

## ÖZET

### KURKUMİN VE PİPERİN DOĞAL BİLEŞENLERİNİ İHTİVA EDEN KATI LİPİT EMULSİYONLARININ TEDAVİ AMAÇLI UYGULAMALARI

5 Mevcut buluş kurkumin ve piperin doğal bileşenlerini ihtiva eden katı lipid emülsiyon formülasyonlarına (emülsömlara) ve söz konusu emülsömların neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanımına ilişkindir.

## İSTEMLER

1. Piperin ve kurkumin içeren farmasötik formülasyonlara ilişkin olup özelliği;
  - çekirdeği trigliserit türevlerinden
  - dış katmanı fosfolipidlerden
- 5 oluşun ve hem çekirdeğinde hem de dış katmanında kolesterol veya ester türevleri bulunan emulsom formunda olmasıdır.
2. İstem 1'e göre bir formülasyon olup özelliği trigliserit türevlerinin 25 °C sıcaklıkta katı veya likit kristal formda olan yağlardan, trikaprin, trilaurin, trimyristin, tripalmitin ve tristearin gibi doğal, çift sayılı, dalsız trigliseritlerden, 10 mono doymamış yağ asitlerinden, kısmi hidrojene bitkisel yağlardan oluşun bir grubun içerisindeinden seçilmesidir.
3. İstem 2'ye göre bir formülasyon olup özelliği trigliserit türevinin tripalmitin olmasıdır.
4. İstem 1-3'e göre bir formülasyon olup özelliği fosfolipidlerin, soya lesitini, 15 yumurta lesitini, fosfatidil gliserol, fosfatidil inostol, fosfatidil etanolamin, fosfatidik asit, sfingomiyelin, di fosfatidilgliserol, fosfatidil serin, fosfatidil kolin, kardiyolipin gibi doğal fosfolipidlerden veya dimyristoyl fosfatidilgliserol, dimyristoyl fosfatidilkolin, 1,2-dipalmitol-rak-gliserol-3- fosfatidilkolin (DPPC) gibi sentetik fosfolipidlerden veya hidrojene veya kısmi hidrojene lesitinler ve 20 fosfolipidlerden oluşun bir grubun içerisindeinden seçilmesidir.
5. İstem 4'e göre bir formülasyon olup özelliği fosfolipitin 1,2-dipalmitol-rak-gliserol-3- fosfatidilkolin (DPPC) olmasıdır.
6. İstem 1-5'e göre bir formülasyon olup özelliği kolesterol veya ester türevlerinin kolesterol, palmitoyl kolesterol, oleoyl kolesterolden oluşun bir grubun içerisindeinden 25 seçilmesidir.
7. İstem 6'ya göre bir formülasyon olup özelliği kolesterol veya ester türevlerinin, kolesterol olmasıdır.
8. İstem 1-7'ye göre bir formülasyon olup özelliği emulsom yapısını oluşturan trigliserit, fosfolipid ve kolesterol türevlerinin birbirine ağırlıkça oranının

(trigliserit:fosfolipid:kolesterol) 17:1:1 ile 21:3:1 aralığında, tercihen 18:1.5:1 ile 20:2:1 aralığında olmasıdır.

9. İstem 1-8'e göre bir formülasyon olup özelliği;

- çekirdeğin trigliserin palmitattan

5 - dış katmanın 1,2-dipalmitol-rak-glisero-3- fosfatidilkolin (DPPC)

oluşması ve hem çekirdeğinde hem de dış katmanında kolesterol bulunan emulsom formunda olması ve trigliserin palmitat:DPPC:kolesterol oranının 17:1:1 ile 21:3:1 aralığında, tercihen 18:1.5:1 ile 20:2:1 aralığında olmasıdır.

10. İstem 1-9'a göre bir formülasyonun elde edilmesinde kullanılacak bir yöntem olup özelliği;

- trigliserit, fosfolipid ve kolesterol türevlerinin bir organik çözücü, tercihen klorofom içerisinde çözülmesi

- kurkumin ve piperinin bir organik çözücü, tercihen kloroform içerisinde çözülmesi

15 - Elde edilen çözeltilerin karıştırılması ve düşük basınç altında organik çözücünün uzaklaştırılmasıyla film yapısının elde edilmesi

- Elde edilen film yapısının suda çözülmesiyle kurkumin ve piperin içeren emulsom formülasyonlarının elde edilmesi adımlarını içermesidir.

20 11. İstem 10'a göre bir yöntem olup özelliği elde edilen kurkumin ve piperin içeren emulsom formülasyonunun sonikasyon banyosu, filtrasyon (ekstrüzyon) veya homojenizasyon işlemine tabi tutulmasıdır.

12. İstem 1-9'a göre piperin ve kurkumin içeren emulsom formülasyonunun neoplastik hastalıkların tedavisi için ilaç olarak kullanılması.

13. İstem 12'ye göre bir kullanım olup neoplastik hastalık kanserdir.

25 14. İstem 13'e göre bir kullanım olup kanser karsinoma, lenfoma, blastoma sarkoma veya lösemi olabilir.

15. İstem 14'e göre bir kullanım olup kanser 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, b6brek kanseri, t6k6r6k bezi karsinomu, tiroid kanseri ve çeşitli baş ve boyun kanserleri olabilir.

5

10

15

20

25

## TARİFNAME

### KURKUMİN VE PİPERİN DOĞAL BİLEŞENLERİNİ İHTİVA EDEN KATI LİPİT EMULSİYONLARININ TEDAVİ AMAÇLI UYGULAMALARI

#### 5 TEKNİK ALAN

Mevcut buluş kurkumin ve piperin doğal bileşenlerini ihtiva eden katı lipid emülsiyon formülasyonlarına (emülsomlara) ve söz konusu emülsomların neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanımına ilişkindir.

#### 10 TEKNİĞİN BİLİNER DURUMU

Kurkumin, zerdeçal bitkisinin; piperin ise karabiber bitkisinin anamaddesini oluşturmaktadır. Bu doğal iki aktif bileşiğin çeşitli tedavi edici etkileri eski medeniyetlerden günümüze bilinmektedir. Modern tıp uygulamalarında ise özellikle son yıllarda kullanımları araştırılmakta ve belirli hastalık modellerine karşı (çeşitli kanser türleri ve Alzheimer gibi) etkili oldukları gözlemlenmektedir. Bilhassa kurkumin (zerdeçal), anti-inflamatuvar, anti-kanserojen, anti-bakteriyal, anti-romatizmal ve rejeneratif özellikleri dolayısıyla büyük bir kullanım potansiyeli oluşturmaktadır. Ancak kurkuminin suda yeterince çözünmemesi ve sudaki kararsızlığı (hızla alt bileşenlerine ayrılması), terapötik uygulamalarda kullanımını engellemektedir. Vücut emilimi düşük olan kurkumin, yüksek dozlarda (örn. günde 8-10 mg) kullanılsa bile kandaki miktarı terapötik etki gösterecek konsantrasyon değerlerinin çok altında kalmaktadır. Bu durum, sağlık sorununun bulunduğu dokuya kurkuminin yeterli miktarda iletilmemesi sonucunu doğurmaktadır.

Yapılan çalışmalarda karabiberin (piper nigrum) içerisinde bulunan piperin etken maddesinin zerdeçal ile birlikte kullanımının, zerdeçalın çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttırmak suretiyle sinerjik bir etki oluşturduğu görülmüştür. Buna göre kurkumin ile piperin maddelerinin birarada kullanımı daha yüksek biyoyararlanıma sahip formülasyonların elde edilmesini sağlamaktadır.

Tekniğin bilinen durumu dikkate alındığında kurkuminden maksimum fayda sağlamak için bu maddenin özellikle bağırsaklarda emilimini arttıran ve/veya direkt

kana enjeksiyonunu sağlayan çeşitli nanotaşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

5 Bu özelliklere sahip formülasyonların geliştirilmesi amacıyla yapılan çeşitli çalışmalarda sinerjik etki gösteren kurkumin ve piperin moleküllerinin lipozom, misel, katı lipid nanopartiküller, polimerler, dendrimerler gibi çeşitli makromoleküler platformlar üzerinde taşınmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak, řu ana kadar yapılan bu tip formülasyonlarda temel olarak düşük ilaç yükleme kapasitesi, formülasyonun hazırlanmasına kullanılan organik üzücü ve srfaktana bağlı olarak istenmeyen toksisite ve yan etkiler görülmesi, düşük kararlılık oranı, hücre içine 10 alımda yetersizlik, hızlı ilaç salınım problemi ve yüksek ekonomik maliyet gibi problemler görülmektedir. Buluş sahipleri tekniğin bilinen durumunda var olan bu problemlerin, özellikle sürfaktan kullanımından kaynaklanan toksisite probleminin, üstesinden gelmeyi amaçlamakta ve var olan bu formülasyonlara alternatif bir kurkumin-piperin formülasyonu geliştirmeyi hedeflemektedir.

15

#### BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Buluş; bir fosfolipid katman ve piperin ve kurkuminin içerisinde dağıldığı bir trigliserit katı çekirdekten oluşan emulsiyonlara ve söz konusu emulsiyonların neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanımına ilişkindir.

20

#### BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, piperin ve kurkumin içeren farmasötik formülasyonlara ilişkin olup özelliği;

- ekirdeği trigliserit türevlerinden
- 25 - dış katmanı fosfolipidlerden

oluşan ve hem çekirdeğinde hem de dış katmanında kolesterol veya ester türevleri bulunan emulsiyon formunda olmasdır.

Buluş sahipleri yaptıkları çalışmalarda; yukarıda verilen özelliklere sahip emulsiyonlar içerisinde formüle edilen kurkumin ve piperin formülasyonlarının (i) yapısında 30 organik üzücü ve sürfaktan içermemesi sayesinde toksik etki göstermemesi; (ii) yapı içerisine yüksek miktarda kurkumin ve piperin yüklenmesine olanak sağlaması; (iii)

kendine özgü katı fazdaki yapısı sayesinde salınım süresini arttırarak kurkumin ve piperinin etki süresini uzatması; ve (iv) emulsomların dış yüzeyini oluşturan fosfolipidlerin modifiye edilebilir yapılar olması sayesinde protein, polimer, çeşitli hedefleyici ligandlar v.b. moleküllerin bağlanmasıyla hedeflendirilmiş veya salınım veya emilim özellikleri değiştirilmiş kurkumin ve piperin formülasyonlarının hazırlanmasına olanak sağlaması avantajlarına sahip olduğunu bulmuşlardır.

Buluşun bir uygulamasında buluşa uygun kurkumin ve piperin içeren emulsom formülasyonların çekirdeğini oluşturan trigliserit türevleri; 25 °C sıcaklıkta katı veya likit kristal formda olan yağlardan, trikaprin, trilaurin, trimiyristin, tripalmitin ve tristearin gibi doğal, çift sayılı, dalsız trigliseritlerden, mono doymamış yağ asitlerinden, kısmi hidrojene bitkisel yağlardan oluşan bir grubun içerisinden seçilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında kurkumin ve piperin içeren emulsom formülasyonlarının çekirdeğini oluşturan trigliserit türevi madde olarak tripalmitin, diğer adıyla trigliserin palmitat, kullanılır.

Buluşun bir uygulamasında kurkumin ve piperin içeren emulsom formülasyonların dış yüzeyini oluşturan fosfolipidler, soya lesitini, yumurta lesitini, fosfatidil gliserol, fosfatidil inostol, fosfatidil etanolamin, fosfatidik asit, sfingomiyelin, di fosfatidilgliserol, fosfatidil serin, fosfatidil kolin, kardiyolipin gibi doğal fosfolipidlerden veya dimiyristoyl fosfatidilgliserol, dimiyristoyl fosfatidilkolin, 1,2-dipalmitol-rak-glisero-3- fosfatidilkolin (DPPC) gibi sentetik fosfolipidlerden veya hidrojene veya kısmi hidrojene lesitinler ve fosfolipidlerden oluşan bir grubun içerisinden seçilebilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında fosfolipid olarak 1,2-dipalmitol-rak-glisero-3- fosfatidilkolin (DPPC) kullanılır.

Buluşun bir uygulamasında kurkumin ve piperin içeren emulsom formülasyonların çekirdeğinde ve dış katmanında bulunan kolesterol; kolesterol, palmitoyl kolesterol, oleoyl kolesterolden oluşan bir grubun içerisinden seçilir.

Buluşun bir uygulamasında emulsom yapısını oluşturan trigliserit, fosfolipid ve kolesterol türevlerinin birbirine ağırlıkça oranı (trigliserit:fosfolipid:kolesterol) 17:1:1 ile 21:3:1 aralığında, tercihen 18:1.5:1 ile 20:2:1 aralığındadır.

Buna göre buluşun tercih edilen bir uygulamasında mevcut buluş kurkumin ve piperin içeren farmasötik formülasyonlarına yönelik olup özelliği;

- çekirdeğin trigliserin palmitattan

- dış katmanın 1,2-dipalmitol-rak-glisero-3- fosfatidilkolin (DPPC)

oluşması ve hem çekirdeğinde hem de dış katmanında kolesterol bulunan emulsom formunda olmasıdır.

- 5 Buluşun bir uygulamasında emulsom yapısını oluşturan trigliserin palmitat, 1,2-dipalmitol-rak-glisero-3- fosfatidilkolin (DPPC) ve kolesterolün birbirine ağırlıkça oranı (trigliserin palmitat:DPPC:kolesterol) 17:1:1 ile 21:3:1 aralığında, tercihen 18:1.5:1 ile 20:2:1 aralığındadır.

Buna göre buluşun özellikle tercih edilen bir uygulamasında mevcut buluş kurkumin ve piperin içeren farmasötik formülasyonlarına yönelik olup özelliği;

- 10
- çekirdeğin trigliserin palmitattan
  - dış katmanın 1,2- dipalmitol-rak-glisero-3- fosfatidilkolin (DPPC)

oluşması ve hem çekirdeğinde hem de dış katmanında kolesterol bulunan emulsom formunda olması ve trigliserin palmitat:DPPC:kolesterol oranının 17:1:1 ile 21:3:1 aralığında, tercihen 18:1.5:1 ile 20:2:1 aralığında olmasıdır.

- 15 Buluşun bir uygulaması buluşa uygun kurkumin ve piperin içeren emulsomların hazırlanmasında kullanılacak bir yöntemle ilişkin olup söz konusu yöntem;

- trigliserit, fosfolipid ve kolesterol türevlerinin bir organik çözücü, tercihen kloroform içerisinde çözülmesi
- kurkumin ve piperinin bir organik çözücü, tercihen kloroform içerisinde çözülmesi

- 20
- Elde edilen çözeltilerin karıştırılması ve düşük basınç altında organik çözücünün uzaklaştırılmasıyla film yapısının elde edilmesi
  - Elde edilen film yapısının suda çözülmesiyle kurkumin ve piperin içeren emulsom formülasyonlarının elde edilmesi adımlarını içerir.

- 25 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında elde edilen kurkumin ve piperin içeren emulsom formülasyonu, formülasyonu oluşturan emulsomların partikül büyüklüğü dağılımının homojen hale getirilmesi amacıyla sonikasyon banyosu, filtrasyon (ekstrüzyon) veya homojenizasyon işlemine tabi tutulur.

- 30 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında söz konusu yöntemde organik çözücü, tercihen kloroform oda sıcaklığında, veya 40-60 °C arasında bir sıcaklıkta uzaklaştırılabilir.

Buluş bir diğere açıdan, buluşa uygun kurkumin ve piperin içeren emulsom formüasyonlarının neoplastik hastalıkların tedavisi için ilaç olarak kullanılmasına yöneliktir.

- 5 Mevcut buluş kapsamında kullanılan “neoplastik hastalıklar” ifadesi habis (malign) tümörlere veya kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize olan bir fizyolojik duruma, örneğin kanser hastalığına işaret eder. Buluş kapsamında “neoplastik hastalık” ve “kansere” terimleri birbiri ile değişebilir şekilde kullanılabilir. 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.

- 15 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.

- 20 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.

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. Tarifname ayrıca esas olarak bahsi geçen özellikleri/elemanları içeren ya da bunlardan meydana gelen diğer uygulamaları da kapsamaktadır.

5 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.

ORNEKLER:

Ornek 1: Piperin ve Kurkumin İçeren Emulsomların Hazırlanması

Tablo 1: Emulsom oluşturan bileşenler ve miktarları

	<b>Moleküler Ağırlığı (g/mol)</b>	<b>Miktarı (mg)</b>	<b>Kütle Kesiri</b>	<b>Mol Kesiri</b>
<b>Tripalmitin</b>	807.34	20	0.87	0.82
<b>DPPC</b>	734.04	2	0.09	0.09
<b>Kolesterol</b>	386.66	1.04	0.04	0.09

15

Tablo 1’de yer alan miktarlarda tripalmitin, DPPC ve kolesterol kloroform içerisinde çözülür. Ayrı bir yerde kurkumin ve piperin de kloroform içerisinde çözülür. Elde edilen iki karışım birleştirilir ve düşük basınç altında 60 °C sıcaklıkta çözücü olarak kullanılan kloroform uzaklaştırılır.

20 Elde edilen filmin suda çözülmesiyle piperin ve kurkumin içeren emulsom formülasyonları elde edilir.

Daha sonra isteğe bağlı olarak elde edilen emulsomların boyutlarının homojen hale getirilmesini sağlamak amacıyla sonikasyon, filtrasyon (ekstrüzyon) veya homojenizasyon uygulanır.

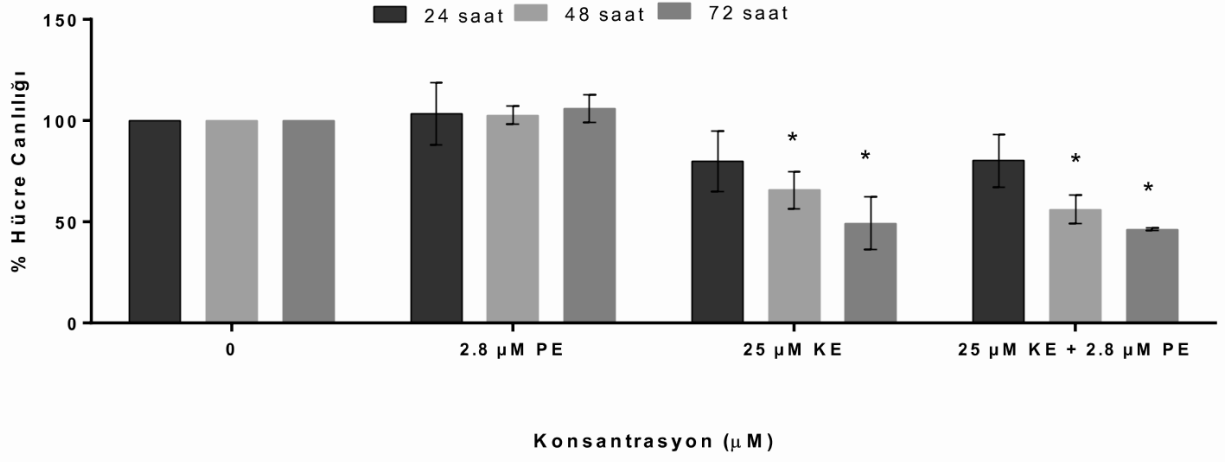
## Ornek 2: HCT116 Hücreleri ile Hücre Canlılığı Testi

HCT116 hücrelerinin kurkumin ve piperin yüklü emulsomlar ile muamelesi sonrası hücre canlılıkları MTS hücre canlılığı tekniği yardımıyla saptanmıştır. 96 kuyucuklu tabaklar kullanılarak yapılan analizde, HCT116 hücre hattı için kuyucuk başına 10 bin hücre ekilmiştir. Hücrelerin oturması gözlemlendikten sonra 2,8 µM piperin yüklü emulsom ve 25 µM kurkumin yüklü emulsom ile ayrı ayrı ve birlikte muamele edilmiştir. Negatif kontrol olarak muamele görmemiş hücreler kullanılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik muamele sürelerinin ardından hücreler MTS (“CellTiter96 AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay”) kolorimetrik hücre ajanı ile muamele edilmiştir (Şekil 1). Karanlıkta iki saat inkübasyonu sonucunda mikrotabak spektrofotometre kullanılarak hücrelerin 490 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu prosedür 24 saat, 48 saat ve 72 saat zaman dilimlerinde tekrarlanmıştır. Alınan sonuçların analizleri negatif kontrol hücrelerinin canlılık oranının %100 kabul edilmesiyle hesaplanmıştır. Elde edilen hücre canlılık oranları HCT116 hücreleri için Şekil 1’de verilen grafikte görülmektedir. Buna göre sadece piperin yüklü emulsom ile muamele edilen hücrelerde hücre canlılığı kontrol grubundan farklılık göstermezken; kurkumin yüklü emulsom ile muamele edilenler hücrelerde hücre canlılığı 48. saatte %65, 72. saatte %49 olurken; kurkumin artı piperin yüklü emulsomlar ile muamele edilen hücreler için bu değerler %56 ve %46 olarak belirlenmiştir. Kurkumin ve piperin yüklü emulsomlar ile muamele edilen HCT116 hücreleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir.

### Şekillerin Açıklamaları:

Şekil 1’de sırasıyla 2.8 µM piperin yüklü emulsom (PE) ve 25 µM kurkumin yüklü emulsom (KE) ve kombinasyonlarının (25 µM KE + 2.8 µM PE) HCT116 hücre canlılığı üzerindeki etkisi gösterilmektedir.

1/1



Şekil 1