

ÖZET**HİSTOTRİPSİ AJANI OLARAK KULLANIMA UYGUN NANOKAP KÜMELERİ**

- 5 Mevcut buluş, histotripsi ajanı olarak kullanıma uygun nanokap kümelerine, söz konusu kümelerin hazırlanmasında kullanılan usullere ve buluşa uygun kümelerin histotripsi ajanı olarak veya ilaç taşımada kullanımına ilişkindir.

İSTEMLER

1. Alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin ve/veya alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye olmuş alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrinden seçilen konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen konuk molekülü içeren ve en az üç nanokap'ın bir araya gelmesiyle oluşan nanokap kümeleri.
2. İstem 1'e göre nanokap kümeleri olup özelliği konuk molekülün C3-C8 perflorokarbon türevinin oktafloropropan, dekaflorobutan, perfloropentan, perfloroheksan, perfloroheptan ve perflorooktan moleküllerini ve C3-C8 karbon taşıyan dallı doymuş florokarbon yapıları içerisinden seçilmesidir.
3. İstem 2'ye göre nanokap kümeleri olup özelliği konuk molekülün perfloroheksan veya perfloropentan olmasıdır.
4. İstem 1-3'ten herhangi birine göre nanokap kümeleri olup özelliği konak molekülün alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin ile alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrinin karışımından oluşmasıdır.
5. İstem 4'e göre nanokap kümeleri olup özelliği konak molekülün kütlece %1-30 oranında alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin ve kütlece %99 ile %70 oranında alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin karışımından oluşmasıdır.
6. İstem 4'e göre nanokap kümeleri olup özelliği konak molekülün beta-siklodekstrin ve alkin, tiol veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş beta-siklodekstrinden oluşmasıdır.
7. İstem 1-6'dan herhangi birine göre nanokap kümeleri olup özelliği en az bir terapötik ajan ve/veya hedefleyici ajanla fonksiyonelleştirilmesidir.
8. İstem 7'ye göre nanokap kümeleri olup özelliği hedefleyici ajanın folik asit, antibodiler, antibodi parçaları veya çeşitli peptitler içerisinden seçilmesidir.

9. İstem 7'ye göre nanokap kümeleri olup özelliği terapötik ajanın antineoplastik ajan, tercihen küçük moleküllü antineoplastik ajan veya biyolojik kökenli antineoplastik ajanlar olmasıdır.
10. İstem 1-6'dan herhangi birine göre nanokap kümesinin en az bir terapötik ajanla modifiye edilmesiyle elde edilen ilaç-nanokap kümesi konjugatları.
11. İstem 10'a göre ilaç-nanokap kümesi konjugatları olup özelliği nanokap kümelerinin hedefleyici ajanla modifiye edilmesidir.
12. Etken madde olarak İstem 10-veya 11'e göre ilaç-nanokap kümesi konjugatlarını içeren farmasötik bileşimler.
13. İstem 12'ye göre farmasötik bileşim olup en az bir yardımcı madde içerir.
14. İstem 1-9'dan herhangi birine göre nanokap kümelerinin hazırlanmasında kullanım için bir usul olup özelliği
 - a. Konak molekülün uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
 - b. Çözelti içerisine kullanılan konak molekül miktarının, mol olarak 1-10 katı, tercihen 3-6 katı, özellikle tercihen 5 katı kadar C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekül eklenmesi
 - c. Oluşan çökeltinin katı ve sıvı kısımlarının birbirinden ayrılarak katı kısmının kurutulması ile nanokap kümelerinin elde edilmesi adımlarını içermektedir.
15. İstem 14'e göre nanokap kümelerinin hazırlanmasında kullanılan bir usul olup özelliği;
 - a. Beta-siklodekstrinin ve alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş beta-siklodekstrinin uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
 - b. Çözelti içerisine toplam beta siklodekstrin ve alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş beta-siklodekstrin mol miktarının 5 katı kadar perflorohekzan veya perfloropentan eklenmesi
 - c. Oluşan çökeltinin katı ve sıvı kısımlarının birbirinden ayrılarak katı kısmının kurutulması ile beta-siklodekstrin/amin veya alkin veya azit veya tiol beta-siklodekstrin perflorohekzan veya perfloropentan nanokap kümelerinin elde edilmesi adımlarını içermesidir.
16. İstem 14 veya 15'e göre bir usul olup a. adımıyla kullanılan uygun çözücü bir organik çözücü veya su veya herhangi bir sulu çözelti içerisinden seçilir

17. Histotripsi ajanı veya ultrason kontrast ajanı olarak kullanım için İstem 1-9 dan herhangi birine göre göre nanokap kümeleri.

18. Kanser tedavisinde kullanım için İstem 1-9' dan herhangi birine göre göre nanokap kümeleri.

5 19. Histotripsi ajanı veya ultrason kontrast ajanı olarak kullanım için İstem 10-veya 11'e göre ilaç-nanokap kümesi konjugatları

20. Kanser tedavisinde kullanım için İstem 10-veya 11'e göre ilaç-nanokap kümesi konjugatları.

21. Kanser tedavisinde kullanım için İstem 12'ye göre farmasötik bileşimler.

10

15

HİSTOTRİPSİ AJANI OLARAK KULLANIMA UYGUN NANOKAP KÜMELERİ

TARİFNAME

Teknik Alan

- 5 Mevcut buluş, histotripsisi ajanı olarak kullanıma uygun nanokap kümelerine, söz konusu kümelerin hazırlanmasında kullanılan usullere ve buluşa uygun kümelerin histotripsisi ajanı olarak veya ilaç taşımada kullanımına ilişkindir.

Bilinen Teknik

- 10 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
- 15 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
- 20 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
- 25 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
- 30 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 histotripsisi 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, üzerine fonksiyonel gruplar takılabilen, yüksek stabiliteye sahip ve terapötik ajan ve/veya hedefleyici ajanla modifiye edilebilen yeni histotripsisi ajanları geliştirmeyi hedeflemektedir.

Şekillerin Detaylı Anlatımı

Şekil 1: Mono-6-Alkin-Deoksi-6-β-Siklodekstrin molekülünün (Alkin-βCD) sentez şeması gösterilmektedir.

Şekil 2: Hedefli nanokap kümelerinin sentezi ve karakterizasyonunu gösteren şema.

Burada yer alan kısaltmaların açıklaması aşağıda verilmektedir.

A: Beta-siklodekstrin

B: Alkin grubuyla modifiye edilmiş beta-siklodekstrin

C: Nanokap kümesi

D: Nanokap kümesinin EPPT1 peptidiyle modifiye edilmesiyle elde edilen, hedeflendirilmiş nanokap kümesi.

Şekil 3: Nanokap kümelerinin histotripsisi ajanı olarak etkinlikleri gösterilmektedir.

Burada yer alan kısaltmaların açıklaması aşağıda verilmektedir.

i) EPPT1 ile modifiye edilmiş nanokap kümeleri

ii) Azid grubuyla modifiye edilmiş beta-siklodekstrin içeren nanokap kümeleri

iii) Alkin grubuyla modifiye edilmiş beta-siklodekstrin içeren nanokap kümeleri

iv) Kontrol

Buluşun Detaylı Anlatımı

5 Mevcut buluş alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin'den seçilen bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren ve en az iki inklüzyon kompleksinin bir araya gelmesiyle oluşan nanokap kümelerine ilişkindir.

10 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.

15 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.

20 Buluş kapsamında kullanılan "konak molekül" ifadesi alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin ve/veya alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin molekülünü ifade etmektedir.

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

30 Buluş kapsamında kullanılan "nanokap" ifadesi alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin'den seçilen bir konak molekül ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülün konuk-konak kompleksi yapmasıyla elde

edilen inklüzyon komplekslerini ifade etmektedir. Bu bağlamda tarifname içerisinde “konuk konak kompleksi”, “inklüzyon kompleksi” ve “nanokap” ifadeleri birbiri ile aynı anlamda olup birbiri yerine kullanılabilir.

5 Buluş kapsamında kullanılan “nanokap kümeleri” ifadesi en az üç, nanokap’ın biraraya kümelenmesi ile oluşan kompleksleri ifade etmektedir. Bu yapılar rastgele şekilde biraraya gelmemektedir, buluşa konu inklüzyon kompleksleri içerisindeki konuk moleküller olan perfloro karbonların sahip olduğu hidrofobik özelliği bu nanokapların biraraya gelmesini sağlar. Bu şekilde iç kısmında hidrofobik perflorokarbon zincirlerinin ve dış kısmında ise hidrofilik alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin’in ve bunların inklüzyon komplekslerinin yer aldığı kümelenmeler oluşur.

Mevcut buluş alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin’den ve/veya alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin’den seçilen bir konak molekül ve 15 C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekülü içeren en az üç inklüzyon kompleksinin bir araya gelmesiyle oluşan nanokap kümelerine ilişkindir.

Buluşun bir uygulamasında konak molekül; %1-30 oranında alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrinden ve %99 ile %70 oranında alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin karışımından oluşur.

Bu anlamda buluşa uygun nanokap kümelerini oluşturan konak molekül alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin ile alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrinin karışımından oluşur. Örneğin buluşa uygun 25 nanokap kümesini oluşturan konak molekül beta-siklodekstrin ile alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş beta-siklodekstrini içerebilir.

Buluş bir diğer açıdan buluşa uygun nanokap kümeleri en az bir terapötik ajan ve/veya hedefleyici ajanla modifiye edilmiş olabilir.

Bu yönüyle mevcut buluş en az bir terapötik ajan, bir diğer deyişle ilaç ve isteğe bağlı 30 olarak hedefleyici ajanla modifiye edilen ilaç-nanokap kümesi konjugatlarına ilişkindir.

Bu tarifname kapsamında kullanılan “buluşı uygun nanokap kümeleri” ifadesi alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin ve/veya alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrin ve C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen
5 bir konuk molekülü içeren en az iki inklüzyon kompleksinin bir araya gelmesiyle elde edilen ve isteğe bağlı olarak bir terapötik ajan ve/veya hedefleyici ajanla modifiye edilen yapıları ifade etmektedir.

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

Beta-siklodekstrin 7 şeker ünitesinden oluşan dış yüzeyi hidrofilik, iç yüzeyi ise
15 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
20 vücudun hidrofilik ortamında hedef dokuya iletimi sağlamaktadır. Kümelenme hem hidrofobik serbes perflorokarbon molekülleri hem de kompleks oluşturmuş yapının dışta kalan kısa perflorokarbon zincir parçasının serbest perflorokarbon ile etkileşmesi sonucu merkezde hidrofobik dışta hidrofilik siklodekstrin molekülleri kalacak şekilde gerçekleşiyor.

25

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 alkin, tiol, azit veya amin modifikasyon gruplarıyla modifiye edildiğini ifade etmektedir. Bir başka deyişle; söz konusu konak moleküller
30 üzerinde bulunan modifiye edilebilir gruplar %10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 veya %100 oranında modifikasyon grubuyla modifiye edilmiş olarak bulunabilir.

Perflorohekzan; organoflor ailesine mensup bir molekül olup, kararlı C-F bağlarına sahiptir. Söz konusu madde, vücutta metabolize olmamakta ancak basit şekilde inhalasyon yoluyla vücuttan atılabilmektedir. Perflorohekzan oda sıcaklığında sıvı formdadır, kaynama sıcaklığı ise 56 °C'dir. Kaynama noktasının düşük olması bu maddenin histotripsi 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 ulaşıp ulaşmadığı ultrason ile rahatlıkla görülebilmekte ve ajanların 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 tedavi sağlayacağı öngörülmektedir.

Burada kullanılan “hedefleyici ajan” ifadesi vücut içerisindeki çeşitli spesifik hedef 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 folik asit, antibodiler, antidiyotikler, antidiyotik parçaları veya çeşitli peptitler içerisinden seçilebilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında hedefleyici ajan olarak EPPT1 peptidi kullanılır.

Buluşun bir uygulaması buluşa uygun nanokap kümelerinin hazırlanmasında kullanılan bir usule ilişkin olup söz konusu usul;

- Konak molekülün, örneğin beta-siklodekstrinin su içerisinde çözülmesi
- Çözelti içerisine kullanılan konak molekül miktarının, mol olarak 1-10 katı, tercihen 3-6 katı, özellikle tercihen 5 katı kadar C3-C8 perflorokarbon türevlerinden seçilen bir konuk molekül, örneğin perflorohekzan eklenmesi
- Oluşan çökeltinin katı ve sıvı kısımlarının birbirinden ayrılarak katı kısmının kurutulması ile nanokap kümelerinin elde edilmesi adımlarını içermektedir.

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

Buluşa uygun usulde 1 mol eşdeğerliğe sahip konak moleküle, örneğin alfa-siklodekstrin, beta-siklodekstrin, gama-siklodekstrin ve/veya alkin, tiol azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş alfa-siklodekstrin veya beta-siklodekstrin veya gama-siklodekstrine karşılık 1-10 mol, tercihen 3-6 mol, özellikle tercihen 5 mol eşdeğerliğe sahip C3-C8 perflorokarbon türevi, örneğin perflorohekzan veya perflorokarbon kullanılması nanokap kümelerinin oluşmasında önemli rol oynar.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında nanokap kümelerinin hazırlanmasında kullanılan bir usul;

- a. Beta-siklodekstrinin ve alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş beta-siklodekstrinin uygun bir çözücü içerisinde çözülmesi
- b. Çözelti içerisine toplam beta siklodekstrin ve alkin, tiol, azit veya amin gruplarından en az biriyle modifiye edilmiş beta-siklodekstrin mol miktarının 5 katı kadar perflorohekzan veya perfloropentan eklenmesi
- c. Oluşan çökeltinin katı ve sıvı kısımlarının birbirinden ayrılarak katı kısmının kurutulması ile beta-siklodekstrin/amin veya alkin veya azit veya tiol beta-siklodekstrin perflorohekzan veya perfloropentan nanokap kümelerinin elde edilmesi adımlarını içerir.

Bir diğer açıdan mevcut buluş, histotripsin ajanı veya ultrason kontrast ajanı olarak kullanım için buluşa uygun nanokap kümelerine ilişkindir.

Bir diğer açıdan mevcut buluş, buluşa uygun nanokap kümelerinin histotripsin ajanı veya ultrason kontrast ajanı olarak kullanımına ilişkindir.

Bir diğer açıdan mevcut buluş, kanser tedavisinde kullanım için buluşa uygun nanokap kümelerine ilişkindir.

Bir diğer açıdan mevcut buluş, kanser tedavisinde kullanım için buluşa uygun ilaç-nanokap kümesi konjugatlarına ilişkindir.

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.

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

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

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

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

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

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.

- 15

Buluş bir diğer açıdan buluşa uygun nanokap kümelerini veya ilaç-nanokap konjugatlarını içeren farmasötik bileşimlere ilişkindir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında farmasötik bileşim içerisinde yer alan nanokap kümeleri beta siklodekstrin veya alkin, tiol veya amin grubuyla fonksiyonelleştirilmiş beta siklodekstrin ve perflorohekzan veya perfloropentandan oluşur.

- 20

Buluş aynı zamanda, beta-siklodekstrin ve perflorohekzan veya perfloropentan nanokap kümelerini içeren farmasötik bileşimleri açıklamaktadır.

- 25 Buluş aynı zamanda, beta-siklodekstrin ve perflorohekzan veya perfloropentan nanokap kümelerine konjuge olarak en az bir terapötik ajan, tercihen antineoplastik ajan, içeren farmasötik bileşimleri açıklamaktadır.

Buluş kapsamında bahsedilen antineoplastik ajan küçük moleküllü antineoplastik ajanlardan veya biyolojik kökenli antineoplastik ajanlardan seçilebilir. Biyolojik kökenli antineoplastik ajanlar örneğin proteinler, peptitler, antikorlar, monoklonal antikorlar olabilir.

- 30

Bahsi geçen antineplastik terapötik ajanlar, kanser hastalığının tedavisinde herhangi bir rol oynayabilir. Söz konusu ajanlar örneğin; hücre döngüsünü durdurma, damar endotel büyüme faktörü (VEGF) inhibisyonu, immün cevap değiştirici v.b. şekilde etki gösteren herhangi bir ajan olabilir.

- 5 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında buluşa uygun nanokap kümelerini veya ilaç-nanokap konjugatlarını içeren farmasötik bileşimler; buluşa uygun inklüzyon kompleksinin yanı sıra en az bir yardımcı ajan içerir.

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

- 10 herhangi bir farmasötik etkinliği bulunmamaktadır.

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

- 15 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.

ÖRNEKLER:

- 20 **Örnek 1: Beta-Siklodekstrin Perflorohekzan Inklüzyon Kompleksinin Hazırlanması**

100 mg beta-siklodekstrin 6 mL saf su ile karıştırılır. Beta-siklodekstrin tamamen çözüldükten sonra 5 kat olacak şekilde molar oranlarda perflorohekzan eklenir. Karışım gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılır. Sonrasında bir saat boyunca bozdolabında 4 °C sıcaklıkta bekletilen karışım 5000 rpm hızda 10 (12000 rpm de 2 dk) dakika boyunca santrifüjlenir. Sıvı kısım dökülür ve elde edilen katılar vakum altında kurutulur.

- 25

Örnek 2: Mono-6-Alkin-Deoksi-6-β-Siklodekstrin (Alkin-βCD) Sentezi

Alkin-βCD sentezi için Ts-CD (1 eq) azot atmosferinde dimetilformamid (DMF) içerisinde çözülmüş ve üzerine propargilamin (38 eq) ilave edilmiştir. Reaksiyon, bir yağ banyosu kullanılarak 80°C'ye ısıtılmış ve gece boyunca karıştırılmıştır. Ürün

- 30

birkaç kez MeOH/su karışımında çözülüp asetonitrilde çöktürülerek beyaz katı olarak elde edilmiştir. Elde edilen katı, vakum altında kurutulmuştur (Şekil 1).

Örnek 3: Mono-6-Azido-Deoksi-6-Siklodekstrin (Azit- β CD) Sentezi:

5 Azit- β CD sentezi için Ts-CD (1 eq) ve NaN₃ (20 eq) geri soğutucu varlığında 300 mL su içerisinde 1000C'da gece boyunca karıştırılmıştır. Karışım süzöldükten sonra vakum distilasyonu ile hacmi yaklaşık 15 mL'ye indirilmiştir. İçerisinde 1,1,2,2,-tetrakloro etan (15 eq) eklenerek yarım saat boyunca karıştırılmıştır. 4 °C 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek, katı faz alınarak kristalizasyon ile saflaştırılmıştır. Saf katı vakum altında kurutulur

10 Örnek 4: Mono-6-Amino-Deoksi-6-Siklodekstrin (Amin- β CD) Sentezi:

Azit-BCD (1 eq) ve trifenil fosfin (1,1 eq) inert ortamda 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Üzerine bir miktar su eklenerek 90 °C'de 3 saat boyunca spiral soğutucu ile yeniden karışmaya bırakıldı. Bu sürenin sonunda soğutulan karışım vakum distilasyonu ile başlangıç hacminin 1/3'üne getirilmiştir ve aseton eklenerek 15 çöktürülmüştür. 3500 rpm'de 5 dk boyunca 4°C'de santrifüj edilmiş ve katı faz alınarak vakum yardımıyla kurutulmuştur.

Örnek 5: Fonksiyonel Nanokap Kümelenmelerinin Hazırlanması (Hedefsiz Nanokap Kümelenmeleri)

20 Fonksiyonel nanokap kümelenmeleri kütlece %20 fonksiyonel siklodekstrin (CD) türevi (Azit-CD veya Alkin-CD veya amine-CD) kullanılarak %80 beta-siklodekstrin (BCD) ile karıştırılıp molce 5 kat PFH eklenerek hazırlanmıştır. Bu yolla başlangıçta tüm bileşenler çözünür haldedir. Elde edilen bu fonksiyonel nanokap kümelenmeleri hem PEG aşılmasında hem de EPPT1 peptid aşılmasında (hedefli nanokaplar) kullanılmıştır.

25 Alkin fonksiyonlu nanokap kümelenmeleri için alkin- β CD (1 eq) ve β CD (4 eq) 5mL çift damıtılmış suda manyetik karıştırıcı kullanılarak 700 rpm'de çözündürülmüştür. Berrak bir çözelti elde edildikten sonra üzerine PFH (20 eq) eklenerek, gece boyunca karıştırıldıktan sonra çözelti bir gece boyunca 4°C'deki buzdolabında bekletildi. Daha sonra çözelti 15 dakika boyunca 5,000 rpm'de santrifüj edilerek nihai çökelti vakum 30 altında kurutuldu.

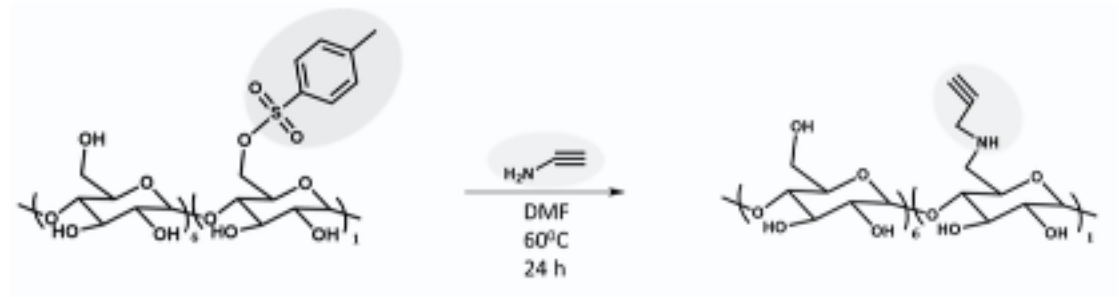
Örnek 6: Hedefli Nanokap Kümelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Hedefleme ajanı olarak seçilmiş olan EPPT1 peptid azide uç grubu içerecek şekilde sentezletilip satın alınmıştır. Dolayısıyla alkin grupları içeren fonksiyonel nanokap kümelenmeleri bu peptid ile fonksiyonlandırılabilir.

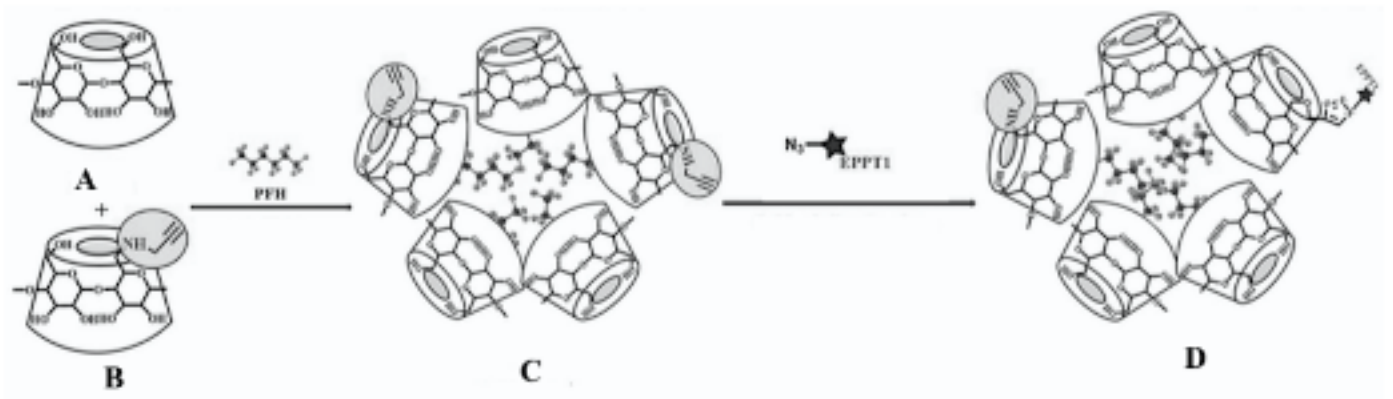
- 5 Alkin-BCD nanokap kümelenmeleri oda sıcaklığında 1.9 mL çift damıtılmış su içinde manyetik karıştırıcı kullanılarak 750 rpm’de dağıtıldı. N₃-EPPT1 (0.05 eq) ve CuSO₄ (1 eq) ve sodyum askorbat (2 eq) ilave edildi ve sistem azotatmosferinde bırakılmıştır. Bu reaksiyon karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırıldı. “Click” reaksiyonu tamamlandıktan sonra CuSO₄/sodyum askorbat sistemi su ile yıkanarak ve santrifüj ile uzaklaştırıldı (Şekil 2).

10 **Örnek 7: Nanokap Kümelerinin Histotripsi Etkinliklerinin İncelenmesi**

- Şu ana kadar elde edilen kararlı komplekslerin kavitasyon eşik basınçları önceden havasızlaştırılmış agaroz jel içerisine yerleştirilen nanokap kümelenmeleri ile test edilmiştir. Bu yapılar aynı konsantrasyonda ve aynı PFH oranı ile hazırlandıklarından kavitasyon eşik basıncını belirlemek için aynı miktarda nanokap kümelenmesi kullanılmıştır. Yapılan çalışmada mL içerisindeki nanokap miktarını eşitleyerek kıyaslama yapılmıştır. Bu aşamadan sonra, tek döngülü histotripsi darbeleri uygulamak için 500 kHz'lik bir dönüştürücü kullanılmış ve darbe tekrarlama frekansı 1 Hz'e ayarlanmıştır. Sonuçlar yüksek hızlı bir kamera kullanılarak kaydedilmiştir. Şekil 3’te görüleceği gibi, hedefli nanokaplar ve kullanılan fonksiyonel nanokaplar normal BCD nanokap kümelenmeleri ile normal histotripsi ile kıyaslanmışlardır. Hedefli ve hedefsiz tüm nanokap kümelenmelerinin eşik basıncını düşürdüğü gözlenmiştir.



Şekil 1



Şekil 2

p'		3.5 MPa	8.0 MPa	12.0 MPa	18.5 MPa	24.0 MPa	30.0 MPa
i)							
ii)							
iii)							
iv)							

Şekil 3