

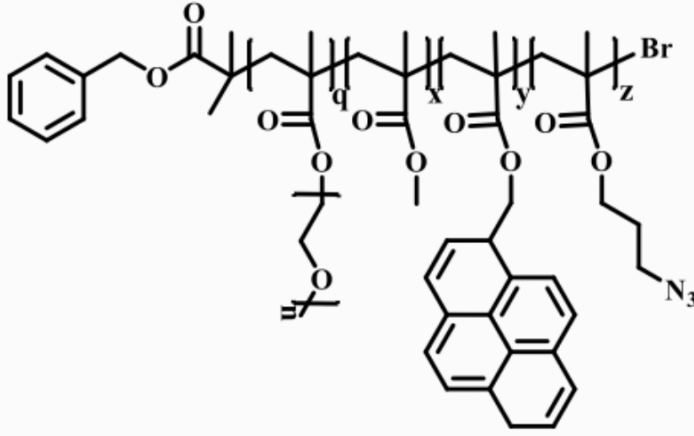
## ÖZET

### 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 hazırlanmasında kullanılan yöntemlere ilişkindir.

## İSTEMLER

1. Fonksiyonlanabilir rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği indirgenmiş grafen oksit'in (rGO) yüzeyinin poli [poli (etilen glikol metakrilat)-*ko*- (metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azido propil metakrilat)] (PAMP) kopolimeriyle kaplanmış olmasıdır.
2. İstem 1'e göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı 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)] (PAMP) kopolimeri ile kaplanmış olmasıdır ki burada; n, q, x, y ve z birbirinden bağımsız olarak 1 ile 250 arasında bir doğal sayıdır.



Formül I

3. İstem 1 veya 2'ye göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği n; 1-250 arasında bir doğal sayıdır, q, x, y ve z birbirinden bağımsız olarak 1 ile 50 arasında bir doğal sayıdır.
4. İstem 1-3'ten herhangi birine göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği alkin grubuna sahip herhangi bir molekülle fonksiyonelleştirilmesidir.
5. İstem 4'e göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği alkin grubuna sahip veya alkin grubuyla modifiye edilmiş hedefleyici ajanlar veya terapötik ajanlarla fonksiyonelleştirilir. 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 ,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajanla fonksiyonelleştirilmesidir.

7. İstem 6'ya göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı olup özelliği rGO yüzeyine  $\pi$ - $\pi$  etkileşimiyle tutunabilen ajanın terapötik ajan, tercihen bir antineoplastik, özellikle tercihen doksorubisin olmasıdır.
- 5 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 antikolar, tirozin kinaz inhibitörleri, rapamisinin memeli hedefi (mTOR) inhibitörleri, retinoidler, bağışıklık sistemini düzenleyici maddeler, 10 histonedeasetilaz inhibitörleri ve diğer maddeleri kapsayan ancak bunlar ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilmesidir.
9. İstem 1-8'den herhangi birine göre rGO temelli bir nanotaşıyıcı ve bu nanotaşıyıcıya kovalent veya  $\pi$ - $\pi$  etkileşimiyle nonkovalent olarak konjuge olmuş terapötik ajan, tercihen antineoplastik ajan ve/veya hedefleyici molekül içeren 15 ilaç-nanotaşıyıcı konjugatları.
10. Kanser hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanım için İstem 9'a göre ilaç-nanotaşıyıcı konjugatları.
11. İstem 9'a göre ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarını içeren farmasötik bileşimler.

## 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  
5 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 material 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. GO'e kıyasla daha düzgün arı peteği yapısına sahip rGO grafene özgü özellikleri daha iyi sergilediğinden biyolojik uygulamalarda kullanım için cazip bir ajan haline  
20 gelmektedir. Ancak, düşük suda çözünürlüğe sahip olması ve biyoyumluluğunun düşük olması kullanımını sınırlandırmaktadır.

Tekniğin bilinen durumunda rGO'nun çözünürlük ve biyoyumluluk 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 kovalent yolla 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, ve yüzeyden daha hızlı salınmasına olanak sağlayan fonksiyonlanabilir bir nanotaşıyıcı geliştirmeyi amaçlamaktadır.

### **Şekillerin Detaylı Açıklaması**

Şekil 1: Grafen oksit üzerine in-situ PAMP polimeri kaplama ve rGO'ya indirgenmeyi gösteren şema. Burada a) oda sıcaklığında 2 saat karıştırılma sonrası ve sonrasında Hidrazin hidrat ve PAMP polimerinin eklenmesi ile 80 C'de 22 saat karıştırıldığını göstermektedir.

Şekil 2: PAMP polimeriyle kaplı ve yüzeyine EPPT1 peptidinin “click” yoluyla bağlandığı nanotaşıyıcının üzerine nonkovalent şekilde, fiziksel etkileşimle doksorubisin bağlanmasıyla ilaç-nanotaşıyıcı konjugatının elde edilmesi gösterilmektedir. Burada bu bağlanma işlemi pH değeri 8 olan PBS içerisinde'de %10 DMSO ile 35°C'de yapılır.

### **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-azido propil metakrilat)] (PAMP) kopolimeriyle kaplanmış olmasıdır.

Buluşa uygun PAMP polimerinin yapısında bulunan piren grupları, polimerin  $\pi$ - $\pi$  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. Ayrıca, buluş sahipleri beklenmeyen bir şekilde polimer üzerinde yer alan azid gruplarının ilaç salınımını hızlandırdığını tespit etmişlerdir.

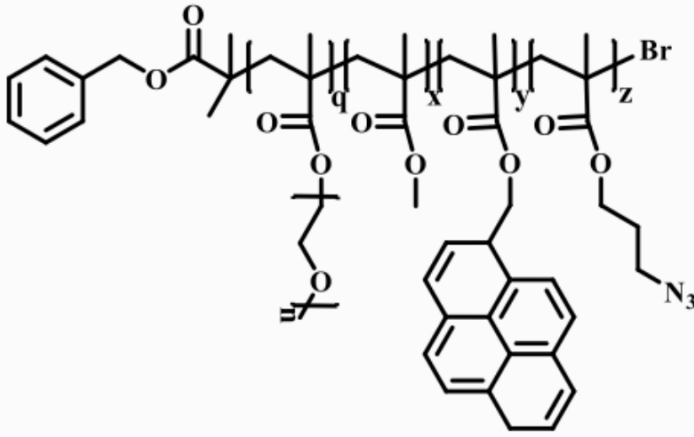
Buluş kapsamında kullanılan indirgenmiş grafen oksit ve rGO ifadeleri birbiriyle eşdeğer olup, birbiri yerine kullanılabilir.

Buluş kapsamında kullanılan “buluşa uygun rGO temelli nanotaşıyıcı” ifadesi yüzeyinin poli [poli(etilen glikol metakrilat)-*ko*-(metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azido propil metakrilat)] (PAMP) kopolimeriyle kaplanmış rGO'yu ifade etmektedir.

Burada bahsedilen “PAMP polimeri ile kaplama” ifadesi PAMP polimerinin rGO yüzeyiyle nonkovalent bağ ile bağlanmasını ve/veya  $\pi$ - $\pi$  etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunmasını ifade etmektedir.

Buluş kapsamında kullanılan “PAMP” ifadesi ile “poli [poli(etilen glikol metakrilat)-  
5 *ko*- (metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azido propil metakrilat)]” ifadesi birbirini ile eş anlamlı olup, birbirini 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  
10 [poli(etilen glikol metakrilat)-*ko*- (metil metakrilat)-*ko*-(1-pirenmetakrilat)-*ko*-(3-azido propil metakrilat)] (PAMP) kopolimeri ile kaplanmış olmasıdır ki burada; n, q, x, y ve z birbirinden bağımsız olarak 1 ile 250 arasında bir doğal sayıdır.



Formül I

15 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında n; 1-250 arasında bir doğal sayıdır, q, x, y ve z birbirinden bağımsız olarak 1 ile 50 arasında bir doğal sayıdır.

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

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

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.

Buluşun bir diğer uygulamasında buluşa uygun rGO temelli bir nanotaşıyıcı,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajanla modifiye edilebilir. Burada bahsi geçen  $\pi$ - $\pi$  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.

Buluş içerisinde bahsedilen “alkin grubuna sahip veya alkin grubuyla modifiye edilmiş 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.

Buluş kapsamında antineoplastik ajanlar nükleosit analogları, antifolatlar, diğer metabolitler, topoizomerez 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 ile sınırlı olmayan bir gruptan seçilebilir.

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

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.

Topoizomeras 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.

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

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

- 10 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.

- 15 Anti-hormon 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.

- 20 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.

- 25 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.



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.

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)] (PAMP) polimeriyle kaplı grafen oksit'ten oluşan bir ilaç-nanotaşıyıcı konjugatına ilişkin olup, özelliği; alkin grubuna sahip bir hedefleyici ajan ve/veya terapötik ajanla kovalent olarak fonksiyonelleştirilmiş olmasıdır.

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)] (PAMP) polimeriyle kaplı grafen oksit'ten oluşan bir ilaç-nanotaşıyıcı konjugatına ilişkin olup, özelliği; alkin grubuna sahip bir hedefleyici ajan ve/veya terapötik ajanla kovalent olarak ve  $\pi$  - $\pi$  etkileşimiyle rGO yüzeyine tutunabilen bir ajan, tercihen bir terapötik 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 içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarıdır.

Buluşa uygun ilaç-nanotaşıyıcı konjugatları, 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 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/veya hedefleyici ajanları içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarına 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.

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: 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 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 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.

Buluş konusu formül I ve formül II ile gösterilen hibrit karbon nanotüpler (h-CNT) 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.

Buluş bir diğer açıdan rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş antineoplastik ajanları içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarını içeren farmasötik bileşimlere ilişkindir.

5 Buluş konusu rGO temelli nanotaşıyıcı ile kovalent veya non-kovalent şekilde konjuge olmuş antineoplastik ajanları içeren ilaç-nanotaşıyıcı konjugatlarını içeren 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-  
10 nanotaşıyıcı konjugatlarında bulunan belirli antineoplastik ajana, hastalığın mizacına 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,  
15 antimikrobiyaller, ya da anestetik maddelerden ya da bunların ikili, üçlü 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-  
20 nanotaşıyıcı konjugatlarında mevcut olan maddeden farklı olması kaydıyla bu 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.  
25 Açıklama ayrıca esas olarak bahsi geçen özellikleri/elemanları içeren ya da bunlardan meydana gelen diğer uygulamaları da kapsamaktadır.

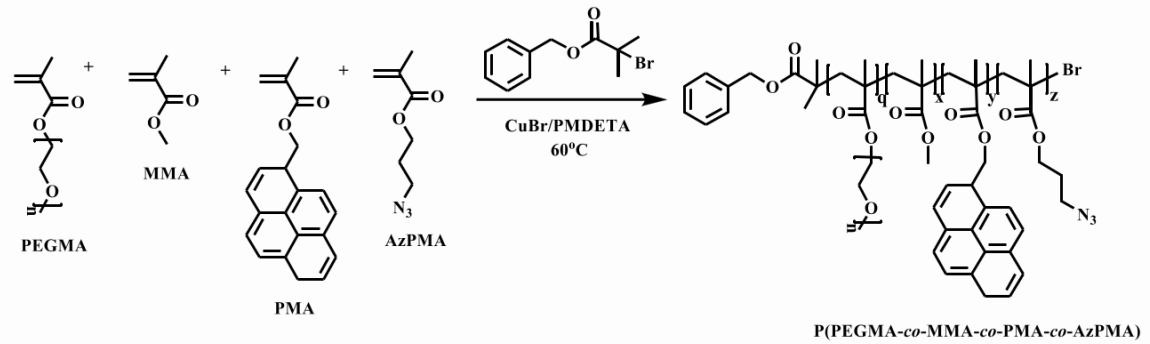
Patentler ve başvurular benzeri teknik referanslar referans yolu ile bu dokümana dahil edilmiştir.

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

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

## ÖRNEKLER

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



- 10 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 başlatıcının eklenmesiyle, reaksiyon karışımı, reaktörü atmosferden atıl hale getirmek için sıvı nitrojen içinde hemen donduruldu. 3 döngü FPT'den (dondur-pompala-
- 15 çözdür) sonra, reaksiyon karışımı 60 °C'de 3 saat bir yağ banyosuna konuldu. Katalizörlerin bazik alüminyum oksit'le uzaklaştırılmasından sonra, THF içindeki konsantre reaksiyon karışımı soğuk dietil eter ile çökteldi.

### Örnek 2: İndirgenmiş Grafen Oksit Üzerine PAMP Kaplaması ve Grafen Oksitin İn situ İndirgenmesi; PAMP-rGO

- 20 Elde edilen PEG ve  $\pi$  bağları içeren piren içeren PAMP kopolimerleri ile grafen plakaların kaplanması ve aynı zamanda kaplama sırasında indirgenerek indirgenmiş grafen oksite dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Demirel ve ark tarafından yayınlanan makalede bu adımın optimizasyonundan ayrıntılı olarak bahsedilmektedir. Kısaca grafen oksit (GO) solüsyonu (4 mg/mL), indirgeyici ajan hidrazin ile GO/kopolimer:
- 25 1/10 (g/g) kaplama oranı ile elde edildi. Çözücü sistemi H<sub>2</sub>O: DMF / 2:1 (mL / mL) olarak düzenlendi. Başlangıçta, reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra 1 mg GO için 1  $\mu$ 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  $\pi$ - $\pi$  etkileşimi elde edildi (Şekil 1). Halihazırda araştırılmış olan kopolimer ve rGO'nun termal davranışı kullanılarak, rGO plakalarındaki kopolimer kaplama veriminin% 'si hesaplanmıştır.

### 10 **Örnek 3: EPPT1 Hedeflemeli, PAMP Kaplamalı Nanotaşıyıcı platformunun Bakır Katalizli Azid-Alkin Click Reaksiyonu ile Hazırlanması; PAMP-rGO-EPPT1**

Alkin-PEG-EPPT1 polimeri, pH: 8'de PBS içinde  $\text{CuSO}_4$  / Sodyum askorbat katalizör sistemi kullanılarak PAMP kaplı rGO (PAMP-rGO) yüzeyinde yer alan azit fonksiyonel grubuna konjuge edildi. 8 mg  $(\text{P}_{15}\text{A}_{10}\text{MP})_{2000}$ -rGO, 7 ml pH: 8 PBS içerisinde dağıtılmıştır. İlk olarak  $1.178 \times 10^{-7}$  mol  $\text{CuSO}_4$  katalizörü ve  $2.36 \times 10^{-7}$  mol sodyum askorbat eklendi. Ardından, CuAAC'den en iyi verimi elde etmek için reaktöre 3 kez donma-pompa-çözme (FPT) uygulandı. Bundan sonra reaktör bir gece boyunca 35 °C'ye kondu.  $(\text{P}_{15}\text{A}_{10}\text{MP})_{2000}$ -rGO-EPPT1 bileşimi, pH: 8 PBS çözeltisi içerisinde 3 kez yeniden dağıtıldı ve bağlanmayan PAMP-rGO'yu çıkarmak için santrifüjlendi ve bağlanmamış Alkyne-PEG-EPPT1, reaksiyon karışımından ayrıldı. PBS tuzlarından gelen fazla iyonlardan kurtulmak için, yaklaşık pH: 8 deiyonize su ile iki kez yıkandıktan sonra peptid yüklü parçacıklar, sıvı nitrojen ile kıvamlandırıldı ve bir liyofilizatörde gece boyunca kurutuldu.

### 25 **Örnek 4: EPPT1 Hedefli PAMP Kaplamalı rGO Nanoplatformlarına İlaç Yükleneşi; PAMP-rGO-EPPT1-Dox**

Doksorubisin-HCl, PAMP-rGO-EPPT1 yüzeyine  $\pi$ -  $\pi$  istifleme yoluyla yüklendi, H-bağlanması ve elektrostatik etkileşimler,% 95'e varan olağanüstü yüksek yükleme verimliliği ile ulaştı. Terapötik yükleme, 10 mg PAMP-rGO-EPPT1 hedefli nanotaşıyıcılara 10 mg Dox eklenerek uygulandı, içerisinde 10 mL %10 DMSO olan pH: 8 değerine sahip PBS çözeltisi içerisinde ultrasonikasyonla dağıtıldı ve gece boyunca 35 °C'de karanlıkta karıştırıldı. Reaksiyon karışımı, 14,000 rpm'de 15 dakika

süreyle santrifüjlendi, süpernatant boşaltıldı ve yüklenmemiş ilaçları ölçmek için toplandı. PAMP-rGO-EPPT1-Dox bileşimi, iyonlardan kurtulmak için pH: 8 PBS çözeltisi ile 3 kez ve çift damıtılmış su ile 1 kez yeniden dağıtıldı ve ardından santrifüj edildi. Daha sonra PAMP-rGO-EPPT1-Dox solüsyonu gece boyunca dondurularak kurutuldu (Şekil 2).

Yukarıdaki örneklerde PAMP-rGO-EPPT1-Dox ilaç-nanotaşıyıcı konjugatını elde etmek için; rGO yüzeyi öncelikle PAMP polimeri ile modifiye edilmiş ve sonrasında polimer üzerinde azid grupları ile alkin grubuyla modifiye edilen EPPT1 peptidi click reaksiyonuna sokularak EPPT1'in rGO yüzeyine bağlanması sağlanmış ve sonrasında bir ilaç molekülü olan doksorubisin  $\pi$ -  $\pi$  istifleme yoluyla yüklendi.

Aynı ürünü elde etmek için bir diğer yöntem PAMP polimeri ile modifiye edilen rGO'nun yüzeyine önce olan doksorubisin  $\pi$ -  $\pi$  istifleme yoluyla yüklenmesi ve sonrasında Doksorubisin yüklü rGO'nun alkin grubuyla modifiye edilen EPPT1 peptidi ile click reaksiyonuna sokulmasıyla PAMP-rGO-Dox-EPPT1 ilaç-nanotaşıyıcı konjugatının elde edilmesi adımlarını içerir.

#### **Örnek 5: Nanotaşıyıcının Antikanser etkisi**

Nano taşıyıcıların sitotoksitesini ve biyoyumluluğunu belirlemek için, serbest Dox, PAMP-rGO-EPPT1, PMP-rGO-EPPT1 boş taşıyıcılar, PAMP/PMP-rGO-DOX hedefsiz ilaç taşıyıcıları ve hedeflenen PAMP/PMP-rGO-EPPT1-Dox ilaç taşıyıcıları, hücre canlılığını belirlemek amacıyla Resazurin Assay ile, MCF-7 kanser hücre hattı ile 24. ve 48. saatlerde değerlendirildi. PAMP polimeri yapısında azid grubu içeren monomerler içermesi yönüyle PMP polimerinden ayrılmaktadır.

Konsantrasyon ve zamana bağlı toksisite, taşıyıcılardaki Dox konsantrasyonu 2,5, 5, 7,5 ve 10  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  olmak üzere dört farklı konsantrasyona ayarlandığında hücre canlılıklarının azalmasıyla yansdı.

Dox ve Dox taşıyan farklı bileşimler ile 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra sonuçlar, PAMP<sub>2000</sub> kaplı türevlerin, MCF-7 meme kanseri hücre hattında bir konsantrasyon ve zamana bağlı hücre canlılığı profili gösterdiğini gösterdi.

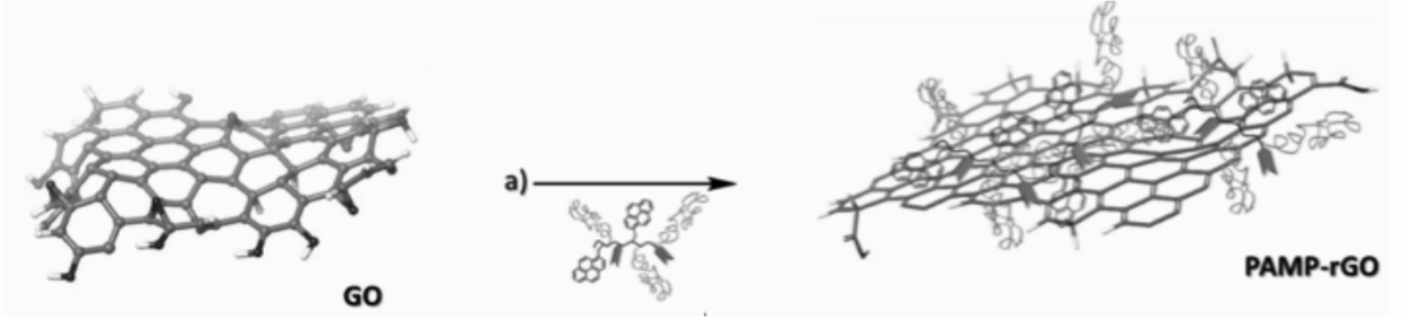
Boş taşıyıcılar ((P<sub>15</sub>A<sub>10</sub>MP)<sub>2000</sub>-rGO-EPPT1 ve (P<sub>15</sub>A<sub>10</sub>MP)<sub>2000</sub>-rGO-EPPT1) hücre canlılığında herhangi bir azalma göstermedi, aksine taşıyıcının biyoyumluluğunu gösteren hücre çoğalmasını gösterdiler.

Dox taşıyan hedeflenen ve hedeflenmeyen taşıyıcılardaki doz miktarı, 2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/µl gibi aynı miktara sahipti. Azit içeren hedeflenmemiş (P<sub>15</sub>A<sub>10</sub>MP)<sub>2000</sub>-rGO-Dox nanotaşıyıcıda azitten kaynaklı hızlandırılmış salım performansı görülmektedir. Bu salım davranışı azid içermeyen (P<sub>15</sub>A<sub>10</sub>MP)<sub>2000</sub>-rGO-Dox ilaç nanotaşıyıcı konjugatında görülmemektedir. Azid grubu içeren (P<sub>15</sub>A<sub>10</sub>MP)<sub>2000</sub>-rGO-Dox, tüm konsantrasyon değerleri için azid grupları içermeyen analogdan daha fazla kanser hücresi öldürmüştür. EPPT1 taşıyıcıya konjuge olduktan sonra, daha önce belirtildiği gibi salımı yavaşlatır. İlaç salım profili verilerinde gösterildiği gibi, EPPT1 hedefleyicili taşıyıcı, azidle veya azid olmadan, kanser hücrelerinin yaklaşık% 75'ini öldürmüştür.

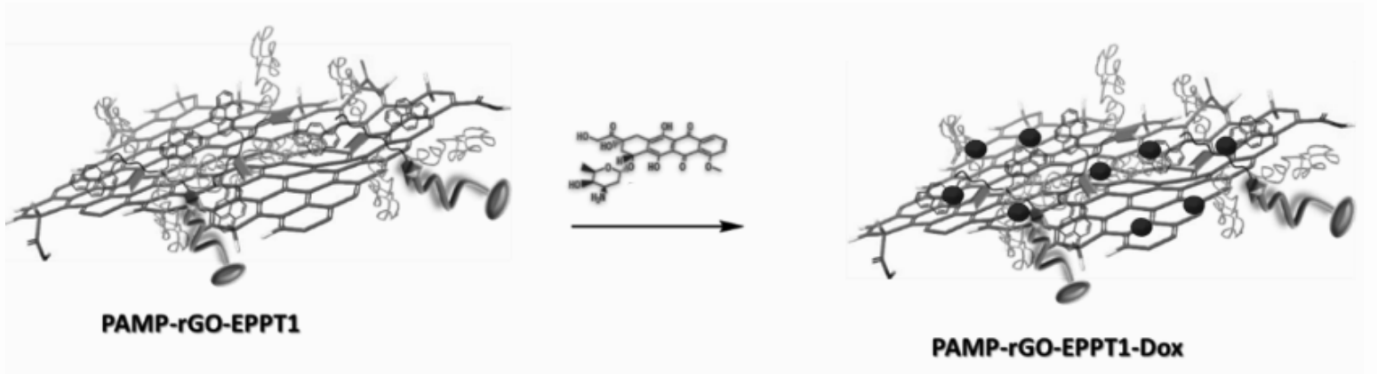
PEG500 içeren PAMP kopolimer bileşimleri suda etkili bir şekilde dağılamadığından, hücre canlılığındaki azalma PEG2000 içeren bileşimler kadar net ölçülemedi, ancak ilaç salım profili ile orantılı bir eğilim gözlemleyebildi.

Boş taşıyıcı, herhangi bir bileşimde önemli sitotoksosite yaratmadı.

(P<sub>26</sub>A<sub>10</sub>MP)<sub>500</sub>-rGO-Dox, aynı zaman çerçevesi, özellikle 48 saatlik inkübasyondan sonra, içinde azid grubu içermeyen (P<sub>26</sub>MP)<sub>500</sub>-rGO-Dox'tan daha fazla ilaç salınımı yaptı.



Şekil 1



Şekil 2