rHDL formülasyonunun uygulanan dozajı 1-120 mg/kg vücut ağırlığı aralığında olabilir. Tercihen, dozaj 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg ve 70 mg/kg dozajları da kapsayabilen 5-80 mg/kg aralığındadır

Böylece buluşun tercih edilen düzenlemeleri tamamen anlaşılabilir ve pratik olarak etkili olabilir, referans aşağıdaki sınırlandırıcı olmayan Örneklere yapılabilir.

15 **ÖRNEKLER**

Bundan sonra sağlanan Örnekler, hangi rHDL formülasyonu faktörlerinin (CSL111 gibi) karaciğer toksisitesi (Örnekler 1 & 2) ve gelişmesi ve buluşun bir rHDL formülasyonuna ait düzenlemelerin toksisite testine (Örnekler 3 ila 8) katkıda bulunduğunu belirlemek üzere başlangıçtaki çalışmaları açıklar.

ÖRNEK 1

25 ***Farklı Apo-A1:PC oranlarını ve kolat seviyelerinin kontrol edilmesinin etkilerini karşılaştıran karaciğer toksisite çalışması***

30 ALT aktivitesi tarafından ölçüldüğü üzere karaciğer toksisite seviyesi, farklı Apo A1:PC oranları (1:150, 1:100 & 1:50) içeren HDL preparatlarına yönelik sıçan modelinde belirlenmiştir (Örnek 2'de aşağıda modelin detaylarına bakınız). Her bir HDL preparatı, 1:50 preparata yönelik 1.1 g/L ila 1:150'e yönelik 6 g/L aralığında seviyelerle farklı kolat konsantrasyonları bulundurmıştır.

35 Sonuçlar, 300 mg/kg'dan dozlar bakımından 1:150 HDL preparatına yönelik artan ALT seviyelerinin gözlemlendiğini göstermiştir. 1:100 HDL preparatı, 600 mg/kg'da kayda değer bir şekilde artan seviyelerle, 400 mg/kg'dan dozajlarda artan ALT seviyelerine neden

olmuştur. Öte yandan, ALT aktivitesinde bir artış, 600 mg/kg bir doza kadar 1:50 HDL preparatına yönelik gözlenmemiştir (ŞEKİL 1). Bu sonuçlar karaciğer toksisitesinin HDL preparatında PC seviyesi ve/veya kolat seviyesi tarafından azaltıldığını belirtir. Kolat seviyesinin ALT aktivitesinin üzerinde direkt bir etkiye sahip olup olmadığını incelemek üzere, CSL111'de kolatın tamamen tükendiği ek bir çalışma yürütülmüştür. Sonuçlar bir CSL111 preparatının içindeki kolat azalımının, 300 mg/kg'da bir sıçana aşılandığında, ALT seviyelerinde bir azalma ile sonuçlandığını gösterir (ŞEKİL 2). İlave, kolatın akabinde tüketilen HDL preparatına tekrar eklenmesi halinde, tekrar takviye yapılan HDL preparatı, 300 mg/kg'da bir sıçana aşılandığında, artan ALT seviyelerine neden olmuştur (ŞEKİL 2). Bu çalışmalar kolatın yaklaşık 1 g/L azaltılmasının rHDL toksisitesini büyük ölçüde azalttığını gösterir, ancak aynı zamanda ilave bir katkı faktörü, yaklaşık olarak 50 apoA1 :PC oranında PC'de bir azalmadır.

ÖRNEK 2

15

Derecelendirilmiş kolat seviyelerini ve Apo-A1:PC oranlarını karşılaştıran karaciğer toksisitesi çalışması

GİRİŞ

20

Bu çalışmanın amacı, rHDL PC 1:150 (3g/L Kolat), rHDL PC 1:100 (1g/L Kolat), rHDL PC 1:50 (3g/L Kolat), rHDL PC 1:50 (0.2 g/L Kolat) gibi derecelendirilmiş kolat konsantrasyonları ve Apo A-I ile PC oranlarıyla yeniden yapılandırılan HDL formülasyonlarının (rHDL) hepatoksitesini belirlemek olmuştur. Bilinçli sıçan modeli karaciğer fonksiyonu üzerinde yukarıda belirtilen formülasyonların etkisini belirlemek üzere kullanılmıştır. Hepatoksisite, serumda karaciğer enzim aktivitesinin (ALT ve AST) belirlenmesi tarafından değerlendirilmiştir.

Apo-A formülasyonların aktif bileşeni olarak düşünülür ve Apo-A1'in plazma seviyeleri maruz kalma durumunun ana göstergesidir.

30

MATERYALLER VE YÖNTEMLER

Test rHDL formülasyonlarının uygulanması

35

Test rHDL formülasyonu 1

Madde/INN:	rHDL PC 1:150 (3g/L Kolat)
Üretici:	CSL Behring AG, Bern, İsviçre
Lot sayısı:	Q.3
Doz:	600 mg/kg vücut ağırlığı
Yol:	Kuyruk damarı aracılığıyla itravenöz infüzyon
Sıklık:	infüzyon t=0-60 dakika.
Uygulama hacmi:	31.25 mL/kg/saat

Test rHDL formülasyonu 2

Madde/INN:	rHDL PC 1:100 (1g/L Kolat)
Üretici:	CSL Behring AG, Bern, İsviçre
Lot sayısı:	0.3-2
Doz:	600 mg/kg vücut ağırlığı
Yol:	Kuyruk damarı aracılığıyla itravenöz infüzyon
Sıklık:	infüzyon t=0-60 dakika.
Uygulama hacmi:	30.30 ml/kg/saat

5 Test rHDL formülasyonu 3

Madde/INN:	rHDL PC 1:50 (3g/L Kolat)
Üretici:	CSL Behring AG, Bern, İsviçre
Lot sayısı:	P.3
Doz:	600 mg/kg vücut ağırlığı
Yol:	Kuyruk damarı aracılığıyla itravenöz infüzyon
Sıklık:	infüzyon t=0-60 dakika.
Uygulama hacmi:	31.58 ml/kg/saat
Son kullanım tarihi:	yok

Test rHDL formülasyonu 4

Madde/INN:	rHDL PC 1:50 (0.2 g/L Kolat)
Üretici:	CSL Behring AG, Bern, İsviçre
Lot sayısı:	P.2
Doz:	900 mg/kg vücut ağırlığı
Yol:	Kuyruk damarı aracılığıyla intravenöz infüzyon
Sıklık:	infüzyon t=0-120 dakika.
Uygulama hacmi:	23.08 ml/kg/saat vücut ağırlığı

Çalışma Tasarımı

- 5 Bu çalışma, toplamda 14 sıçan ile açık bir dört-kollu deney olarak tasarlanmıştır. Dozlama sistemi Tablo 1'de özetlenir.

Tedavi Grupları

- 10 Tablo 1: Tedavi grupları

No.	Tedavi	Doz (mg/kg)	Yol	hacim (mL/kg/saat)	program (t=x dakika)	N
1	rHDL PC 1:150 (3g/L Kolat)	600	intravenöz	31.25	0-60	4
2	rHDL PC 1:100 (1g/L Kolat)	600	intravenöz	30.30	0-60	4
3	rHDL PC 1:50 (3g/L Kolat)	600	intravenöz	31.58	0-60	4
4	rHDL PC 1:50 (0.2g/L Kolat)	900.	intravenöz	23.08	0-120	2

Deney Hayvanları

Türler:	Sıçanlar
Aile:	CD
Cinsiyet:	erkek
Hayvanların Sayısı:	14
Tedarikçi:	Charles River Laboratuvarları (Sulzfeld, Almanya)
Vücut ağırlığı:	286-328 g
Variş yaşı:	7-9 hafta
Barınma:	makrolon kafesleri
Yatak:	talaş (Braun, Battenberg, Almanya)
Su:	Çeşme suyu, istenildiği kadar
Yemek:	standart sıçan diyeti (Ssniff-Versuchsdieten, Soest, Almanya)
Işık/karanlık:	12 saat/12 saat
Sıcaklık:	21-22 °C
Bağıl nem:	%40 - 50

Hayvanlar tutma aygıtlarına (sıçan tutucu) yerleştirilmiştir ve lateral kuyruk damarı intravenöz bir kateter ile delinmiştir. Test maddeleri 60/120 dakika boyunca infüze edilmiştir.

5

Kan örnekleri, retro-orbital venöz kompleksinden alınmıştır ve infüzyondan sonra taban çizgisinde, 1saat/2saat ve 7saat/8saat boyunca serum tüplerinin içine toplanmıştır. Kan örnekleri, -20°C'de muhafaza edilen serumlara işlenmiştir.

10 **Karaciğer enzimlerinin belirlenmesi**

Örnekler, ticari olarak temin edilebilen (Greiner Biochemica) enzimatik fotomerik test kitleri kullanılarak AST ve ALT aktivitesine yönelik analiz edilmiştir.

15 **Apo A-I plazma seviyesinin belirlenmesi**

İnsan Apo A-I seviyelerinin belirlenmesi, nefelometrik bir analiz tarafından gerçekleştirilmiştir.

SONUÇLAR

5

1:50, 1:100 ve 1:150 Apo A-I ile PC oranları ile rHDL formülasyonları ve aynı zamanda 1 veya 3 g/L tanımlanan bir Kolat konsantrasyonu veya tüketilen Kolat (0.2 g/L) incelenmiştir. Salin bir araç ve CSL 111 olumlu kontrol işlevi görmüştür. Kan örnekleri, 7 saat veya 8 saatte ve infüzyon ucunda (1saat veya 2saat, sırasıyla, 600 ve 900 mg/kg) taban çizgisinde (zaman noktası 0) alınmıştır. Karaciğer enzim aktivitesi (ALT ve AST) ve insan Apo A-I seviyeleri, daha önceden belirtilen zaman-noktalarında tahmin edilmiştir.

10

Taban çizgisinde AST konsantrasyonu, 63 ve 87 U/L aralığında olmuştur. AST konsantrasyonu, Apo AI:PC 1:50 (Kolat 0.2 g/L) haricinde tüm formülasyonlar bakımından infüzyonun sonunda ve 7saa/8saat zaman-noktasında artmıştır.

15

Taban çizgisinde ALT konsantrasyonu, 39 ve 45 U/L aralığında olmuştur. AST konsantrasyonu, Apo AI:PC 1:50 (Kolat 0.2 g/L) haricinde tüm formülasyonlar bakımından infüzyonun sonunda ve 7saa/8saat zaman-noktasında artmıştır.

20

Taban çizgisinde insan Apo A-I konsantrasyonu, en düşük tespit seviyesinin altında olmuştur. İnfüzyonun sonunda, 600 mg/kg'da dozlanan tüm formülasyonlara yönelik konsantrasyon yaklaşık olarak 13 g/L'ye artmıştır. 900 mg/kg'de formülasyon 1:50, 15 g/L bir Apo A-I konsantrasyonu ile sonuçlanmıştır.

25

Tüm gruplar, dozlar ve zaman-noktalarına yönelik araçlar ve standart sapmalar, Tablo 2 ile 4'te verilir.

30 Tablo 2: AST serum seviyeleri (ortalama±SD)

Tedavi / Serum konsantrasyonu (U/L)

Zaman-noktası	rHDL PC 1: 150 (3g/L Kolat)	rHDL PC 1:100 (1g/L Kolat)	rHDL PC 1:50 (3g/L Kolat)	rHDL PC 1:50 (0.2g/L Kolat) (*)
---------------	-----------------------------	----------------------------	---------------------------	---------------------------------

	600 mg/kg	600 mg/kg	600 mg/kg	900 mg/kg
	n=4	n=4	n=4	n=2
Taban çizgisi	65.81±15.96	63.33±7.16	66.83±9.62	87.26±25.41
1 saat/2saat(*)	275.48±66.20	166.19±118.42	287.77±122.04	55.29±1.71
7 saat/8saat(*)	1755.65±562.36	433.42±320.17	286.57±65.38	91.44±15.45

Tablo 3: Sonrasında ALT serum seviyeleri (ortalama±SD)

Tedavi / Serum konsantrasyonu (U/L)				
Zaman-noktası	rHDL PC 1:150 (3g/L Kolat)	rHDL PC 1:100 (1g/L Kolat)	rHDL PC 1:50 (3g/L Kolat)	rHDL PC 1:50 (0.2g/L Kolat) (*)
	600 mg/kg	600 mg/kg	600 mg/kg	900 mg/kg
	n=4	n=4	n=4	n=2
Taban çizgisi	38.91±3.28	43.02±6.39	45.27±4.07	41.51±6.87
1 saat/2saat(*)	211.80±61.26	105.19±69.09	147.62±51.32	33.11±2.98
7 saat/8saat(*)	1552.96±715.45	435.66±323.69	263.07±69.86	55.90±16.92

Tablo 4: Apo A-I serum seviyeleri (ortalama± SD)

Tedavi / Serum konsantrasyonu (g/L)				
Zaman-noktası	rHDL 1:150 Kolat)	PC (3g/L 1:100 Kolat)	rHDL PC 1:50 (3g/L Kolat)	rHDL PC -1:50 (0.2g/L Kolat) (*)
	600 mg/kg	600 mg/kg	600 mg/kg	900 mg/kg
	n=4	n=4	n=4	n=2

Zaman- noktası	Tedavi / Serum konsantrasyonu (g/L)							
	rHDL 1:150 Kolât)	PC (3g/L	rHDL 1:100 Kolât)	PC (1g/L	rHDL (3g/L	PC Kolât)	1:50 (0.2g/L (*)	rHDL PC -1:50 Kolât)
	600 mg/kg		600 mg/kg		600 mg/kg		900 mg/kg	
	n=4		n=4		n=4		n=2	
Taban çizgisi	0.246±0.000		0.246±0.000		0.246±0.000		0.246±0.000	
1 saat/2saat(*)	13.150±0.687		13.900±0.248		13.000±1.217		14.700±1.414	
7 saat/8saat(*)	10.175±0.185		7.700±1.352		7.075±0.595		9.250±0.283	

SONUÇ

Sonuç olarak, sadece 900 mg/kg'da rHDL formülasyonu Apo A1:PC oranı 1:50 (0.2 g/L kolat) herhangi bir karaciğer fonksiyonu test anormalliği göstermemiştir. Öte yandan, 600 mg/kg'da daha yüksek kolat seviyeleriyle (3 g/L) aynı 1:50 rHDL formülasyonu, yüksek AST ve ALT seviyelerinin her ikisini de göstermiştir. Bu, karaciğer toksisitesinin rHDL formülasyonlarının lipid ve kalıntı temizleyici içeriğinin kontrol edilmesi yoluyla en iyi şekilde minimum hale geldiğini belirtir.

ÖRNEK 3

rHDL formülasyonlarındaki kolat seviyelerini karşılaştıran stabilite deneyleri

Buluşun rHDL formülasyonunun bir düzenlemesi, önceki teknik rHDL formülasyonu CSL111 ile karşılaştırıldığında, CSL111'e en azından eşdeğer bir biyolojik aktivite korunurken, büyük ölçüde azalmış karaciğer toksisitesi gösterir. Bu rHDL formülasyonu, daha düşük bir protein ila PC oranı, daha düşük bir kolat seviyesi, daha yüksek bir protein içeriği ve azalmış bir sükröz konsantrasyonu açısından CSL111'den farklıdır.

Yeniden yapılandırılan HDL'nin formülasyonu

Başlangıç materyali Apo-AI

Başlangıç materyali olarak, saflaştırılmış ve pastörize edilmiş bir Apo-AI solüsyonu kullanılmıştır. Parti boyutu 30 g veya 35 g protein olmuştur.

Lipid solüsyonu

Lipid solüsyonunu üretimine yönelik formül aşağıda verilir. İlk olarak, 10 mM Tris, 10 mM NaCl ve 1 mM EDTA içeren tampon solüsyon yapılmıştır. Gerekli miktar eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Tampon solüsyonunun [g]} = \frac{\text{protein miktarı [g]} \cdot 1000 \cdot 0.025 \cdot \text{oran}}{150} \quad \text{eşitlik 1}$$

Akabinde, sodyum kolat (1.3 mol / mol lipid) bu solüsyona eklenmiştir ve çözünmüştür.

Akabinde, hesaplanan lipid miktarı uygulanmıştır (eşitlik 2), karışım 6-18 saat hafif bir şekilde karıştırılmıştır (lipid çözünmüştür) ve akabinde bir 0.2µm Millipak 40 Gama Altın, (Millipore Art. MPGL04GH2) önceden sterilize edilmiş filtre kurulumu kullanılarak filtrelenmiştir.

$$\text{lipid miktarı [g]} = \frac{\text{protein miktarı [g]} \cdot \text{protein oranı} \cdot M(\text{lipid})[\text{g/mol}] \cdot 100}{M(\text{apoA-I})[\text{g/mol}] \cdot \text{lipid saflığı [\%]}} \quad \text{eşitlik 2}$$

M(lipid): PC'ye yönelik 775g/mol; SM'ye yönelik 731g/mol
M(Apo-AI): 28'078 g/mol

Lipid inkübasyon ve UF/DF

Apo-AI solüsyonu (30 g - 35 g protein), 5L bir iki kılıflı kabın içine yerleştirilmiştir ve 1-4°C'ye soğutulmuştur. Akabinde, lipid solüsyonu eklenmiştir ve 1-4°C'de 2-16 saat karıştırılmıştır. Bazı deneylere yönelik, protein-lipid solüsyonu 30°C'de 30 dakika ısıtılmıştır, soğutulmuştur ve akabinde 1-4°C'de 2-16 saat inkübe edilmiştir.

Kolatı uzaklaştırmak üzere, %1 süktroz solüsyonunun 7-9 hacmine karşı 10 kDa kaset ile UF/DF gerçekleştirilmiştir.

- 5 Solüsyon akabinde 22-28 g/L (FP içinde 20 g/L protein konsantrasyonu) veya 32-38 g/L'ye (FP içinde 30 g/L protein konsantrasyonu) konsantre edilmiştir ve sonrasında süktroz ve WFI eklenerek %7.5 süktroz ve 20 g/L veya 30 g/L proteine getirilmiştir. rHDL kütlesi steril bir şekilde filtrelenmiştir (Sartopore 2, 150 cm², PES, 0.1 µm kesilmiştir, Sartorius Art. 5441358K4--00) ve laminar akışın içinde doldurulmuştur.

10

Amberlit ile kolat azaltımı

Amberlit Hazırlanması

- 15 Tüm filtrasyon adımları, Nalgen 0.2 µm PES filtre (Art. 595-4520) ile gerçekleştirilmiştir.

- Amberlit XAD-2 (400 g), %20 500 mL metanola (v/v) eklenmiştir. Süspansiyon, 1-2 saat karıştırılmıştır ve akabinde Amberlit filtrelenmiştir. Akabinde, 300 ml 1M NaOH, 1000 mL bir beherin içine yerleştirilmiştir, Amberlit eklenmiştir ve 15 dakika karıştırılarak 55-
20 60°C'ye ısıtılmıştır. Amberlit filtrelenmiştir; sonrasında bu prosedür iki kez daha tekrarlanmıştır. Akabinde, Amberlit pH nötr olana kadar su (SWA) (yaklaşık olarak 10-15 L) ile yıkanmıştır, filtrelenmiştir, 300 mL metanole eklenmiştir, 1 saat karıştırılmıştır ve akabinde karışım en az bir gece 2-8°C'de bırakılmıştır. Metanolü uzaklaştırmak üzere, Amberlit filtrelenmiştir, yaklaşık olarak 10 L su (SWA) ile yıkanmıştır ve tekrar
25 filtrelenmiştir. Akabinde, Amberlit tüketilecek yeniden yapılandırılan HDL'nin süktroz konsantrasyonuna karşılık gelen, %7.5 veya %10 olarak, yaklaşık 4L bir süktroz solüsyonunun içine dökülmüştür. Karışım birkaç dakika karıştırılmıştır ve kullanmadan hemen önce filtrelenmiştir.

- 30 **Amberlit ile kolat azaltımı**

Yeniden yapılandırılan HDL 2-8°C'ye soğutulmuştur, Amberlit XAD-2 eklenmiştir ve karışım 3.5 saat karıştırılmıştır. Amberlit filtrelenmiştir ve boşaltılmıştır. Bu adım iki kez gerçekleştirilmiştir.

Deneye bağılı kalarak, 5 g proteine yönelik, her bir tüketme adımı bakımından 100-160g Amberlit kullanılmıştır.

Tüketimden sonra, farklı kolat konsantrasyonları sağlamak üzere kolat eklenmiştir.

5

Yeniden oluşturulan HDL 1:75 PC'nin 0.7g/L bir kolat konsantrasyonuna azaltılmasına yönelik, eklenecek Amberlit miktarı, Amberlitin yeniden yapılandırılan HDL'ye farklı oranlarda eklenmesi ile (ön deney) deney yoluyla belirlenmiştir. Bu deneyler, 5g protein başına 50g Amberlit ile yapılan bir tedavinin gerekli olduğunu bulmuştur. Bu Amberlit ile

10

Stabilite değerlendirmeleri

CSL111

15

Karaciğer toksisitesini etkileyebilen varsayılan bir bileşik, kolattır. Bu nedenle, nihai formülasyonda kolat azaltımı bir ana hedef olmuştur. Başlangıç deneyleri CSL111 ile gerçekleştirilmiştir. Yine de stabil bir ürün garantileyen minimal kolat konsantrasyonunu bulmak üzere, yeniden yapılandırılan CSL111 Amberlit ile muamele edilmiştir ve

20

sonrasında kolat farklı konsantrasyonlar elde etmek üzere tekrar eklenmiştir.

Stabilite değerlendirmeleri bu materyaller üzerinde gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda, farklı kolat konsantrasyonları ile CSL111'in stabilitesi üzerinde liyofilizasyonun etkisi

25

Yeniden yapılandırılan HDL 1:50 PC / 1:75 PC

İki formülasyonun (1.50 PC ve 1:75 PC), Amberlit ile kolatı tüketilmiştir ve farklı kolat konsantrasyonları elde etmek üzere kolat eklenmiştir. Bu solüsyonlar liyofilize edilmiştir, yeniden yapılandırılmıştır ve bu formülasyonların stabilitesini garanti altına almak üzere ihtiyaç duyulan minimal olarak gerekli kolat konsantrasyonunu belirlemek üzere stabilite incelenmiştir.

30

SONUÇLAR

35

CSL111'e yönelik sonuçlar

CSL111, kolatı uzaklaştırmak üzere Amberlit ile muamele edilmiştir. Kolat akabinde çalışmaya yönelik gerekli farklı konsantrasyonları elde etmek üzere eklenmiştir.

5

2.8 g/L kolat altındaki aralıkta, kolat konsantrasyonunun daha fazla azaltılmasından dolayı türbidite artmıştır. 2.8 g/L'nin üzerindeki kolat konsantrasyonlarına yönelik, türbidite değerlerinde neredeyse hiçbir değişiklik tespit edilmemiştir (ŞEKİL 3).

10 Bu örnekler akabinde liyofilize edilmiştir ve yeniden yapılandırılmıştır. 7 gün muhafaza edilmesinden ve 0saat, 24saat sonra, türbidite ölçülmüştür. Liyofilizasyon ve yeniden yapılandırmadan sonra türbidite değerleri, liyofilize edilmeyen örneklerden daha yüksektir (karşılaştırınız ŞEKİL 3 ve ŞEKİL 4).

15 Yeniden yapılandırılan CSL111 partikülleri, stabil kalmak üzere minimum bir kolat konsantrasyonuna gerek duyar. Kolat konsantrasyonunun aşırı düşük olması halinde, topaklaşma ve türbidite oluşur. Aynı zamanda, moleküler boyut dağılımı, düşük kolat konsantrasyonlarında daha hızlı değişir.

20 Yeniden yapılandırılan HDL 1:50 PC

Türbiditeye yönelik veri ŞEKİLLER 5 & 6'da verilir.

25 Türbidite verisi RT'deki değişikliklerin, ≥ 0.3 g/L olan kolat konsantrasyonlarına yönelik küçük olduğunu belirtmiştir.

30 RT'de 24 saat sonra SE-HPLC kromatogramları (gösterilmemiştir), türbidite değerleri ile aynı yatkınlığı göstermiştir. ≥ 0.3 g/L olan bir kolat konsantrasyonu ile, değişiklikler küçüktür. 0.8 - 1.0 g/L arasında, kromatogramlar neredeyse hiçbir fark göstermez. Bu nedenle, kolat konsantrasyonunun 1.0 g/L'nin üzerine çıkması halinde, stabilitede bir artışın elde edilmesi beklenmez. 20 g/L protein ile 1:50 formülasyonuna yönelik, 0.3 - 1.0 g/L arasında bir kolat konsantrasyonu, bu nedenle optimal olarak düşünülür. 30 g/L protein içeren bir ürüne yönelik hesaplandığında, optimal kolat konsantrasyonu 0.5 - 1.5 g/L aralığında olabilir.

35

Yeniden yapılandırılan HDL 1:75 PC

1:75 formülasyonunun türbidite ölçümleri (ŞEKİLLER 7 & 8), 0.6 g/L kolatın altındaki konsantrasyonlara yönelik net bir artış gösterir. Diğer konsantrasyonlara yönelik (0.6 - 2.0 g/L kolat) bir günlük muhafaza etme işleminden sonra farklılıklar düşüktür.

RT'de 24 saat sonra moleküler boyut dağılımının SE-HPLC kromatogramları (gösterilmemiştir), tüketilen ve diğer örnekler arasında net bir fark göstermiştir.

1.0 - 1.3 g/L kolat arasında, kromatogramlar neredeyse hiçbir fark göstermemiştir. Bu nedenle, 1.3 g/L üzerinde kolat konsantrasyonlarına yönelik stabilitede büyük bir artış beklenmez. 20 g/L protein ile 1:75 formülasyonuna yönelik, 0.6 - 1.3 g/L arasında bir kolat konsantrasyonu bu nedenle optimal olarak değerlendirilir. 30 g/L protein ile bir formülasyona yönelik bu, 0.9 - 2.0 g/L bir nihai kolat konsantrasyonuna eşittir.

SONUÇLAR

0.5 - 1.5 g/L optimal bir kolat konsantrasyonu, buluşun rHDL formülasyonuna yönelik seçilmiştir. Bu aralığın altında, stabilite düşmüştür. 1.5 g/L'nin üzerindeki kolat konsantrasyonları, stabilitede küçük bir artışa neden olmuştur. Ancak, karaciğer toksisitesinde kabul edilebilir bir artış, daha yüksek kolat konsantrasyonları ile beklenebilir.

ÖRNEK 4

CSL111 ile karşılaştırmalı karaciğer toksisite deneyi

GİRİŞ

Bu çalışmanın amacı, tavşanlara intravenöz infüzyon yapılmasından sonra, buluşa ait rHDL formülasyonunun bir düzenlemesinin uygun hepatotoksik profilini doğrulamak olmuştur. Hepatotoksite, serumdaki artan karaciğer enzimi (ALT) aktivitesi olarak tanımlanır. Apo-A1, her iki formülasyonun aktif bileşeni olarak düşünülür ve Apo-A1 plazma seviyeleri maruz kalma durumunun ana göstergesidir.

MATERYALLER & YÖNTEMLER

Test rHDL formülasyonlarının uygulanması

5 Test rHDL formülasyonu 1

Madde/INN:	rHDL CSL111
Üretici:	CSL Behring AG, Bern
Lot sayısı:	E502-03750-00005
Doz:	75 mg/kg vücut ağırlığı
Yol:	intravenöz
Sıklık:	infüzyon t=0-40 dakika.
Uygulama hacmi:	4.95 mL/kg/saat

Test rHDL formülasyonu 2

Madde/INN:	rHDL (PC 1:55)
Üretici:	CSL Behring AG, Bern
Lot sayısı:	1003.E009.01
Doz:	75 mg/kg vücut ağırlığı
Yol:	intravenöz
Sıklık:	infüzyon t=0-40 dakika
Uygulama hacmi:	3.87 mL/kg/saat

Çalışma Tasarımı

10

Bu çalışma, toplamda 6 dişi tavşan ile açık iki-kollu bir deney olarak tasarlanmıştır. Dozlama sistemi Tablo 5'te özetlenir.

Tedavi Grupları

15

Tablo 5: Tedavi grupları

No.	Tedavi	Doz / hacim / yol	N (f)
1	rHDL CSL111	75 mg/kg vücut ağırlığı / 4.95mL/kg/saat / intravenöz	3
2	rHDL PC1:55	75 mg/kg vücut ağırlığı / 3.87 mL/kg/saat / intravenöz	3

Deney Hayvanları

Türler:	Tavşan
Aile:	CHB
Hayvanların sayısı, Cinsiyet:	6 (dişi)
Tedarikçi:	Fa. Bauer (Neuenstein-Lohe, Almanya)
Vücut ağırlığı:	3.1 - 3.3 kg
Varış yaşı:	yaklaşık 3 - 4 ay
Barınma:	Çelik telli kafesler; 1 hayvan/kafes
Yatak:	yok
Su:	Çeşme suyu, istenildiği kadar
Yemek:	Deukanin Peletleri (Deuka), istenildiği kadar
Işık/karanlık:	12 saat / 12 saat
Sıcaklık:	21-23 °C
Bağıl nem:	%50

Hayvan Modeli

- Hayvanlar, bir tutma aygıtının içine (tavşan tutucu) yerleştirilmiştir. Bir intravenöz kateteri, kulak damarının içine yerleştirilmiştir. Test maddeleri, 40 dakika süren bir intravenöz infüzyon şeklinde verilmiştir. Kan örnekleri, kulak arterinden alınmıştır ve serum ve (%5) streptokinaz-plazma şişelerinin içine toplanmıştır. Kan örnekleri seruma işlenmiştir, -20°C'de muhafaza edilmiştir ve plazmaya işlenmiştir ve - 80°C'de muhafaza edilmiştir.

Karaciğer enzimlerinin belirlenmesi

Örnekler, ticari olarak temin edilebilen (Greiner Biochemica) enzimatik fotometrik test kitleri kullanılarak ALT aktivitesine yönelik analiz edilmiştir.

5

Apo A-I plazma seviyesinin belirlenmesi

İnsan Apo A-I'nin belirlenmesi, nefrlometrik bir analiz tarafından gerçekleştirilmiştir.

10 SONUÇLAR

İn vivo verinin araçları ve standart sapmaları, Tablolar 6 ila 7'de verilir.

Burada test edilen rHDL formülasyonunun düzenlemesi, ALT serum seviyelerini yükseltmemiştir. CSL111, 8 saat içinde ALT'yi 25 U/L'den 94 U/L'ye yükseltmiştir.

15

İnsan Apo-AI'nin pik seviyeleri, rHDL formülasyonu (1.5 mg/dL) ve CSL111'e (1.6 mg/dL) yönelik 40 dakika zaman-noktasında görülmüştür.

20 Tablo 6: ALT serum seviyeleri (ortalama $\pm$ SD)

Tedavi / Serum konsantrasyonu (U/L)

Zaman-noktası	rHDL CSL 111	rHDL PC 1:55
	75 mg/kg	75 mg/kg
	n=3	n=3
Taban çizgisi	25.38 $\pm$ 9.05	45.07 $\pm$ 4.77
40 dakika	35.62 $\pm$ 25.04	52.31 $\pm$ 16.21
2 saat	56.77 $\pm$ 28.77	49.05 $\pm$ 10.84
4 saat	63.65 $\pm$ 33.42	43.17 $\pm$ 11.53
8 saat	94.22 $\pm$ 58.63	33.26 $\pm$ 4.25

Tablo 7: Apo-A1 plazma seviyeleri (ortalama $\pm$ SD)

Tedavi / Serum konsantrasyonu (mg/dL)

Zaman-noktası	rHDL CSL 111	rHDL PC 1:55
	75 mg/kg	75 mg/kg
	n=3	n=3
Taban çizgisi	0.000±0.000	0.000±0.000
40 dakika	1.571±0.311	1.509±0.481
2saat	1.083±0.323	1.203±0.250
4saat	0.939±0.356	1.073±0.164
8saat	0.740±0.260	0.830±0.198

ÖRNEK 5

Buluşun sentetik HDL partiküllerini üretme kabiliyeti, daha düşük fosfolipid seviyeleri içeren partiküllere yönelik belirlenmiştir. Apo A-I ile fosfolipid oranları, 1:2 ile 1:55 aralığındadır.

Sentetik HDL partiküllerini üretmek üzere, sodyum kolat (New Zealand Pharmaceuticals) tamponun (10 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM TRIS, pH 8.0) içinde çözünmüştür ve berrak olana kadar karıştırılmıştır. Soya fasülyesi fosfatidil-kolin (Fosfolipid GmbH), uygun bir kolat hacmine eklenmiştir ve oda sıcaklığında 16 saat karıştırılmıştır. ApoA-I solüsyonu, 10 mM NaCl ile 9.0 g/L bir protein konsantrasyonuna (OD280 tarafından belirlenen) seyreltilmiştir ve uygun protein ile lipid oranını elde etmek üzere lipid solüsyonunun uygun bir hacmi ile karıştırılmıştır. Karışım 16 saat 2-8°C'de karıştırılmıştır. HDL taklitleri, çalışma tamponu olarak %1 sükroz kullanılarak bir HiPrep 26/10 tuzdan arındırma kolonu üzerinde kolat uzaklaştırma işlemi tarafından hazırlanmıştır. Eluat, sırasıyla, 20 g/L bir protein konsantrasyonuna ve %7.5 sükroza ultrafiltrasyon tarafından konsantre edilmiştir.

Yeniden yapılandırılan HDL preparatları, 2-8°C'de inkübe edilmiştir (korunmuştur) ve aşağıdaki parametreler 0, 5 ve 14 gün sonra ölçülmüştür:

- İletim (405nm), partikül boyutu dağılımı (SE-HPLC), endotoksinler, SDS-PAGE (azaltıcı ve azaltıcı-olmayan), Native PAGE, LCAT aktivasyonu, apoA-I konsantrasyonu ve *in-vitro* toksisite.

0.Günde aşağıdaki ilave testler gerçekleştirilmiştir: i) lipid içeren örneklerle yönelik adapte edilen modifiye Biüre tarafından protein konsantrasyonu (deoksikolat Biüre solüsyonuna eklenmiştir); ii) fosfatidil-kolin konsantrasyonu (ProDiagnostics mti-diagnostics GmbH); ve iii) kolat konsantrasyonu kolorimetrik bir Gallsäuren test kiti ve
5 Gallsäuren-Durdurma reaktifleri (Trinity Biotech).tarafından ölçülmüştür.

Partikül boyut dağılımı, çalışma tamponu olarak PBS + %0.1 sodyum azid ile Superose 6 10/300 GL bir kolon (GE Healthcare) kullanılarak SE-HPLC tarafından belirlenmiştir. Akış oranı 0.5 mL/dakika olmuştur, 5 µL örneği enjekte edilmiştir, tespit etme işlemi 280
10 nm bir dalga boyunda meydana gelmiştir. Sentetik HDL partikülleri, %4-12 NuPAGE Novex Bis-Tris Jeller ve MOPS veya MES elektroforez tamponu (İnvitrojen) ile XCell SureLock Mini-Hücre kullanılarak SDS-PAGE (azaltıcı/azaltıcı-olmayan) tarafından analiz edilmiştir. Protein bantları, Bio-Safe Koomassie Boyası (Bio-Rad) ile görselleştirilmiştir. Native PAGE, %4-16 Native Page Novex Bis-Tris Jeller ve
15 NativePAGE Çalışma Tamponu Kiti (İnvitrojen) ile Xcell SureLock Mini-Hücresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein bantları, GelCode Mavi Boya Reaktifi (Thermo Scientific) ile görselleştirilmiştir. ApoA-I konsantrasyonu, bir 3D CE aleti (Agilent technologies) ve bir Genişletilmiş Işık Yolu CE kapileri (50 µm, 56 cm, her ikisi Agilent Technologies'den) kullanılarak kapiler elektroforez ile belirlenmiştir. Elektroforez
20 tamponu, 53 mM Na-Borat pH 9.1, %0.21 SDS, %5 metanol olmuştur. Elektroforez 25 kV'de çalıştırılmıştır.

LCAT aktivitesi, dört koypa ile belirlenmiştir. Kısaca, 10 µL örnekleri soğutulmuş bir tübün içinde pipetlenmiştir. 150 µL insan plazması, 150 µL PBS ve 20 µL 14C
25 kolesterol (Perkin Elmer), 25mg/mL insan albümin solüsyonunun içinde çözünmüştür, karıştırılmıştır ve 90 dakika 2-8°C'de inkübe edilmiştir. Kopya örnekler, 37°C'de, diğer iki örnek (boş) 30 dakika 2-8°C'de inkübe edilmiştir. 2 mL etanol reaksiyonu durdurmak üzere eklenmiştir ve akabinde hekzan (1x 5 mL, 1x 3 mL) ile iki kez özütlenmiştir. Hekzan kurumak üzere buharlaştırılmıştır ve kalıntılar 0.5 mL hekzan içinde tekrar
30 çözünmüştür. Kolesterol ester, 2x1 mL hekzan ile ayrıştırılarak, bir katı faz Amino SPE kolonun içinden ekstraktın geçirilmesi ile diğer maddelerden ayrılmıştır. Eluat içindeki radyoaktivite, bir sintilasyon beta sayacı üzerinde belirlenmiştir.

HEP-G2 hücrelerinin hazırlanmasına dahil edilen *in-vitro* toksisite (Gün 1): Bir T75
35 balonundan HEP-G2 hücrelerinin günlük-faz kültürü alınmıştır, kültür ortamı

uzaklaştırılmıştır ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. 10 mL kültür ortamı (%90 DMEM, %10 etkisiz hale getirilmiş FCS, %1 ikinci derecede amino asitler, %1 Pen/Strep) içinde tripsinizasyon ve yeniden süspansiyondan sonra, konsantrasyon Neubauer/Tripan mavisi tarafından belirlenmiştir. 100 ul hücreler (10x10⁴ C/mL)/göz, 96 gözlü F-tabanlı plakaların içine dölllenmiştir. Plaka, 37°C/%5 CO₂, %95 H₂O'da bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon (Gün 1): En yüksek bileşik konsantrasyonunun 700 µL örneği kültür ortamında hazırlanmıştır. Gözlerin birinci dizisinden ortam uzaklaştırılmıştır ve 200 ul solüsyon hücrelere eklenmiştir. Bir seri 1:2 seyreltme serisi yapılmıştır ve plaka 37°C/%5 CO₂, %95 H₂O'da 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Yaşanabilirlik (Gün 3): 50 µL 3x Nötr Kırmızı Solüsyon (100 mL PBS içinde 70 mg Nötr Kırmızı) her bir göze eklenmiştir. Plaka, 37°C/%5 CO₂, %95 H₂O'da 2 saat inkübe edilmiştir ve gözler 200 µL PBS/göz ile bir kez yıkanmıştır, 100 µL etanol her bir göze eklenmiştir ve plaka 20 dakika bir karıştırıcının üzerine koyulmuştur. Her bir göz içinde adsorpsiyon 540 nm okunmuştur.

15

Farklı oranlarda fosfolipid ile protein içeren sentetik HDL partiküllerinin özelliklerinin bir özeti, Tablo 8'de sağlanır. % iletimi, partiküllerin stabil olduğunu belirtir. Sentetik partiküllerde mevcut olan fosfolipid seviyeleri azaltıldığında, LCAT değerleri düşer. Bu durum, fosfolipidin LCAT'ye yönelik bir sübstrat olarak işlev görmesi ile tutarlıdır.

20

HPLC-SEC sonuçları, 1:20 ve 1:30 oranlarına sahip partiküllerin tek bir simetrik pik şeklinde ayrıştırıldığını belirtir. Daha düşük lipid ile Apo A-I seviyeleri ile sentetik HDL partikülleri, 1:5 ve 1:2 oranlarına sahip partiküllerde daha belirgin bir tespit parçası içermiştir. Ek olarak, ana pikin ayrıştırma süresi, fosfolipid ile proteinin azaltılmasından dolayı daha sonradır. Bu, partiküllerin giderek daha küçük olmaya başladığını belirtir. Bu boyut değişimi, aynı zamanda Native PAGE sonuçlarında yansıtılır, burada düşük bir moleküler ağırlık bandı, oranın 1:55 ile 1:2 azalması nedeni ile, artan bir yoğunlukta gözlenmiştir. SDS-PAGE, tüm örnekler bakımından benzer olmuştur.

30

In vitro analiz sonuçları, her bir preparata yönelik hücre yaşanabilirlik durumunun 14 gün boyunca stabil kaldığını belirtmiştir. Hücreler, en yüksek konsantrasyonda (2 mg/mL) yeniden yapılandırılan HDL ile inkübe edildiğinde, artan lipid seviyeleri ile gözlenen hücre yaşanabilirliğinde küçük bir azalma olmuştur (Aşağıya bakınız, Tablo 9).

Tablo 8: Farklı Apo A-I ile fosfolipid oranları (1:2 ila 1:55) ile sentetik HDL partiküllerinin özelliklerinin özeti.

Örnek	Zaman (günler)	Apo (mg/mL)	A-I Protein (mg/mL)	Fosfolipid (g/L)	Oran	Kolat (g/L)	LCAT (%Ref)	İletim (%)	Endotoksin (EU/mg)
1:55	t=0	21.00	20.4	33.3	59	1.4	78	72.3	3.0
	t=5	-	-	-	-	-	82	70.6	3.2
	t=14	20.74	-	-	-	-	81	70.6	5.4
1:40	t=0	20.60	20.0	21.9	39	0.8	51	73.9	2.4
	t=5	-	-	-	-	-	53	72.3	2.7
	t=14	21.93	-	-	-	-	52	72.2	2.4
1:30	t=0	19.79	19.7	16.3	30	0.4	37	75.7	2.1
	t=5	-	-	-	-	-	41	74.1	10.1
	t=14	20.75	-	-	-	-	39	74.0	2.9
1:20	t=0	18.34	19.7	10.9	20	0.1	28	76.8	0.8
	t=5	-	-	-	-	-	33	74.8	11.6
	t=14	19.32	-	-	-	-	29	75.0	1.9
1:10	t=0	16.21	19.8	5.4	10	0.1	27	76.3	3.3
	t=5	-	-	-	-	-	26	76.5	2.1
	t=14	16.33	-	-	-	-	24	76.2	2.5
1:5	t=0	15.15	18.7	2.8	5	<0.1	23	77.0	1.9
	t=5	-	-	-	-	-	23	77.2	1.4
	t=14	16.97	-	-	-	-	20	75.9	1.4
1:2	t=0	14.06	17.5	1.0	2	<0.1	20	77.6	1.6
	t=5	-	-	-	-	-	20	77.8	1.1
	t=14	14.59	-	-	-	-	17	77.3	0.8

* Boş hücreler, veri elde edilmediğini belirtir.

Tablo 9: Farklı Apo A-I ile fosfolipid oranları (1:2 ile 1:55) ile sentetik HDL partiküllerinin % yaşanabilirlik özeti.

	HDL Konsantrasyonu (mg/mL)	1:2	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40	1:55
0 gün	0.5	97	87	104	95	97	109	97
	1.0	105	96	110	101	109	100	105
	2.0	101	84	86	93	87	76	77
5 gün	0.5	98	89	102	102	100	111	97
	1.0	105	100	110	107	108	110	105
	2.0	97	87	89	93	94	81	78
14 gün	0.5	97	96	107	103	103	112	103
	1.0	106	99	113	107	111	112	106
	2.0	95	86	91	97	100	91	78

ÖRNEK 6

5

Farklı temizleyiciler kullanılarak yeniden yapılandırılan sentetik HDL partiküllerinin toksisite üzerine etkisi incelenmiştir.

10 Partikülleri meydana getirmek üzere, Amberlit XAD-2 boncukları bir gece %20 metanol içinde inkübasyon tarafından temizlenmiştir ve akabinde 1 M sodyum hidroksit ile dört kez ve çok arı su ile iki kez yıkanarak sterilize edilmiştir. Kullanımdan önce, boncuklar %7.5 sükroz ile yıkanmıştır ve bir filtre üzerinde kurutulmuştur.

15 Sentetik HDL partikülleri, aşağıdaki yöntem yoluyla yapılmıştır. Kalıntı kolat içeren dondurularak kurutulmuş HDL partikülleri, 30 g/L bir protein konsantrasyonuna WFI ile yeniden yapılandırılmıştır. Amberlit XAD-2 boncukları (g protein başına 10 g), yeniden yapılandırılan HDL preparatına eklenmiştir ve çalkalanarak 3.5 saat 2-8°C'de inkübe edilmiştir. Filtrasyon yoluyla boncukların uzaklaştırılmasından sonra, bu prosedür başka bir Amberlit XAD-2 boncuk miktarı (g protein başına 10 g boncuk) ile bir kez 20 daha tekrar edilmiştir. Bu boncuklar akabinde filtrasyon yoluyla uzaklaştırılmıştır ve temizleyici (kolat, deoksikolat, oktilglukozit, Polisorbitat 80) 1 g/L veya 6 g/L olarak nihai bir temizleyici konsantrasyonu elde etmek üzere eklenmiştir.

Örnekler akabinde, yukarıdaki Örnek'te belirlendiği üzere stabiliteye yönelik test edilmiştir.

Polisorbat 80 preparatlarına yönelik, temizleyici seviyesi fotometrik bir analiz tarafından belirlenmiştir. 1000 µL örneklerinin içindeki protein, 5 mL 0.1 M amonyum asetat ile çökelmiş ve santrifüjleme yoluyla çöktürülmüştür.

Süpernatant kurumak üzere buharlaştırılmıştır ve 1ml sodyum tetraborat tamponu pH 9.1 (ilave 10 mL HCl, ilave 100 mL H₂O ile 0.953 g sodyum tetraborat) içinde tekrar çözünmüştür, 4ml TBPE-K solüsyonu (1.76 g potasyum klorid, 0.48 g sodyum tetraborat, 4800 µL 0.1 M KOH, 5 mL etanol içinde 0.015 g TBPE-K, H₂O ile ilave 100 mL) eklenmiştir ve 30 dakika bir uçtan-uca karıştırıcının üzerinde 2.5 ml diklorometan ile özütlenmiştir. Faz ayırımından sonra, diklorometan fazının absorpsiyonu, 611 nm'de (referans dalga boyu 700 nm) ölçülmüştür.

Fosfolipid ile proteinin farklı oranlarını içeren sentetik HDL partiküllerinin özelliklerinin bir özeti, Tablo 10'da sağlanır. % iletimi ve LCAT değerleri partiküllerin stabil ve işlevsel olduğunu belirtir. .

HPLC-SEC sonuçları, tek bir simetrik pik olarak ayrıştırılan farklı temizleyiciler ile partikülleri belirtir. Bu aynı zamanda, Native PAGE'de gözlenen bant modellerinde yansıtılır. SDS-PAGE tüm örnekler bakımından benzerdir. *in vitro* analiz sonuçları, hücre yaşanabilirliğinin mevcut olan temizleyici seviyesine bağlı olarak değiştiğini belirtmiştir. Özellikle, yüksek temizleyici seviyeleri azalan hücre yaşanabilirliği ile sonuçlanmıştır. Değerler öte yandan, 14 gün boyunca stabil kalmıştır (bakınız Tablo 11).

Tablo 10: Farklı temizleyiciler ile sentetik HDL partiküllerinin özelliklerinin özeti

Örnek	Zama	Apo	Protei	Fosfoli	Kol	LCA				Endotoksi
	n	A-I	n	pid	Ora	T	LCA	İleti	nin	
	(günl	(mg/m	(mg/m	(g/L)	n	(%Re	T	m	(EU/mg)	
	er)	L)	L)			f)				
Polisorba	t=0	21.24	20.98	37.28	64	-	97	83	65.4	0.0
t 1 g/L	t=5	-	-	-	-	-	97	80	62.9	0.0

Örnek	Zaman (günler)	Apo A-I (mg/mL)	Protein (mg/mL)	Fosfolipid (g/L)	Oran (g/L)	Kolat (g/L)	LCA T (%Reff)	LCA T	İletim	Endotoksin (EU/mg)
Polisorbat 6 g/L	t=14	22.07	-	-	-	-	103	82	65.6	0.0
	t=0	21.42	21.09	38.10	65	-	108	85	63.8	0.0
	t=5	-	-	-	-	-	114	83	59.2	0.1
	t=14	20.71	-	-	-	-	131	94	63.9	0.0
Deoksikolat 1 g/L	t=0	21.26	20.94	36.42	63	1.3	104	86	68.5	0.0
	t=5	-	-	-	-	-	103	89	65.8	0.0
	t=14	23.08	-	-	-	-	113	89	66.2	0.1
Deoksikolat 6 g/L	t=0	19.79	21.39	37.92	64	6.1	113	101	69.0	0.0
	t=5	-	-	-	-	-	118	101	65.8	0.0
	t=14	20.63	-	-	-	-	126	103	64.1	0.0
Oktilglukozit 1 g/L	t=0	16.33	21.39	35.38	60	-	91	80	63.4	0.0
	t=5	-	-	-	-	-	94	80	57.8	0.0
	t=14	22.34	-	-	-	-	99	81	62.7	0.0
Oktilglukozit 6 g/L	t=0	20.75	20.94	35.66	62	-	113	93	62.4	0.0
	t=5	-	-	-	-	-	115	94	59.4	0.0
	t=14	21.9	-	-	-	-	127	102	55.9	0.0
Kolatat 1 g/L	t=0	22.25	21.24	36.52	62	1.4	101	88	68.2	0.0
	t=5	-	-	-	-	-	106	90	65.6	0.1
	t=14	22.54	-	-	-	-	115	86	66.4	0.0
Kolatat 6 g/L	t=0	21.54	21.13	34.66	59	7.2	122	106	67.8	0.0
	t=5	-	-	-	-	-	130	103	66.3	0.0
	t=14	22.43	-	-	-	-	140	114	163.1	0.0

Örnek	Zaman (günler)	Apo A-I (mg/mL)	Protein (mg/mL)	Fosfolipid (g/L)	Kolesterol (g/L)	LCA T (%Ref)	LCA İletim	Endotoksin (EU/mg)
-------	----------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	--------------	------------	--------------------

* Boş hücreler veri elde edilmediğin belirtir.

Tablo 11: Farklı temizleyicilerin varlığında sentetik HDL partiküllerinin % yaşanabilirliğinin özeti

Gün	HDL Konsantrasyonu (mg/mL)	Kolat (1 g/L)	Kolat (6 g/L)	Oktilglukozit (1/L)	Oktilglukozit (6g/L)	Deoksikolat (1g/L)	Deoksikolat (6 g/L)	PS80 (1 g/L)	PS80 (6 g/L)
0	0.5	90	90	99	56	98	32	95	74
	1.0	81	72	86	21	76	7	79	31
	2.0	55	32	26	5	39	5	43	7
5	0.5	88	90	103	56	95	35	97	73
	1.0	80	68	88	18	75	6	83	25
	2.0	58	30	35	5	44	5	41	5
14	0.5	91	92	89	56	96	32	95	72
	1.0	84	70	86	17	76	10	85	23
	2.0	56	31	49	5	40	5	44	5
5									

ÖRNEK 7

Sentetik HDL partikülleri, yukarıda HDL partiküllerini yeniden yapılandırmak üzere POPC'nin (NOF Corporation) kullanılmasının haricinde, ÖRNEK 5'te açıklandığı üzere yapılmıştır. Partiküller akabinde, Örnek 5'te açıklanan yöntemler ile incelenmiştir.

Sonuçlar, Soya fasulyesi fosfatidilkolin ile yeniden yapılandırılan sentetik HDL partiküllerine benzer toksisite özellikleri gösteren stabil/işlevsel bir ürün belirtir (Tablolar 12 & 13).

Tablo 12: Sentetik HDL partiküllerinin özelliklerinin özeti

Örnek	Zaman (günler)	Apo (mg/mL)	A-I Protein (mg/mL)	Fosfolipid (g/L)	Oran	Kolat (g/L)	LCAT (%Ref)	İletim (%)
	t=0	23.27	23.1	32.1	50	1.2	85	69.7
PC, 1:55	t=5	-	-	-	-	-	83	69.9
	t=14	20.90	-	-	-	-	87	69.9
	t=0	21.55	22.1	30.4	50	1.2	151	72.0
POPC, 1:55	t=5	-	-	-	-	-	145	73.0
	t=14	19.90	-	-	-	-	149	72.2

* Boş hücreler veri elde edilmediğin belirtir.

Tablo 13: Farklı fosfolipidlerin varlığında sentetik HDL partiküllerinin %
5 yaşanabilirliğinin özeti.

	HDL Konsantrasyonu (mg/mL)	Soya fasülyesi PC	POPC
0 gün	0.5	102	101
	1.0	97	101
	2.0	63	63
5 gün	0.5	104	113
	1.0	96	99
	2.0	62	59
14 gün	0.5	105	112
	1.0	96	92
	2.0	60	53

ÖRNEK 8

Buluşa ait yeniden yapılandırılan HDL formülasyonlarının yükselen dozlarının güvenliği
10 ve toleransı ve farmakokinetikleri, sağlıklı gönüllülerde tek veya birçok intravenöz

infüzyon tarafından değerlendirilebilir. Çalışma, biri yükselen dozlarda sentetik HDL partiküllerinin kullanımını ve diğeri normal bir salin (%0.9) plasebo karşılaştırıcının kullanımını içeren iki kola sahiptir. İnfüzyonlar rastgele ve çift kör gerçekleştirilecektir. (Özne, Araştırmacı ve Sonuç değerlendirici).

5

Sağlıklı gönüllüler, 18 yıl ila 55 yıl aralığında ve en az 45 kg ağırlığında olacak şekilde erkek veya kadın olabilir. Diğer bir giriş kriteri, 18 ve 42.0 kg/m² arasında bir vücut kütle endeksini (BM) içerir. Hariç tutma kriteri aşağıdaki unsurları içerebilir: i) klinik olarak kayda değer tıbbi bir durumun, rahatsızlığın veya hastalığın kanıtı; ii) hepatobiliyer hastalığın kanıtı; iii) klinik olarak ilgili anormal laboratuvar test sonuçlarının kanıtı; ve iv) alkol veya madde kötüye kullanım geçmişinin kanıtı.

10

Güvenlik ve tolerans, i) infüzyondan sonra 14 güne kadar ilaçla ilgili klinik olarak olumsuz olayların sıklığı; ve ii) infüzyondan sonra 14 güne kadar karaciğer fonksiyon testlerinin ölçülmesi tarafından (örneğin, alanin aminotransferaz (ALT) veya aspartat aminotransferazın (AST) yükselmesi) ölçülecektir. Farmakokinetik bilgi, sentetik HDL partiküllerinin infüzyonundan sonra 10 güne kadar ölçülebilir. Belirli ölçümler, lipoprotein plazma seviyelerinin belirlenmesini içerecektir.

15

20 SONUÇ

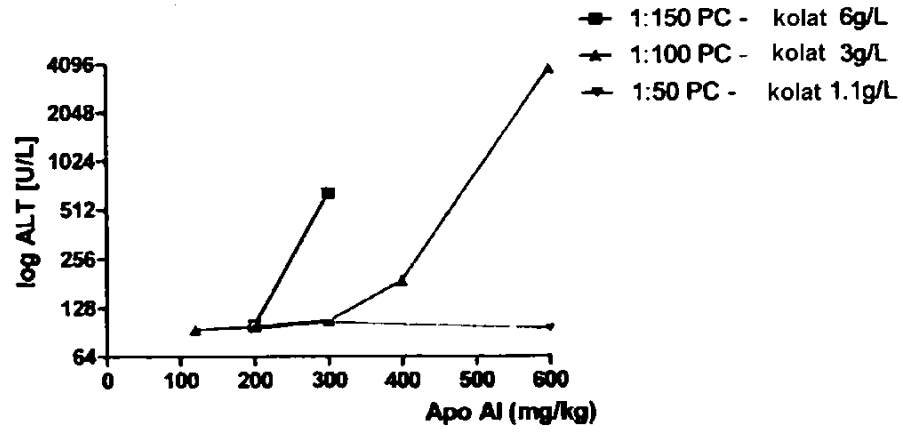
Buluşun bir rHDL formülasyonu ve bir CSL111 formülasyonunun düzenlemeleri, buluşun rHDL formülasyonunun biyolojik aktiviteyi korurken, toksisite profilini geliştirip geliştirmediğini test etmek üzere değerlendirilmiştir. Buluşun rHDL formülasyonunu, 1:40 veya 1:55 olarak azalan bir Apo-AI ila PC oranına sahiptir, öte yandan CSL111 1:150 olan bir orana sahiptir. Ek olarak, ilave saflaştırma girişimleri, formülasyonda büyük ölçüde bir kolat azalmasına yol açmıştır. Sonuç olarak buluşun rHDL formülasyonunu, CSL111 ile kıyaslandığında azalmış bir hepatik toksisite gösterir. Önemli olarak, aktif bileşene benzer bir maruz kalma durumu belirterek, her iki formülasyona yönelik Apo-AI serum seviyeleri benzer olmuştur (bakınız Tablo 7).

25

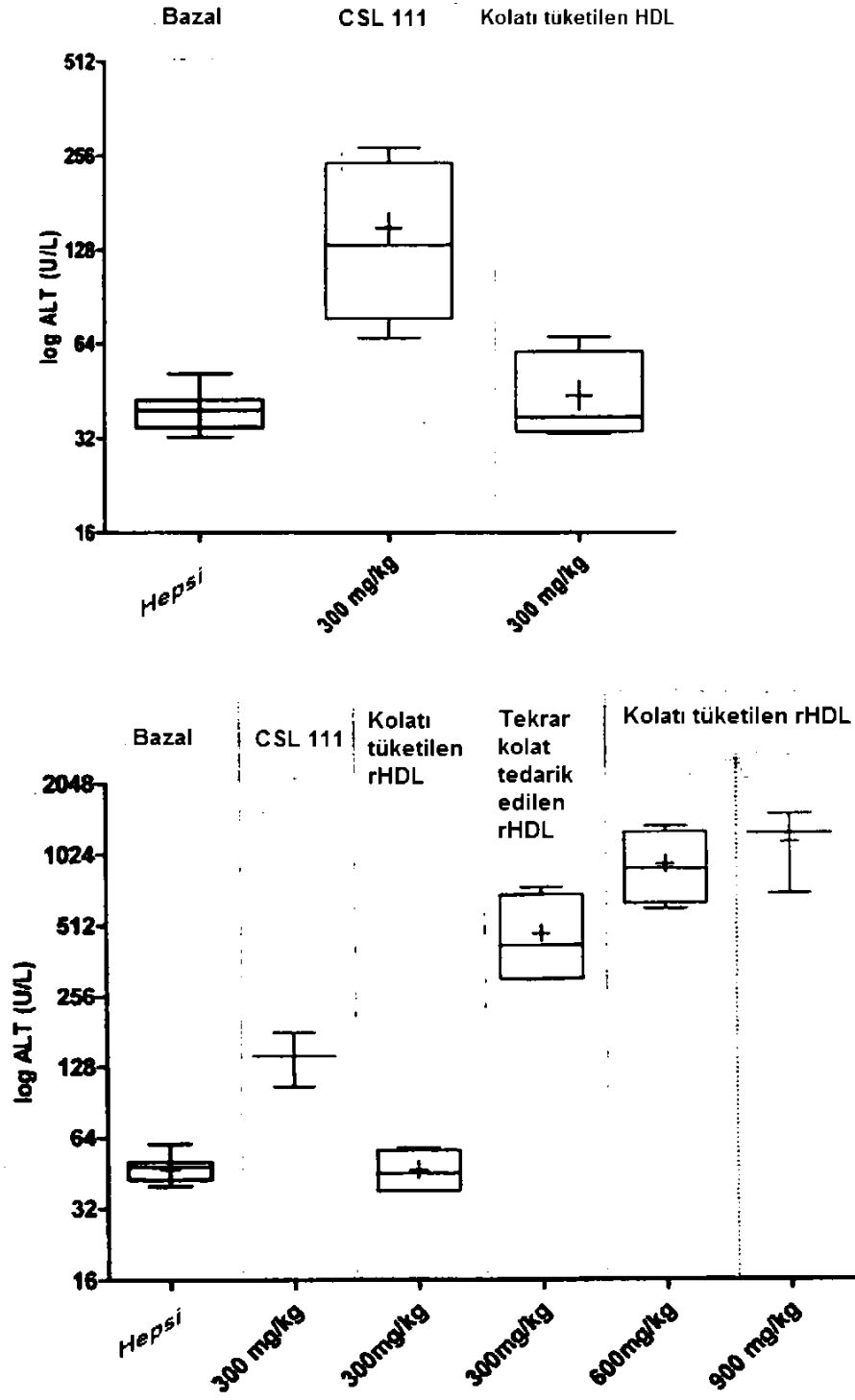
30

Spesifikasyon genelinde amaç, buluşun, özelliklerin herhangi bir düzenleme veya spesifik bir koleksiyona sınırlandırmaksızın buluşun tercih edilen düzenlemelerinin açıklanmasıdır. Mevcut buluştan sapılmaksızın açıklanan ve gösterilen düzenlemelere çeşitli değişiklikler ve modifikasyonlar yapılabilir.

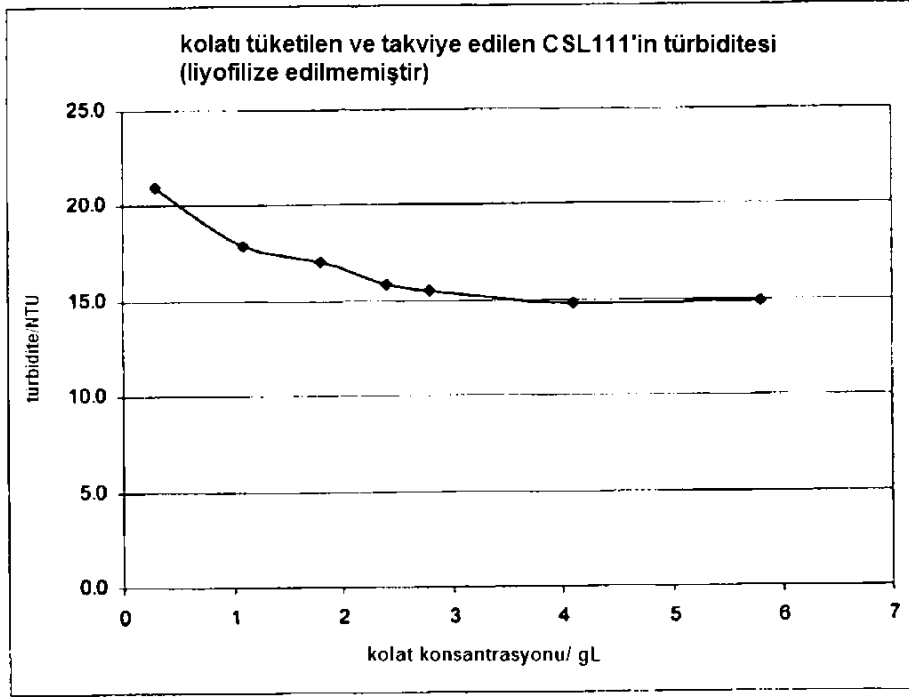
35



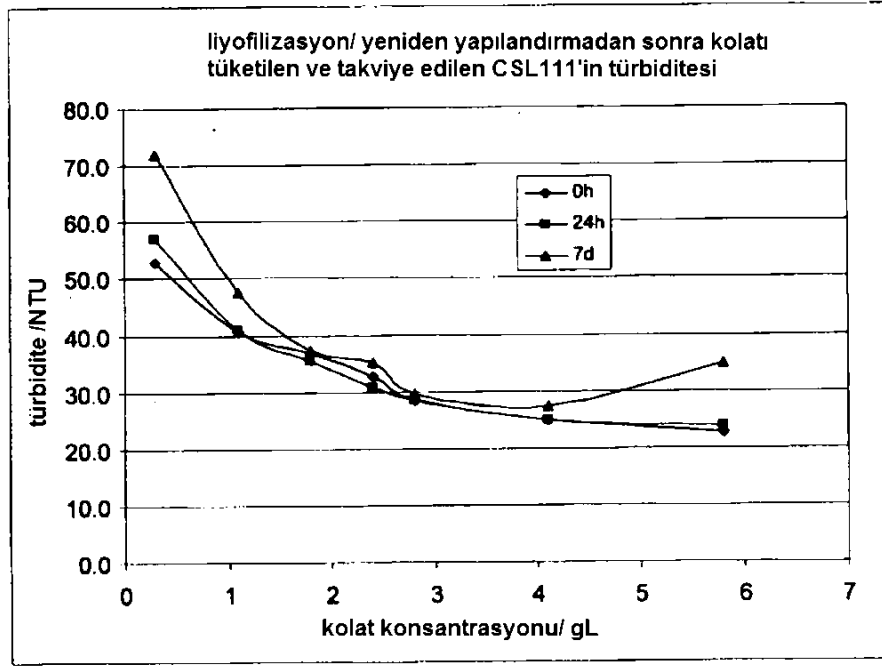
Şekil 1



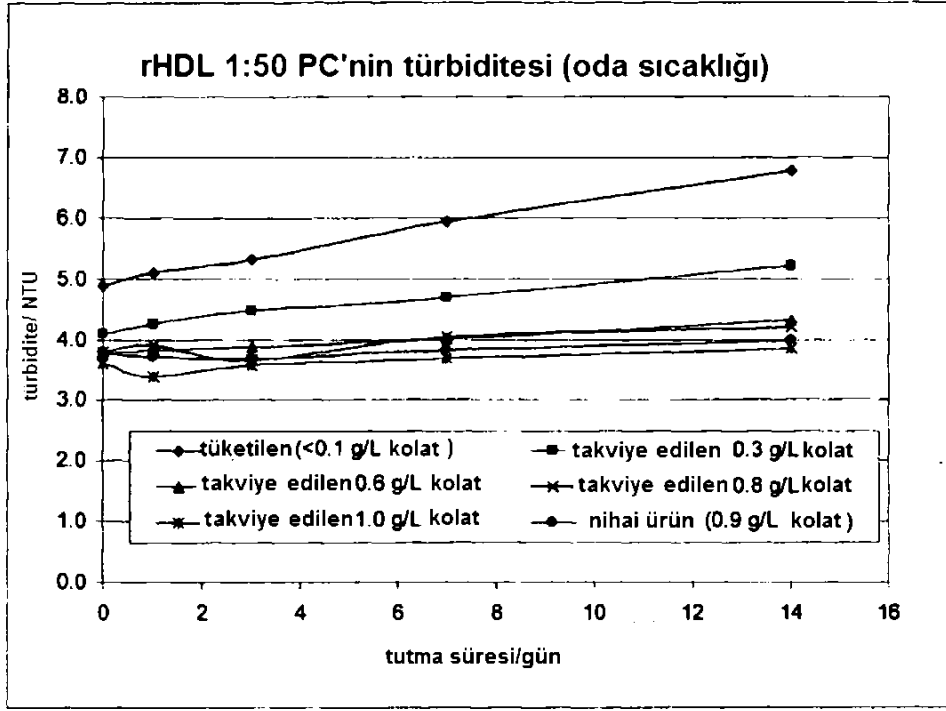
Şekil 2



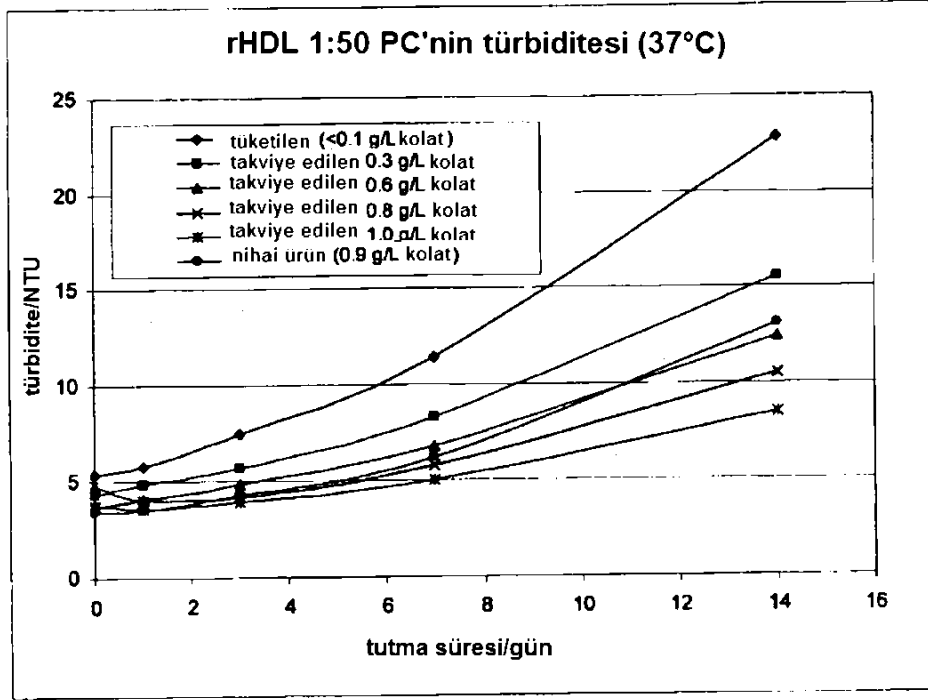
Şekil 3



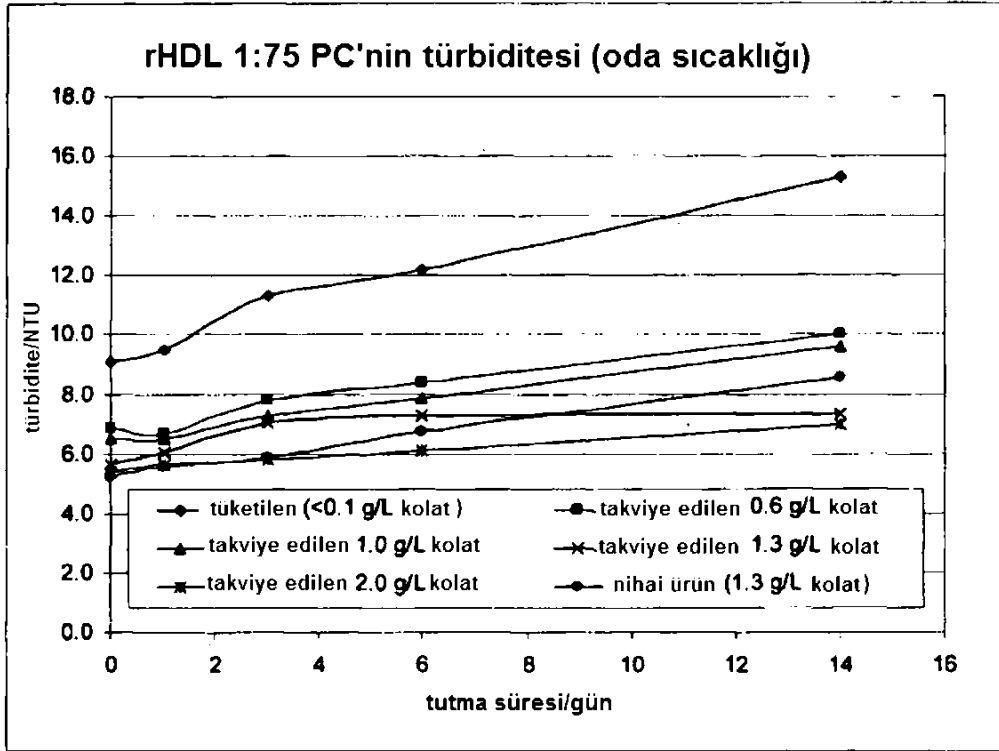
Şekil 4



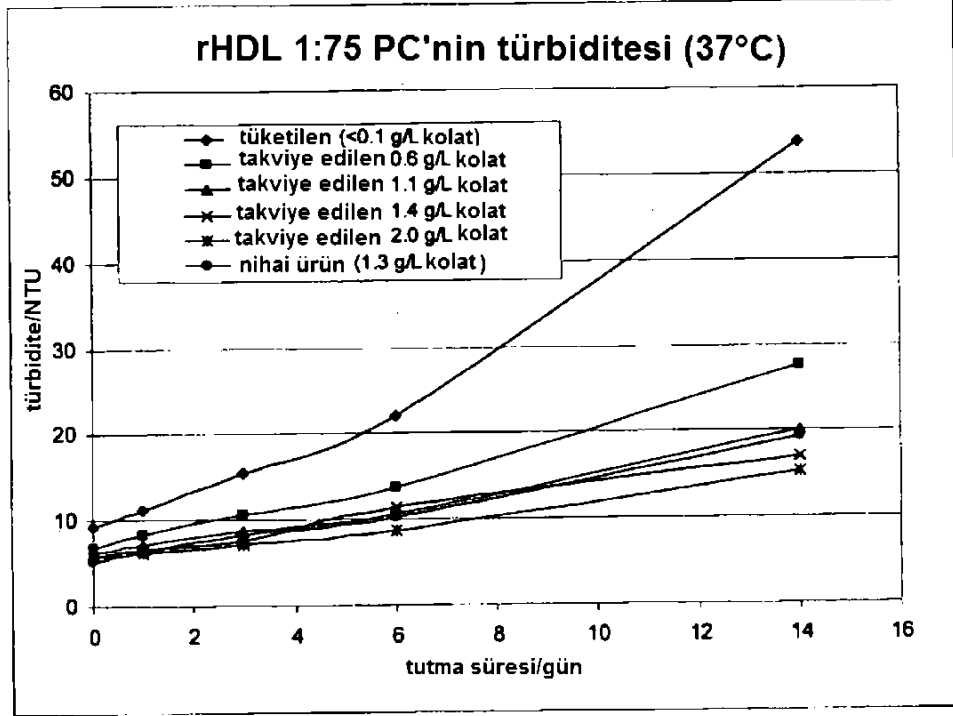
Şekil 5



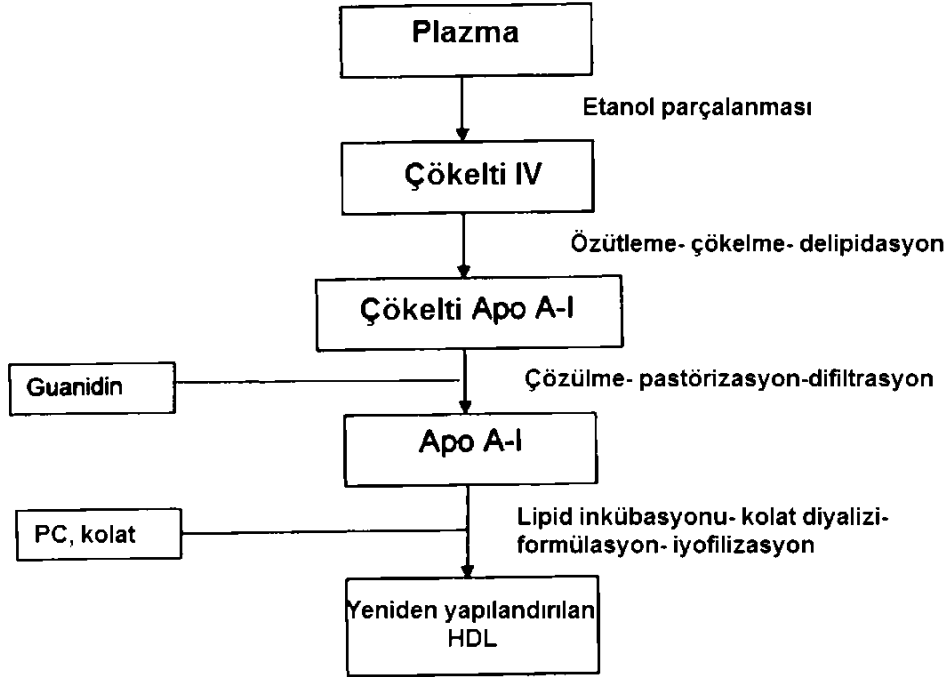
Şekil 6



Şekil 7



Şekil 8

**Şekil 9**