

OZET

HİSTOTRİPSİ AJANI OLARAK KULLANIMA UYGUN İNKLÜZYON KOMPLEKSLERİ

- Mevcut buluş, histotripsi ajanı olarak kullanıma uygun inklüzyon komplekslerine, söz
- 5 konusu komplekslerin hazırlanmasında kullanılan usullere ve buluşa uygun komplekslerin histotripsi ajanı olarak veya ilaç taşımada kullanımına ilişkindir.

İSTEMLER

1. Beta-siklodekstrin, veya metillenmiş betasiklodekstrin'den oluşan bir konak molekül ve perflorohekzan veya perfloropentan içerisinde seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon kompleksleri.
- 5 2. İstem 1-8'e göre bir inklüzyon kompleksi olup özelliği metillenmiş beta-siklodekstrin ve perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon kompleksi olmasıdır.
3. İstem 1-9'a göre bir inklüzyon kompleksi olup özelliği hedefleyici ajanla modifiye edilmiş olmasıdır.
- 10 4. İstem 10'a göre bir inklüzyon kompleksi olup özelliği hedefleyici ajanın ajanlar antibodiler, antibodi parçaları veya çeşitli peptitler içerisinde seçilmesidir.
5. İstem 1-4'e göre bir inklüzyon kompleksinin hazırlanmasında kullanılan bir usul olup özelliği;
 - a. Konak molekülün uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
- 15 b. Elde edilen çözeltinin belirli bir sıcaklığa soğutulması
- c. Soğutulan çözelti içerisinde C3-C8 perflorokarbon eklenmesi
- d. Oluşan çökeltinin katı ve sıvı kısımlarının birbirinden ayrılarak katı kısmının kurutulması ile konak molekül-C3-C8 perflorokarbon inklüzyon kompleksinin elde edilmesi adımlarını içermesidir.
- 20 6. İstem 12'ye göre bir inklüzyon kompleksinin hazırlanmasında kullanılan bir usul olup özelliği;
 - a. Beta-siklodekstrinin uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
 - b. Elde edilen çözeltinin belirli bir sıcaklığa soğutulması
 - c. Soğutulan çözelti içerisinde perflorohekzan eklenmesi
- 25 d. Oluşan çökeltinin katı ve sıvı kısımlarının birbirinden ayrılarak katı kısmının kurutulması ile beta-siklodekstrin perflorohekzan inklüzyon kompleksinin elde edilmesi adımlarını içermesidir.
7. İstem 12-13'e göre bir usul olup a. adımında kullanılan uygun çözücü bir organik çözücü veya su veya herhangi bir sulu çözelti içerisinde seçilir

8. İstem 14'e göre bir usul olup çözücü olarak su kullanılır.
9. İstem 12-15'e göre bir usul olup özelliği a. adımında çözünmenin sağlanması için karışımın 70-90 °C sıcaklığa ısıtılmasıdır.
10. İstem 12-16'ya göre bir usul olup özelliği b. adımında çözeltinin 35 °C ile 55 °C arasında bir sıcaklığa ısıtılmasıdır.
11. İstem 5-9'a göre bir inklüzyon kompleksinin hazırlanmasında kullanılan bir usul olup özelliği;
- a. Konak molekülün uygun bir organik solvent içerisinde çözülmesi
- b. Elde edilen çözeltiye bir inorganik tuz eklenmesi
- 10 c. Elde edilen çözeltiye dimetil karbonat eklenmesi
- d. Oluşan karışımın oda sıcaklığında karıştırılması
- e. Solüsyonun süzülerek katıların uzaklaştırılması ve sonrasında uçucu bileşenlerin uzaklaştırılmasıyla metillenmiş konak molekül elde edilmesi
- 15 f. Elde edilen metillenmiş konak molekülün uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
- g. Elde edilen çözeltinin içerisine C3-C8 perflorokarbon eklenerek solüsyonun karıştırılması
- h. Oluşan katıların sıvılardan ayrılarak kurutulmasıyla metillenmiş konak molekül-C3-C8 perflorokarbon inklüzyon kompleksinin elde edilmesi
- 20 adımlarını içermesidir.
12. İstem 18'e göre bir inklüzyon kompleksinin hazırlanmasında kullanılan bir usul olup özelliği;
- a. Beta-siklodektrinin uygun bir organik solvent içerisinde çözülmesi
- b. Elde edilen çözeltiye bir inorganik tuz eklenmesi
- 25 c. Elde edilen çözeltiye dimetil karbonat eklenmesi
- d. Oluşan karışımın oda sıcaklığında karıştırılması
- e. Solüsyonun süzülerek katıların uzaklaştırılması ve sonrasında uçucu bileşenlerin uzaklaştırılmasıyla metillenmiş beta-siklodekstrin elde edilmesi

- f. Elde edilen metillenmiş beta-siklodekstrinin uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
- g. Elde edilen çözeltinin içerisine perflorhekzan eklenerek solüsyonun karıştırılması
- 5 h. Oluşan katıların sıvılardan ayrılarak kurutulmasıyla metillenmiş beta-siklodekstrin perfloro hekzan inklüzyon kompleksinin elde edilmesi adımlarını içermesidir.
- 13. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere istem 1-4'e göre inklüzyon kompleksleri.
- 14. Kanser teşhisinde kullanılmak üzere istem 1-4'e göre inklüzyon kompleksleri.
- 10 15. Ultrason görüntüleme ajanı olarak kullanılmak üzere istem 1-4'e göre inklüzyon kompleksleri.
- 16. Histotripsi ajanı olarak kullanılmak üzere, İstem 1-4'e göre inklüzyon kompleksleri.
- 17. İstem 1-4'e göre inklüzyon komplekslerini içeren farmasötik bileşimler.
- 15 18. İstem 17'ye göre bir farmasötik bileşim olup inklüzyon kompleksinin yanı sıra en az bir yardımcı ajan içerir.
- 19. İstem 17-18'e göre bir farmasötik bileşim olup özelliği uygun dozaj formunda hazırlanmasıdır.
- 20. İstem 19'a göre bir farmasötik bileşim olup injektabl formda hazırlanır.
- 20 21. İstem 20'ye göre bir farmasötik bileşim olup intravenöz, intraperitoneal, intratrakeal yoldan verilmeye uygundur.

HİSTOTRİPSİ AJANI OLARAK KULLANIMA UYGUN İNKLÜZYON KOMPLEKSLERİ

TARİFNAME

5 Teknik Alan

Mevcut buluş, histotripsisi ajanı olarak kullanıma uygun inklüzyon komplekslerine, söz konusu komplekslerin hazırlanmasında kullanılan usullere ve buluşa uygun komplekslerin histotripsisi ajanı olarak veya ilaç taşımada kullanımına ilişkindir.

10 Bilinen Teknik

Histotripsisi, mikrosaniye süresince, yüksek frekanslı ultrason (US) sinyalleri kullanarak akustik kavitasyon mekanizması ile mekanik olarak hücre parçalama tekniğidir. Bu ultrason sinyalleri vücutta halihazırda çözünmüş olarak bulunan gaz baloncuklarından bir baloncuk bulutu oluştururlar. Bu bulutun yeteri kadar enerji kazanarak parçalanması sonucu (kavitasyon) içinde bulundukları dokuda da mekanik parçalanma/hasar oluşur. Kavitasyonun oluşması için oldukça yüksek basınç gerekmektedir.

Histotripsisi, dokuda hasara yol açması nedeniyle kanser vakalarında, tümör dokularının yok edilmesinde kullanılması öngörülen yeni bir metottur. Ancak, herhangi bir histotripsisi ajanının kullanılmadığı durumda gaz baloncuklarından bir gaz bulutu elde etmek için yaklaşık 28MPa-30MPa bir basınç gerekmektedir, ki bu basınç tümör olmayan sağlam dokuda bile hasara yol açabilecek düzeydedir.

Bu amaçtan yola çıkılarak yakın zamanda nanodamlacık aracılı histotripsisi geliştirilmiştir. Söz konusu yöntemde bir perflorokarbon (PFK), örneğin perfloropentan enkapsüle edilmiş polimerik nanodamlacıklar kullanılmaktadır. Bu ajan tümör içerisine girdiğinde, doku içerisindeki gaz baloncukları yerine, bu nanodamlacıkların içerisinde bulunan perfloropentan gaz bulutu (kavitasyonun) oluşumunda çekirdek görevi görmektedir. Bu yöntemle beraber kavitasyonun oluşması için gerekli basıncın 28 MPa seviyesinden 7 MPa seviyesine indiği görülmekte olup bu şekilde uygulama esnasında sağlıklı dokuya zarar verilmesinin önüne geçilmiştir.

Mevcut yöntem nanodamlacıkların ana bileşeni olarak 3 bloktan oluşan bir polimerin hazırlanması için komplike adımlar içermekte ve bu da gelişmiş sentez yeteneği ve uzmanlık gerektirmektedir. Bir diğer nokta ise nanodamlacıkların çekirdeklerine enkapsüle edilen PFK miktarının belirlenmesinin mümkün olmamasıdır. İkincil bir karakterizasyon yöntemi ile nanodamlacık konsantrasyonu mL'deki nanodamlacık sayısı olarak belirlenir ve uygulanan doz bu değer üzerinden hesaplanabilir, fakat bu etkinlik gösteren PFK miktarının belirlendiği anlamına gelmez çünkü PFK miktarı sadece sayıya değil nanodamlacık boyut ve boyut dağılımına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ayrıca, söz konusu nanodamlacıklar histotripsi ajanı olarak kullanılabilecek bilinen tek ajan olup, bu ajanlara alternatif olarak kullanılabilecek yeni, hazırlanması kolay ve kullanıcı rahatlığı sağlayan yeni ajanlar geliştirilmesi gerekmektedir.

Buluş sahipleri mevcut buluşla hazırlaması kolay yeni histotripsi ajanları geliştirmeyi hedeflemektedir.

- 15 Buluş sahipleri ayrıca, kullanım ve saklama kolaylığı sağlayan yeni histotripsi ajanları geliştirmeyi hedeflemektedir.

Buluş sahipleri ayrıca, konsantrasyonun kolaylıkla belirlenebileceği histotripsi ajanları geliştirmeyi hedeflemektedir.

20 **Buluşun Detaylı Anlatımı**

- 25 Mevcut buluş alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya bunların suda daha iyi çözünür türevleri veya biyoyoumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerine ilişkindir.

Burada kullanılan “alfa-siklodekstrin” ifadesi birbirine alfa 1-4 bağları ile bağlanmış altı (6) adet glikoz ünitesinden oluşan bir polisakkariti ifade etmektedir. Söz konusu molekül konik bir yapıya sahip olup, iç kısmı hidrofobik dış kısmı ise hidrofilik özelliğe sahiptir.

- 30 Burada kullanılan “beta-siklodekstrin” ifadesi birbirine kovalent olarak bağlı yedi (7) adet glikoz ünitesinden oluşan bir polisakkariti ifade etmektedir. Söz konusu molekül

konik bir yapıya sahip olup, iç kısmı hidrofobik dış kısmı ise hidrofilik özelliğe sahiptir.

Burada kullanılan “gama-siklodekstrin” ifadesi birbirine kovalent olarak bağlı sekiz (8) adet glikoz ünitesinden oluşan bir polisakkariti ifade etmektedir. Söz konusu molekül konik bir yapıya sahip olup, iç kısmı hidrofobik dış kısmı ise hidrofilik özelliğe sahiptir.

Burada kullanılan “biyouyumlu hale getirilmiş” ifadesi söz konusu moleküllerin vücutta herhangi bir immün reaksiyona neden olmayacak, sitotoksik ve hemolitik etki yaratmayacak şekilde modifiye edilmiş olmasını ifade eder. Söz konusu modifikasyon herhangi bir protein veya amino asit veya bir polimer, örneğin çeşitli boyutlarda poli(etilen glikol) (PEG) zincirleri, ile yapılabilir. Bu bağlamda, “biyouyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren ve kaliksaren” ifadesi PEG’lenmiş kukurbituril, PEG’lenmiş pillaren veya PEG’lenmiş kaliksaren’i de kapsamaktadır.

Burada kullanılan “kukurbituril” ifadesi metilen köprüleriyle birbirine bağlanan glikolüril monomerlerinden oluşan makrosiklik molekülleri tanımlamaktadır. Söz konusu moleküller içerisindeki glikolüril ünitelerinin sayısına göre farklı boyutlarda olabilirler. Buluş kapsamında kullanılan kukurbituril molekülleri 5 veya 6 veya 7 veya 8 glikolüril ünitesinden oluşabilir.

Burada kullanılan “kaliksaren” ifadesi kısa hidrokarbon köprüleriyle birbirine bağlanan fenol gruplarından oluşan organik makrosiklik molekülleri tanımlamaktadır.

Burada kullanılan “pillaren” ifadesi para pozisyonunda metilen köprüleriyle birbirine bağlanan hidrokinon ünitelerinden oluşan makrosiklik molekülleri tanımlamaktadır. Söz konusu moleküller içerisindeki hidrokinon ünitelerinin sayısına göre farklı boyutlarda olabilirler. Buluş kapsamında kullanılan pillaren molekülleri 5 veya 6 veya 7 veya 8 veya 9 veya 10 hidrokinon ünitesinden oluşabilir. Buluş kapsamında kullanılan “pillaren” ve “pillararen” ifadeleri birbiri ile aynı olup, yukarıda tanımlanan yapıyı ifade etmek için birbiri yerine kullanılabilir.

Buluş kapsamında kullanılan “konak molekül” ifadesi alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin veya biyouyumlu hale getirilmiş kukurbituril veya biyouyumlu hale getirilmiş kaliksaren veya modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin veya modifiye edilmiş beta-siklodekstrin veya modifiye edilmiş gama-siklodekstrin

molekölünü ifade etmekte olup, mevcut buluş kapsamında birbiri ile değişebilir şekilde kullanılabilir.

Buluş kapsamında kullanılan “C3-C8 perflorokarbon türevi” ifadesi oktafloropropan, dekaflorobutan, perfloropentan, perfloroheksan, perfloroheptan ve perflorooktan
5 moleküllerini ve C3-C8 karbon taşıyan dallı doymuş florokarbon yapıları kapsamaktadır. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında C3-C8 perflorokarbon türevi olarak perfloroheksan kullanılır.

Bir diğer açıdan mevcut buluş, histotripsi ajanı ve/veya ilaç hedeflendirici ajan veya ultrason görüntüleme ajanı olarak kullanıma uygun alfa-siklodekstrin, beta-
10 siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren’den seçilen bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerine ilişkindir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında, buluş histotripsi ajanı ve/veya ilaç hedeflendirici ajan veya ultrason görüntüleme ajanı olarak kullanıma uygun beta-
15 siklodekstrin ve perfloroheksan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerine ilişkindir.

Buluş kapsamında kullanılan “konuk-konak inklüzyon kompleksi” ifadesi bir konak molekülün, örneğin beta-siklodekstrinin, bir konuk molekülü, örneğin perfloroheksanı
20 kovalent olmayan etkileşim sayesinde enkapsüle etmesini ifade etmektedir. Buluş kapsamında “konuk-konak inklüzyon kompleksi”, “inklüzyon kompleksi” veya “host-guest inclusion complex” ifadeleri aynı anlamda olup birbiri yerine kullanılabilir.

Beta-siklodekstin 7 şeker ünitesinden oluşan dış yüzeyi hidrofilik, iç yüzeyi ise
25 hidrofobik özellikte olan yuvarlak bir halka formunda moleküldür. Bu molekülün kullanımının güvenli olduğu Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından da onaylanmıştır. Beta-siklodekstrinin hidrofobik iç yüzeyi hidrofobik bir molekül olan perfloroheksan ile etkileşime girerek onu enkapsüle etmektedir, beta-siklodekstrinin dış yüzeyinin hidrofilik yapıya sahip olması sayesinde ise oluşan inklüzyon kompleksi
30 vücudun hidrofilik ortamında hedef dokuya iletimi sağlamaktadır.

Buluş kapsamında kullanılan konak molekül örneğin beta-siklodekstrin herhangi bir modifikasyon olmadan kullanılabileceği gibi bir hidrokarbonla, örneğin, metil, etil,

propil, hidroksi propil, sülfobutil eter tercihen metil grubuyla veya bir suda çözünür polimerle, örneğin poli(etilen glikol) ile veya tersinir poliaminler veya çitosan, dekstran, hyalüronik asit, poli(oksazolin), poli(N-(2-hidroksipropil)metakrilamid (HPMA) tercihen poli(etilen glikol) ile modifiye edilerek de kullanılabilir. Buluşun

5 tercih edilen bir uygulamasında konak çözünürlüğünü artırmak amacıyla metil grubuyla modifiye edilmiş konak kullanılmaktadır.

Buluşun özellikle tercih edilen bir uygulamasında beta-siklodekstrinin çözünürlüğünü arttırmak amacıyla metil grubuyla modifiye edilmiş / metillenmiş beta-siklodekstrin kullanılmaktadır.

- 10 Burada kullanılan “modifiye edilmiş” ifadesi söz konusu molekül üzerindeki modifiye edilebilir grupların %10 ile %100’ünün, tercihen %20 ile %90’ının, özellikle tercihen % 30 ile % 80’inin bahsi geçen modifikasyon gruplarıyla modifiye edildiğini ifade etmektedir. Bir başka deyişle; söz konusu konak moleküller üzerinde bulunan modifiye edilebilir gruplar %10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 veya
- 15 %100 oranında modifikasyon grubuyla modifiye edilmiş olarak bulunabilir.

- Dolayısıyla buluş kapsamında kullanılan “beta-siklodekstrin” ifadesi herhangi bir modifikasyona uğramamış beta-siklodekstrini ve bir hidrokarbonla modifiye edilen beta-siklodekstrini örneğin metil grubuyla modifiye edilmiş, bir diğer deyişle metillenmiş beta-siklodekstrini de kapsamaktadır. Buluş kapsamında bahsi geçen
- 20 hidrokarbonla modifiye edilen konak molekül, örneğin beta-siklodekstrin, herhangi bir hidrokarbonla, örneğin metil grubuyla modifiye edilmiş olarak ticari kaynaklardan satın alınabilir, veya laboratuvar ortamında, tekniğin bilinen durumunda uzman kişilerce bilinen yöntemler kullanılarak hazırlanabilir. Buluş kapsamında “metillenmiş” ve metil grubuyla modifiye edilmiş” ifadeleri birbiri
- 25 ile değişebilir şekilde kullanılmaktadır.

Buluşun tercih edilen bir uygulaması metillenmiş beta-siklodekstrin ve perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerine ilişkindir.

- Perflorohekzan; organoflor ailesine mensup bir molekül olup, kararlı C-F bağlarına sahiptir. Söz konusu madde, vücutta metabolize olmamakta ancak basit şekilde
- 30 inhalasyon yoluyla vücuttan atılabilmektedir. Perflorohekzan oda sıcaklığında sıvı formdadır, kaynama sıcaklığı ise 56 °C’dir. Kaynama noktasının düşük olması bu maddenin histotripsisi ajanı olarak kullanımında avantaj sağlamaktadır. Bu sayede,

perflorohekzan düşük basınçla buharlaşmakta ve gaz bulutu oluşturarak dokuda kavitasyon oluşmasını sağlamaktadır. Ayrıca, perflorohekzan bir ultrason kontrast ajanıdır. Bu şekilde beta-siklodektrin-perflorohekzan inklüzyon komplekslerinin tümör dokuya ulaşip ulaşmadığı ultrason ile rahatlıkla görülebilmekte ve ajanların

5 hedef dokuya ulaşmasının ardından kavitasyon işlemi başlatılabilmektedir. Ayrıca, beta-siklodekstrinin boyutunun küçük olması ve uniform bir yapıya sahip olması nedeniyle tümör dokusuna bilinen histotripsi ajanlarına göre daha iyi nüfuz edeceği ve böylelikle daha etkili bir kavitasyon sağlayacağı öngörülmektedir.

Buluş bir başka açıdan bir hedefleyici ajanla modifiye edilen alfa-siklodektrin, beta-siklodektrin, gama-siklodektrin veya biyouyumlu hale getirilmiş kukurbituril,

10 pillaren veya kaliksaren'den seçilen bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerine ilişkindir.

Ayrıca, buluş bir hedefleyici ajanla modifiye edilen beta-siklodektrin veya

15 metillenmiş beta-siklodektrin ve perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerine ilişkindir.

Burada bahsi geçen hedefleyici ajanla modifikasyon; alfa-siklodektrin, beta-siklodektrin, gama-siklodektrin veya biyouyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan grubun içerisinde seçilen bir konak molekülün

20 bir hedefleyici ajanlar konjugasyonu ile elde edilmektedir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında konak molekül olarak alfa-siklodektrin veya beta-siklodektrin veya gama-siklodektrin molekülünün dış yüzeyinde bulunan serbest -OH grubunun hedefleyici ajanla konjugasyonu ile elde edilmektedir.

Burada kullanılan "hedefleyici ajan" ifadesi vücut içerisindeki çeşitli spesifik hedef

25 dokulara bağlanma eğilimi olan molekülleri ifade etmektedir. Bir başka deyişle hedefleyici ajanlar kendilerine özel reseptörlere sahip olan hücrelere bağlanma eğilimi olan molekülleri ifade etmektedir.

Buluş kapsamında kullanılabilecek hedefleyici ajanlar antibodiler, antibodi parçaları veya çeşitli peptitler içerisinde seçilebilir.

Buluşun bir uygulaması buluşa uygun alfa-siklodektrin, beta-siklodektrin, gama-siklodektrin veya biyouyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den seçilen bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden

30

seçilen bir konuk molekülü içeren inklüzyon komplekslerinin hazırlanmasında kullanılan bir usule ilişkin olup söz konusu usul;

- a. Konak molekülün, örneğin beta-siklodekstrinin uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
- 5 b. Elde edilen çözeltinin belirli bir sıcaklığa soğutulması
- c. Soğutulan çözelti içerisine C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekül, örneğin perflorohekzan eklenmesi
- d. Oluşan çökeltinin katı ve sıvı kısımlarının birbirinden ayrılarak katı kısmının kurutulması ile konak molekül- C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen
- 10 bir konuk molekülü içeren inklüzyon kompleksinin, örneğin beta-siklodekstrin-perflorohekzan inklüzyon kompleksinin elde edilmesi adımlarını içermektedir.

Burada kullanılan “bir çözücü” terimi, reaksiyon esnasında kullanılan reaktiflerin çözünmesini sağlayacak herhangi bir solventi ifade etmektedir.

Buluşun bir uygulamasında a. adımında kullanılan uygun çözücü bir organik çözücü veya su veya herhangi bir sulu çözelti olabilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında çözücü olarak su kullanılmaktadır.

Buluşun bir uygulamasında a. adımında çözünmenin sağlanması için beta-siklodekstrin çözelti karışımı belirli bir sıcaklığa ısıtılabilir, söz konusu çözelti tercihen 70-90 °C sıcaklığa, özellikle tercihen 80 °C sıcaklığa ısıtılır.

Buluşun bir uygulamasında b. adımında çözelti 35 °C ile 55 °C arasında bir sıcaklığa, tercihen 45 °C sıcaklığa soğutulur.

Buluşun bir başka uygulaması buluşa uygun metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan inklüzyon komplekslerinin hazırlanmasında kullanılan bir usule ilişkin olup söz konusu usul;

- a. Beta-siklodekstrin molekülünün uygun bir organik solvent içerisinde çözülmesi
- b. Elde edilen çözeltiye bir inorganik tuz eklenmesi
- 30 c. Elde edilen çözeltiye dimetil karbonat eklenmesi
- d. Oluşan karışımın oda sıcaklığında karıştırılması

- e. Solüsyonun süzülerek katıların uzaklaştırılması ve sonrasında uçucu bileşenlerin uzaklaştırılmasıyla metillenmiş beta-siklodekstrinin elde edilmesi
 - f. Elde edilen metillenmiş beta-siklodekstrinin uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
 - 5 g. Elde edilen çözeltinin içerisine perflorohekzan eklenerek solüsyonun karıştırılması
 - h. Oluşan katıların sıvılardan ayrılarak kurutulmasıyla metillenmiş beta-siklodekstrin-perflorohekzan inklüzyon kompleksinin elde edilmesi adımlarını içermektedir.
- 10 Buluş bir diğer açıdan alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin tedavi amaçlı kullanımına ilişkindir.
- 15 Buluş bir açıdan beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin tedavi amaçlı kullanımına ilişkindir.
- Buluş bir açıdan metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin tedavi amaçlı kullanımına ilişkindir.
- 20 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında, buluşa uygun alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon kompleksleri kanser tedavisinde kullanılırlar.
- 25 Buluşun bir diğer uygulamasında beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon kompleksleri kanser tedavisinde kullanılırlar.
- Buluşun bir diğer uygulamasında metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon kompleksleri kanser tedavisinde kullanılırlar.
- 30 Buluş bir diğer açıdan alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin histotripsi ajanı olarak kullanımına ilişkindir.

Buluş ayrıca, beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin histotripsisi ajanı olarak kullanımına ilişkindir.

Buluş ayrıca, metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin histotripsisi ajanı olarak kullanımına ilişkindir.

5 Buluş bir diğer açıdan alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyoumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin teşhis amaçlı kullanımına ilişkindir.

10 Buluş ayrıca, beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin teşhis amaçlı kullanımına ilişkindir.

Buluş ayrıca, metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin teşhis amaçlı kullanımına ilişkindir.

15 Buluşun bir tercih edilen bir uygulamasında, buluşa uygun alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyoumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon kompleksleri çeşitli kanser türlerinin teşhisinde, kullanılırlar.

20 Buluş ayrıca, beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin çeşitli kanser türlerinin teşhisinde kullanımına ilişkindir.

Buluş ayrıca, metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin çeşitli kanser türlerinin teşhisinde kullanımına ilişkindir.

25 Buluş bir diğer açıdan alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyoumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin görüntüleme amaçlı kullanımına ilişkindir.

Buluş ayrıca, beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin görüntüleme amaçlı kullanımına ilişkindir.

30 Buluş ayrıca, metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerinin görüntüleme amaçlı kullanımına ilişkindir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında buluşa uygun alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyouyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren inklüzyon kompleksleri ultrason görüntüleme amacıyla kullanılır.

Buluşun özellikle tercih edilen bir uygulamasında beta-siklodekstrin perflorohekzan inklüzyon kompleksleri ultrason görüntüleme amacıyla kullanılır.

Buluşun özellikle tercih edilen bir uygulamasında metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan inklüzyon kompleksleri ultrason görüntüleme amacıyla kullanılır.

10 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında, buluşa uygun alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyouyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon kompleksleri çeşitli kanser türlerinin görüntülenmesinde kullanılırlar.

15 Buluşun özellikle tercih edilen bir uygulamasında beta-siklodekstrin perflorohekzan inklüzyon kompleksleri çeşitli kanser türlerinin görüntülenmesinde kullanılır.

Buluşun özellikle tercih edilen bir uygulamasında metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan inklüzyon kompleksleri çeşitli kanser türlerinin görüntülenmesinde kullanılır.

20 Burada kullanılan “kanser” ifadesi habis (malign) tümörlere veya kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize olan bir fizyolojik duruma işaret etmektedir. Kanser örnekleri karsinoma, lenfoma, blastoma sarkoma ve lösemiye içermekte olup bunlarla sınırlı değildir.

25 Karsinoma, burada kullanıldığı şekliyle, epitel hücrelerden oluşan bir kanser türünü ifade etmektedir.

Lenfoma, burada kullanıldığı şekliyle, lenfositlerden gelişen bir kanser türünü anlatmaktadır.

Blastoma, burada kullanıldığı şekliyle, blast hücre adıyla da bilinen öncü hücrelerden gelişen bir kanser türünü anlatmaktadır.

30 Sarkoma, burada kullanıldığı şekliyle, mezenkimal kökenli değişmiş hücrelerden kaynaklanan kanser türünü anlatmaktadır.

Lösemi, burada kullanıldığı şekliyle, kemik iliğinde başlayan ve yüksek sayıda anormal akyuvar hücresi oluşumuna neden olan kanser türünü ifade etmektedir.

5 Kanser türlerine ait daha özel örnekler meme kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser, deri kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mezotelyom, gastrointestinal kanser, pankreas kanseri, gliyoblastom, vulva kanseri, rahim ağzı kanseri, endometriyal karsinom, yumurtalık kanseri, karaciğer kanseri, hepatom, mesane kanseri, böbrek kanseri, tükürük bezi karsinomu, tiroid kanseri ve çeşitli baş ve boyun kanserlerini içerir.

10 Buluş bir diğer açıdan alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerini içeren farmasötik bileşimleri açıklamaktadır.

15 Buluş aynı zamanda, beta-siklodekstrin perfloroheksan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerini içeren farmasötik bileşimleri açıklamaktadır.

20 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında buluşa uygun alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin veya biyoyumlu hale getirilmiş kukurbituril, pillaren veya kaliksaren'den oluşan bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerini içeren farmasötik bileşimler; buluşa uygun inklüzyon kompleksinin yanı sıra en az bir yardımcı ajan içerir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında beta-siklodekstrin perfloroheksan konuk-konak (host-guest) inklüzyon komplekslerini içeren farmasötik bileşimler buluşa uygun inklüzyon kompleksinin yanı sıra en az bir yardımcı ajan içerir.

25 Söz konusu yardımcı ajan buluşa uygun farmasötik bileşimin, çözünürlüğü, dağılımı, doz tekdüzeliğinin sağlanması vb. kriterleri karşılaması için kullanılan bir ajan olup herhangi bir farmasötik etkinliği bulunmamaktadır.

30 Buluşa uygun inklüzyon komplekslerini içeren farmasötik bileşimler tekniğin bilinen durumunda var olan herhangi bir dozaj formunda bulunabilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında buluşa uygun dozaj formları injektabl formda bulunur. Söz konusu injektabl formlar özellikle tercihen intravenöz, intraperitoneal, intratrakeal yoldan verilmeye uygun şekilde hazırlanmış olabilir.

Şimdi buluş sadece örnek amaçlı olan ve bu buluşun kapsamını herhangi bir şekilde kısıtlar olarak yorumlanmaması gereken aşağıdaki örneklere atıfta bulunularak açıklanacaktır.

ORNEKLER:

5 Örnek 1: Beta-Siklodekstrin Perflorohekzan İnküzyon Kompleksinin Hazırlanması

50 mg beta-siklodekstrin 1 mL saf su ile karıştırılır ve 80 °C sıcaklığa ısıtılır ve karıştırılır. Beta-siklodekstrin tamamen çözündükten sonra solüsyon 45 °C sıcaklığa soğutulur. Sonrasında 1, 2, 20 veya 50 kat olarak şekilde molar oranlarda perflorohekzan eklenir. Karışım gece boyunca 45 °C sıcaklıkta karıştırılır. Sonrasında bir saat boyunca bozdolabında 4 °C sıcaklıkta bekletilen karışım 5000 rpm hızda 10 dakika boyunca santrifüjlenir. Sıvı kısım dökülür ve elde edilen katılar vakum altında kurutulur.

15 Örnek 2: Metillenmiş Beta-Siklodekstrin Perflorohekzan İnküzyon Kompleksinin Hazırlanması

3 g beta-siklodekstrin üzerinde soğutucu bulunan bir çift boyunlu balon içerisinde 60 mL DMF ile çözülür. Beta-siklodekstrin tamamen çözündükten sonra karışıma 8.6 g K_2CO_3 eklenir. Sonrasında karışıma 8 mL anhidrus dimetil karbonat damla damla eklenir ve oluşan reaksiyon karışımı gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılır.

20 Sonrasında karışım katalizörün uzaklaştırılması için 2000 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüjlenir. Elde edilen sıvı kısımdan çözücü ve fazla dimetil karbonat düşük basınçta distilasyon yöntemiyle uzaklaştırılır. Sonrasında kalan kısım aseton içerisinde rekristalize edilir ve oluşan çökelti diyetilerle yıkanır. Elde edilen katı madde filtrelenir ve vakum altında kurutulur.

25 Metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan inküzyon kompleksinin elde edilmesi için öncelikle 50 mg metillenmiş beta-siklodekstrin 1 ml su içerisinde oda sıcaklığında çözülür, sonrasında karışıma 5, 10 veya 50 kat olacak şekilde molar oranlarda perflorohekzan eklenir. Oluşan çözelti 24 saat boyunca karıştırılır. Reaksiyon karışımı sonrasında 5000 rpm hızında 10 dakika boyunca santrifüjlenir,

30 sıvı kısım atılır, çözen katı kısım ise düşük basınç altında kurutulur.

Örnek 3: Hücre Canlılığı Testleri

Hücre canlılığı testi metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan inklüzyon kompleksinin vücuttaki hücrelerle ne şekilde etkileşime geçtiğinin belirlenmesi bakımından önem taşımaktadır.

- 5 Buluşa uygun inklüzyon kompleksleri vücuttaki kanı temizlemek ve kan akışından çeşitli partkülleri ve antijenleri uzaklaştırmakla görevli olan ve immünolojik uyarılara karşı enflamatuvar aracılığıyla oluşturan retikülo-endotelial sistem organlarından böbreğe ait HEK-293T hücreleri kullanılarak test edilmiştir.

- 10 Bu amaçla 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonundaki beta-siklodekstrin (BCD), metillenmiş beta-siklodekstrin (MCD) ve metillenmiş beta-siklodekstrin ve perflorohekzan inklüzyon kompleksi (MIC) solüsyonları hazırlanmıştır. Ayrıca 0.1 µL, 0.13 µL, 0.15 µL miktarında perflorohekzan (PFH) da aynı hücreler üzerinde test edilmiştir. Test edilen perflorohekzan miktarı belirlenirken 1 mg/mL MIC içerisindeki perflorohekzan miktarı baz alınmıştır. 1 mg/mL MIC içerisinde 0.15 µL perflorohekzan olduğu belirlenmiştir. Daha düşük konsantrasyonlardaki inklüzyon komplekslerinde, örneğin 0.1 mg/mL ve 0.5 mg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla 0.015 µL ve 0.075 µL perflorohekzan olduğu tespit edilmiş, bu miktarlar çok düşük olduğundan 0.1 µL ve 0.13 µL miktarındaki perflorohekzan miktarlarıyla deneme yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar Şekil 1’de gösterilmektedir.

- 20 Bu grafikten de görüldüğü üzere 0.1 mg/ml miktarında MIC inklüzyon kompleksi % 94,5 hücre canlılığı gösterirken, 1 mg/mL konsantrasyonunda % 86,8’e düşmektedir bu da konsantrasyonun 10 kat artırılmasına rağmen hücre canlılığında çok büyük bir düşüş olmadığını göstermektedir.

- 25 Diğer yandan, perflorohekzan maksimum konsantrasyon olarak kullanılan 0.15 µL miktarında % 89 hücre canlılığı göstermektedir. Bu da bu ajanın toksik olmadığına işaret etmektedir.

Örnek 4: Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Testi

- 30 Kompleksin boyutu histotripsisi için gerekli eşiğin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Küçük boyutlu parçacıklar hem daha kolay enjekte edilmekte hem de tümör dokuda birikimleri daha yüksek olmaktadır. Özellikle tümör dokudaki geçirgen

vasküler dokunun 200 nm ve altındaki partikülleri tümör dokusu içerisine geçirdiği göz önüne alınırsa boyutu 200 nm ve altında olan partiküllerin ilaç taşıma veya tümörde birikim bakımından daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

5 Tekniğin bilinen durumunda var olan nanodamlacıkların boyutu 204 nm olarak raporlanmıştır, bu değerin üst sınırdaki yer aldığı ve daha düşük boyutta bir ajanın tümör dokusunda daha iyi performans gösterebileceği düşünülmektedir.

Yapılan DLS testlerinde elde edilen sonuç Şekil 2’de grafik olarak verilmektedir.

10 Burada BCD; beta-siklodekstrin’i; MBCD metillenmiş beta-siklodekstrini; MIC ise metillenmiş beta-siklodekstrin ile perflorohekzanın inklüzyon kompleksini ifade etmektedir.

15 Şekil 2’den de görülebileceği üzere, beta-siklodekstrin 16.42 nm boyutunda, metillenmiş beta-siklodekstrin 19.55 nm boyutunda ve metillenmiş beta-siklodekstrin ile perflorohekzanın inklüzyon kompleksi ise 48.68 nm boyutunda olup tümörde iyi bir birikim için gerekli olan maksimum partikül boyutu olan 200 nm değerinin oldukça altındadır. Bu özelliği nedeniyle, buluşa uygun inklüzyon komplekslerinin tekniğin bilinen durumunda var olan nanodamlacık formundaki histotripsisi ajanlarından daha üstün olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Diğer bir üstünlük ise histotripside asıl etkinliği sağlayan PFK miktarını belirleme noktasında sağlanmıştır. Konuk- konak kompleksi oluşumu %98-%100 gibi yüksek bir değerle gerçekleştirilebildiği için 20 inklüzyon kompleksinin molce miktarı PFK konunun molce miktarına eşit olacaktır. Bu durum kullanım pratikliği ve güvenilirliği açısından önemlidir.

Ornek 5: Doku Taklitleyen Agaroz Fantomlarda Histotripsisi Sınır Değerinin Ölçümü

25 Yapılan çalışmalarda dokularda ve doku taklitleyen ortamlarda kavitasyon oluşturmak için 26-30 MPa basınç gerektiği açıklanmıştır.

Bu amaçla yapılan ilk deneyde 30V voltaj ve 500 kHz transformatör kullanılmıştır. Aynı şartlar altında gözlemlenmek üzere 3 farklı ortam hazırlanmıştır. Bunlardan ilki herhangi bir histotripsisi ajanı içermeyen negatif kontrol ortamıdır, bir diğeri sadece 30 PFH içeren pozitif kontrol ortamı ve sonuncusu ise buluşa uygun metillenmiş beta-siklodekstrin perflorohekzan inklüzyon kompleksi (MIC) içeren ortamdır.

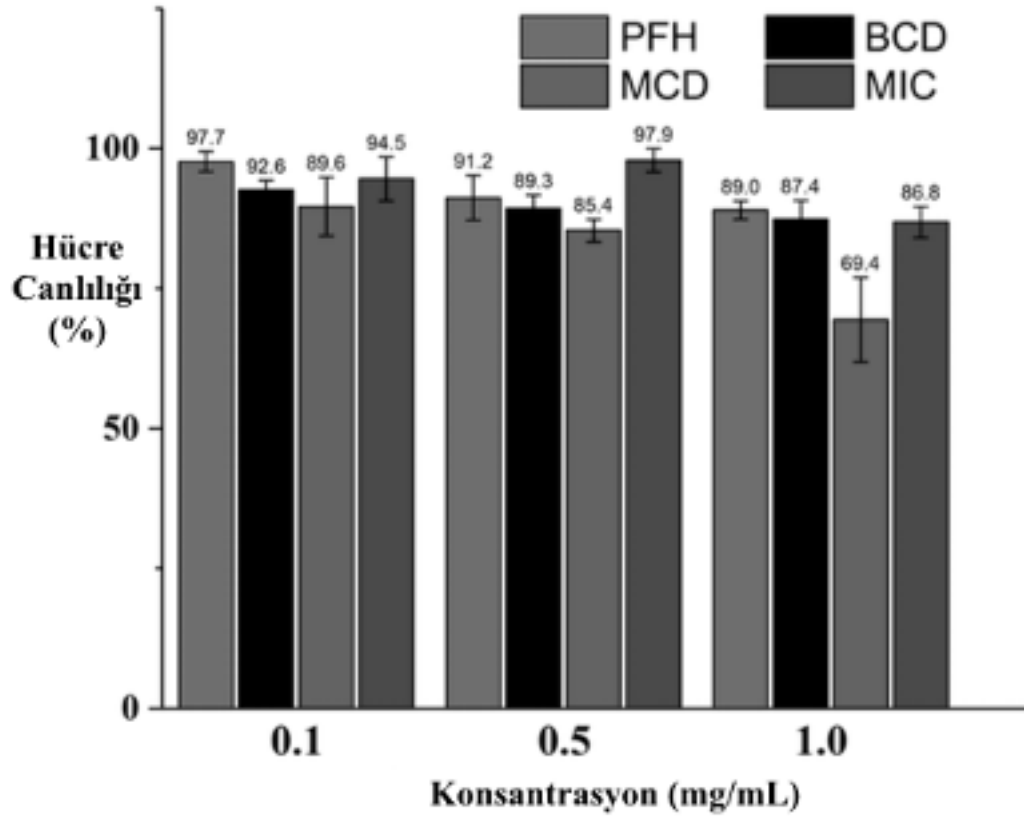
Deneyin gerçekleştirilmesinin ardından yüksek hızlı kamera görüntüleri tespit edilmiştir, söz konusu görüntüler Şekil 3'te verilmektedir. Görüntülerden de anlaşılabilceği gibi, hiçbir histotripsi ajanı kullanılmayan negatif kontrol ortamında kaviteasyon yokken, buluşa uygun inklüzyon komplekslerinin kullanıldığı örnekte kaviteasyon oluşmaktadır.

İkinci deneyde 40V voltaj ve 500 kHz transformatör kullanılmıştır. Bu deney için de yukarıda detayları verilen pozitif ve negatif kontrol ortamları ve buluşa uygun MIC içeren ortam kullanılmıştır. Bu deneyde de histotripsi ajanı içermeyen negatif kontrol ortamında herhangi bir kaviteasyon gözlemlenmezken MIC içeren ortamda kaviteasyon görülmektedir, ayrıca kaviteasyon oluşumunun 30V ortamına göre daha fazla olduğu da gözlemlenmektedir (Şekil 4) .

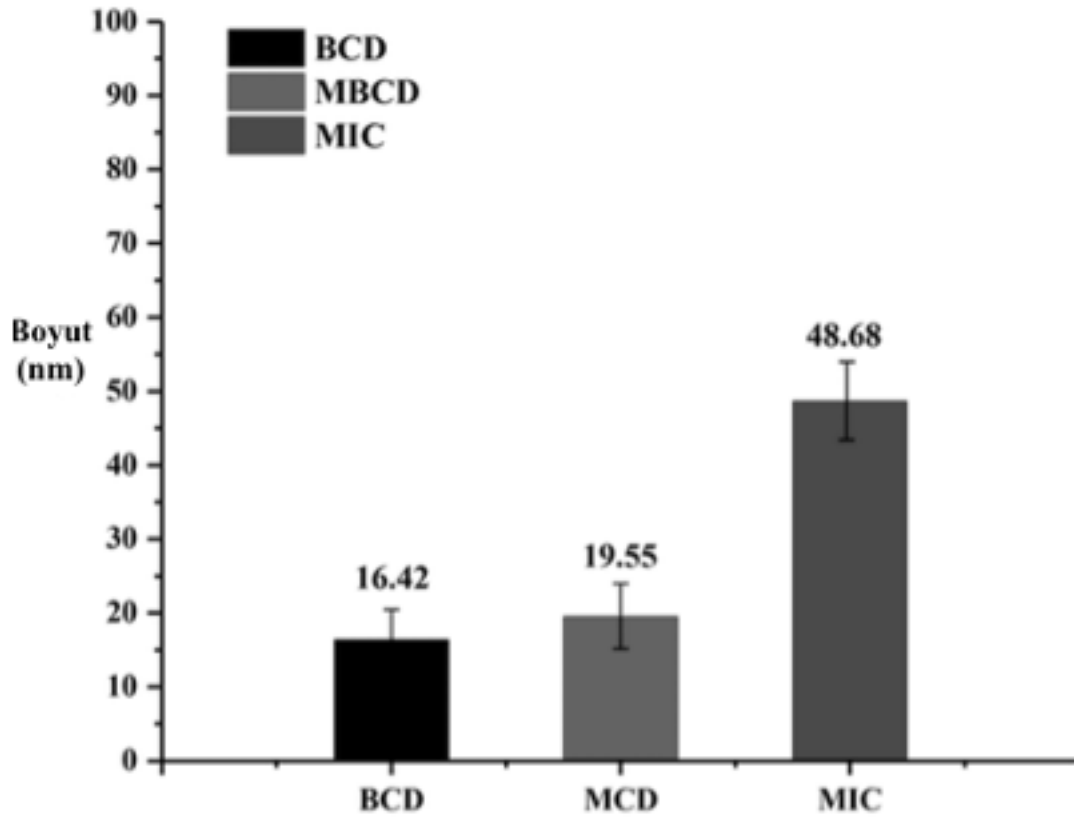
Yapılan bu deneyler sonucunda; negatif kontrol ortamlarında hiç kaviteasyon olmaması oluşturulan basıncın 26-30 MPa değerinden düşük olduğunu göstermektedir. Aynı şartlarda buluşa uygun inklüzyon komplekslerinin kaviteasyon oluşturması ise buluşun amaçlanan şekilde daha düşük basınç değerlerinde, etraftaki sağlıklı dokuya da zarar vermeyecek şekilde kaviteasyon oluşumunu sağladığını göstermektedir.

20

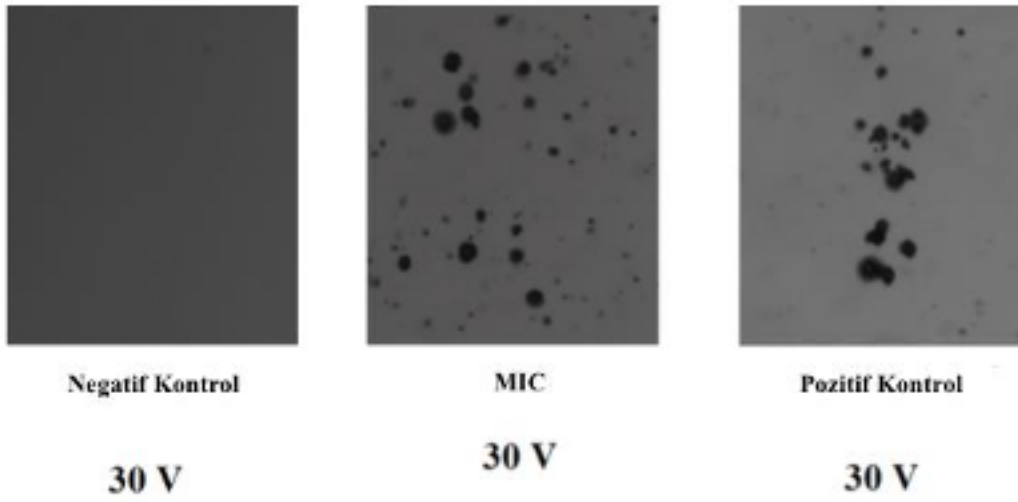
25



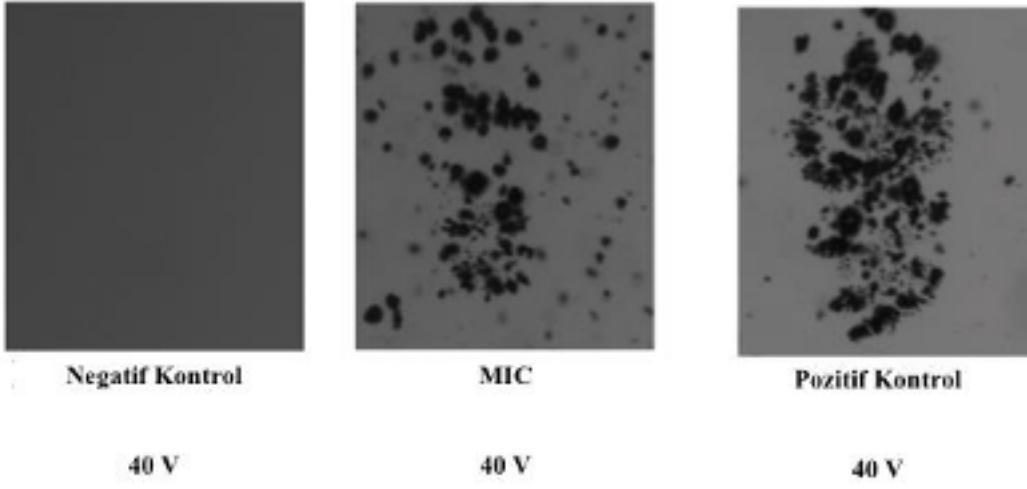
Şekil 1



Şekil 2



Şekil 3



Şekil 4