

ÖZET

PARAZİTLERİN VE PARAZİTLERDEN ELDE EDİLEN EKSTRASELÜLER VEZİKÜLLERİN KANSER TEDAVİSİNDE KULLANIMI

- 5 Buluş kanser tedavisi amacıyla parazitleri ve parazitlerden izole edilen ekstraselüler veziküllerin kullanımı ile ilgilidir. Buluş, parazitlerin ve parazit eksozomlarının kanser tedavisinde kullanımını ve eksozomların ilaç yükleme kapasitesinden yararlanılarak eksozomlara etkin madde yüklenmesini; böylece sağlıklı hücrelere yan etki göstermeksizin doğrudan hedef kanser hücrelerine
- 10 spesifik ilaç taşınması yapılarak ilacın biyoyararlanımının artırılması ile tümöre spesifik hedef bölgede istenilen etkinin alınmasını amaçlamaktadır. Buluş kapsamında, ekstraselüler veziküller için kaynak olarak özellikle *Leishmania infantum* paraziti kullanılmaktadır.

15

İSTEMLER

1. Habis (malign) tümörlere veya kontrolsüz hücre büyümesi şeklinde açıklanan fizyolojik durumların ifadesi olan neoplastik hastalıkların tedavisi için kullanılan parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.
- 5
2. Acanthamoeba sp. (*Acanthamoeba castellanii*), Echinococcus spp., E. histolytica spp., *Ancylostoma brazilense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum*, and *Uncinaria stenocephala*., *Angiostrongylus cantonensis*, *Ascaris*, *Giardia*,
 10 *Leishmania* spp. (*L. Arabica*, *L. archibaldi*, *L. aristedesii*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. colombiensis*, *L. Deanei*, *L. donovani*, *L. enriettii*, *L. equatorensis*, *L. forattinii*, *L. garnhami*, *L. gerbil*, *L.guyanensis*, *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. infantum*, *L. killicki*, *L. lainsoni*, *L. major*, *L. Mexicana*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoi*, *L. shawi*, *L. tarentolae*, *L. tropica*, *L. turanica*, *L. venezuelensis*), *Plasmodium* spp. (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*), *Schistosoma* spp., *Toxoplasma* spp. (*Toxoplasma gondii*), *Trypanosoma brucei* ssp. türlerinden oluşan bir gruptan seçilen en az bir parazit olan İstem 1'deki gibi parazitler.
- 15
3. Acanthamoeba sp. (*Acanthamoeba castellanii*), Echinococcus spp., E. histolytica spp., *Ancylostoma brazilense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum*, and *Uncinaria stenocephala*., *Angiostrongylus cantonensis*, *Ascaris*, *Giardia*,
 20 *Leishmania* spp. (*L. Arabica*, *L. archibaldi*, *L. aristedesii*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. colombiensis*, *L. Deanei*, *L. donovani*, *L. enriettii*, *L. equatorensis*, *L. forattinii*, *L. garnhami*, *L. gerbil*, *L.guyanensis*, *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. infantum*,
 25 *L. killicki*, *L. lainsoni*, *L. major*, *L. Mexicana*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoi*, *L. shawi*, *L. tarentolae*, *L. tropica*, *L. turanica*, *L. venezuelensis*), *Plasmodium* spp. (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*), *Schistosoma* spp., *Toxoplasma* spp. (*Toxoplasma gondii*), *Trypanosoma brucei* ssp. türlerinden oluşan bir gruptan seçilen en az bir parazit kaynaklı olan İstem 1 veya 2'deki gibi
 30 parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.

4. Parazit antijenlerinin (ısı ile inaktive edilmiş veya direkt antijenin kendisi), genetik materyalinin (mRNA, small RNA, mitochondrial DNA, DNA fragments), gen transferi ve transfekte olmuş parazitlerin (plazmid aktarımı, lentiviral, SV40 antijeni ile elektroporasyon), CRISPR (nükleodit düzenleme içeren yöntemler)
- 5 kanser tedavisi için kullanılan istem 1'deki gibi bir parazit ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.
5. Parazit antijenlerinin (ısı ile inaktive edilmiş veya direkt antijenin kendisi), genetik materyalinin (mRNA, small RNA, mitochondrial DNA, DNA fragments),
- 10 gen transferi ve transfekte olmuş parazitlerin (plazmid aktarımı, lentiviral, SV40 antijeni ile elektroporasyon), CRISPR (nükleodit düzenleme içeren yöntemler) kanser tedavisinde nano taşıyıcı sistemler içerisine enkapsüle edilerek kullanılan İstem 1'deki gibi parazitler.
- 15 6. Kültür medyası olan İstem 1'deki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.
7. Parazit olarak *Leishmania infantum* seçildiği İstem 2'deki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.
- 20 8. Parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin karakterize edilmesinde parazit olarak *Leishmania infantum* İstem 3'teki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.
- 25 9. Neoplastik hastalık olarak; meme kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser, deri kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mezotelyom, gastrointestinal kanser, pankreas kanseri, sarkoma, blastoma, lenfoma, gliyoblastom, nöroblastom, vulva kanseri, rahim ağzı kanseri, endometriyal karsinom, yumurtalık kanseri, karaciğer kanseri, hepatom, lösemi,
- 30 mesane kanseri, böbrek kanseri, tükürük bezi karsinomu, tiroid kanseri ve çeşitli baş ve boyun kanserlerinden oluşan bir gruptan seçilen en az bir kanser hastalığı

için kullanılan İstem 1'deki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.

5 **10.** Glioblastoma hücre hattı olan U87 kanser hücrelerinin öldürülmesi şeklinde kanser tedavisi için kullanılan İstem 9'daki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler vezikülleri.

10 **11.** Glioblastoma hücre hattı olan A172 kanser hücrelerinin öldürülmesi şeklinde kanser tedavisi için kullanılan İstem 9'daki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler vezikülleri.

15 **12.** Nöroblastoma hücre hattı olan SHSY-5Y kanser hücrelerinin öldürülmesi şeklinde kanser tedavisi için kullanılan İstem 9'daki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler vezikülleri.

13. Melanoma hücre hattı olan SH4 kanser hücrelerinin öldürülmesi şeklinde kanser tedavisi için kullanılan İstem 9'daki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler vezikülleri.

20 **14.** Prostat hücre hattı olan 22RV kanser hücrelerinin öldürülmesi şeklinde kanser tedavisi için kullanılan İstem 9'daki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler vezikülleri.

25 **15.** Çift fazlı sıvı sistemleri ile izolasyon (ATPS), dereceli santrifüj, ultrasantrifüj, sukroz gradient ultrasantrifüj, polimerik çöktürme, ultrafiltrasyon, kromatografik yöntemler ile izolasyon (affinite kromatografi (antikor and peptid affinite), boyut ayrımı kromatografisi (boyut dışlama kromatografisi)), mikro boncuklar ile izolasyondan iyon yüküne göre çöktürme (elektriksel yük bazlı çöktürme), salting tuzla çöktürme yöntemlerinden en az biri ile izole edilen yukarıdaki istemlerden herhangi birindeki gibi parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.

30

16. Ekstraselüler veziküllerin izole edileceği parazitin kültür medyasının toplanması,
- 5 – kültür medyasının hücre artıkları ve parazitler gibi istenmeyenlerden uzaklaştırılması amacıyla 5-20 dakika süreyle 2,000g-10,000g arasında bir hızda santrifüj edilmesi,
- santrifüj sonrasında filtreleme ile 220 nm ve üstü boyuttaki parçacıkların uzaklaştırılması,
- 10 – santrifüj işlemi ile elde edilen vezikül-protein karışımının ayrıştırılması amacıyla PEG fazı ve DEX fazı içeren çift fazlı sıvı sistemi içerisine alınması,
- PEG fazının proteinlere, DEX fazının ise fosfolipid yapılı membranlara olan kimyasal eğiliminden yararlanılarak veziküllerin; vezikül dışı proteinlerden, hücresel yağlardan ve diğer kirliliklerden arındırılması,
- 15 – izole edilmiş veziküllerin elde edilmesi adımlarından oluşan bir çift fazlı sıvı sistem ile izolasyon yöntemiyle izole edilen İstem 15'deki gibi parazit ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller.
17. Yukarıdaki istemlerden herhangi birindeki gibi parazitler ve parazitlerden 20 elde edilen ekstraselüler vezikülleri içeren ve içerisinde ekstraselüler veziküller, emülsiyon sistemleri, biyolojik ve kimyasal yapılı nanopartiküller (polimerik nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller), inorganik yapılı nanopartiküller (metalik nanopartiküller), lipid yapılı veziküler sistemler (lipozomlar, niozomlar ve etozomlar), dendrimerler, polimer ilaç- konjugatları miseller, karbon 25 nanotüplerden oluşan bir gruptan seçilen nano taşıyıcı sistemler bulunan bir farmasötik bileşim.
18. İstem 17'ye göre farmasötik bileşim olup diğer etken madde antiparazitik, antibakteriyel, antiviral, antineoplastik ve/veya sitotoksik ve/veya antimetastatik 30 etki gösteren bilinen aktif bileşikler ve bunların ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşan bir gruptan seçilen en az bir aktif bileşik içermektedir.

19. İstem 18'e göre farmasötik bileşim olup antibakteriyel etki gösteren aktif bileşik olarak; amikasin, gentamisin, kanamisin, neomisin, netilmisin, tobramisin, paromisin, streptomisin, spektinomisin, geldanamisin, herbimisin, rifaksimisin, lorakarbef, ertapenem, doripenem, imipenem, meropenem, sefadroksil, sefazolin, sefalotin, sefaleksisin, sefaklor, sefamandol, sefoksitin, sefprozil, sefuroksim, sefiksim, sefdinir, sefditoren, sefooperazon, sefotaksim, sefpodoksım, seftazidim, seftibüten, seftizoksım, sefepim, seftarolin fosamil, seftobiprol, teikoplanin, vankomisin, televansin, dalbavansin, oritavansin, clindamisin, linkomisin, daptomisin, azitromisin, klaritromisin, diritromisin, eritromisin, roksitromisin, troleandomisin, telitromisin, spiramisin, aztreonam, furazolidon, nitrofurantoin, linezolid, posizolid, radezolid, torezolid, amoksisilin, ampisilin, azlosilin, karbenisilin, kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin, mezlosilin, metisilin, nafsilin, okzasilin, penisilin G, penisilin V, piperasilin, temosilin, tikarsilin, klavulanat, sulbaktam, tazobaktam, basitrasin, kolistin, polimiksin B, siprofloksasin, enoksasin, gatifloksasin, gemifloksasin, levofloksasin, lomefloksasin, moksifloksasin, nalididik asit, norfloksasin, ofloksasin, trovafloksasin, grepafloksasin, sparfloksasin, temafloksasin, mafenid, sulfasetamid, sulfadiazin, sülfadimetoksin, sülfametizol, sülfametoksazol, sulfanilimid, sülfasalazin, sülfisoksazol, trometoprim, demeklosiklin, doksisiklin, minosiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, klofazimin, dapson, kapreomisin, sikloserin, etambutol, isoniyazid, pyrazinamid, rifampisin, rifabutin, rifapentin, streptomisin, arsfenamin, kloramfenikol, fosfomisin, fusidik asit, metronidazol, mupirosin, platensimisin, kinupristin, dalfopristin, tiamfenikol, tigesiklin, tinidazol, trimetoprim'i ve bunların ikili veya üçlü kombinasyonları ve/veya enkapsülasyonlarından oluşan bir grubun içerisinde seçilen en az bir ajan içermektedir.

20. İstem 18'e göre bir farmasötik bileşim olup antiviral etki gösteren aktif bileşik olarak; abakavir, asiklovir, adefovir, amantadin, amprenavir, ampligen, arbidol, atazanavir, atripla, balavir, sidofovir, kombivir, dolutegravir, darunavir,

delavirdin, didanosin, dokosanol, eduksudin, efavirenz, emtrisitabin, enfuvirtid, entekavir, ekoliver, famsiklovir, fomivirsen, fosamprenavir, foskarnet, fosfonet, gansiklovir, ibasitabin, imunovir, idoksuridin, imikuimod, indinavir, inosin, interferon tip I, interferon tip II, interferon tip III, interferon, lamivudin, lopinavir, 5 lovrid, maravirok, moroksidin, metisazon, nelfinavir, nevirapin, neksavir, nitazoksanit, novir, oseltamivir, peginterferon alfa-2a, pensiklovir, peramivir, plekonaril, podofilotoksin, proteaz inhibitörü, nükleosit analogları, ralgetavir, ribavirin, rimantadin, ritonavir, piramidin, saquinavir, sofosbuvir, stavudin, telaprevir, tenofovir, tipranavir, trifliridine, trizivir, tromantadin, trovada, 10 valasiklovir, valgansiklovir, vidarabin, viramidin, zalsitabin, zanamivir, zidovudin'i ve bunların ikili veya üçlü kombinasyonları ve/veya enkapsülasyonlarından oluşan bir grubun içerisinde seçilen en az bir ajan içermektedir.

15 **21.** İstem 18'e göre bir farmasötik bileşim olup antiparazitik etki gösteren aktif bileşikler olarak; nitazoksanit, melarsoprol, eflornitin, metronidazol, tinidazol, miltefosin, mebendazol, pirantel pamoat, tiyabendazol, dietilkarbamazin, ivermektin, niklosamid, prazikuantel, albendazol, rifampin, amfoterisin B, fumagillin, furazolidon, nifursemizon, nitaksozanid, ornidazol, paramomisin 20 sülfat, pentamidin, pirimetamine, tinidazol, albendazol, mebendazol, tiyabendazol, fenbendazol, triklabendazol, flubendazol, abamektin, dietilkarbamazin, ivermektin, suramin, pirantel pamoat, levamisol, niklosamid, nitasokzanid, oksiklonazd, monepantel, derquantel, amfoterisin B, üre stibamin, sodyum stiboglukonat, meglumin antimoniya, paromomisin, miltefosin, 25 flukonazol, pentamidin'den ve bunların ikili veya üçlü kombinasyonları ve/veya enkapsülasyonlarından oluşan bir grubun içerisinde seçilen en az bir ajan içermektedir.

30 **22.** İstem 18'e göre bir farmasötik bileşim olup ekstraselüler veziküller ve/veya nanotaşıyıcı sistemlerle kombine olarak antineoplastik etki gösteren aktif bileşikler olarak; siklofosfamid, ifosfamid, temozolomid, kapesitabin, 5-floro

5 urasil, metotreksat, gemsitabin, pemetrekset, mitomisin, bleomisin, epirubisin, doksorubisin, etoposit, paklitaksel, irinotekan, dosetaksel, vinkristin, karboplatin, cisplatin, okzaliplatin, bevacizumab, setuksimab, gefitinib, imatinib, trastuzumab, denosumab, rituksimab, sunitinib, zoledronat, abirateron, anastrozol, bikalutamid, eksemestan, goserelin, medroksiprogesteron, oktreotid, tamoksifen, bendamustin, karmustin, klorambusil, lomustin, melfalan, prokarbazin, streptozosin, fludarabin, raltitrexed, aktinomisin D, daktinomisin, doksorubisin, mitoksantron, eribulin, topotekan, vinblastin, vinorelbin, afatinib, aflibersept, krizotinib, dabrafenib, interferon, ipilimumab, lapatinib, nivolumab, panitumumab, pembrolizumab, 10 pertuzumab, sorafenib, trastuzumab emtansin, temsorilimus, vemurafenib, ibandronik asit, pamidronat, bexarotan, buserelin, siproteron, degareliks, folinik asit, fulvestrant, lanreotid, lenalidomid, letrozole, leuprorelin, megestrol, mesna, talidomid, vinkristin'den ve bunların ikili veya üçlü kombinasyonları ve/veya enkapsülasyonlarından oluşan bir grubun içerisinde seçilen en az bir ajan 15 içermektedir.

23. İstem 18-22'den herhangi birine göre bir farmasötik bileşim olup en az bir etkin madde içerir.

20 **24.** İstem 18-23'den herhangi birine göre bir farmasötik bileşim olup, tedavide uygulama yönteminin; parenteral, intravenöz, intradermal, subkutan, intraperitoneal, topikal, intratekal, intranasal, intraserebroventriküler, oküler, vajinal, üretral, transdermal, sublingual, subaraknoid, rektal, periodontal, perinöral, peridural, periartiküler, oral, intratimpanik, intratumor, intrapulmoner, 25 intrasinovial, intramuskuler, intraovarian, intrameningeal, intracorporus kavemosum, intrakoronar, intraserebral, epidural, kütanöz, bukkal, dental'den oluşan bir gruptan seçilen en az bir uygulama yöntemi olmasıdır.

25. Adjuvan olarak kanser tedavisi için kullanılan İstem 1'e göre ekstrasellüler 30 veziküller.

25418.89

- 26.** İstem 18-24'den herhangi birine göre bir farmasötik bileşim olup, parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin, 3D-MPL, kolesterol, CG oligonukleotid içeren alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat, tokoferol, emülsiyon sistemlerinden en az birinin veya bunların ikili veya daha fazla kombinasyonu içerisinde bulunması ile oluşturulmaktadır.
- 5

TARİFNAME
PARAZİTLERİN VE PARAZİTLERDEN ELDE EDİLEN
EKSTRASELÜLER VEZİKÜLLERİN KANSER TEDAVİSİNDE
KULLANIMI

5

Teknik Alan

Bu buluş kanser tedavisi amacıyla parazitleri ve parazitlerden izole edilen ekstraselüler veziküllerin kullanımı ile ilgilidir.

10 **Önceki Teknik**

Kanser günümüzün en tehlikeli ve sık rastlanan hastalıklarından biridir. 2012 yılında dünyada ortalama 14.1 milyon yeni kanser vakası olduğu düşünülmektedir [1]. Birçok farklı kimyasal ve biyolojik ajan kanser tedavisinde denenmiş olsa da geliştirilen tedavi yöntemleri etkinliklerinin düşük ve yan etkilerinin yüksek olması dolayısıyla yetersiz kalmaktadır. Örneğin, kemoterapi göğüs kanseri gibi birçok kanser türünde en sık başvurulan tedavi yöntemi olsa da vücutta kemik iliği, saç ve sindirim sistemi gibi birçok sağlıklı dokuya ciddi zararlar verir [2]. Tedavi metotlarının yetersizliği, bilim insanlarını kanser alanında yeni metotların denemeye itmiştir. Bu denemeler arasında, eksozomlar etkili sonuçlar vaat etmektedir.

20

Başvuru kapsamında kullanılan “neoplastik hastalıklar” ifadesi, habis (malign) tümörlere veya kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize olan bir fizyolojik duruma, örneğin kanser hastalığına işaret etmektedir. Bu kapsamda, “neoplastik hastalık” ve “kanser” terimleri birbiri ile değişebilir şekilde kullanılabilir. Kanser örnekleri karsinoma, lenfoma, blastoma sarkoma ve lösemiye içermekte olup bunlarla sınırlı değildir.

25

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

30

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

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

Kanserin tedavisi adına sıklıkla, cerrahi operasyon ve/veya kemoterapi kullanılmaktadır. Cerrahi operasyon, bazı vakalarda, tam ve etkili bir sonuç doğururken; genellikle, hayatta kalan ve uzun zamanda kanser oluşumunu tetikleyecek olan kanserli hücreler ihtimaline karşı, ameliyat sonrası kemoterapötik ilaç uygulanması söz konusudur. Çoğunlukla kemoterapi, kanserli hücrenin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar vererek bir takım yan etkilere neden olur. Vücutta çoğalma hızı yüksek olan hücreler kemoterapiden en çok etkilenen hücrelerdir ki bunlar da saç, kemik iliğinde üretilen kan hücreleri ve sindirim sistemi hücreleridir.

25

Kemoterapi sonrası sıklıkla gözlemlenen yan etkiler;

- *Halsizlik*: Çoğunlukla kan hücrelerinin etkilenmesinden dolayı oluşan anemi sebebi ile olsa da kaynağı psikolojik de olabilir.
 - *Bulantı ve Kusma*: İlaçlara olan duyarlılıktan dolayı olabileceği gibi psikolojik sebepler ile de olabilir.
- 30

- *Saç Dökülmesi:* Hızlı büyümelerinden dolayı kemoterapiden özellikle olumsuz olarak etkilenen saçın dökülmesi, hastaların psikolojilerinin bozulmasındaki en büyük nedenlerden birisidir.
- 5 • *Kan Değerlerinin Düşmesi:* Kemik iliğinin kemoterapiden etkilenmesi, kan hücrelerinde kayda değer bir düşüş olması ile sonuçlanır. Bu düşüşün sonucu olarak da dokulara yeterli oksijen gidememesinden, bağışıklığın zayıflamasına kadar kan pıhtılaşmasındaki zorluklara kadar birçok olumsuzluk gözlemlenebilir.
- 10 • *Ağız Yaraları:* Kemoterapi ilaçları bazen ağız içerisinde iltihaplı yaralara neden olabilir. Bu süreçte hastaların, aşırı sıcak veya soğuk içeceklerden kaçınmaları ve ağız hijyenlerine azami dikkat göstermeleri gerekmektedir.
- 15 • *İshal veya Kabızlık:* Sindirim sistemi hücrelerinin farklı kemoterapik ajanlara karşı gösterdikleri tepki sonucu ishal veya kabızlık gözlemlenebilir. Çoğunlukla diyet ile etkileri azaltılabilen bu durum, kimi vakalarda damar yolundan sıvı alınmasının gerektiği kadar şiddetli ishale de dönüşebilir.
- 20 • *Cilt ve Tırnak Değişiklikleri:* Kemoterapötik ilaçlar cilt renginde koyulaşma, ciltte soyulma, kızarıklık veya kuruluk yan etkilere sahiptir. Tırnakların kolay kırılması veya renklerinin koyulaşması da gözlemlenebilir. Özellikle ciltteki soyulmalara, bağışıklığı zayıflamış olan hastalarda açık yara oluşturacağından dolayı, çok dikkat edilmesi gerekir.
- 25 • *Uyku Problemleri:* Genellikle psikolojik sebeplerle ortaya çıksa da vücudun özellikle kemoterapi sırasında dinlenememesi durumu hem kemoterapinin etkisini azaltan hem de hastanın ruh sağlığını daha da bozan bir durumdur.

Tedavi başarısının artması için kemoterapinin gerek cerrahi operasyonla gerekse diğer yöntemlerle birlikte kullanılması gerekliliği ile birlikte, yan etkilerinin çokluğu ve hastadan hastaya değişmesinden dolayı tahmin edilemezliği, bilim 30 insanların yeni tedavi yöntemleri aramaya itmiştir.

Nauts ve ark. (1953) mikroorganizmaların antitümör yanıt oluşturabileceğini göstermişlerdir. Zayıflatılmış ya da genetik olarak modifiye edilmiş, patojenik olmayan organizmaların antitümör ajan olarak kullanılabileceği fikri üzerinde çalışmışlardır [3]. *Toxoplasma gondii* and *Acanthamoeba castellanii*'nin antitumor aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Bu gelişmelerin ışığında, mikroorganizmalarla onkolojide yeni bir tedavi alanı oluşmuş, ilk kez 1931 yılında kullanılan "Biyoterapi" adı altında araştırma ve gelişme çalışmaları yapılmıştır [4, 5, 6, 7, 8].

Baird ve ark. (2013), zayıflatılmış *Toxoplasma gondii* parazitini B16F10 murin melanom tedavisinde kullanmışlar, *Toxoplasma gondii* verilen farelerde, güçlü bir CD8+ T hücre-kaynaklı antitümör yanıtın oluştuğunu göstermişlerdir [9].

Bose ve ark. (2016) yaptığı çalışmada, ısı ile zayıflatılmış *Leishmania donovani*'nin HepG2 karaciğer kanser hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) kaynaklı p53'ye bağlı mitokondrial yolağında apoptozun indüklendiği sonucuna varmışlardır [10].

Yang ve ark. (2017), *Plasmodium* ile enfekte edilmiş farelerden izole edilen eksozomları Lewis akciğer kanser modelinde denemişler ve tumor anjiyogenezini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir [11].

Mevcut tedavi yöntemlerini geliştirmek ve yan etkileri azaltabilmek adına başlatılan çalışmalarda eksozomlar elde edildikleri hücrenin spesifik kargo içeriklerini taşımaları ile hedeflemede kullanılabilirliği dolayısıyla ön plana çıkmıştır.

Ekstraselüler veziküller; hücreler arasında maddelerin taşınmasında görev alan ve sitoplazma sıvısından en az bir çift tabakalı lipit katmanlı küçük keseciklerdir. Ekstraselüler veziküllerden biri olan eksozomlar ise, yüksek ökaryotlara, bitkilere kadar birçok organizma tarafından salgılanan, farklı boyutlarda bulunabilen çift tabakalı lipit zar taşıyan veziküllerdir. Bu veziküllerin önemi, hücresel fonksiyonu

etkilemek amacıyla diğer hücelere bilgi aktarma kapasitesi altında yatar. Eksozomlar ile sinyal aktarımı, proteinler, lipidler, nükleik asitler ve şekerlerden oluşan birçok farklı kategorideki biyomoleküller aracılığı ile gerçekleştirilir [12]. Üretildikleri hücrenin yüzey proteinlerini taşıdıkları için, eksozomlar *in vivo* sistemlerde verildikleri hücre türüne güdümlüdürler. Bu özellikleri, eksozomları, ilaç, biyoaktif madde ve gen terapisi için nükleik asitleri taşımakta elverişli kılar. Eksozomların bir diğer ayırt edici yanı, taşıdıkları sinyallerin ve kargoların üretildikleri hücreye ve hücrenin o anda bulunduğu fizyolojik durumlara has olmalarıdır. Farklı canlıların eksozomları, aynı canlının farklı türdeki hücrelerinin eksozomları ve aynı hücrenin ayrı koşullardaki eksozomları farklı özellikler gösterir.

Her hücre kendi amaçlarına yönelik eksozomlar üretir. Kanser hücrelerinin ürettikleri eksozomlar ile vücutta kendileri için elverişli bir ortam yarattıkları [13], bağışıklık sisteminden kaçtıkları [14, 15] ve metastasis için eksozomlardan faydalandıkları [16] keşfedilmiştir. Vücudun kansere karşı cevabında ise kök hücre eksozomlarının [17] ve özellikle bağışıklık sistemi hücreleri olan dendritik hücrelerin eksozomlarının [18, 19] birçok çalışması bulunmaktadır. Başarılı sonuçlar gösteren bir başka eksozom kaynağı bitkilerdir. Limondan elde edilen eksozomlar kronik miyeloid lösemi modeli üzerinde tedavi amacıyla başarılı bir şekilde kullanılmıştır [20].

Bütün ökaryotik hücreler kendi eksozomlarını üretirler, buna ökaryotik parazitler de dahildir. Leishmaniasis, *Leishmania protozoan* parazitlerinin enfeksiyon kapmış dişi tatarcık (sandfly) sineklerinin ısırması ile insana taşınan, vektörel kaynaklı bir grup hastalığa verilen ortak addır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre Leishmaniasis, Türkiye ve ülke coğrafyası da dahil olmak üzere özellikle Güney Avrupa, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkeleri dahil dünya çapında 60'dan fazla ülkede yaygın görülmektedir.

5 Teknikte bilinen uygulamalardan EP1687025 sayılı Avrupa patent başvurusunda, interlökin 18 ve saponin destekleyici sistemi içeren bir aşı kompozisyonundan bahsedilmektedir. Buluş kapsamında açıklanan kombinasyon terapisinin, bulaşıcı hastalıklar, kanserler, otoimmün hastalıklar ve ilişkili koşulların tedavisinde ve korunmasında kullanışlı olduğu belirlenmiştir.

10 Teknikte bilinen uygulamalardan CN102988417 sayılı Çin patent başvurusu dokümanında, hastalıkların önlenmesi ve kontrolü için helmantik parazit biyolojik ajanlarının kullanımından bahsedilmektedir. Bu parazit preparatları, bir düzenleyici T hücresi fonksiyonunu etkilemektedir. Parazit preparatının uygulanmasıyla düzenleyici T hücre aktivitesi değiştirilerek bir hastalığın tedavisi gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem ile tedavi edilen hastalıklardan olarak Th1 veya Th2 ilişkili kanser gösterilmektedir.

15 **Buluşun Kısa Açıklaması**

20 Buluşun amacı, parazit ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin kanser tedavisinde kullanımınıdır. Parazit eksozomlarının sağlıklı hücrelere yan etki göstermeksizin doğrudan kanser hücrelerinde yanıt oluşturmaktadır. Ayrıca, eksozomların ilaç yükleme kapasitesinden yararlanılarak eksozomlara etkin madde yüklenebilmekte; böylece hedef hücreye spesifik ilaç taşınması yapılarak ilacın biyoyararlanımının artırılması ile tümöre spesifik hedef bölgede istenilen etkinin alınması gerçekleştirilmektir. Buluş kapsamında, ekstraselüler veziküller (eksozomlar) için kaynak olarak özellikle *Leishmania infantum* paraziti kullanılmaktadır.

25

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Bu buluşun amacına ulaşmak için gerçekleştirilen “**Parazitlerin ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin kanser tedavisinde kullanımı**” ekli şekillerde gösterilmiş olup; bu şekillerden:

- Şekil 1** – *Leishmania infantum* parazitlerinin U87 hücreleri ile birlikte 2 farklı dozda inkübasyonunun hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin değerlendirilmesinin grafiksel gösterimidir.
- 5 **Şekil 2** – Kültür ortamındaki U87 hücrelerinin parazit ile inkübasyonundan 8 saat sonraki parazit enfeksiyonunu gösteren ışık mikroskobu fotoğrafının gösterimidir
- Şekil 3** – *Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların 8 farklı dozda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada U87 hücrelerinin hücre canlılığına etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 10 **Şekil 4** – *Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların 8 farklı dozda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada A172 hücrelerinin hücre canlılığına etkisinin grafiksel gösterimidir.
- Şekil 5** – *Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların 8 farklı dozda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada SHSY5Y hücrelerinin hücre canlılığına etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 15 **Şekil 6** – *Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların 8 farklı dozda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada SH4 hücrelerinin hücre canlılığına etkisinin grafiksel gösterimidir.
- Şekil 7** – *Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların 8 farklı dozda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada 22RV hücrelerinin hücre canlılığına etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 20 **Şekil 8** – *Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların 8 farklı dozda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada hDF hücrelerinin hücre canlılığına etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 25 **Şekil 9** – *Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların 8 farklı dozda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada Hacat hücrelerinin hücre canlılığına etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 30 **Şekil 10** – *Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların 8 farklı dozda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada Astrosit hücrelerinin hücre canlılığına etkisinin grafiksel gösterimidir.

- 5 **Şekil 11** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 48 saatlik uygulamada, SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde Bax gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 5 **Şekil 12** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 48 saatlik uygulamada SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde Bcl-2 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 10 **Şekil 13** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 48 saatlik uygulamada SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde Caspase 3 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 10 **Şekil 14** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 48 saatlik uygulamada SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde p53 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 15 **Şekil 15** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 3 saatlik uygulamada SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde p21 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 15 **Şekil 16** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 3 saatlik uygulamada Astrosit hücrelerinde p21 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 20 **Şekil 17** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 3 saatlik uygulamada SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde p53 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 25 **Şekil 18** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 3 saatlik uygulamada Astrosit hücrelerinde p53 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 25 **Şekil 19** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 3 saatlik uygulamada SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde Caspase3 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.
- 30 **Şekil 20** –*Leishmania infantum* parazitlerinden elde edilen eksozomların tek dozda 3 saatlik uygulamada Astrosit hücrelerinde Caspase3 gen ifadesine etkisinin grafiksel gösterimidir.

Buluş, parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin, neoplastik hastalıkların tedavisi için kullanılmasıdır. Bu “neoplastik hastalıklar” ifadesi habis (malign) tümörlere veya kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize olan bir fizyolojik durum olup, kanser hastalığına işaret eder. Buluş kapsamında

5 “neoplastik hastalık” ve “kanser” terimleri birbiri ile değişebilir şekilde kullanılabilir. Neoplastik hastalık olarak; meme kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser, deri kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mezotelyom, gastrointestinal kanser, pankreas kanseri, sarkoma, blastoma, lenfoma, gliyoblastom, nöroblastom, vulva kanseri, rahim

10 ağız kanseri, endometriyal karsinom, yumurtalık kanseri, karaciğer kanseri, hepatom, lösemi, mesane kanseri, böbrek kanseri, tükürük bezi karsinomu, tiroid kanseri ve çeşitli baş ve boyun kanserlerinden oluşan bir gruptan seçilen en az bir kanser hastalığı için olabilmektedir. Buluş kapsamında, glioblastoma hücre hattı olan U87 kanser hücrelerinin ve A172 kanser hücrelerinin, nöroblastoma hücre

15 hattı olan SHSY-5Y kanser hücrelerinin, melanoma hücre hattı olan SH4 kanser hücrelerinin, prostat hücre hattı olan 22RV kanser hücrelerinin öldürülmesi şeklinde kanser tedavisi gerçekleştirilmektedir.

Buluş konusu, *Leishmania* parazitlerin ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler

20 veziküllerin seçici olarak kanser hücrelerini öldürmesi sebebiyle kanser tedavisinde kullanılmalarını ele almaktadır. Buluşun geliştirilmesi kapsamında, parazitlerin ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin kanser üzerinde yüksek derecelerde ölümcül olduklarını, fakat sağlıklı hücreler üzerinde neredeyse hiçbir yan etki göstermediği gözlemlenmiştir.

25

Buluş kapsamında, parazit eksozomlarının ilaç yükleme kapasitesinden yararlanılarak eksozomlara etkin madde yüklenebilecek; hedef hücreye spesifik ilaç taşınması yapılabilecek, böylece ilacın biyoyararlanımı artırılarak hedef bölgede istenilen etkinin alınması sağlanabilecektir.

30

Buluşun farklılığı, kanser tedavisinde *Leishmania* parazitinden izole edilen eksozomların kullanılmasıdır. Önceki teknik başlığı altında bahsedilen çalışmalarda direkt parazitlerin kullanılması, parazitlerin hastalık oluşturması nedeniyle tedavide kullanılmaları önünde ciddi bir engeldir. Buluş konusunda ise, 5 parazitlerden elde edilen eksozomlar kullanılarak, direkt parazitlerin kullanımındaki olası hastalık riskinin önüne geçilmektedir.

Buluştaki aralarında *Leishmania infantum* parazitinin de yer aldığı çeşitli parazitler ve parazitlerden elde edilen eksozomlar kanser tedavisinde kullanılmaktadır. 10 Buluş kapsamında, burada kullanılan “parazitler” *Acanthamoeba* sp. (*Acanthamoeba castellanii*), *Echinococcus* spp., *E. histolytica* spp., *Ancylostoma brazilense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum*, and *Uncinaria stenocephala*., *Angiostrongylus cantonensis*, *Ascaris*, *Giardia*, *Leishmania* spp. (15 *L. Arabica*, *L. archibaldi*, *L. aristedesii*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. colombiensis*, *L. Deanei*, *L. donovani*, *L. enriettii*, *L. equatorensis*, *L. forattinii*, *L. garnhami*, *L. gerbil*, *L. guyanensis*, *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. infantum*, *L. killicki*, *L. lainsoni*, *L. major*, *L. Mexicana*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoi*, *L. shawi*, *L. tarentolae*, *L. tropica*, *L. turanica*, *L. venezuelensis*), *Plasmodium* spp. (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*), *Schistosoma* spp., *Toxoplasma* spp. 20 (*Toxoplasma gondii*), *Trypanosoma brucei* ssp. türlerini içermektedir. Buluş kapsamında yukarıda sıralanan bu parazitlerden biri kullanılabildiği gibi, bunlardan en az bir parazit kaynaklı olan bir parazit veya parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküller kullanılmaktadır.

Buluş kapsamında, parazit olarak *Leishmania infantum* seçilmekte olup, 25 parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin karakterize edilmesinde parazit olarak *Leishmania infantum* seçilmektedir. Kanser tedavisinde kullanımı parazitlerin kültür medyası olabilmektedir.

Buluş kapsamında parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler 30 veziküllerinin, parazit antijenlerinin (ısı ile inaktive edilmiş veya direkt antijenin kendisi), genetik materyalinin (mRNA, small RNA, mitochondrial DNA, DNA

fragments), gen transferi ve transfekte olmuş parazitlerin (plazmid aktarımı, lentiviral, SV40 antijeni ile elektroporasyon), CRISPR (nükleodit düzenleme içeren yöntemler) kanser tedavisi için kullanılmaktadır. Bunlar, kanser tedavisinde nano taşıyıcı sistemler içerisine enkapsüle edilerek kullanılmaktadır.

5

Parazitler ve parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin izolasyonu, buluş kapsamında, çift fazlı sıvı sistemleri ile izolasyon (ATPS), dereceli santrifüj, ultrasantrifüj, sukroz gradient ultrasantrifüj, polimerik çöktürme, ultrafiltrasyon, kromatografik yöntemler ile izolasyon (affinite kromatografi (antikor and peptit

10 affinite), boyut ayrımı kromatografisi (boyut dışlama kromatografisi)), mikro boncuklar ile izolasyondan iyon yüküne göre çöktürme (elektriksel yük bazlı çöktürme), salting tuzla çöktürme yöntemlerinden en az bir izolasyon yöntemi kullanılmaktadır. Buluş kapsamında tercih edilen çift fazlı sıvı izolasyon yöntemi:

- Ekstaselüler veziküllerin izole edileceği parazitin kültür medyasının

15 toplanması,

- kültür medyasının hücre artıkları ve parazitler gibi istenmeyenlerden uzaklaştırılması amacıyla 5-20 dakika süreyle 2,000g-10,000g arasında bir hızda santrifüj edilmesi,
- santrifüj sonrasında filtreleme ile 220 nm ve üstü boyuttaki parçacıkların

20 uzaklaştırılması,

- santrifüj işlemi ile elde edilen vezikül-protein karışımının ayrıştırılması amacıyla PEG fazı ve DEX fazı içeren çift fazlı sıvı sistemi içerisine alınması,
- PEG fazının proteinlere, DEX fazının ise fosfolipid yapılı membranlara

25 olan kimyasal eğiliminden yararlanılarak veziküllerin; vezikül dışı proteinlerden, hücresel yağlardan ve diğer kirliliklerden arındırılması,

- izole edilmiş veziküllerin elde edilmesi adımlardan oluşmaktadır.

Buluş kapsamında geliştirilen ve parazitler ve parazitlerden elde edilen

30 ekstraselüler vezikülleri içeren bir formülasyon; veziküller, emülsiyon sistemleri, biyolojik ve kimyasal yapılı nanopartiküller (polimerik nanopartiküller, katı lipid

nanopartiküller), inorganik yapılı nanopartiküller (metalik nanopartiküller), lipid yapılı veziküler sistemler (lipozomlar, niozomlar ve etozomlar), dendrimerler, polimer ilaç- konjugatları miseller, karbon nanotüplerden oluşan bir gruptan seçilen nano taşıyıcı sistemler içermektedir. Bu formülasyon; diğer etken madde

5 antiparazitik, antibakteriyel, antiviral, antineoplastik ve/veya sitotoksik ve/veya antimetastatik etki gösteren bilinen aktif bileşikler ve bunların ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşan bir gruptan seçilen en az bir aktif bileşik içermektedir. Bu formülasyon antibakteriyel etki gösteren aktif bileşik olarak;

10 amikasin, gentamisin, kanamisin, neomisin, netilmisin, tobramisin, paromisin, streptomisin, spektinomisin, geldanamisin, herbimisin, rifaksimisin, lorakarbef, ertapenem, doripenem, imipenem, meropenem, sefadroksil, sefazolin, sefalotin, sefaleksim, sefaklor, sefamandol, sefoksitin, sefprozil, sefuroksim, sefiksim, sefdinir, sefditoren, sefoperazon, sefotaksim, sefpodoksim, seftazidim, seftibüten, seftizoksim, sefepim, seftarolin fosamil, seftobiprol, teikoplanin, vankomisin,

15 televansin, dalbavansin, oritavansin, clindamisin, linkomisin, daptomisin, azitromisin, klaritromisin, diritromisin, eritromisin, roksitromisin, troleandomisin, telitromisin, spiramisin, aztreonam, furazolidon, nitrofurantoin, linezolid, pozizolid, radezolid, torezolid, amoksisilin, ampisilin, azlosilin, karbenisilin, kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin, mezlosilin, metisilin, nafsilin, okzasilin,

20 penisilin G, penisilin V, piperasilin, temosilin, tikarsilin, klavulanat, sulbaktam, tazobaktam, basitrasin, kolistin, polimiksin B, siprofloksasin, enoksasin, gatifloksasin, gemifloksasin, levofloksasin, lomefloksasin, moksifloksasin, nalididik asit, norfloksasin, ofloksasin, trovafloksasin, grepafloksasin, sparfloksasin, temafloksasin, mafenid, sulfasetamid, sulfadiazin, sülfadimetoksin,

25 sülfametizol, sülfametoksazol, sulfanilimid, sülfasalazin, sülfisoksazol, trometoprim, demeklosiklin, doksisiklin, minosiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, klofazimin, dapson, kapreomisin, sikloserin, etambutol, isoniyazid, pyrazinamid, rifampisin, rifabutin, rifapentin, streptomisin, arsfenamin, kloramfenikol, fosfomisin, fusidik asit, metronidazol, mupirosin, platensimisin, kinupristin,

30 dalfopristin, tiamfenikol, tigesiklin, tinidazol, trimetoprim'i ve bunların ikili veya üçlü kombinasyonları ve/veya enkapsülasyonlarından oluşan bir grubun

içerisinde seçilen en az bir ajan içermektedir. Bu formülasyon antiviral etki gösteren aktif bileşik olarak; abakavir, asiklovir, adefovir, amantadin, amprenavir, ampligen, arbidol, atazanavir, atripla, balavir, sidofovir, kombivir, dolutegravir, darunavir, delavirdin, didanosin, dokosanol, eduksudin, efavirenz, emtrisitabin, enfuvirtid, entekavir, ekoliver, famsiklovir, fomivirsen, fosamprenavir, foskarnet, fosfonet, gansiklovir, ibasitabin, imunovir, idoksuridin, imikuiomod, indinavir, inosin, interferon tip I, interferon tip II, interferon tip III, interferon, lamivudin, lopinavir, lovirod, maravirok, moroksidin, metisazon, nelfinavir, nevirapin, neksavir, nitazoksanit, novir, oseltamivir, peginterferon alfa-2a, pensiklovir, peramivir, plekonaril, podofilotoksin, proteaz inhibitörü, nükleosit analogları, ralgetavir, ribavirin, rimantadin, ritonavir, piramidin, saquinavir, sofosbuvir, stavudin, telaprevir, tenofovir, tipranavir, trifliridine, trizivir, tromantadin, trovada, valasiklovir, valgansiklovir, vidarabin, viramidin, zalsitabin, zanamivir, zidovudin'i ve bunların ikili veya üçlü kombinasyonları ve/veya enkapsülasyonlarından oluşan bir grubun içerisinde seçilen en az bir ajan içermektedir. Bu formülasyon antiparazitik etki gösteren aktif bileşikler olarak; nitazoksanit, melarsoprol, eflornitin, metronidazol, tinidazol, miltefosin, mebendazol, pirantel pamoat, tiyabendazol, dietilkarbamazin, ivermektin, niklosamid, prazikuantel, albendazol, rifampin, amfoterisin B, fumagillin, furazolidon, nifursemizon, nitaksozanid, ornidazol, paramomisin sülfat, pentamidin, pirimetamine, tinidazol, albendazol, mebendazol, tiyabendazol, fenbendazol, triklabendazol, flubendazol, abamektin, dietilkarbamazin, ivermektin, suramin, pirantel pamoat, levamisol, niklosamid, nitasokzanid, oksiklonazd, monepantel, derquantel, amfoterisin B, üre stibamin, sodyum stiboglukonat, meglumin antimoniat, paromomisin, miltefosin, flukonazol, pentamidin'den ve bunların ikili veya üçlü kombinasyonları ve/veya enkapsülasyonlarından oluşan bir grubun içerisinde seçilen en az bir ajan içermektedir. Bu formülasyon ekstraselüler veziküller ve/veya nanotaşıyıcı sistemlerle kombine olarak antineoplastik etki gösteren aktif bileşikler olarak; siklofosfamid, ifosfamid, temozolomid, kapesitabin, 5-floro urasil, metotreksat, gempisitabin, pemetrekset, mitomisin, bleomisin, epirubisin, doksorubisin, etoposid,

paklitaksel, irinotekan, dosetaksel, vinkristin, karboplatin, cisplatin, okzaliplatin, bevacizumab, setuksimab, gefitinib, imatinib, trastuzumab, denosumab, rituksimab, sunitinib, zoledronat, abirateron, anastrozol, bicalutamid, eksemestan, goserelin, medroksiprogesteron, oktreotid, tamoksifen, bendamustin, karmustin, 5 klorambusil, lomustin, melfalan, prokarbazin, streptozosin, fludarabin, raltitrexed, aktinomisin D, daktinomisin, doksorubisin, mitoksantron, eribulin, topotekan, vinblastin, vinorelbin, afatinib, aflibersept, krizotinib, dabrafenib, interferon, ipilimumab, lapatinib, nivolumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, sorafenib, trastuzumab emtansin, temsorilimus, vemurafenib, ibandronik asit, 10 pamidronat, bexarotan, buserelin, siproteron, degarelik, folinik asit, fulvestrant, lanreotid, lenalidomid, letrozole, leuprorelin, megestrol, mesna, talidomid, vinkristin'den ve bunların ikili veya üçlü kombinasyonları ve/veya enkapülasyonlarından oluşan bir grubun içerisinde seçilen en az bir ajan içermektedir. Ayrıca bu formülasyon en az bir etkin madde içermektedir. Etkin 15 madde, yukarıda tanımlanmış ve sıralanmış olan maddeleri kapsamaktadır.

Yukarıda açıklanan bu farmasötik bileşimin tedavide uygulama yöntemi; parenteral, intravenöz, intradermal, subkutan, intraperitoneal, topikal, intratekal, intranasal, intraserebroventriküler, oküler, vajinal, üretral, transdermal, 20 sublingual, subaraknoid, rektal, periodontal, perinöral, peridural, periartiküler, oral, intratimpanik, intratumor, intrapulmoner, intrasinovial, intramuskuler, intraovarian, intrameningeal, intracorporus kavernosum, intrakoronar, intraserebral, epidural, kütanöz, bukkal, dental'den oluşan bir gruptan seçilen en az bir uygulama yöntemidir.

25

Buluş kapsamında ekstraselüler veziküller, adjuvan olarak kanser tedavisi için kullanılmaktadır. Buluş kapsamında açıklanan farmasötik bileşim; parazitlerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin, 3D-MPL, kolesterol, CG oligonukleotid içeren alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat, tokoferol, emülsiyon 30 sistemlerinden en az birinin veya bunların ikili veya daha fazla kombinasyonu içerisinde bulunması ile oluşturulabilmektedir.

Buluşun amacı doğrultusunda kanser tedavisinde kullanılacak parazitlerin ve parazit ekstraselüler veziküllerinin üretilmesi, aşağıdaki adımları içermektedir:

5 **1. Parazitlerin kültürü**

Leishmania infantum (MHOM/MA/67/ITMA-P263) promastigotları 27 °C'de RPMI mediumunda (ısıca inaktive ettirilmiş %10 fetal bovin serum, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomisin eşliğinde) inkübe edilir. Logaritmik faza ulaşan parazitler (10⁶/ml) enfektif hale
10 getirilir.

2. Kültüre edilmiş parazitlerin glioblastoma kanseri ile muamele edilip Annexin V deneyi ile apoptoz miktarlarının ölçümü

15 Kültür ortamındaki glioblastoma U87 hücrelerinin üzerine hazırlanmış olan parazitler eklenir. 2 farklı doz olmak üzere (U87 hücrelerinin 50 ve 100 katı) verilen parazitler 8 saat inkübe edildikten sonra U87 hücrelerinin üstündeki parazitler uzaklaştırılır. Ertesi gün Annevin V solüsyonu eklenerek ölüm oranı akış sitometrisi cihazında ölçülür.

20

3. Parazit medyasının toplanması

Buluşun kapsamında parazit ekstraselüler vezikülleri, çift fazlı sıvı sistem ile izolasyon, dereceli santrifüj, ultrafiltrasyon, kromatografik yöntemler, polimer bazlı izolasyon, mikro boncuklar ile izolasyondan oluşan bir gruptan seçilen bir
25 izolasyon yöntemiyle izole edilmektedir. Aralarından en saf bir şekilde ekstraselüler vezikül izolasyonu çift fazlı sıvı sistem ile izolasyon ile sağlanmaktadır ve bu sebeple başvuru kapsamında bu izolasyon yöntemi tercih edilmektedir.

30 Buluş kapsamında kullanılan parazit ekstraselüler veziküllerinin izolasyonu için kullanılan çift fazlı sıvı sistem ile izolasyon yöntemi,

- Ekstraselüler veziküllerin izole edileceği parazitin kültür medyasının toplanması
- Kültür medyasının hücre artıkları ve parazitler gibi istenmeyenlerden uzaklaştırılması amacıyla 5-20 dakika süreyle 2,000g-10,000g arasında bir hızda santrifüj edilmesi,
- Santrifüj sonrasında filtreleme ile 220 nm ve üstü boyuttaki parçacıkların uzaklaştırılması
- Santrifüj işlemi ile elde edilen vezikül-protein karışımının ayrıştırılması amacıyla PEG fazı ve DEX fazı içeren çift fazlı sıvı sistemi içerisine alınması,
- PEG fazının proteinlere, DEX fazının ise fosfolipid yapılı membranlara olan kimyasal eğiliminden yararlanılarak veziküllerin; vezikül dışı proteinlerden, hücresel yağlardan ve diğer kirliliklerden arındırılması,
- İzole edilmiş veziküllerin elde edilmesi adımlarından oluşmaktadır.

15

4. MTS

Hücreler kültür ortamında %10 fetal bovin serum (Invitrogen) ve %1 PSA (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) içerisinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning Glasswork, Corning, NY) 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildikten sonra 1., 2. ve 3. günlerde hücrelerin canlılık düzeyleri ölçülmüştür. Hücre canlılığı 3-(4,5-di-metil-tiazol-2-il)-5-(3-carboksi-methoksi-fenil)-2-(4-sulfo-fenil)-2H-tetrazolyum (MTS)-metodu (CellTiter96 Aqueous One Solution; Promega, Southampton, UK) kullanılarak ölçüldü. 100µl büyüme besiyeri içerisinde olan hücrelerin üzerine 10µl MTS solüsyonu eklenmiş ve 2 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra 490nm dalga boyunda ELISA plaka okuyucu (Biotek, Winooski, VT) cihazı ile aborbans ölçümü yapılarak canlılık analizi gözlemlenmiştir.

25

5. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

Hücreler kültür ortamında %10 fetal bovin serum (Invitrogen) ve %1 PSA (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) içeren Dulbecco's modified Eagle's

30

medium (DMEM) içerisinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning Glasswork, Corning, NY) 150.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildikten sonraki gün, hücreler çeşitli dozlarda (10-40 ug/ml) parazit eksozomu ile inkübe edilmiş, inkübasyondan 3. ve 48. saat sonra hücrelerdeki p21, p53, caspase 3, Bcl-2 ve Bax gen ifadelerine bakılmıştır. Özetle, hücrelerden Trizol® ile RNA izolasyonu yapılmış, NanoDrop spektrofotometresi ile total RNA konsantrasyonları ölçülmüş ve sonrasında cDNA kiti (Roche) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. RT-PCR, SYBR Green Kit (Thermofisher scientific) kullanılarak 95 °C for 15 dk, 39 döngüde 95 °C 15 sn, 58 °C 1 dk ve 72 °C 30 sn programında tamamlanmıştır. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Buluş konusunun tekniğın bilinen durumu karşısında farklılıklarından biri, parazit ve parazit kültür ortamından izole edilen eksozomların kullanılmasıdır ve hem izole edildiği canlı türü bakımından hem de parazitlerin eksozomunun kullanılması bakımından belirgin bir farklılık yaratmaktadır. Bu eksozomlar hücrelerin dışarıya salgıladıkları kimyasalların sadece bir parçasıdır. Buluş kapsamında parazitlerin ve eksozomlarının hem kanser hem de sağlıklı hücre hatları üzerine olan etkisi gösterilmektedir. Parazitler glioblastoma hücre hattı olan U87 hücrelerinin üzerine hem 50 kat hemde 100 kat olacak şekilde verilip kanser hücrelerinin apoptoz yani ölüm oranları değerlendirilmekte ve 8 saat inkübasyonunun sonucunda iki dozda da yüzde 30'lara varan ölüm gözlemlenmektedir (Şekil 1). Aynı zamanda apoptoza yani ölüme giden hücrelerin *Leishmania infantum* parazitleri ile enfeksiyonunu yaklaşık yüzde 68 oranında olmaktadır (Şekil 2). Sadece parazitlerin değil; aynı zamanda bu parazitlerin salgıladığı ve besi ortamından izole edilen eksozomlar belirli kanser ve sağlıklı hücreler üzerine belirli konsantrasyonlarda (0.78-50 µg/ml) verilip 3 gün boyunca hücre canlılığına bakıldığında U87 glioblastoma hücrelerinde (%40 ve üzeri), SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde (%90 ve üzeri), A172 glioblastomada (%45 ve üzeri), SH4 melanoma hücrelerinde (%90 ve üzeri), 22RV prostat hücrelerinde (%90 ve üzeri) hücre canlılığında azalma, ölüm görülürken; sağlıklı

hücre hatları olan HACAT, hDF ve Astrosit hücrelerinde canlılığa herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (Şekil 3-10).

SHSY-5Y Nöroblastoma hücrelerinde, 10 ug/ml dozda eksozom verilip 48 saat inkübasyondan sonra p53, caspase 3, Bcl-2 ve Bax gen ifadesi Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile tayin edilmiş, sonucunda SHSY-5Y Nöroblastoma hücrelerinde p53, caspase 3 ve Bax geninde anlamlı bir artış ve Bcl-2 gen ifadesinde azalma görülmüştür (Şekil 11-14). SHSY-5Y Nöroblastoma ve Astrosit (NHA) hücrelerinde, 40 ug/ml dozda eksozom verilip 3 saat inkübasyondan sonra p21, p53 ve caspase 3 gen ifadesindeki değişiklikler değerlendirilmiş; SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerinde p21 ve caspase 3 gen ifadelerinde anlamlı bir artış görülmüş, Astrosit (NHA) hücrelerinde ise p21, p53 ve caspase 3 gen ifadelerinin azaldığı sonucuna varılmıştır (Şekil 15-20). Yapılan deneyler ışığında elde edilen sonuç, buluş konusunun, yüksek miktarlarda kanser hücrelerinde ölüme (apoptosis) sebep olurken sağlıklı hücrelerin üzerinde sitotoksik bir etki bırakmayan bir formülasyonun geliştirilmesine uygunluğunu göstermektedir.

Buluş konusunun avantajları aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

- Buluş farklı kanser türleri üzerinde 24 saat içinde neredeyse tamamen etki göstermekte ve sağlıklı hücreler üzerinde yan etki göstermemektedir,
- Parazitler, özellikle *Leishmania* türleri genetik modifikasyonlara son derece açık oldukları için parazitler ve parazitlerin ekstraselüler vezikülleri ihtiyaca göre genetik müdahale ile modifiye edilebilirler, kanser üzerindeki etkinlikleri, parazitlerden elde edile üretim hacmi gibi alanlarda iyileştirmelere açıklardır,
- Eksozomların ilaç yükleme kapasitesinden yararlanılarak eksozomlara etkin madde yüklenebilmekte; böylece hedef hücreye spesifik ilaç taşınması yapılarak ilacın biyoyararlanımının artırılması ile tümöre spesifik hedef bölgede istenilen etkinin alınması sağlanabilmektedir,

25418.89

- Buluřta kullanılan ekstraselöler veziköller yüksek hacimlerde uygun fiyatlarla üretilebilen ürünlerdir.

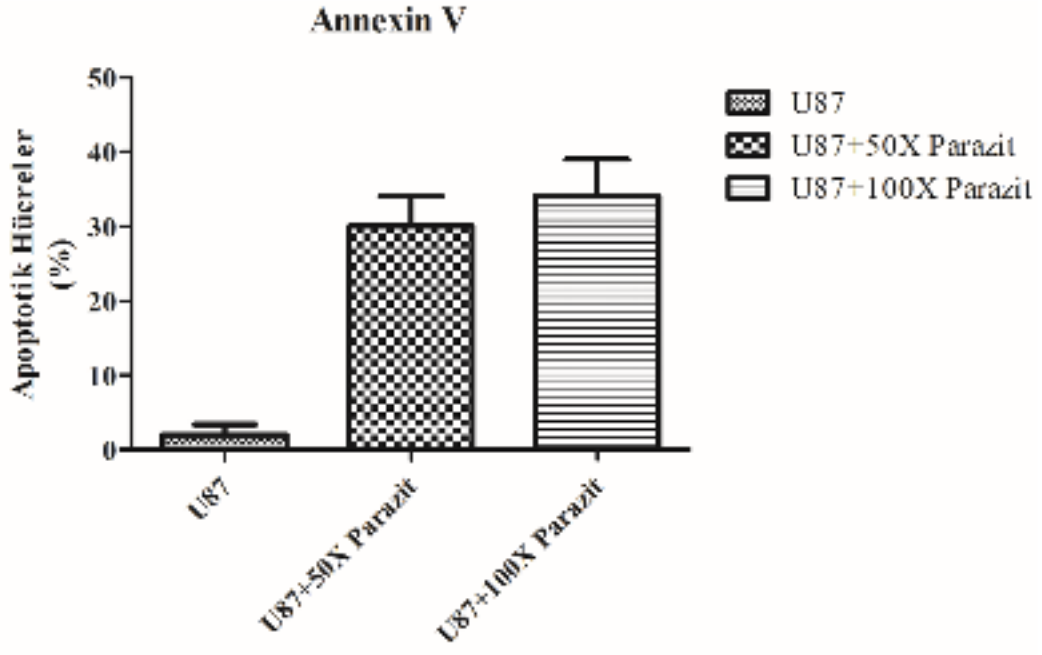
5

KAYNAKLAR

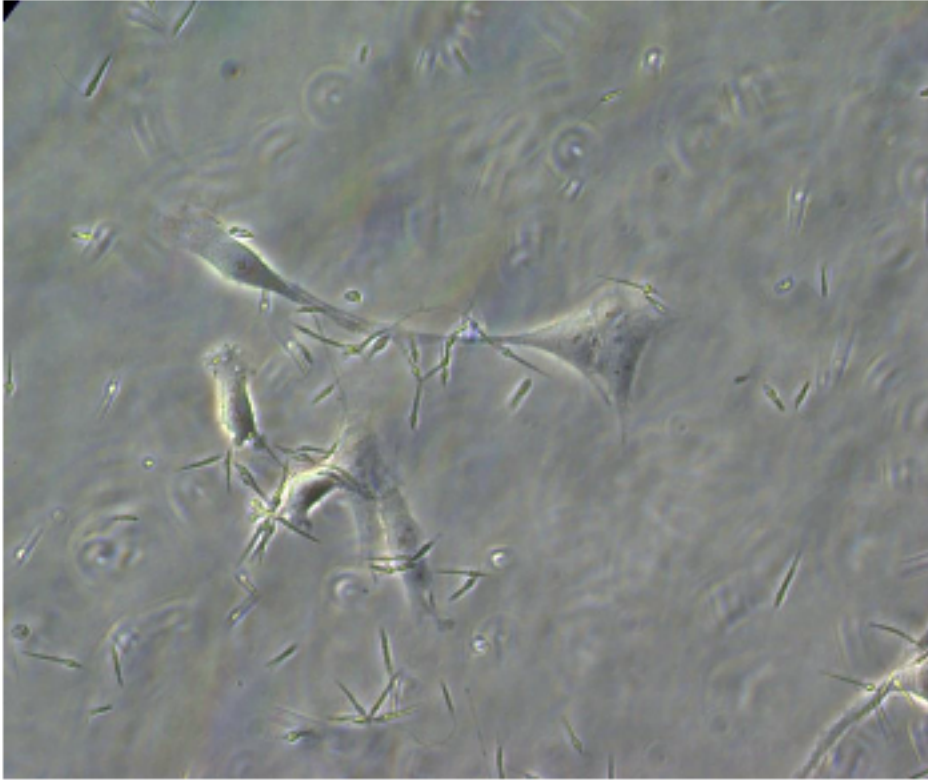
- [1]. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer, 2015. 136(5): p. E359-E386.
- 5 [2]. Tao, J.J., K. Visvanathan, and A.C. Wolff, Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. The Breast, 2015. 24: p. S149-S153.
- [3]. Nauts HC, Fowler GA and Bogatko FH: A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. Acta Med Scand Suppl 1953;276:1-103.
- 10 [4]. Atayde VD, Jasiulionis MG, Cortez M, Yoshida N: A recombinant protein based on trypanosoma cruzi surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. Melanoma Res 2008;18:172-183.
- [5]. Kallinikova VD, Matekin PV, Ogloblina TA, Leikina MI, Kononenko AF, Sokolova NM, Pogodina LS: [anticancer properties of flagellate protozoan trypanosoma cruzi chagas, 1909]. Izv Akad Nauk Ser Biol 2001:299-311.
- 20 [6]. Kim JO, Jung SS, Kim SY, Kim TY, Shin DW, Lee JH, Lee YH: Inhibition of lewis lung carcinoma growth by toxoplasma gondii through induction of th1 immune responses and inhibition of angiogenesis. J Korean Med Sci 2007;22:S38-46.
- [7]. Lopez NC, Valck C, Ramirez G, Rodriguez M, Ribeiro C, Orellana J, Maldonado I, Albini A, Anaconda D, Lemus D, Aguilar L, Schwaeble W, Ferreira A: Antiangiogenic and antitumor effects of trypanosoma cruzi calreticulin. PLoS Negl Trop Dis 2010;4:e730.
- 25 [8]. Roskin Gr, Exempliarskaia E: Protozoeninfektion und experimenteller Krebs. Z Krebsforsch 1931;34:628- 645.
- 30

- [9]. Baird R. et al., Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma by intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge. *J Immunol.* 2013 January 1; 190(1): 469–478. doi:10.4049/jimmunol.1201209.
- 5 [10]. Bose D. et. al., Heat Killed Attenuated *Leishmania* Induces Apoptosis of HepG2 Cells Through ROS Mediated p53 Dependent Mitochondrial Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2016;38:1303-1318.
- [11]. Yang Y. et al., Exosomes from Plasmodium-infected hosts inhibit tumor angiogenesis in a murine Lewis lung cancer model. *Nature Oncogenesis* 10 (2017) 6, e351; doi:10.1038/oncsis.2017.52.
- [12]. Théry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2002. 2(8): p. 569.
- [13]. Kahlert, C. and R. Kalluri, Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of molecular medicine*, 2013. 15 91(4): p. 431-437.
- [14]. Clayton, A. and M.D. Mason, Exosomes in tumour immunity. *Current oncology*, 2009. 16(3): p. 46.
- [15]. Clayton, A., et al., Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *The Journal of Immunology*, 20 2011: p. 1003884.
- [16]. Costa-Silva, B., et al., Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature cell biology*, 2015. 17(6): p. 816.
- [17]. Lee, J.-K., et al., Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. 25 *PloS one*, 2013. 8(12): p. e84256.
- [18]. Viaud, S., et al., Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer research*, 2010: p. 0008-5472. CAN-09-3276.
- [19]. Escudier, B., et al., Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I 30 clinical trial. *Journal of translational medicine*, 2005. 3(1): p. 10.

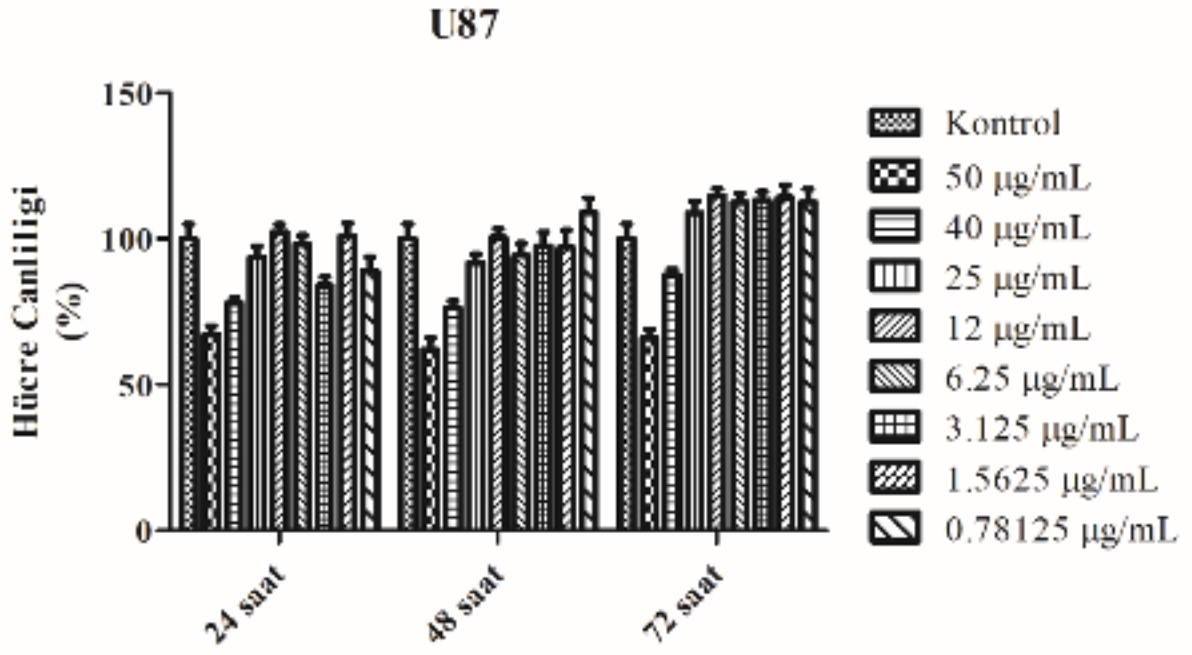
- [20]. Raimondo, S., et al., Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, 2015. 6(23): p. 19514.



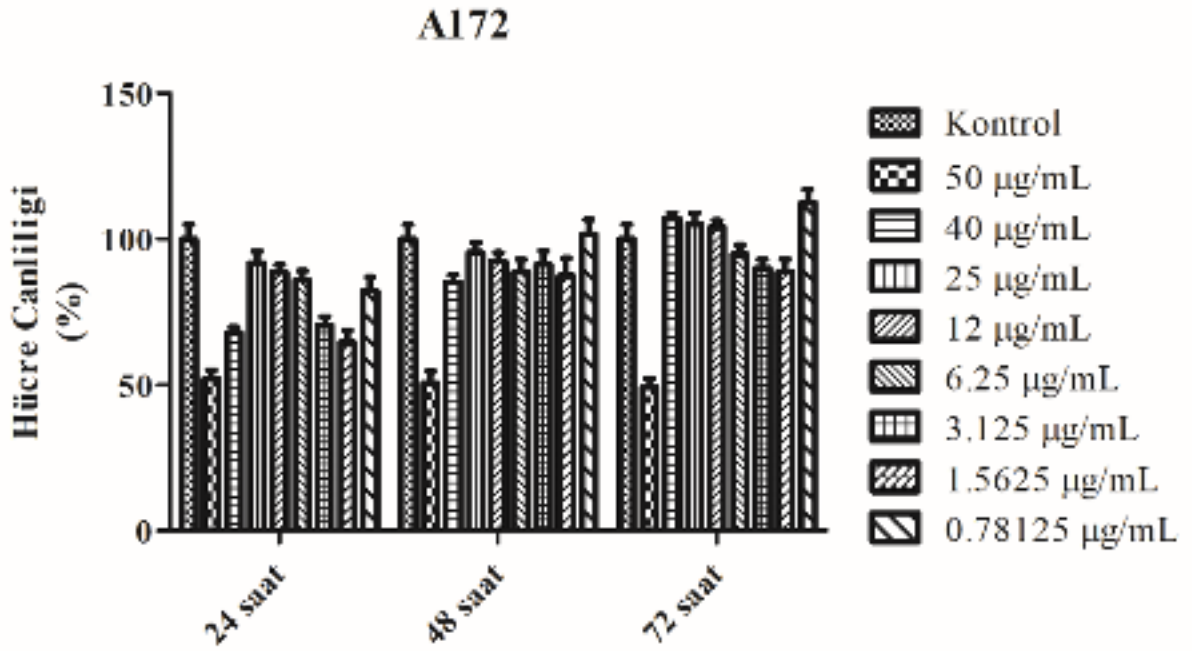
Şekil 1



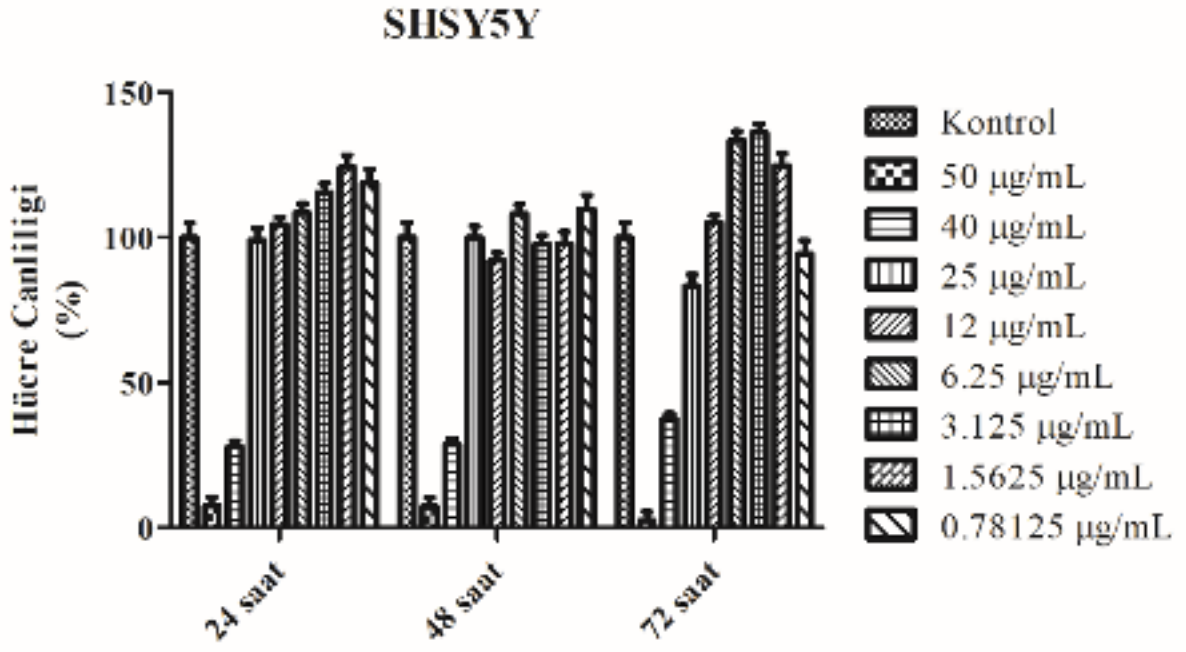
Şekil 2



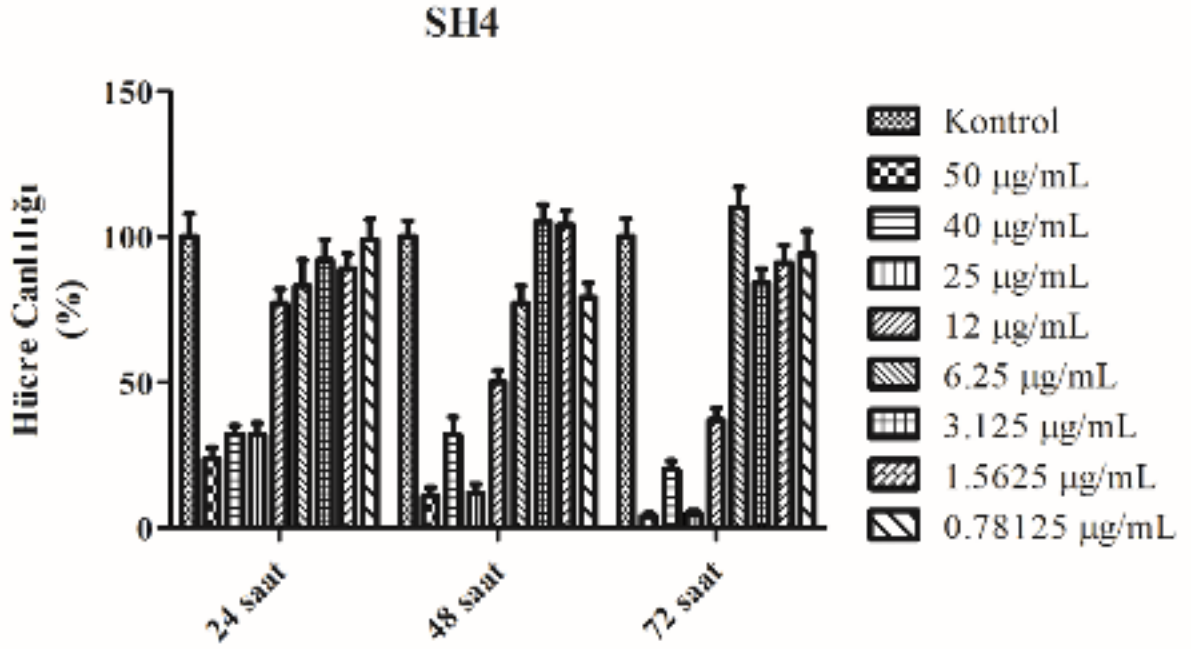
Şekil 3



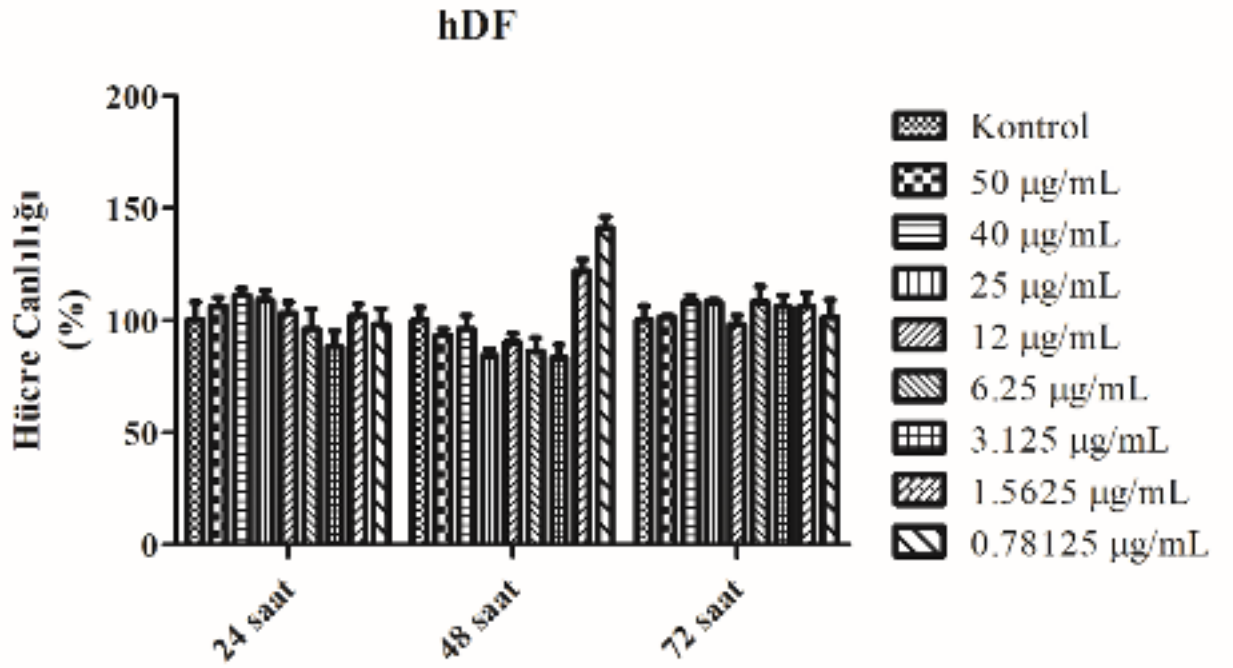
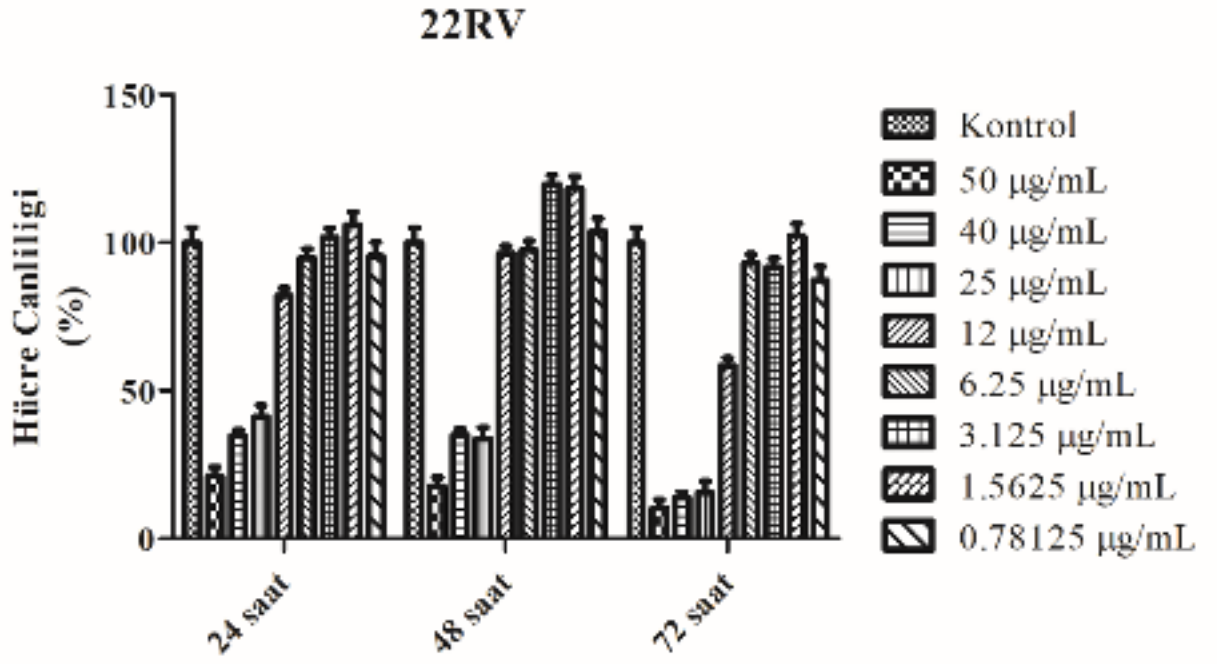
Şekil 4

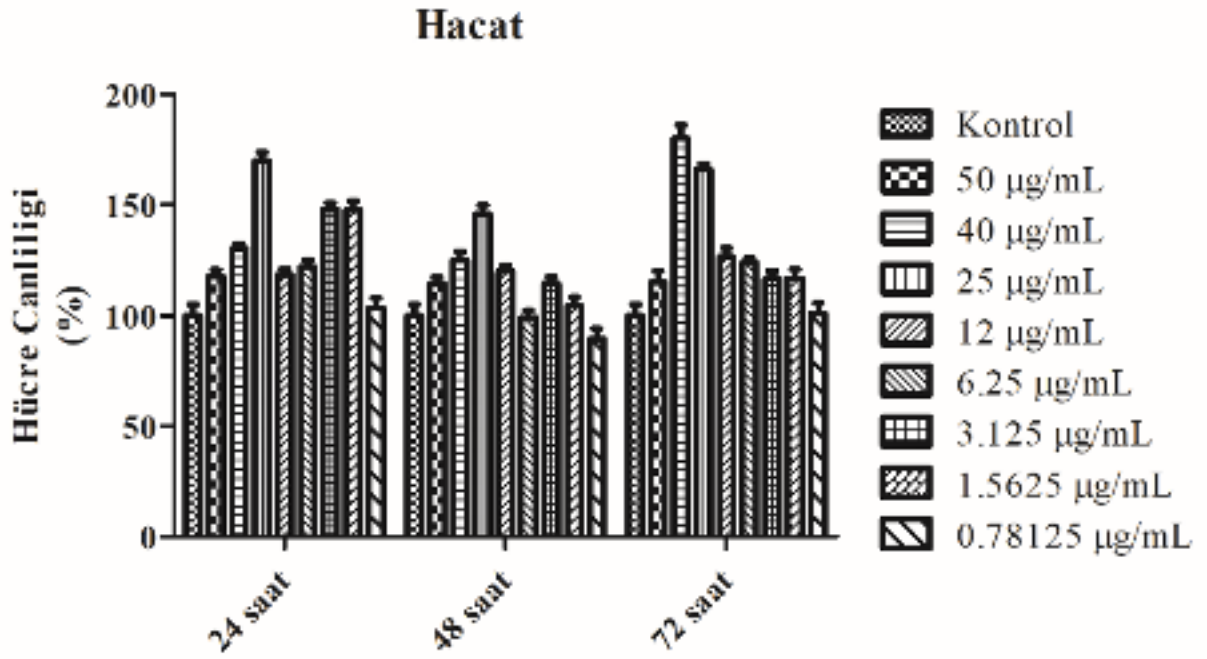


Şekil 5

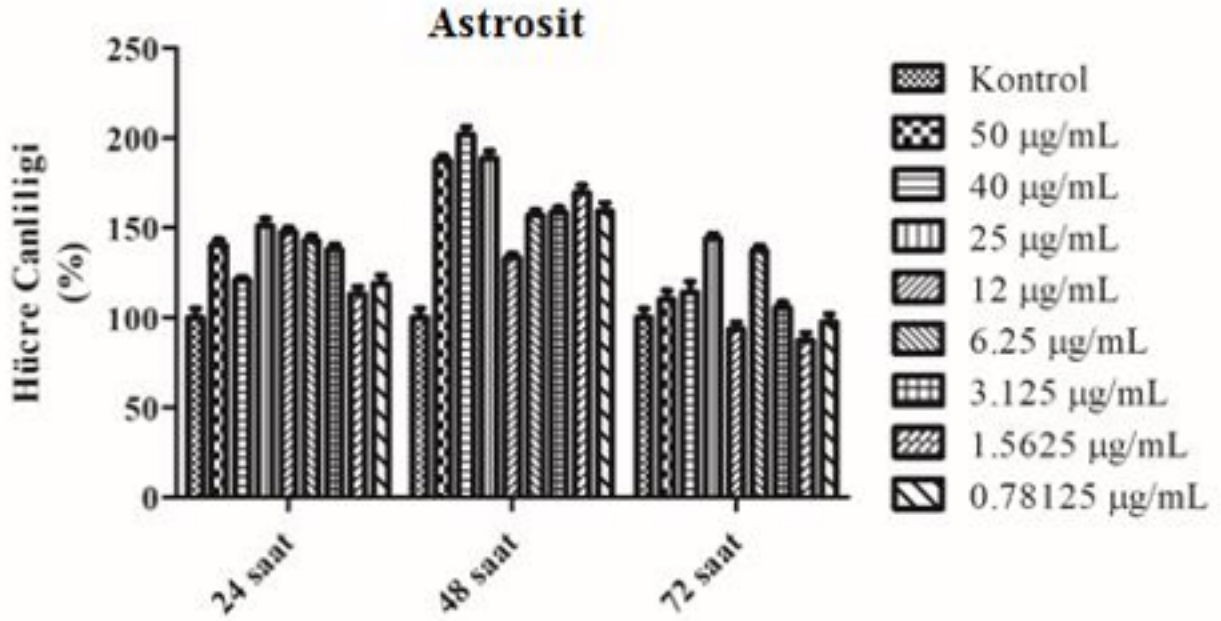


Şekil 6

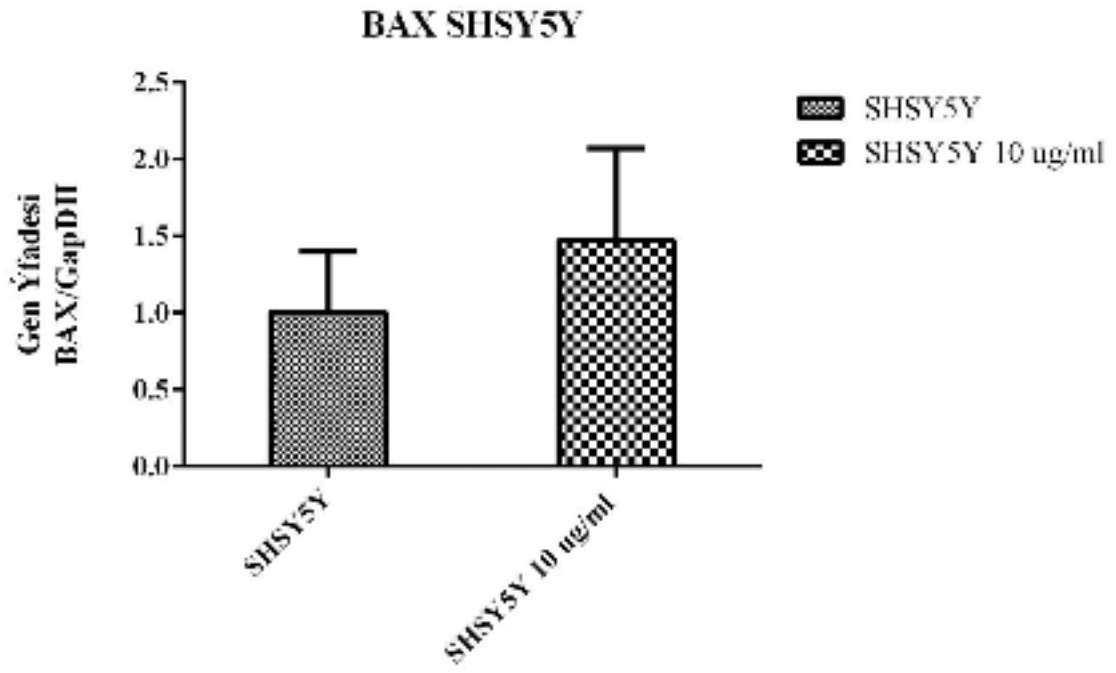




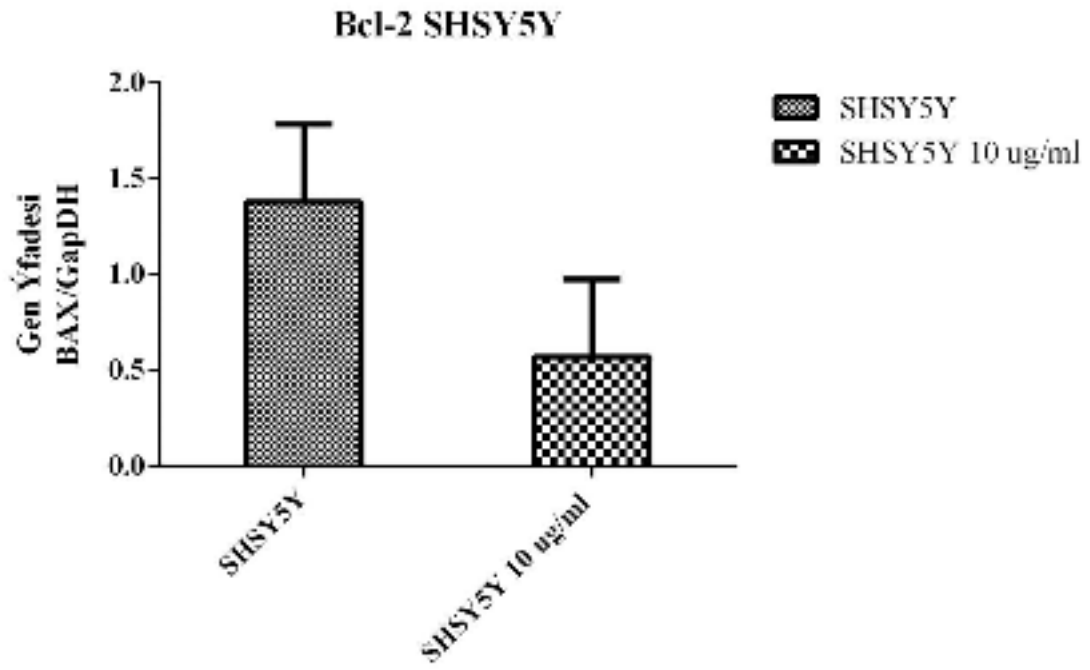
Şekil 9



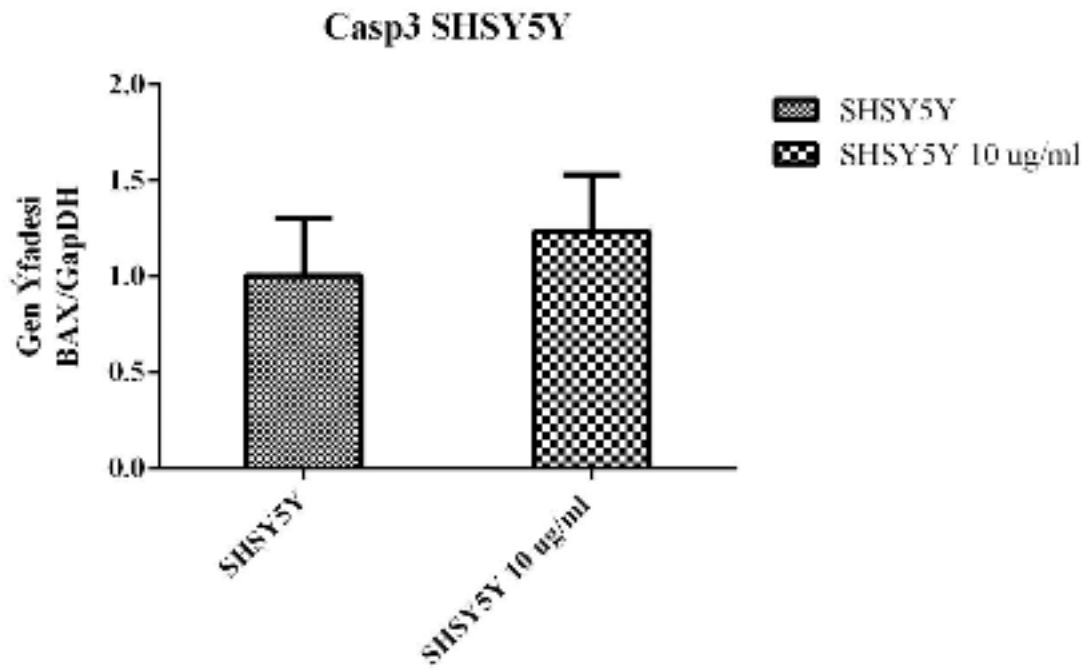
Şekil 10



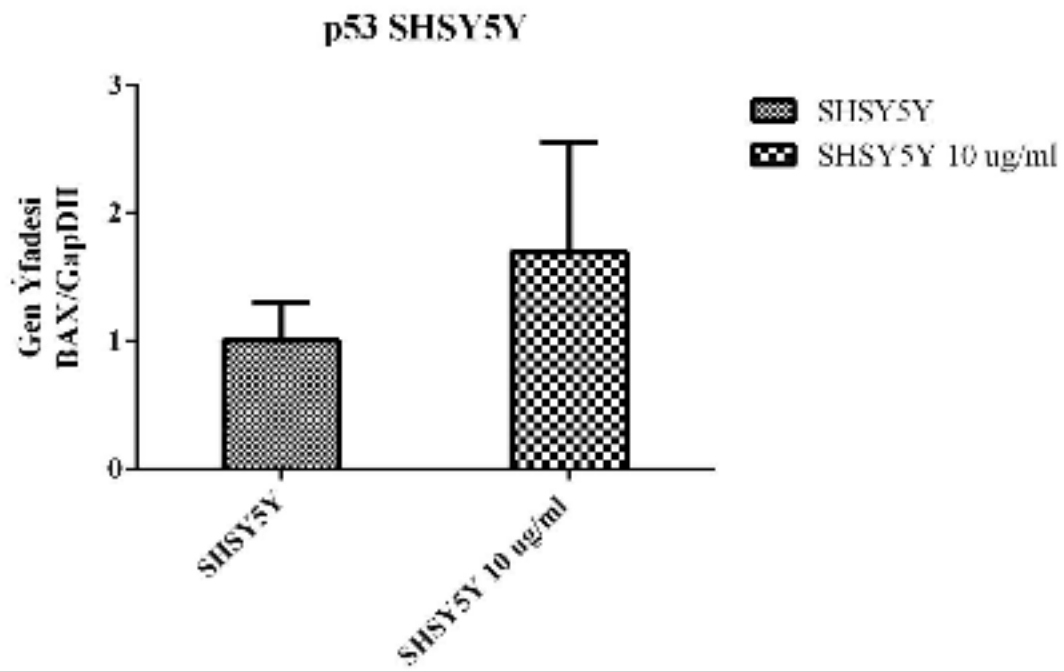
Şekil 11



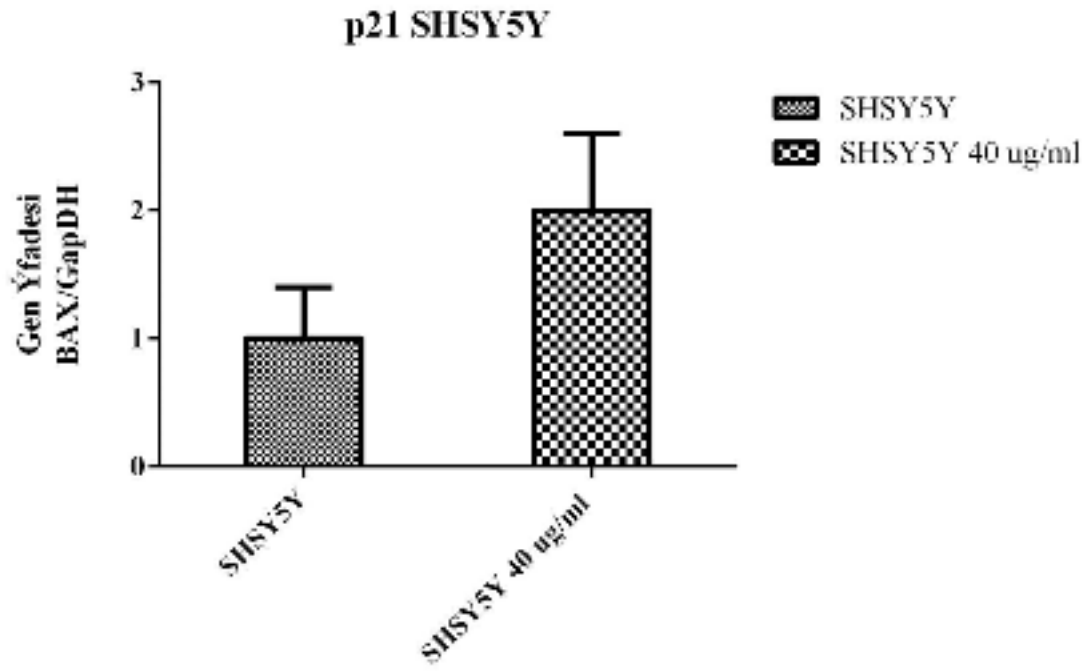
Şekil 12



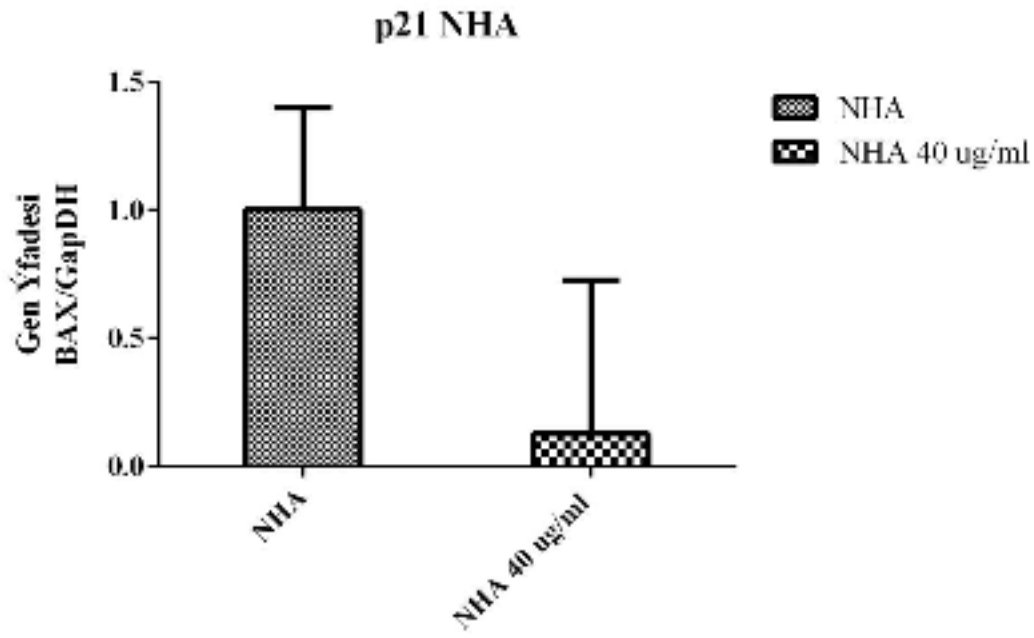
Şekil 13



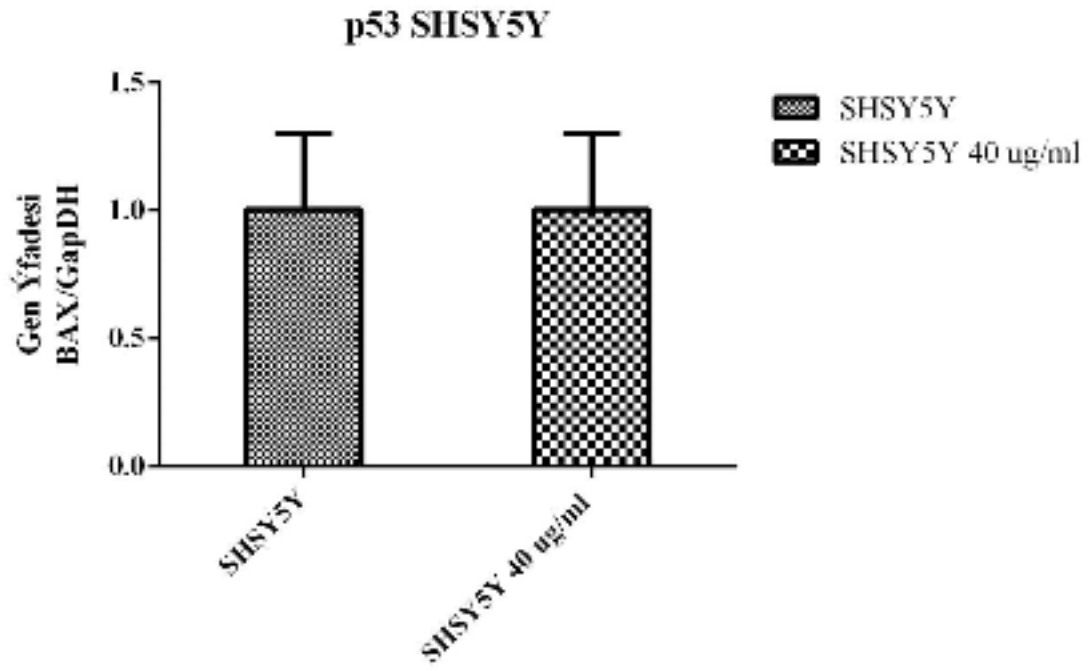
Şekil 14



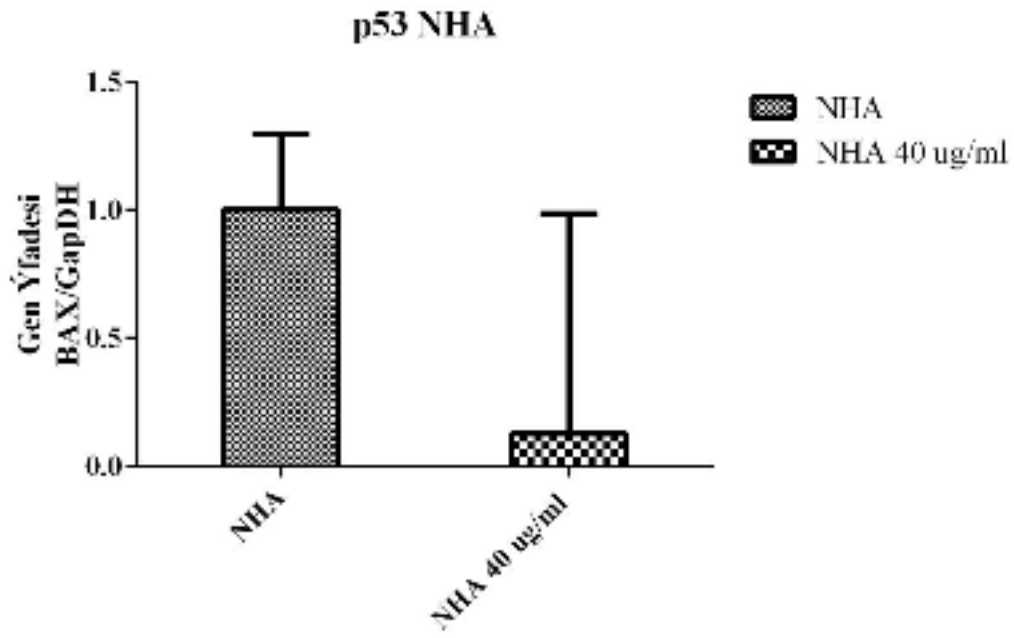
Şekil 15



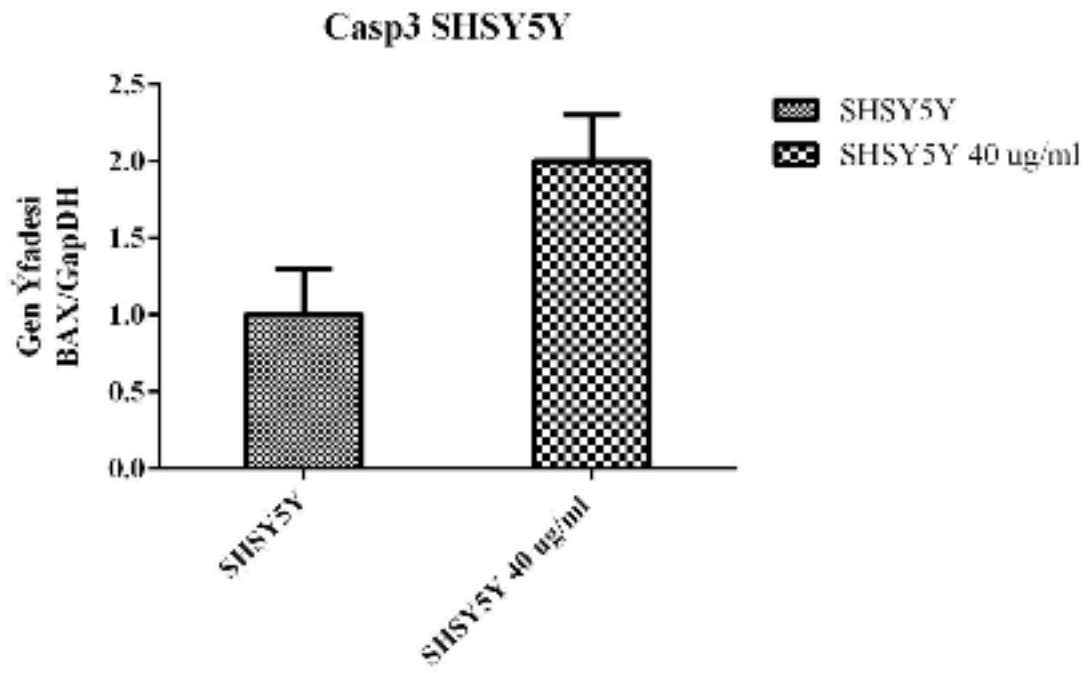
Şekil 16



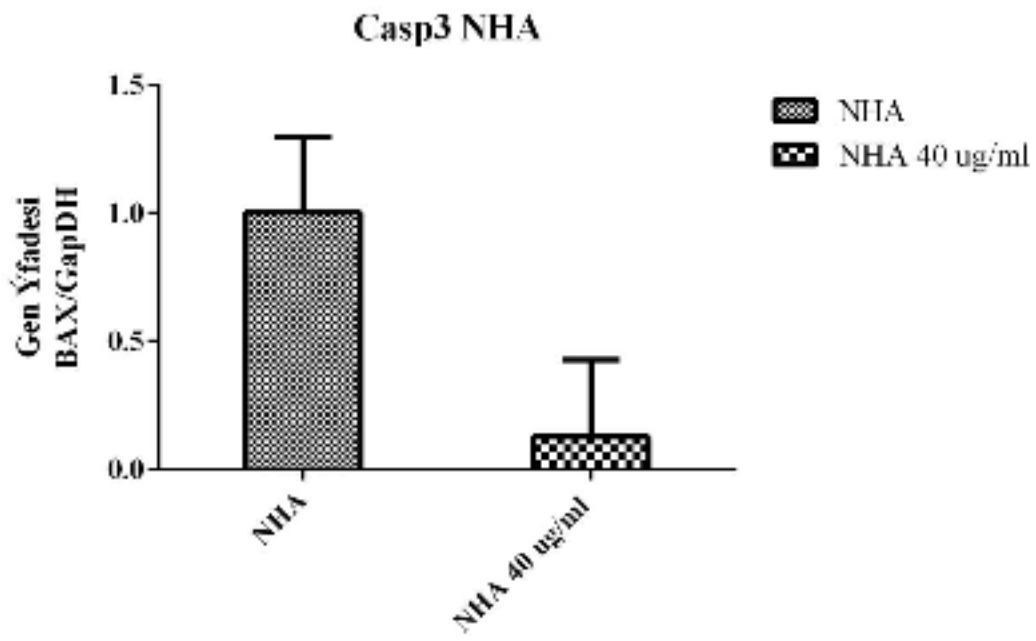
Şekil 17



Şekil 18



Şekil 19



Şekil 20