

ÖZET

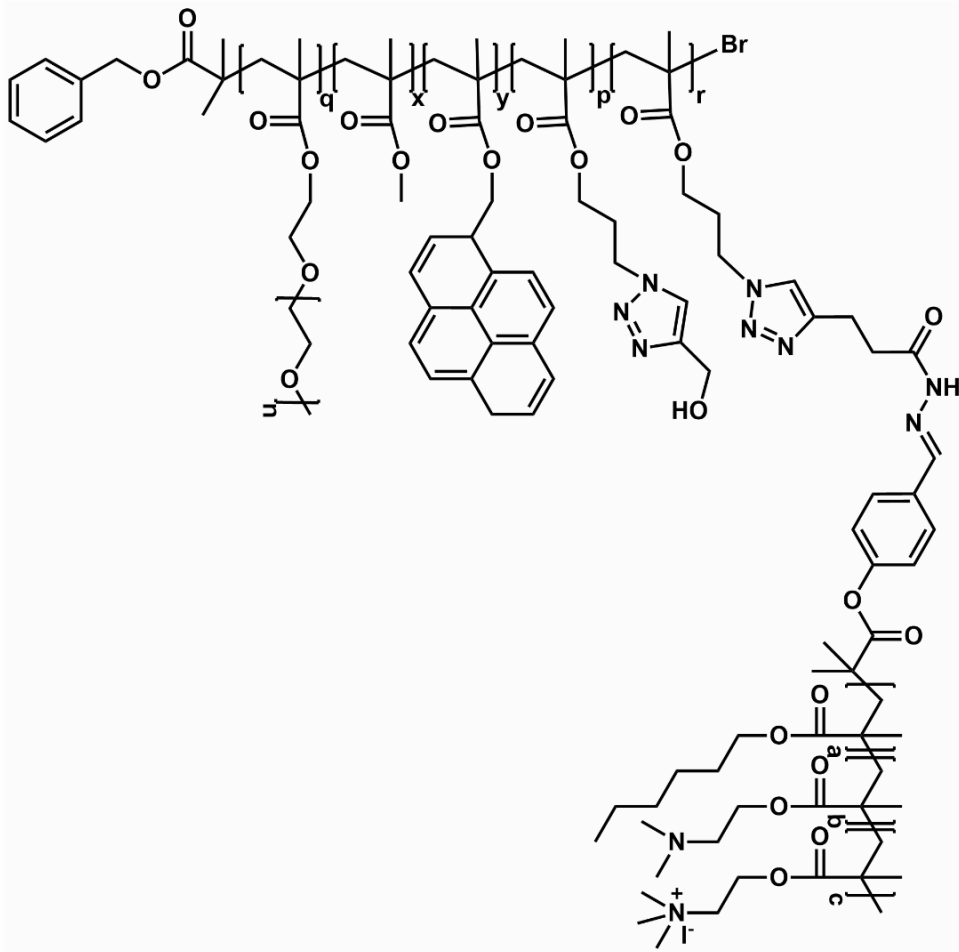
İNDİRGENMİŞ GRAFEN OKSİT (rGO) TEMELLİ İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ

Mevcut buluş, ilaç taşıma sistemi olarak kullanım için metakrilat bazlı bir kopolimerle kaplanmış indirgenmiş grafen oksit (rGO) nanoplatformlarına ve bu platformların

5 hazırlanmasında kullanılan yöntemlere ilişkindir.

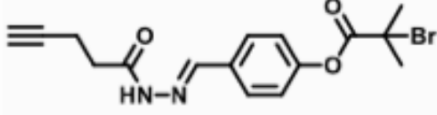
İSTEMLER

1. Fonksiyonlanabilir rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği poli[poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*-(metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azidopropil metakrilat)]-aşı-poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-*ko*-(trimetilaminoetil metakrilat)] (PAMP-aşı-PHDT) kopolimeriyle kaplanmış olmasıdır.
2. İstem 1'e göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği indirgenmiş grafen oksit'in (rGO) yüzeyinin Formül I ile poli[poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*-(metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azidopropil metakrilat)]-aşı-poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-*ko*-(trimetilaminoetil metakrilat)] (PAMP-aşı-PHDT) kopolimeri ile kaplanmış olmasıdır ki burada; n 1 ile 200 arasında p, q, r, x, y, a, b, c birbirinden bağımsız olarak 1 ile 50 arasında bir doğal sayıdır.



Formül I

3. İstem 1-2'den herhangi birine göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği alkin grubuna sahip herhangi bir molekülle fonksiyonelleştirilmesidir.
4. İstem 3'e göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği alkin grubuna sahip veya alkin grubuyla modifiye edilmiş hedefleyici ajanlar veya terapötik ajanlarla fonksiyonelleştirilmiş olmasıdır.
5. İstem 4'e göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği alkin grubuna sahip veya alkin grubuyla modifiye edilmiş terapötik ajanın antineoplastik ajan olmasıdır.
6. İstem 1-5'ten herhangi birine göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği , π - π etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajanla fonksiyonelleştirilmesidir.
- 10 7. İstem 6'ya göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği rGO yüzeyine π - π etkileşimiyle tutunabilen ajanın hedefleyici ajan veya terapötik ajan, tercihen bir antineoplastik, özellikle tercihen doksorubisin olmasıdır.
- 15 8. İstem 5 veya 7'ye göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği antineoplastik ajanın nükleosit analogları, antifolatlar, diğer metabolitler, topoizomera I inhibitörleri, antrasiklinler, podofilotoksinler, taksanlar, vinka alkaloidleri, alkilleyici maddeler, platin bileşikler, antihormonlar, radyofarmasötikler, monoklonal antikörler, tirozin kinaz inhibitörleri, rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) inhibitörleri, retinoidler, bağışıklık sistemini düzenleyici maddeler, histonedeasetilaz inhibitörleri ve diğer maddeleri kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilmesidir.
- 20 9. İstem 1-8'den herhangi birine göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği, iyonik etkileşimle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajanla fonksiyonelleştirilmesidir
10. İstem 9'a göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği iyonik etkileşimle rGO yüzeyine tutunabilen ajanın bir oligopeptit, polipeptit, DNA veya RNA fragmenti, 25 miRNA, siRNA, ssRNA gibi bir biyolojik molekül olmasıdır.
11. İstem 1 veya 2'den herhangi birine göre PAMP-aşı-PHDT polimerinin hazırlanmasında kullanıma uygun Formül II ile gösterilen polimerizasyon başlatıcısı.



Formül II

12. İstem 1-10'dan herhangi birine göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı ve bu nanotaşıyıcıya kovalent veya π - π etkileşimiyle veya iyonik etkileşimle nonkovalent olarak konjuge olmuş terapötik ajan, tercihen antineoplastik ajan ve/veya hedefleyici molekül içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatları.
13. Kanser hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanım için İstem 12'ye göre ilaç-nanotaşıyıcı konjugatları.
14. İstem 13'e göre ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarını içeren farmasötik bileşimler.

10

15

20

25

TARİFNAME

İNDİRGENMİŞ GRAFEN OKSİT (rGO) TEMELLİ İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ

- Mevcut buluş, ilaç taşıma sistemi olarak kullanım için metakrilat bazlı bir kopolimerle kaplanmış indirgenmiş grafen oksit (rGO) nanoplatformlarına ve bu platformların hazırlanmasında kullanılan yöntemlere ilişkindir.

Tekniğin Bilinen Durumu

- Grafenin (G) diğer bilinen biyomalzemelere göre üstün özellikleri onu son zamanlarda antikanser ajan veya gen veya peptit taşınmasında önemli bir materyal haline getirmiştir. Ancak grafenin toksik etkisi kullanımını sınırlandırmaktadır.
- 10 Grafen tek katmanlı bir yapıya sahiptir, diğer yandan benzeri bir yapı olan Grafen oksit (GO) hem çok katmanlı bir yapıya sahiptir hem de yapısı üzerinde onu hidrofilik yapan çok sayıda fonksiyonel oksijen grubu bulundurur. Fakat GO yapısında yer alan sp^3 hibridize karbonlar nedeniyle bu materyal kusurlu bir yüzey oluşumuna sahiptir. GO üzerindeki oksijen grubunun azaltılmasıyla bu problem ortadan kalkabilir fakat bu
- 15 durumda elde edilen materyalin çözünürlüğü kısmen azalmaktadır.

- Grafen'in yüzeyindeki oksijence zengin grupların indirgenmesiyle elde edilen indirgenmiş grafen oksit (rGO), daha düzgün ve geniş yüzey alanına sahiptir. Ayrıca grafene kıyasla daha az toksisiteye sahiptir. Bu yönleriyle rGO biyolojik uygulamalarda kullanım için cazip bir ajan haline gelmektedir. Ancak, düşük suda
- 20 çözünürlüğe sahip olması ve biyouyumluluğunun düşük olması kullanımını sınırlandırmaktadır.

- Tekniğin bilinen durumunda rGO'nun çözünürlük ve biyouyumluluk problemini aşmak için sıklıkla rGO yüzeyi poli(etilen glikol) (PEG) gibi polimerlerle yüzey kaplaması işlemi uygulanmaktadır. Bu şekilde modifiye edilen rGO'nun immün
- 25 hücreler tarafından karaciğer ve dalaktan atılımı engellenir ve dolayısıyla kanda dolaşım süresi uzar.

Bu şekilde PEG ve benzeri polimerlerle kaplanan rGO'larda farklı bir modifikasyon yapılamamaktadır. Bu nedenle rGO'nun biyoyararlanımı artmasına rağmen ilaç taşıma v.b. uygulamalarda kullanımı zorlaşmaktadır.

- 30 Bu teknik problemi çözmek için yola çıkan buluş sahipleri rGO'nun biyoyararlanımını arttırırken aynı zamanda ilaç veya benzeri bir kargo molekülün

taşımasına olanak sağlayan fonksiyonlanabilir bir nanotaşıyıcı geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Şekillerin Detaylı Açıklaması

Şekil 1: Grafen oksit üzerine in-situ PAMP-aşı-PHDT polimeri kaplama ve rGO'ya indirgenmeyi gösteren şema.

A: Fonksiyonlu kopolimer, poli[(poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*- (metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azidopropil metakrilat)] (PAMP)

B: Katyonik kopolimer, poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-*ko*-(trimetilaminoetil metakrilat) (PHDT)

10 C: PAMP-aşı-PHDT polimeri

D: Grafen Oksit

E: PAMP-aşı-PHDT polimeri ile kaplanmış indirgenmiş grafen oksit (rGO) (nanotaşıyıcı)

F: Doksorubisin

15 G: Doksorubisin yüklü PAMP-aşı-PHDT polimeri ile kaplanmış indirgenmiş grafen oksit (rGO) (ilaç-nanotaşıyıcı konjugatı)

101: Hidrofobik monomer (HMA)

102: pH duyarlı monomer (DMAEMA)

103: Katyonik monomer (TMAEMA)

20 104: CuAAC, click reaksiyonu katalizörü

105: π - π etkileşimi ve indirgenme adımı

Şekil 2: Anti-Bcl-2-siRNA ile kompleks oluşturmuş taşıyıcıların MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonunda hücre canlılığı üzerine etkilerinin Resazurin tahlili ile incelenmesi.

25 Şekil 3: siRNA taşıyan nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri ile 48 saat inkübasyonu sonrasında hücre canlılığı üzerine etkilerinin Resazurin tahlili ile incelenmesi.

(i) : Hücre Canlılığı (%)

201: Kontrol

202: Serbest Doksorubisin

203: (PAMP)_{PEG2000}-aşı-PHDT-rGO-siRNA

204: (PAMP)_{PEG2000}-aşı-PHDT-rGO-EPPT1-siRNA

5 205: (PAMP)_{PEG2000}-aşı-PHDT-rGO-Doksorubisin-siRNA

206: (PAMP)_{PEG2000}-aşı-PHDT-rGO-EPPT1-Doksorubisin-siRNA

Buluşun Detaylı Anlatımı

Mevcut buluş fonksiyonlanabilir rGO temelli bir nanotaşıyıcıya ilişkin olup özelliği indirgenmiş grafen oksit'in (rGO) yüzeyinin poli[poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*-(metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azidopropil metakrilat)]-aşı-poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-*ko*-(trimetilaminoetil metakrilat)] (PAMP-aşı-PHDT) kopolimeriyle kaplanmış olmasıdır.

Buluşa uygun PAMP polimerinin yapısında bulunan piren grupları, polimerin π - π etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunmasını sağlamaktadır. PAMP polimerinin yapısında yer alan PEG grupları rGO'nun yüzeyini biyouyumlu hale getirmektedir. PAMP polimeri üzerinde yer alan azid grupları ılımlı koşullarda gerçekleştirilen click reaksiyonuyla alkin içeren çeşitli kargo moleküllerin nanotaşıyıcı üzerine takılmasını mümkün kılarak bu yapıyı fonksiyonlanabilir rGO temelli bir nanotaşıyıcı haline getirmektedir.

Buluşa uygun şekilde PAMP polimerinin üstüne aşıl原因 PHDT olarak adlandırılan poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-*ko*-(trimetilaminoetil metakrilat)] polimerinin yapısında bulunan trimetil aminoetil metakrilat monomeri, polimere katyonik özellik kazandırmakta bu da elde edilen nanotaşıyıcının bir ilaçla konjuge edilmesi durumunda ilacın yüzeyden salınımının artmasını sağlayarak etkili şekilde ilacın hedef bölgeye iletilmesini sağlamaktadır.

Buluş kapsamında kullanılan indirgenmiş grafen oksit ve rGO ifadeleri birbiriyle eşdeğer olup, birbiri yerine kullanılabilir.

Buluş kapsamında kullanılan "buluşa uygun rGO temelli nanotaşıyıcı" ifadesi yüzeyi poli[poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*-(metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azidopropil metakrilat)]-aşı-poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-

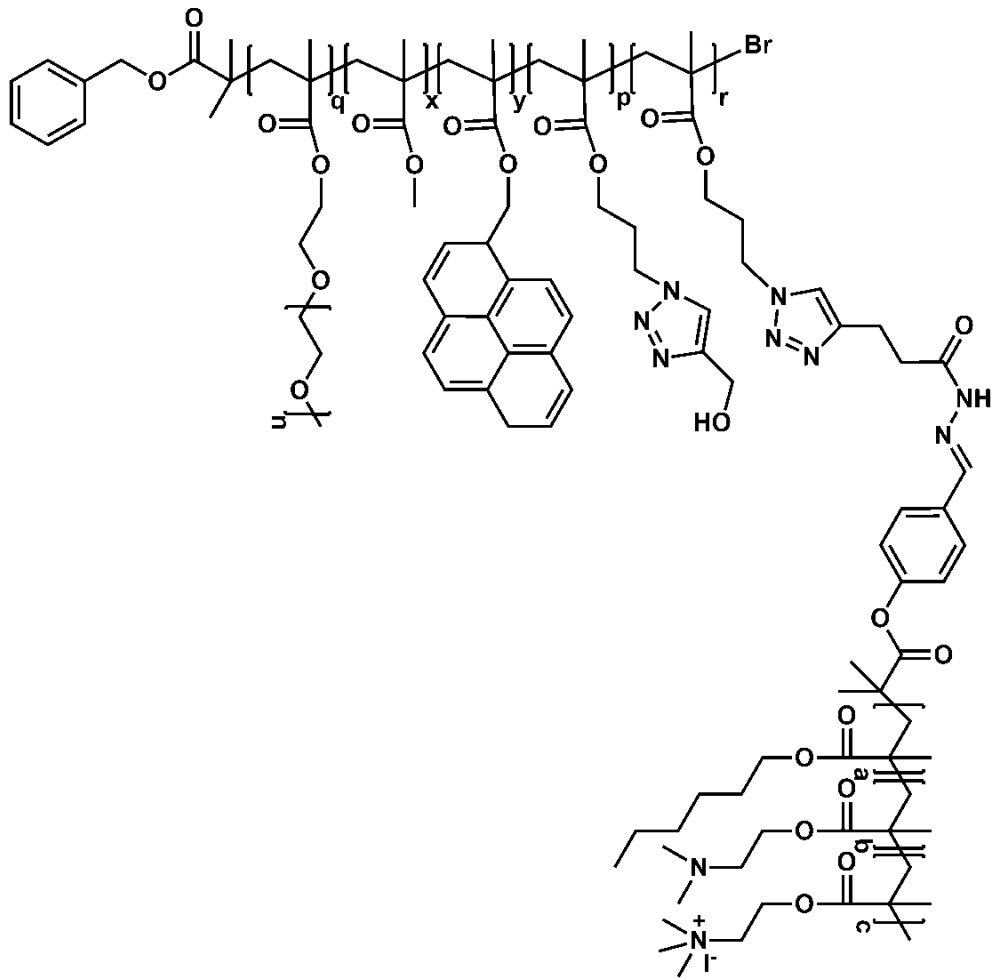
ko-(trimetilaminoetil metakrilat)] (PAMP-aşı-PHDT) kopolimeriyle kaplanmış rGO'yu ifade etmektedir.

Burada bahsedilen “PAMP-aşı-PHDT polimeri ile kaplama” ifadesi PAMP-aşı-PHDT polimerinin rGO yüzeyiyle kovalent olmayan fiziksel etkileşim ile bağlanmasını ve/veya π - π etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunmasını ifade etmektedir.

Buluş kapsamında kullanılan “PAMP” ifadesi ile “poli [poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*-(metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azido propil metakrilat)]” ifadesi birbiri ile eş anlamlı olup, birbiri yerine kullanılabilir.

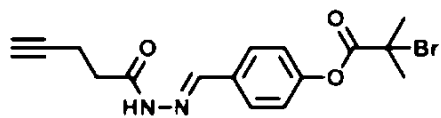
Buluş kapsamında kullanılan “PHDT” ifadesi ile “poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-*ko*-(trimetilaminoetil metakrilat)]” ifadesi birbiri ile eş anlamlı olup, birbiri yerine kullanılabilir.

Buluşun tercih edilen bir uygulaması rGO temelli bir nanotaşıyıcıya ilişkin olup özelliği indirgenmiş grafen oksit'in (rGO) yüzeyinin Formül I ile gösterilen poli [poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*-(metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azido propil metakrilat)-aşı-poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-*ko*-(trimetilaminoetil metakrilat)] (PAMP-aşı-PHDT) kopolimeri ile kaplanmış olmasıdır ki burada; n 1 ile 200 arasında p, q, r, x, y, a, b, c birbirinden bağımsız olarak 1 ile 50 arasında bir doğal sayıdır.



Formül I

Buluş bir diğer açıdan Formül I ile gösterilen poli [poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*-
5 (metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azido propil metakrilat)-aşı-
poli[(hekzil metakrilat)-*ko*-(dimetilaminoetil metakrilat)-*ko*-(trimetilaminoetil
metakrilat)] (PAMP-aşı-PHDT) kopolimerinin hazırlanmasında kullanıma uygun
formül II ile gösterilen polimerizasyon başlatıcısına ilişkindir.



10 FormülII

Buluşun bir uygulamasında, buluşa uygun rGO temelli bir nanotaşıyıcı alkin grubuna sahip herhangi bir molekülle fonksiyonelleştirilebilir.

5 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında rGO temelli bir nanotaşıyıcı alkin grubuna sahip veya alkin grubuyla modifiye edilmiş hedefleyici ajanlar veya terapötik ajanlarla modifiye edilir.

10 Burada bahsedilen hedefleyici ajan tekniğin bilinen durumunda var olan ve çeşitli hastalıkların varlığında daha fazla ifade edildiği bilinen reseptörlere veya enzimlere spesifik substratlar olabilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında hedefleyici ajan olarak EPPT1 kullanılabilir.

15 Buluşun bir diğer uygulamasında buluşa uygun rGO temelli bir nanotaşıyıcı, π - π etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajanla modifiye edilebilir. Burada bahsi geçen π - π etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajan, tercihen bir terapötik ajan, özellikle tercihen doksorubisin gibi bir antineoplastik ajan olabilir. Nonkovalent şekilde rGO yüzeyine tutunan doksorubisin gibi kargo molekülleri hedef bölgede taşıyıcıyla beraber hücre içerisine girmekte ve burada salınarak etki göstermektedir.

Buluşun bir diğer tercih edilen uygulamasında π - π etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajan, bir hedefleyici ajan olabilir.

20 Buluşun bir diğer uygulamasında buluşa uygun rGO temelli bir nanotaşıyıcı, iyonik etkileşimle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajanla modifiye edilebilir. Burada bahsi geçen iyonik etkileşimle rGO yüzeyine tutunabilen ajan bir oligopeptit, polipeptit, DNA veya RNA fragmenti, miRNA, siRNA, ssRNA gibi bir biyolojik molekül olabilir. Bu şekilde rGO temelli nanotaşıyıcı yüzeyine tutunan biyolojik ajanlarla buluşa konu nanotaşıyıcıların belirli bir hedefe, örneğin bir kanser hücresine, daha kolay girmesini ve üzerindeki terapötik ajanı burada salarak farmasötik etkinliğin 25 artırılması amaçlanmaktadır. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında uygun rGO temelli bir nanotaşıyıcı anti-Bcl-2 siRNA ile modifiye edilmektedir. Burada modifikasyon iyonik etkileşimle olmaktadır.

30 Buluş içerisinde bahsedilen “alkin grubuna sahip veya alkin grubuyla modifiye edilmiş terapötik ajan” ve/veya “ π - π etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunabilen terapötik ajan” buluşun tercih edilen bir uygulamasında bir antineoplastik ajan olabilir.

Burada bahsi geçen “antineoplastik ajan” ifadesi kanser hastalığı tedavisinde veya semptomlarının giderilmesinde veya semptomlarının hafifletilmesinde kullanılan ajanları ifade etmektedir.

- 5 Buluş kapsamında antineoplastik ajanlar nükleosit analogları, antifolatlar, diğer metabolitler, topoizomera I inhibitörleri, antrasiklinler, podofilotoksinler, taksanlar, vinka alkaloidleri, alkilleyici maddeler, platin bileşikler, antihormonlar, radyofarmasötikler, monoklonal antikorlar, tirozin kinaz inhibitörleri, rapamisinin memeli hedefi (mTOR) inhibitörleri, retinoidler, bağışıklık sistemini düzenleyici maddeler, histonedeasetilaz inhibitörleri ve diğer maddeleri kapsayan ancak bunlar 10 ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Nükleosit analogları azasitidin, kladribin, klofarabin, sitarabin, desitabin, floksuridin, fludarabin, floroürasil (5-FU), gemesitabin, merkaptopurin, nelarabin, pentostatin, tioguanin, trifluridin ve tipiracili kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

- 15 Antifolatlar metotreksat, pemetreksed, pralatreksed ve raltitreksedi kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Diğer metabolitler hidroksikarbamidi kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

- 20 Topoizomera I inhibitörleri irinotekan ve topotekanı kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Antrasiklinler daunorubisin, doksorubisin, epirubisin, idarubisin, mitoksantron ve valrubisini kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Podofilotoksinler etoposid ve teniposidi kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

- 25 Taksanlar cabazitaksel, dosetaksel ve paklitakseli kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Vinka alkaloidleri vinblastin, vincristin, vindesin, vinflunin ve vinorelbini kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Alkilleyici maddeler bendamustin, klorambusil, dakarbazin, melfalan, streptozotosin ve trabectedini kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

- 5 Antihormon bileşikler abirateron, bicalutamid, siproteron, degarelik, eksemestane, fulvestrant, goserelin, histrelin, leuprolide, mifepristone ve triptorelini kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Tirozin kinaz inhibitörleri afatinib, aksitinib, bosutinib, kobimetinib, crizotinib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, osimertinib, pazopanib, ruksolitinib, sunitinib ve vandetanibi kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

- 10 Rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) inhibitörleri everolimus ve temsirolimus'u kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Retinoidler alitretinoin, beksarotene, isotretinoin, tamibarotene ve tretinoini kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

- 15 Bağışıklık sistemini düzenleyici maddeler lenalidomid, pomalidomid ve talidomidi kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

Histon deasetilaz inhibitörleri belinostat, panobinostat, valproate ve vorinostatı kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

- 20 Diğer maddeler anagrelide, seritinib, dabrafenib, idelalisib, ibrutinib, palbosiklib, vemurafenib, bleomisin, bortezomib, daktinomisin, eribulin, estramustine, iksabepilone, mitomisin, prokarbazin, alektinib, fluksimesteron, iobenguane, imiguimod, interferon, iksazomib, lanreotid, lentinan, octreotid, omacetaksine, tegafur, gimerazil, oterasil, urasil, kombrestatin ve klorokini kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

- 25 Bu tarifname içerisinde verilen uygulamalar göz önüne alındığında buluş; yüzeyi poli [(poli (etilen glikol) metakrilat)-ko-(metil metakrilat)-ko-(1-pirenmetakrilat)-ko-(3-azido propil metakrilat)-aşı-poli[(hekzil metakrilat)-ko-(dimetilaminoetil metakrilat)-ko-(trimetilaminoetil metakrilat)] (PAMP-aşı-PHDT) polimeriyle kaplı grafen oksitten oluşan bir ilaç-nanotaşıyıcı konjugatına ilişkin olup, özelliği; azid grubuna sahip bir terapötik ajan ve/veya hedefleyici ajanla kovalent olarak ve/veya π - π

etkileşimiyle (nonkovalent olarak) rGO yüzeyine tutunabilen bir terapötik ajan ve/veya hedefleyici ajanla nonkovalent olarak fonksiyonelleştirilmiş olmasıdır.

Buluşun bir diğer unsuru buluşa uygun rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş terapötik ajan tercihen antineoplastik ajanları
5 ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarıdır.

Buluşa uygun ilaç-nanotaşıyıcı konjugatları, isteğe bağlı olarak nanotaşıyıcı üzerine kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş bir hedefleyici molekül de içerebilir.

Buluş bir diğer açıdan buluşa uygun rGO temelli nanotaşıyıcı hazırlanmasında ara
10 ürün olarak kullanım için formül I ile gösterilen polimerlere ilişkindir.

Buluş aynı zamanda kanser hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanım için buluşa uygun rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş antineoplastik ajanları ve isteğe bağlı olarak hedefleyici ajanları içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarına ilişkindir.

15 Burada kullanılan şekliyle, "tedavi" ya da "tedavi etme" ifadeleri bir rahatsızlık tarafından tehdit edilen ya da bir rahatsızlığa sahip bir denekte patolojik bir rahatsızlığı karakterize eden en az bir semptomun engellenmesini, azaltılmasını, hafifletilmesini, iyileştirilmesini ya da bloke edilmesini ifade etmektedir. Farklı kanser türlerine ilişkin sınırlayıcı olmayan bir liste aşağıda verilmektedir:

20 karsinomlar, katı dokuların karsinomları, skuamöz hücreli karsinomlar, adenokarsinomlar, sakromlar, gliyomlar, yüksek dereceli gliyomlar, blastomlar, nöroblastomlar, plazmasitomlar, histiositomlar, melanomlar, adenomlar, hipoksik tümörler, miyelomlar, metastatik kanserler ya da genel anlamda kanserler. Burada açıklanan bileşiklerin tedavisinde kullanılabileceği spesifik kanser örnekleri arasında

25 ise B hücreli lenfoma, T hücreli lenfoma, mikozis fungoides, Hodgkin Hastalığı, mesane kanseri, beyin kanseri, sinir sistemi kanseri, baş ve boyun kanseri, baş ve boynun skuamöz hücreli karsinomları, böbrek kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri benzeri akciğer kanserleri, nöroblastom/gliyoblastom, yumurtalık kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, deri

30 kanseri, karaciğer kanseri, melanom, ağzın, boğazın, yemek borusunun skuamöz hücreli karsinomu, kolon kanseri, rahim ağzı kanseri, rahim ağzı karsinomu, göğüs kanseri ve epitelyal kanser, böbrek kanseri, genitoüriner kanser, pulmoner kanser,

yemek borusu karsinomu, baş ve boyun karsinomu, kalın bağırsak kanseri, hemotopietik kanserler; testis kanseri; kolon ve Rektal kanserler, prostat kanseri ya da pankreas kanseri sayılabilir.

5 Buluş konusu rGO temelli ilaç-nanotaşıyıcı konjugatları ayrıca servikal ve anal displazileri, diğer displaziler, ağır displaziler, hiperplazi, tipik olmayan hiperplazi ve neoplazi benzeri kanser öncesi rahatsızlıkların tedavisi için de kullanılabilir.

Burada kullanılan şekliyle "kanser" ve "kanserli" ifadeleri kötü huylu tümörlere işaret etmektedir ya da kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen fizyolojik durumu açıklamaktadır.

10 Buluş bir diğer açıdan rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş antineoplastik ajanları içeren ve isteğe bağlı olarak hedefleyici ajan içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarını içeren farmasötik bileşimlere ilişkindir.

Buluş konusu rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş antineoplastik ajanları içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarını içeren 15 farmasötik bileşim bu bileşimin bir hastaya uygulanması açısından tercih edilen yöntemeye dayalı olarak herhangi bir uygun formda olabilir. Herhangi bir durumda uygulama açısından en uygun yol bu buluşun konusu rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş antineoplastik ajanları içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarında bulunan belirli antineoplastik ajana, hastalığın mizacına 20 ve ciddiyetine ve deneğin fiziksel durumuna dayalı olacaktır.

Buluş konusu rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş antineoplastik ajanları içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatları; antineoplastik ajanlar ya da bağışıklık sistemi düzenleyici ajanlar, antivirüsler, antimikrobiyaller, ya da anestetik maddelerden ya da bunların ikili, üçlü 25 kombinasyonlarından seçilen ikinci bir etken madde ile birlikte, örneğin eşzamanlı olarak, sıralı olarak ya da ayrı olarak da uygulanabilir.

Bahsi geçen ikinci etken madde buluş konusu rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş antineoplastik ajanları içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarında mevcut olan maddeden farklı olması kaydıyla bu 30 tarifname içerisinde listelenen antineoplastik ajanlar arasından seçilebilir.

Bu tarifname bağlamında içerir ifadesinin kapsar ifadesini belirtmesi amaçlanmıştır.

Teknik açıdan uygun olan yerlerde, buluşun uygulamaları birleştirilebilir.

Uygulamalar burada belirli özellikler/elemanlar içerecek şekilde açıklanmıştır.

Açıklama ayrıca esas olarak bahsi geçen özellikleri/elemanları içeren ya da bunlardan

5 meydana gelen diğer uygulamaları da kapsamaktadır.

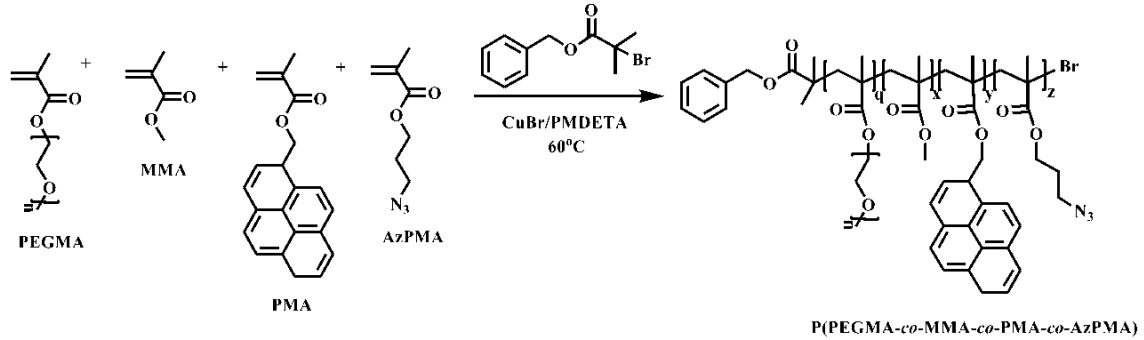
Patentler ve başvurular benzeri teknik referanslar referans yolu ile bu dokümana dahil edilmiştir.

Burada spesifik olarak ve açıkça anlatılan uygulamalar tek başına ya da bir veya birkaç diğer uygulama ile birlikte bir feragatnameye esas teşkil edebilir.

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

ÖRNEKLER

Örnek 1: Poli [poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*-(metil metakrilat)-*ko*-(1-piren metakrilat)-*ko*-(3-azido propil metakrilat) Graft Kopolimer (P(PEGMA-*ko*-AzPMA-*ko*- MMA-*ko*-PMA)); PAMP Sentezi

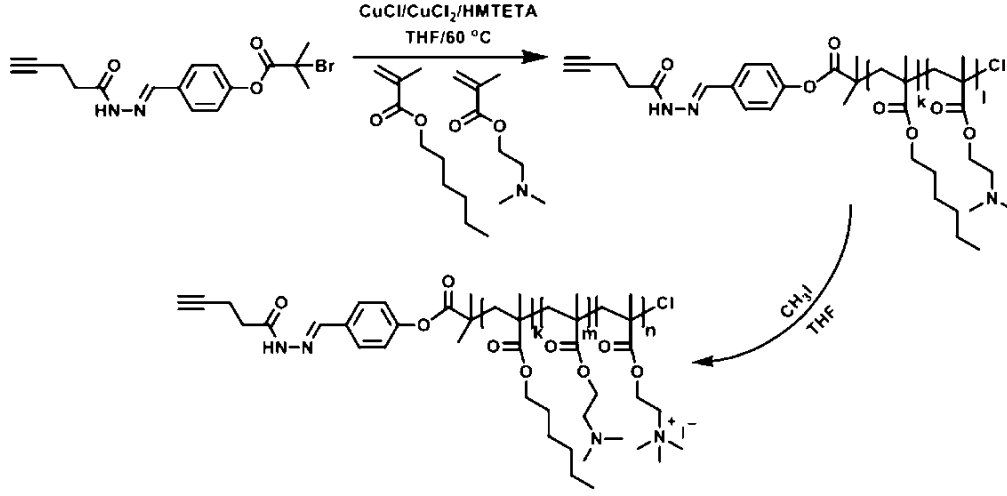


Kısaca, farklı ağırlık oranlarına sahip PEGMA (500 veya 2000 g / mol) MMA, AzPMA ve PMA ve çözücü olarak toluen, 10 mL cam reaktöre eklendi, ardından ligand PMDETA ve katalizör Cu(I)Br eklendi. Son olarak, benzil fonksiyonlu ATRP başlatıcısının eklenmesiyle, reaksiyon karışımı, reaktörü atmosferden atıl hale getirmek için sıvı nitrojen içinde hemen donduruldu. 3 döngü FPT'den (dondur-pompala-çözdür) sonra, reaksiyon karışımı 60 °C'de 3 saat bir yağ banyosuna konuldu. Katalizörlerin bazik alüminyum oksit'le uzaklaştırılmasından sonra, THF

20

25 içindeki konsantre reaksiyon karışımı soğuk dietil eter ile çöktildi.

Örnek 2: P(HMA-*ko*-DMAEMA) ve P(HMA-*ko*-DMAEMA-*ko*-TMAEMA) Sentezi



- Alkin-hidrazon fonksiyonlu ATRP başlatıcısı ile P(HMA-*ko*-DMAEMA) kopolimerlerinin genel sentezi reaktanların iki ayrı cam reaktörde hazırlanması ve
- 5 sonra birleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, reaktanların tek reaktörde birleştirilmesiyle de aynı reaksiyon gerçekleştirilebilir. Birinci reaktöre sırası ile hekzil metakrilat (HMA), 2-(dimetilamino)etil metakrilat (DMAEMA), bakır (II) klorür (CuCl₂) ve bakır (I) klorür (CuCl) eklenerek THF içerisinde çözülmüştür. İkinci cam reaktörde ise 1,1,4,7,10,10-hekzametiltrietilenetetramin (HMTETA) ve
- 10 başlatıcı THF içerisinde çözülmüş ve bu iki reaktör sıvı azot içerisinde dondurularak 3 FPT (dondur, vakumla, erit) döngüsünden sonra azot altında başlatıcı içeren reaktördeki çözelti birinci reaktöre cam şırınga ile aktarılmış ve polimerleşme 60 °C'de önceden belirlenen süreler boyunca gerçekleştirilmiştir. Belirlenen sürenin sonunda reaktör yağ banyosundan alınarak soğutulmuş, bazik alümina üzerinden
- 15 geçirilip bakır süzölmüştür. Dönel buharlaştırıcıda çözücüsü uçurulan reaksiyon karışımı soğuk hekzanda çöktürölmüştür.

- Elde edilen polimerde bulunan DMAEMA tekrar eden ünitelerinin yarısı kuaternize edilmek üzere hedeflenmiştir. Azot atmosferi altında THF içerisinde çözülen polimer üzerine metil iyodür eklenmiş, oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmıştır. Ertesi
- 20 gün reaksiyon karışımında bulunan THF dönel buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmış, kalan reaksiyon karışımı su içerisinde çözölüp 1 kDa gözenek genişliğine sahip diyaliz torbalarına aktarılıp suya karşı diyaliz edilmiştir. İki gün süre ile diyaliz edilen P(HMA-*ko*-DMAEMA-*ko*-TMAEMA) (PHDT) liyofilizatörde kurutulularak elde edilmiştir. Alternatif olarak reaksiyon sonunda, reaksiyon karışımının soğuk hekzan

içerisinde çöktürülmesiyle P(HMA-*ko*-DMAEMA-*ko*-TMAEMA) (PHDT) polimeri elde edilebilir.

Örnek 3: P(PEGMA-*ko*-AzPMA-*ko*-MMA-*ko*-PMA) polimerine P(HMA-*ko*-DMAEMA-*ko*-TMAEMA) polimerinin aşılınması ve PAMP-aşı-PHDT polimerinin elde edilmesi

PAMP kopolimeri üzerindeki 3 adet azit grubunun hedeflendiği reaksiyonda, PAMP ve PHDT kopolimerlerin sırası ile PBS içerisinde cam bir reaktörde çözülmesinin ardından üzerlerine bakır (II) sülfat (1,5 eq) eklenmiş, sodyum askorbatın (4,5 eq) ilavesi sonrasında sıvı azot ile dondurulan reaksiyon karışımı 3 FPT çevirimi sonrasında gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılmaya bırakılmıştır. Ertesi sabah reaksiyona girmemiş azit gruplarının kapatılması maksadı ile azot altında proparjil alkol eklenmiş ve yaklaşık 5 saatin ardından isteğe bağlı olarak katyonik kopolimerin aşılandığı PAMP kopolimeri 3,5 kDa gözenek genişliğine sahip diyaliz torbasına aktarılıp saf suya karşı 3 gün diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası elde edilen aşı kopolimeri liyofilizatörde kurutulmuştur. Elde edilen aşı kopolimerinin ¹H NMR sonucuna bakıldığında iki kopolimerden gelen sinyaller açıkça görülmektedir. Bu sinyaller arasında 5,71 ppm'de bulunan piren grubunun metilen sinyali, 2,56 ppm'de bulunan dimetilamino grubuna komşu metilen ve 2,27 ppm'deki metil protonları arasındaki oran kullanılarak ortalama 4,62 P(HMA-*ko*-DMAEMA-*ko*-TMAEMA) bağlandığı tespit edilmiştir.

Örnek 4: Grafen Oksit Üzerine PAMP-aşı-PHDT Kaplaması ve Grafen Oksitin İn situ İndirgenmesi; PAMP-aşı-PHDT-rGO

Elde edilen PEG ve π bağları içeren piren içeren PAMP-aşı-PHDT aşı kopolimerleri ile grafen plakaların kaplanması ve aynı zamanda kaplama sırasında indirgenerek indirgenmiş grafen oksite dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Demirel ve arkadaşları tarafından yayınlanan makalede bu adımın optimizasyonundan ayrıntılı olarak bahsedilmektedir. Kısaca grafen oksit (GO) solüsyonu (4 mg/mL), indirgeyici ajan hidrazin ile GO/kopolimer: 1/10 (g/g) kaplama oranı ile elde edildi. Çözücü sistemi H₂O: DMF / 2:1 (mL / mL) olarak düzenlendi. Başlangıçta, reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra 1 mg GO için 1 μ L hidrazin hidrat ilavesinden sonra reaksiyon 80 °C'de 20 saat süreyle devam ettirildi. Kaplamasız kopolimer, DMF ve hidrazini kaplamadan sonra uzaklaştırmak için saflaştırma

aşamalarını takiben, plakalar dağıtıldı ve su ve ardından kopolimer için iyi çözücüler olan aseton içinde birkaç kez yıkandı. Reaksiyon karışımı 14,000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi, süpernatant boşaltıldı. PEG fonksiyonel kopolimer kaplı grafen plakalar olarak PEG fonksiyonel kopolimer ve kopolimer üzerindeki piren grubu ile santrifüjlenmiş çökelti arasındaki GO yüzey π - π etkileşimi elde edildi. Halihazırda araştırılmış olan kopolimer ve rGO'nun termal davranışı kullanılarak, rGO plakalarındaki kopolimer kaplama veriminin% 'si hesaplanmıştır.

Örnek 5: PAMP-aşı-PHDT Kaplamalı rGO Nanoplatformlarına İlaç Yüklenmesi; PAMP-aşı-PHDT-rGO-Dox

- 10 Doksorubisin-HCl, PAMP-aşı-PHDT-rGO yüzeyine π - π istifleme yoluyla yüklendi. Terapötik yükleme, 10 mg PAMP-aşı-PHDT-rGO nanotaşıyıcılara 10 mg Dox eklenerek uygulandı. PAMP-aşı-PHDT-rGO ve doksorubisin 10 mL, içerisinde hacimce %10 DMSO olan pH 8 değerine sahip PBS çözeltisi içinde ultrasonikasyonla dağıtıldı ve 35 °C'de karanlıkta gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon karışımı, 14,000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüjlendi, süpernatant boşaltıldı ve yüklenmiş ilaç miktarının tayini için toplandı. PAMP-aşı-PHDT-rGO-Dox bileşimi, bağlanmayan ilaçtan kurtulmak için pH 8 PBS çözeltisi ile 3 kez ve PBS'ten gelen iyonlardan kurtulmak için saf su ile 3 kez yeniden dağıtıldı ve ardından santrifüj edildi. Daha sonra PAMP-aşı-PHDT-rGO-Dox saf su içinde dağıtılıp, sıvı zaot ile dondurulup çözelti gece boyunca liyofilize edildi.

Yukarıdaki örneklerde PAMP-aşı-PHDT-rGO-Dox ilaç-nanotaşıyıcı konjugatını elde etmek için; rGO yüzeyi öncelikle PAMP-aşı-PHDT polimeri ile modifiye edilmiş ve sonrasında bir ilaç molekülü olan doksorubisin π - π istifleme yoluyla yüklenmiştir.

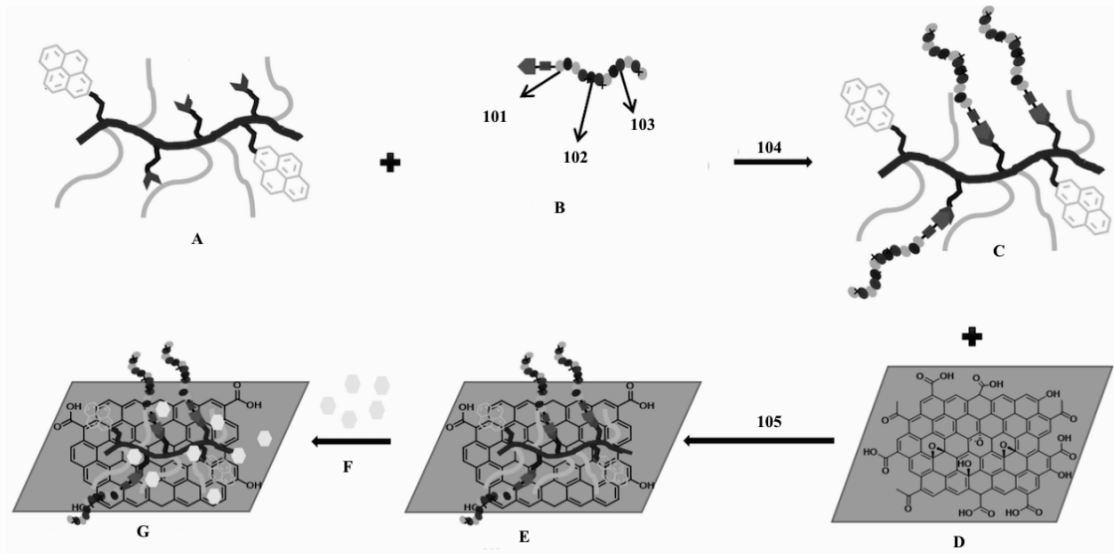
- 25 Aynı ürünü elde etmek için bir diğer yöntem öncelikle grafen oksit yüzeyinin PAMP polimeri ile modifiye edilirken GO'nun rGO'ya in-situ indirgenmesi, sonrasında PHDT aşı polimerinin click reaksiyonu ile rGO üzerine kaplı PAMP polimerine aşılması ve bu şekilde elde edilen PAMP-rGO-PHDT nanotaşıyıcısı üzerine doksorubisinin π - π istifleme yoluyla yüklenmesiyle PAMP-rGO-PHDT-Doksorubisin ilaç-nanotaşıyıcı konjugatının elde edilmesi adımlarını içerir.

- 30 Örnek 6: Nanotaşıyıcının Antikanser etkisi

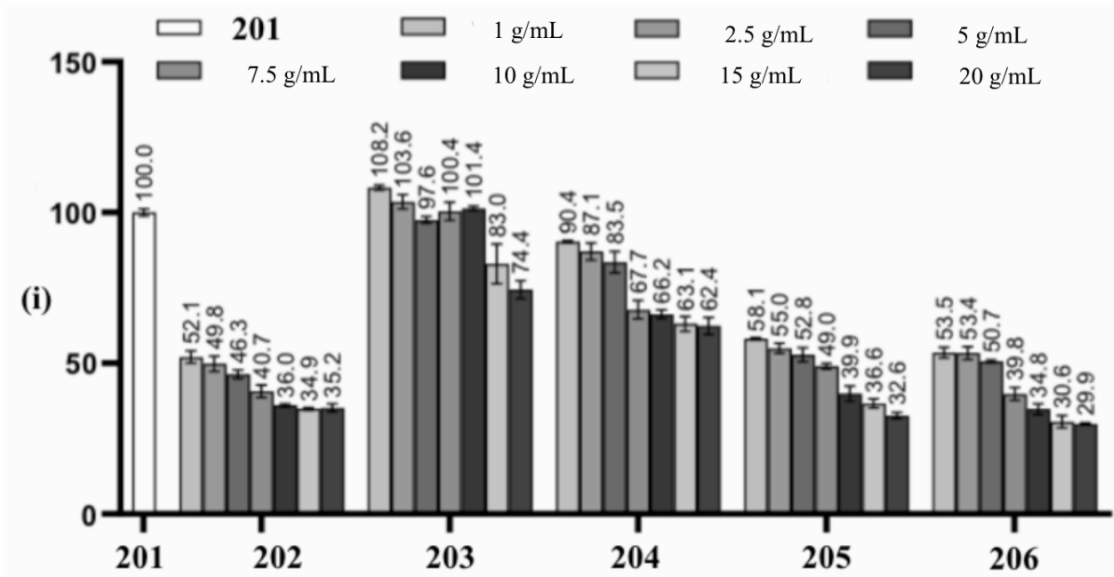
Hücre canlılığının tespit edilmesi maksadı ile tabanı şeffaf, duvarları siyah 96 kuyulu plaka poli-L-lizin ile kaplanıp her bir kuyuya 10.000 hücre ekilmiş ve gece boyunca

inkübe edilmiştir. Kuyu tabanına tutunan hücrelerin üzerinden besi yeri çekilip PBS ile yıkanmış ve besi yeri içindeki farklı konsantrasyonlarda nanopartikül çözeltileri eklenmiştir. Belirlenen sürenin (24 ya da 48 saat) dolması ardından hücreler tekrar PBS ile yıkanmış ve %5 resazurin çözeltisi içeren besi yeri hücreler üzerine eklenip 2
5 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında her bir kuyu 550 nm’de uyarılıp 590 nm’de floresans şiddetleri plaka tabanından okuma alınarak kaydedilmiş, elde edilen değerler pozitif kontrole kıyaslanarak hücre canlılığı tespit edilmiştir.

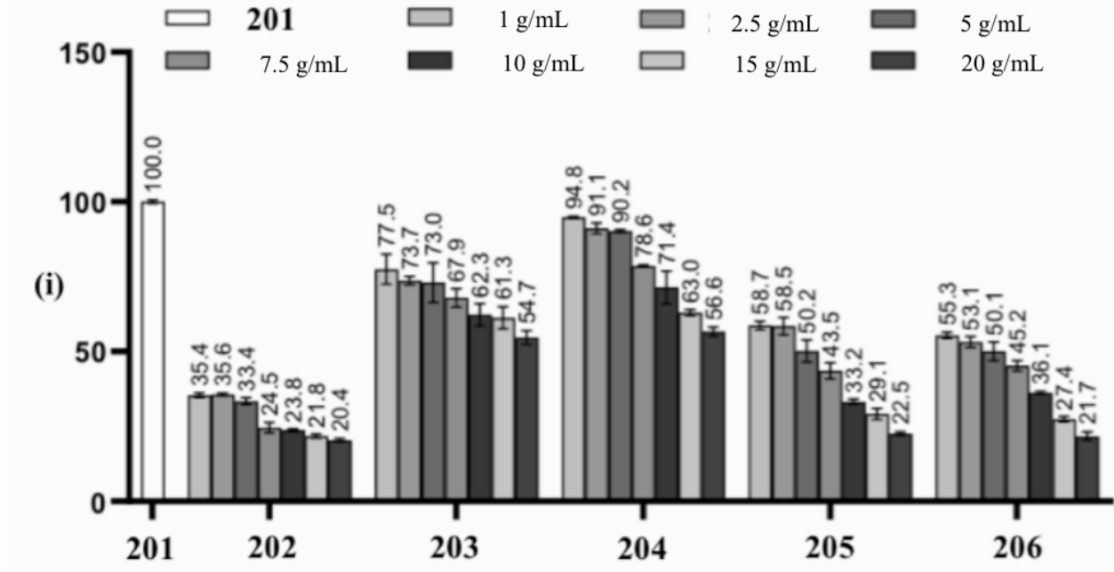
MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan hücre canlılığı deneylerinde artan konsantrasyon ile beraber hücre canlılığında azalma tespit edilmiş, 24 saat boyunca nanopartiküller
10 ile muamele edilip en yüksek hücre ölümüne hedefli, anti-kanser ilaç ve siRNA yüklü (PAMP)PEG2000-aşı-PHDT-rGO-EPPT1-Doksorubisin-siRNA (206) sebep olurken (PAMP)PEG2000-aşı-PHDT-rGO-siRNA(203) kompozisyonu kayda değer bir toksisteye sebep olmamıştır (Şekil 2). Öte yandan nanopartikül muamele süresinin 48 saate çıkarılması ardından (PAMP)PEG2000-aşı-PHDT-rGO-EPPT1 (204)
15 kompozisyonu hedefleme ajanı taşımayan (PAMP)PEG2000-aşı-PHDT-rGO-siRNA (203) kompozisyonu ile kıyaslandığında EPPT1’in biyoyumluluk katkısı ile hedeflenmemiş muadilinden daha biyoyumlu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 1



Şekil 2



Şekil 3