

ÖZET

TAMOKSİFEN DİRENÇLİ MEME KANSERİ TEDAVİSİ İÇİN GELİŞTİRİLEN YENİ STRATEJİLER

- 5 Buluş, meme kanseri tedavisinde ve özellikle tamoksifen direnci geliştiren hastalarda kullanılabilecek, siklik adenosin monofosfatın (cAMP) indüklenmesini sağlayan fosfodiesteraz 4D (PDE4D) modülatörleriyle ilgilidir.

İSTEMLER

1. Buluş, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek fosfodiesteraz (PDE) alt tipi olan PDE4D modülatörleri olup
5 özelliği, tamoksifen direncini ortadan kaldırmayı ve PDE4D inhibisyonu ile siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyesinin arttırılmasını sağlayan ve böylelikle ER stresin indüklenmesi ile dirençli hücrelerin tamoksifen tedavisine yeniden duyarlı hale getirilmesini sağlayan ve bir arada kullanılmalarıyla
10 sinerjik etki yaratan aspirin ve tamoksifen; dipiridamol ve tamoksifen; Gebr-7b ve tamoksifen kombinasyonu olması ile karakterize edilmesidir.

2. İstem 1'de bahsi geçen meme kanseri tedavisinde
15 kullanılabilecek fosfodiesteraz (PDE) alt tipi olan PDE4D modülatörleri olup özelliği, aspirin ve tamoksifen kombinasyonunda; kullanılan aspirinin 75-600 mg/gün olması ile karakterize edilmesidir.

20 3. İstem 1'de bahsi geçen meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek fosfodiesteraz (PDE) alt tipi olan PDE4D modülatörleri olup özelliği, dipiridamol ve tamoksifen kombinasyonunda; kullanılan dipiridamolün 75-400 mg/gün olması ile karakterize edilmesidir.

25

4. İstem 1'de bahsi geçen meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek fosfodiesteraz (PDE) alt tipi olan PDE4D modülatörleri olup özelliği, Gebr-7b ve tamoksifen kombinasyonunda; kullanılan Gebr-7b'nin 0,1-10 mg/gün olması ile
30 karakterize edilmesidir.

5. İstem 1’de bahsi geçen meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek fosfodiesteraz (PDE) alt tipi olan PDE4D modölatörleri olup özelliği, aspirin ve tamoksifen; dipiridamol ve tamoksifen; Gebr-7b ve tamoksifen kombinasyonlarında; kullanılan tamoksifenin 20-80 mg/gün olması ile karakterize edilmesidir.

TARİFNAME

TAMOKSİFEN DİRENÇLİ MEME KANSERİ TEDAVİSİ İÇİN GELİŞTİRİLEN YENİ STRATEJİLER

5 Teknik Alan

Buluş, meme kanseri tedavisinde ve özellikle tamoksifen direnci geliştiren hastalarda kullanılabilecek, siklik adenozin monofosfatın (cAMP) indüklenmesini sağlayan fosfodiesteraz 4D (PDE4D) modülatörleriyle ilgilidir.

10

Tekniğin Bilinen Durumu

Genlerin; radyasyon, çevresel faktörler, mikroorganizmalar gibi çeşitli faktörlerden etkilenmesiyle ortaya çıkan bozukluklar kansere neden olmaktadır. Kadınlarda görülen kanser tipleri arasında birinci sırada yer alan meme kanseri; meme dokusundaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasın anlamına gelmektedir. Meme kanserinde bu faktörler dışında genetik faktör ve yaşlanma da büyük rol oynamaktadır. Meme kanseri riski; yumurtalıklar tarafından salgılanan ve üreme ve adet döngülerinden sorumlu olan östrojen hormonuna maruz kalma süresine bağlıdır ve sürenin uzaması riski arttırmaktadır. Ek olarak, yağ oranı yüksek gıdalarla beslenme ve alkol tüketiminin de östrojen hormonu düzeyini arttırabileceği ve böylelikle kanser gelişim riskini arttırabileceği belirtilmektedir. Bazı risk faktörleri dengeli beslenme ve düzenli egzersiz gibi faaliyetler veya sigara ve alkol tüketilmemesi ile en aza indirgenebilmektedir.

Reseptörlerin östrojen veya progesteron hormonlarına bağlanması durumunda ER-pozitif (ER+) veya PR-pozitif (PR+) olarak

adlandırılma yapılırken, genel adıyla meme kanseri türü "hormon reseptör pozitif" olarak kullanılmaktadır. Hormon reseptör pozitif olduğunda ilerlemenin daha yavaş ve hormon terapi ilaçlarına veya tamoksifen gibi anti-hormonal tedaviye cevap verme eğiliminin daha iyi olduğu gözlenmektedir. Hormon reseptör düzeyi testinin yapılması teşhis amaçlı değildir ancak, tedavi seçenekleri ve tümör özelliklerinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır.

- 10 ER hedefli tedaviler, tamoksifen veya raloksifen gibi seçici ER modülatörü, letrozol, anastrozol ve eksemestan gibi aromataz inhibitörleri veya fulvestrant gibi seçici ER aşağı-düzenleyiciler vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Tamoksifen yüksek riskli ER-pozitif meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılmakta olup, en az 5 yıl tamoksifen tedavisi uygulandığında nüksetme oranının ilk 10 yıl boyunca yaklaşık %40-50 ve ölüm oranının ise ilk 15 yıl boyunca yaklaşık üçte bir oranında azaldığı görülmüştür. Ancak, %40'dan fazla hasta tedavinin ilk aşamasında yeniden direnç veya uzun süreli klinik
- 15 tedavisi boyunca zamanla direnç ve metastaz geliştirmektedir. Endokrin direncini ortadan kaldırmak için geliştirilen stratejilerde ise EGFR inhibitörü (gefitinib), HER2 inhibitörü (transtuzumab) gibi inhibitörlerin tamoksifenle kombinasyonu ile tedavi gerçekleştirilmekte ancak, yine de ilaç direnci gelişimi
- 20 görülmektedir.
- 25

Vücudun farklı doku ve organlarında bulunan fosfodiesteraz (PDE) enzimleri; hücre fonksiyonlarında farklı fizyolojik olaylara aracılık etmekte ve protein kinaz A enzimine bağlanarak etkinleşmesini sağlayan siklik adenosin monofosfatın (cAMP) adenosin monofosfata (AMP) hidrolizini sağlayarak inaktive etmektedir. Çeşitli hücresel fonksiyonlar seçici olarak

düzenleyebilen PDE enzimi, cAMP sinyal yollarının düzenlenmesinde büyük rol oynamaktadır. Bunu da hücre çekirdeğine difüze olabilen ve fosforilasyon sağlayan cAMP ile etkinleştirilen protein kinaz A sayesinde sağlamaktadır. Yapılan 5 çalışmalarında, PDE alt tipi olan PDE4D geninin prostat ve akciğer kanseri hücrelerinde proliferasyona neden olduğu ve PDE4'ün inhibisyonunun antitümör/antiproliferatif etki yarattığı görülmüştür. cAMP'in hücre içindeki düzeylerinin artması için kullanılan PDE4 inhibitörleri ile inflamatuvar hücrelerin 10 aktivasyonu baskılanarak hücre proliferasyonu azaltılabilmektedir.

Tekniğin bilinen durumunda, A. Tari ve diğerleri tarafından 2005 yılında, "Laboratory Investigation" dergisinde yayınlanan 15 "Cyclooxygenase-2 protein reduces tamoxifen and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide inhibitory effects in breast cancer cells." başlıklı makalede ER-pozitif meme tümörlerinde bulunan siklooksijenaz-2 (COX-2) proteinin ilaç direnci oluşturduğundan bahsedilmektedir. WO2016071520 sayılı başvuruda PR-negatif ve 20 ER-negatif meme kanserinin tedavisi için geliştirilen yöntem ve bileşimler anlatılmaktadır. US2015285802 sayılı başvuruda ise meme kanseri geliştirme riskini öngörmek, önlemek ve tedavi etmek amacıyla geliştirilen yöntemlerden bahsedilmektedir. Ancak, meme kanseri için tedavi yöntemleri geliştirilse bile 25 ilaç direnci oluşması durumunda direncin ortadan kaldırılamaması büyük sorun teşkil etmekte ve yeni stratejilerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmaktadır.

Buluşun Çözümünü Amaçladığı Problemler

30 Buluşun amacı, meme kanseri tedavisinde ve özellikle tamoksifen direnci geliştiren hastalarda kullanılabilecek, siklik adenozin

monofosfatın (cyclic adenosine monophosphate-cAMP) indüklenmesini sağlayan fosfodiesteraz alt tipi 4D (PDE4D) modölatörlerinin geliştirilmesidir.

5 Buluşun bir diğer amacı, tamoksifene karşı geliştirilen direnci ortadan kaldırmak ve endokrin dirençli hücreleri tamoksifen tedavisine yeniden duyarlı hale getirmek için kullanılabilecek stratejilerin geliştirilmesidir.

10 Buluşun diğer bir amacı, cAMP hidrolize eden PDE4D geninin baskılanması ve etkinliğinin engellenmesi ile cAMP seviyesinin arttırılması, ER stresinin başlatılması ve tamoksifen direncinin üstesinden gelinmesinin sağlanmasıdır.

15 **Şekillerin Açıklanması**

Şekil 1: Tamoksifen dirençli MCF-7 (TamR) hücrelerinin parental MCF-7 (WT) hücreleri ile karşılaştırılmasında anlamlı zenginleşen yolların analizi

Şekil 2A: Tamoksifen dirençli ve parental MCF-7 hücrelerinde hücre içi cAMP seviyesi

Şekil 2B: Tamoksifen dirençli ve parental T47D hücrelerinde hücre içi cAMP seviyesi

Şekil 3A: Tamoksifen dirençli ve parental MCF-7 hücrelerinde PDE4D ifade seviyesinin Western blot ile analizi

25 Şekil 3B: Tamoksifen dirençli ve parental T47D hücrelerinde PDE4D ifade seviyesinin Western blot ile analizi

Şekil 4A: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde PDE protein aktivitesinin farklı dozlardaki PDE inhibitörü (dipiridamol) ile

farmakolojik olarak susturulması tamoksifen duyarlılığı üzerine etkisi

Şekil 4B: Tamoksifen dirençli T47D hücre modelinde PDE protein aktivitesinin farklı dozlardaki PDE inhibitörü (dipiridamol) ile farmakolojik olarak susturulması tamoksifen duyarlılığı üzerine etkisi

Şekil 5A: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde PDE protein aktivitesinin farklı dozlardaki PDE4D spesifik inhibitörü (Gebr-7b) ile farmakolojik olarak susturulması tamoksifen duyarlılığı üzerine etkisi

Şekil 5B: Tamoksifen dirençli T47D hücre modelinde PDE protein aktivitesinin farklı dozlardaki PDE4D spesifik inhibitörü (Gebr-7b) ile farmakolojik olarak susturulması tamoksifen duyarlılığı üzerine etkisi

Şekil 6A: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde PDE protein aktivitesinin farklı dozlardaki aspirin ile farmakolojik olarak susturulması tamoksifen duyarlılığı üzerine etkisi

Şekil 6B: Tamoksifen dirençli T47D hücre modelinde PDE protein aktivitesinin farklı dozlardaki aspirin ile farmakolojik olarak susturulması tamoksifen duyarlılığı üzerine etkisi

Şekil 7A: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde dipiridamol ve/veya tamoksifen uygulaması sonrasında hücre içi cAMP seviyesi

Şekil 7B: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulaması sonrasında hücre içi cAMP seviyesi

Şekil 7C: Tamoksifen dirençli T47D hücre modelinde dipiridamol ve/veya tamoksifen uygulaması sonrasında hücre içi cAMP seviyesi

Şekil 7D: Tamoksifen dirençli T47D hücre modelinde Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulaması sonrasında hücre içi cAMP seviyesi

Şekil 8A: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde tamoksifen/aspirin kombinasyonu uygulaması takiben hücre içi cAMP seviyesi

5 Şekil 8B: Tamoksifen dirençli T47D hücre modelinde tamoksifen/aspirin kombinasyonu uygulaması takiben hücre içi cAMP seviyesi

Şekil 9A: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde dipiridamol ve/veya tamoksifen uygulaması ardından stres ilişkili kinazlar (JNK and p38) ve PI3K yolağı proteinlerinin Western blot ile
10 analizi

Şekil 9B: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulaması ardından stres ilişkili kinazlar (JNK and p38) ve PI3K yolağı proteinlerinin Western blot ile analizi

15 Şekil 10: Tamoksifen dirençli MCF-7 hücre modelinde aspirin ve/veya tamoksifen uygulaması ardından stres ilişkili kinazlar (JNK and p38) ve PI3K yolağı proteinlerinin Western blot ile analizi

Şekil 11A: MCF-7 TamR hücrelerinde dipiridamol ve/veya
20 tamoksifen uygulanması ile ER stresi ile ilişkili proteinlerin Western blot analizi

Şekil 11B: MCF-7 TamR hücrelerinde Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulanması ile ER stresi ile ilişkili proteinlerin Western blot analizi

25 Şekil 12: MCF-7 TamR hücrelerinde aspirin ve/veya tamoksifen uygulanması ile ER stresi ile ilişkili proteinlerin Western blot analizi

Şekil 13A: MCF-7 TamR hücrelerinde dipiridamol ve/veya tamoksifen uygulamasına bağlı göreceli apoptoz indeksi

Şekil 13B: MCF-7 TamR hücrelerinde Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulamasına bağlı göreceli apoptoz indeksi

Şekil 13C: MCF-7 TamR hücrelerinde aspirin ve/veya tamoksifen uygulamasına bağlı göreceli apoptoz indeksi

5 Şekil 14A: Dipiridamol ve/veya tamoksifen ve Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulamasının dirençli MCF-7 hücre zenograft modelinde tümör büyümesine (hacmine) etkisi

Şekil 14B: Aspirin ve/veya tamoksifen uygulamasının dirençli MCF-7 hücre zenograft modelinde tümör büyümesine (hacmine)

10 etkisi

Şekil 15A: MCF-7 Tam-R hücrelerinde dipiridamol ve/veya tamoksifen ve Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulanması ile tümör ağırlığı değişimi

Şekil 15B: MCF-7 Tam-R hücrelerinde aspirin ve/veya tamoksifen uygulanması ile tümör ağırlığı değişimi

15

Şekil 16A: Dipiridamol ve/veya tamoksifen ve Gebr-7b ve/veya tamoksifenin izole MCF-7 TamR tümör zenograftları

Şekil 16B: Aspirin ve/veya tamoksifenin izole MCF-7 TamR tümör zenograftları

20

Buluşun Açıklanması

Buluş, yeni stratejilerin geliştirilmesini sağlayan ve meme kanseri tedavisinde ve özellikle tamoksifen direnci geliştiren hastalarda kullanılabilecek, siklik adenosin monofosfat (cyclic adenosine monophosphate-cAMP) seviyesinin arttırılması sağlayan fosfodiesteraz alt tipi 4D (PDE4D) modulatorleri ile ilgilidir.

25

Buluş konusu geliştirilen PDE4D modölatörleri; hücresel cAMP konsantrasyonu arttırılmasını sağlayan, asetilsalisilik asit (aspirin-ASA), dipiridamol (dipy) veya seçimli PDE4D inhibitörü (PDE4Is) olarak Gebr-7b kimyasallarının tamoksifen ile birleştirilmesi ile elde edilmektedir. Tamoksifen dirençli ER-pozitif meme kanseri için yeni stratejilerin geliştirilmesinde öncelikle tamoksifen dirençli hücreler (MCF-7 TamR) ve parental hücrelerinde (MCF-7 WT) tüm genom transkriptom dizilimi gerçekleştirilmektedir. Ardından, MCF-7 TamR hücrelerinin MCF-7 WT hücreleri ile karşılaştırılmasında anlamlı zenginleşen yollar analizi (Ingenuity Pathway Analysis (IPA), ($z < -1$, $z > +1$)) yapılmakta ve yapılan analizde en önemli yolak olarak MCF-7 WT hücrelerine kıyasla MCF-7 TamR hücrelerinde cAMP-ortamı sinyalleme olduğu görülmektedir. Şekil 1'de gösterilen yolak zenginleşme analizi ve yapılan tüm genom transkriptom analizi ile PDE4D; tamoksifen direncinin potansiyel düzenleyicisi olarak ön plana çıkmaktadır. Şekil 2A ve B'de ise srasıyla tamoksifen dirençli ve parental MCF-7 ve T47D hücrelerinde ölçülen cAMP seviyeleri verilmektedir. cAMP seviyesinin MCF-7 TamR ve T47D TamR hücrelerinde MCF-7 WT ve T47D WT hücrelerine kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Ek olarak, Şekil 3A ve B'de srasıyla tamoksifen dirençli ve parental MCF-7 ve T47D hücrelerinde PDE4D ifade seviyesinin Western blot ile analizi yer almakta ve PDE4D geninin; tamoksifen dirençli hücrelerde (MCF-7 TamR ve T47D TamR) daha fazla olduğu belirlenmektedir. Şekillerden de anlaşılacağı üzere PDE4D geni ile hücresel cAMP seviyesi arasında ters korelasyon bulunmaktadır.

Buluş konusu, PDE4D geni kazanılmış tamoksifen direncinin kritik bir düzenleyicisi olarak önerilmekte ve küçük moleküllü inhibitörlerle PDE4D geninin engellenmesi ile endokrin dirençli hücrelerin tamoksifen tedavisine yeniden duyarlı hale getirilmesi sağlanmaktadır. PDE4D inhibisyonunun farmakolojik

olarak tamoksifen duyarlılığı üzerindeki etkilerini incelemek için MCF-7 TamR ve T47D TamR hücrelerine; dipiridamol, Gebr-7b, aspirin veya tamoksifen ile kombinasyonu gerçekleştirilen dipiridamol, Gebr-7b veya aspirin uygulanmaktadır. Uygulamadan 5 72 saat sonrasında hücre büyümesi analiz edilmekte ve yüzde büyüme inhibisyonu belirlenmektedir. MCF-7 TamR hücre modelinde PDE protein aktivitesinin farklı dozlardaki dipiridamol, Gebr-7b ve aspirin ile farmakolojik olarak susturulmasının tamoksifen duyarlılığı üzerine etkisi sırasıyla Şekil 4A, 5A ve 6A'da 10 verilmektedir. T47D TamR hücre modelinde PDE protein aktivitesinin farklı dozlardaki dipiridamol, Gebr-7b ve aspirin ile farmakolojik olarak susturulmasının tamoksifen duyarlılığı üzerine etkisi ise sırasıyla Şekil 4B, 5B ve 6B'de 15 gösterilmektedir. Kullanılan tamoksifen konsantrasyonu 7,5 µM iken, dipiridamol konsantrasyonu 1, 5 ve 10 µM, aspirin konsantrasyonu da 10, 100, 200, 500 ve 1000 µM'dir. Gebr-7b 20 yoğunluğu ise 0,01, 1, 5 ve 10 µg/ml'dir. Şekillerde de görüldüğü üzere, tamoksifen ile dipiridamol, Gebr-7b veya aspirin kombinasyonel tedavisinde hücre büyüme inhibisyonu yüzdesi; 25 tamoksifen veya inhibitörün tek başına kullanıldığı tedavilerden daha yüksektir. Ayrıca, tamoksifen ile dipiridamol, Gebr-7b veya aspirin kombinasyonel tedavisinde hücre büyüme inhibisyonu yüzdesi; inhibitör dozajlama miktarı arttıkça artmaktadır. Ek olarak, dipiridamol inhibitörüne göre Gebr-7b inhibitörünün 10 25 ng/ml kadar düşük dozajlarda daha etkili ve tamoksifenle daha fazla sinerjik etkiye sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlarla, PDE4D geninin farmakolojik olarak susturulması, tamoksifen dirençli meme kanseri hücrelerini tamoksifene in vitroda yeniden duyarlı kılmaktadır.

30

Buluşa konu olan aspirin ve tamoksifen kombinasyonunun; cAMP seviyesi üzerindeki etkisi incelenerek tamoksifen dirençli MCF-7 ve T47D hücre modellerinde tamoksifen ve aspirin kombinasyonu

uygulamasının takiben hücre içi cAMP seviyesi belirlenmekte ve sadece aspirin veya tamoksifen kullanımındaki cAMP seviyesi ile karşılaştırma sırasıyla Şekil 8A ve B’de yapılmaktadır. cAMP seviyesinin, aspirin ve tamoksifen kombinasyonunda önemli ölçüde arttığı gözlenmektedir. Dipiridamol veya Gebr-7b ve tamoksifen kombinasyonunda da aynı sonuçlar elde edilmekte ve cAMP seviyesinin büyük ölçüde artması tamoksifen ile inhibitör kombinasyonunun sinerjik etki yarattığını kanıtlamaktadır. Şekil 7A ve B’de ise MCF-7 TamR hücrelerinde sırasıyla dipiridamol ve/veya tamoksifen ve Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulaması sonrasında hücre içi cAMP seviyeleri gösterilmektedir. Şekil 7C ve D’de de T47D hücrelerinde sırasıyla dipiridamol ve/veya tamoksifen ve Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulaması sonrasında hücre içi cAMP seviyeleri verilmektedir. Ek olarak, aspirin ve/veya tamoksifenin MCF-7 TamR hücrelerinde; p38, JNK gibi stres ilişkili kinazların ve PI3K yolağı üzerine etkisinin Western blot ile analizinde, Şekil 10’daki sonuçlar elde edilmektedir. Aspirin ve tamoksifen kombinasyonunda p-JNK ve p-p38 seviyesi anlamlı olarak artmaktayken, hem Ser-473 hem de Thr-308 AKT’nin fosforilasyonu düşmektedir. Dipiridamol veya Gebr-7b inhibitörünün tamoksifenle kombinasyonunda da aynı sonuçla karşılaşılmakta ve inhibitörlerin tamoksifen ile kombinasyonu; fosforilasyon durumu üzerinde sinerjik etki yaratmaktadır. Şekil 9A ve B’de sırasıyla MCF-7 TamR hücre modelinde dipiridamol ve/veya tamoksifen ve Gebr-7b ve/veya tamoksifenin p38, JNK ve PI3K yolağı proteinlerinin Western blot ile analizi gösterilmektedir.

PDE4D inhibisyonu ile tamoksifen duyarlılığından sorumlu ER stresi arasında yer alan ilişkinin belirlenmesi için gerçekleştirilen Western blot analizinde MCF-7 TamR hücrelerinde; inositol-gerektiren enzim 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α), protein kinaz RNA-gibi ER kinaz (protein

kinase RNA-like ER kinase, PERK) ve aktive edilmiş PERK fosforilatları n ökaryotik dönüşüm başlatıcı faktör 2 α (activated PERK phosphorylates eukaryotic translation initiator factor 2 α , eIF2 α) gibi ER stresi ile ilişkili proteinleri kullanılmaktadır.

5 Bununla birlikte, MCF-7 TamR hücrelerine dipiridamol ve/veya tamoksifen, Gebr-7b ve/veya tamoksifen veya aspirin ve/veya tamoksifen uygulanmakta ve proteinlerin Western blot analiz sonuçları sınırlı olarak şekil 11A, 11B ve 12’de gösterilmektedir. cAMP aktivasyonunun devamlılığı ile IRE1 α , PERK ve eIF2 α proteinleri; inhibitörlerin tamoksifenle sinerjik etkisinden dolayı aktifleşmektedir. Böylelikle, PDE4D inhibisyonu sayesinde ER stresi başlatılmakta ve tamoksifen dirençli meme kanser hücreleri tamoksifene duyarlı hale gelmektedir. Ek olarak, MCF-7 TamR hücreleri; kanser hücresi apoptoz analizi için

10 dipiridamol ve/veya tamoksifen, Gebr-7b ve/veya tamoksifen veya aspirin ve/veya tamoksifen ile 72 saat boyunca işleminden geçirilmektedir. Şekil 13A, B ve C’de göreceli apoptoz indeksin inhibitörler ve/veya tamoksifene bağlı değişimi gösterilmekte ve grafikten de anlaşıldığı üzere inhibitörlerin tamoksifenle

15 kombinasyonu apoptoz indeksini önemli ölçüde arttırmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre inhibitörler; cAMP seviyesini ve ER-stres aracılığıyla p38/JNK aktivasyonunu yönlendirerek apoptoza yol açmakta ve tamoksifen direncini kırmaktadır.

25 Aspirinin in vivo tamoksifen direncini ortadan kaldırıp kaldırmadığını test etmek amacıyla ise MCF-7 TamR zenograft oluşturulmaktadır. Ardından MCF-7 TamR zenograftlara; tümör hacmi yaklaşık 100 mm³ değerine ulaştığında 100 mg/kg aspirin ve/veya 2 mg/kg tamoksifen 20 gün boyunca her gün uygulanarak

30 tümör büyümesi gözlenmektedir. Aynı şekilde işlemlerden geçirilen dipiridamol veya Gebr-7b inhibitörünün tamoksifenle kombinasyonunda ise aynı miktarda tamoksifen ve 15 mg/kg dipiridamol veya 3 μ g/kg Gebr-7b kullanılarak 20 gün boyunca her

gün uygulama gerçekleştirilmektedir. Tablo 1’de dipiridamol, Gebr-7b, aspirin ve tamoksifenin; insan ve farede kullanılabilecek doz aralıkları verilmektedir. Şekil 14A ve B’de gösterilen aspirin, dipiridamol veya Gebr-7b inhibitörlerinin tamoksifenle kombinasyonu, tamoksifen veya inhibitörlerin tek başına kullanıldığı tedavi ile karşılaştırıldığında, farelerde MCF-7 TamR tümörlerinin daha az büyüdüğü ve aslında büyümeyi stabilize ettiği görülmektedir. Tüm bu sonuçlarla PDE4D aktivitesinin modülasyonu ve hem in vivo hem de in vitro cAMP seviyesinin artması ile aspirin, dipiridamol ve Gebr-7b inhibitörlerinin tamoksifen direncini ortadan kaldırdığı ve dirençli tümörlerde tamoksifen sensitizasyonu ile sonuçlandırıldığı anlaşılmaktadır. Şekil 15A ve B’de ise aspirin ve/veya tamoksifen, dipiridamol ve/veya tamoksifen ve Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulanması ile tümör ağırlığı değişimi gösterilmektedir. Şekil 16A ve B’de aspirin ve/veya tamoksifen, dipiridamol ve/veya tamoksifen ve Gebr-7b ve/veya tamoksifen uygulamasından sonra izole MCF-7 TamR xenograft modelinden elde edilen tümör resimleri verilmektedir.

20

Tablo 1. Dipiridamol, Gebr-7b, aspirin ve tamoksifenin insan ve farede kullanılabilecek doz aralıkları

	İnsanda Kullanılan Doz	Farede Kullanılan Doz
Dipiridamol	75-400 mg/gün	10-70 mg/kg/gün
Gebr-7b	0,1-10 mg/gün*	3-300 µg/kg/gün
Aspirin	75-600 mg/gün	5-400 mg/kg/gün
Tamoksifen	20-80 mg/gün	5-120 mg/gün

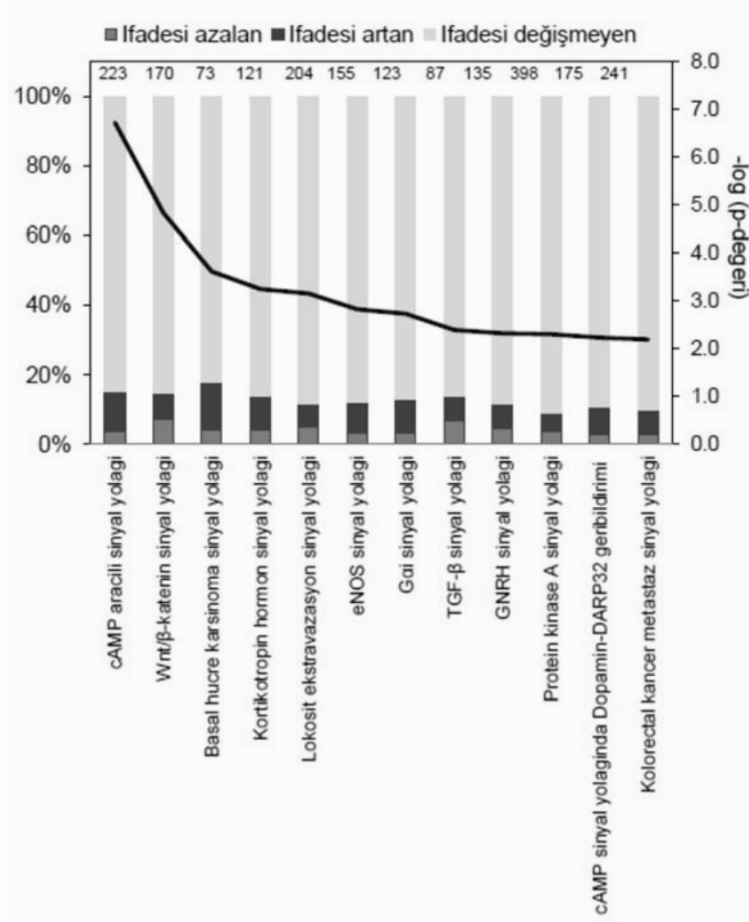
* İnsanda önerilen doz

Özellikle ER-pozitif meme kanserinde kullanılabilecek stratejiler olarak önerilen aspirin, dipiridamol veya PDE4D spesifik inhibitörü olan Gebr-7b ve tamoksifen kombinasyonu cAMP seviyesinin artışı gösterdiği ve sinerjik etki yarattığı görülmektedir. Ancak, özellikle şu ana kadar COX-2 inhibitörü olarak bilinen aspirinin in vitro ve in vivo tamoksifen direncini ortadan kaldırarak PDE4D ve cAMP seviyesi modülatörü ve cAMP indükleyici olduğu ilk defa ortaya çıkmakta ve aspirinin bu özellikleri tamoksifen ile yarattığı sinerjik etkiden kaynaklanmaktadır.

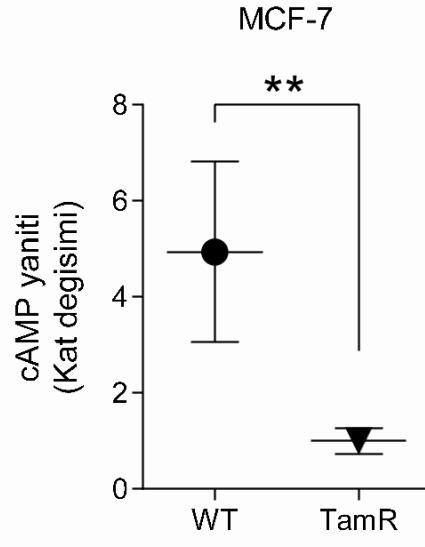
Meme kanser hücresi MCF-7; Fenolsüz Dulbecco besiyeri, %10 fetal serumu, %0,1 insülin, 50 U/ml penisilin/streptomisin, %1 yardımcı amino asitler içinde tekniğin bilinen durumunda kullanılan yöntemlerle kültürlenerek, 5 µM 4-hidroksitamoksifen varlığında MCF-7 TamR hücreleri 1 yıl süre ile büyütülmektedir. MCF-7 WT hücreleri ise tamoksifen eklenmeden aynı koşullarda elde edilmektedir. Hücreler rutin olarak mikoplazma kontaminasyonu için test edilmektedir. Hücresel cAMP seviyesinin belirlenmesi için 10000 hücre ekilmekte ve hücrelere 1 gün sonra PDE4D inhibitörleri ile tamoksifen kombinasyonu 20 dakika boyunca uygulanmaktadır. Ardından, hücreler 2 kez fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanarak LANCA ultra cAMP tespit reaktifleri ile inkübe edilmektedir. Zenograft çalışmalarında ise 6-8 haftalık farelerde MCF-7 TamR hücreleri geliştirilmekte ve östradiol peletler implante edilmektedir. Ardından, 1×10^7 MCF-7 TamR hücreleri meme yağlarına enjekte edilerek tümör büyümesi düzenli olarak izlenmektedir. Tümör 100 mm³ boyutuna ulaştığında ise PDE4D inhibitörleri ve tamoksifen ile işleme tabi tutulmaktadır. Aynı işlemler T47D hücrelerinde de tekrarlanabilmektedir. Buluş konusu geliştirilen PDE4D modülatörleri için yapılan analizlerde yükleme kontrolü için β -aktin kullanılmaktadır.

Buluşun Sanayiye Uygulanma Biçimi:

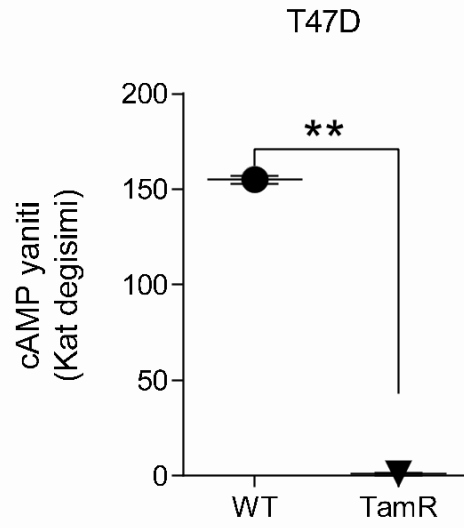
Buluş konusu, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek PDE4D modölatörleri; siklik adenosin monofosfatın indüklenmesini sağlayarak tamoksifene karşı geliştirilen direnci ortadan kaldırmak ve endokrin dirençli hücreleri tamoksifen tedavisine yeniden duyarlı hale getirmesi ile meme kanseri tedavisi için geliştirilen stratejilere göre üstün özellik gösterebilecek yapıdadır.



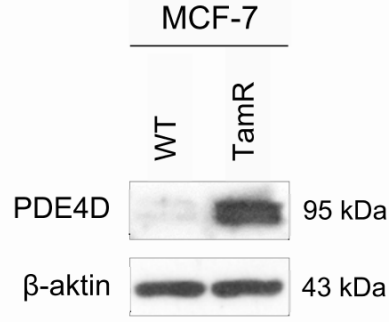
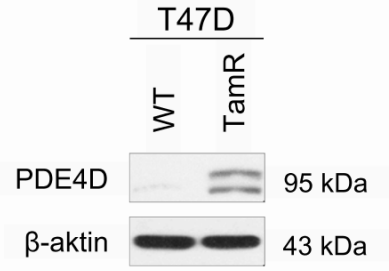
Şekil 1

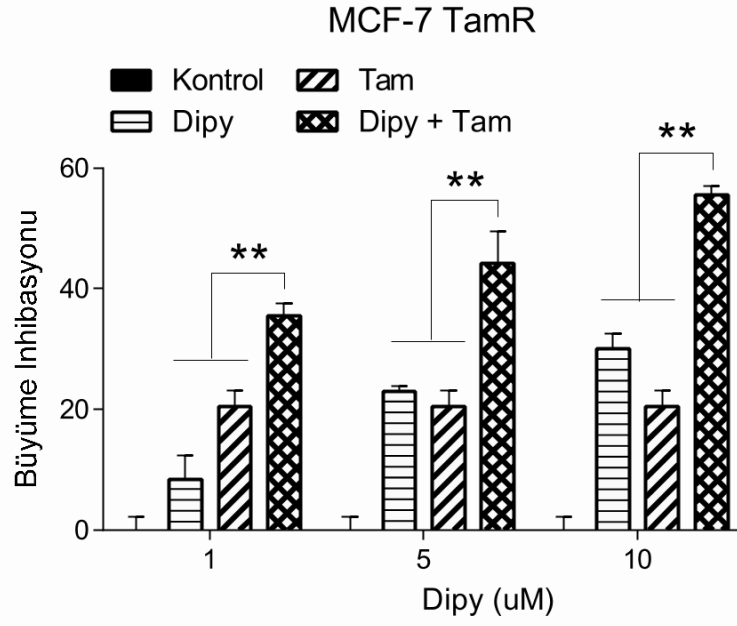


Şekil 2A

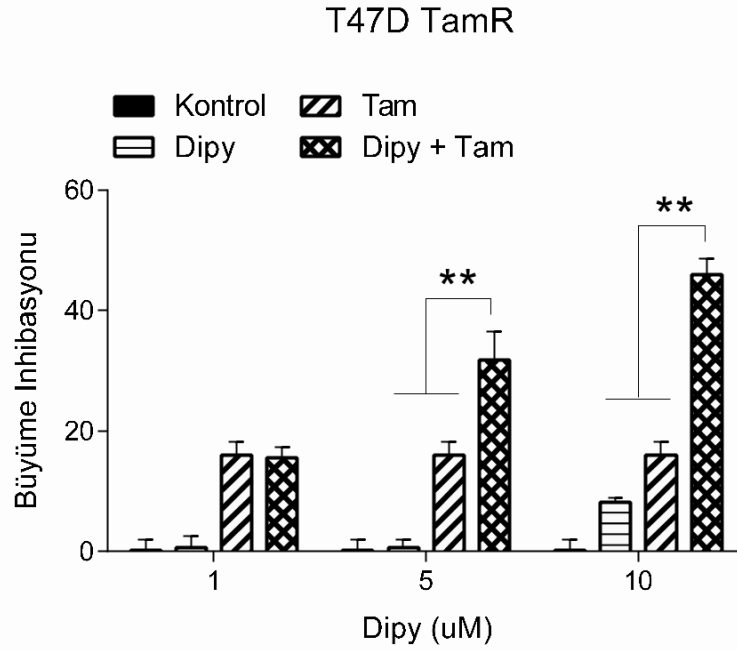


Şekil 2B

**Şekil 3A****Şekil 3B**

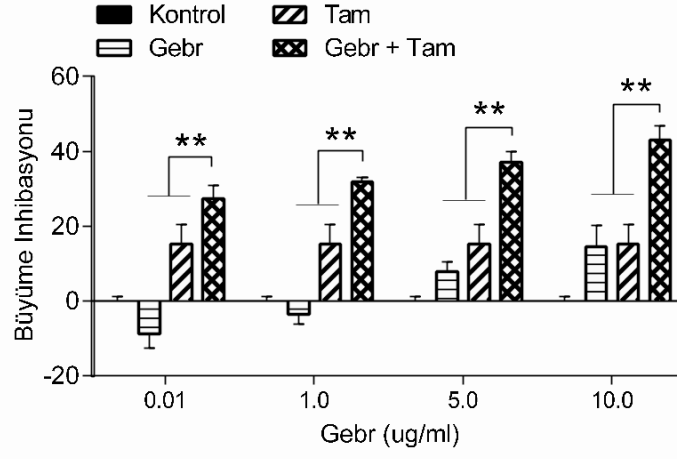


Şekil 4A



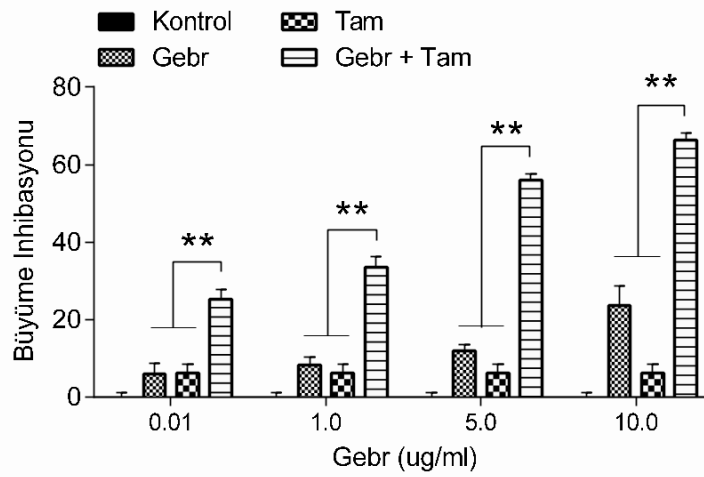
Şekil 4B

MCF-7 TamR

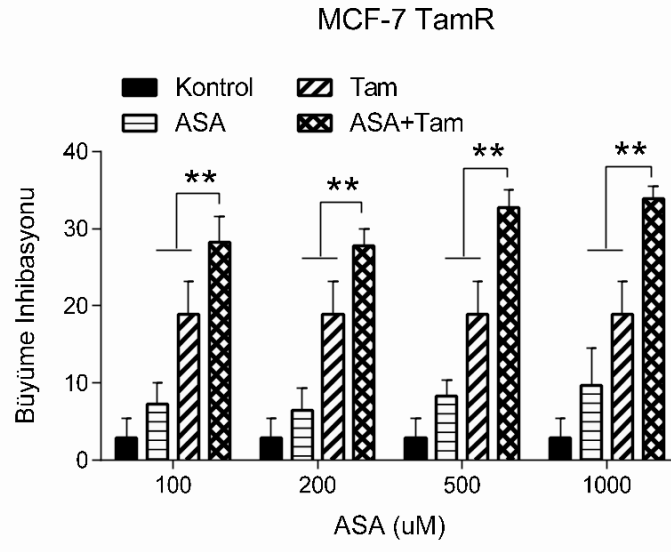


Şekil 5A

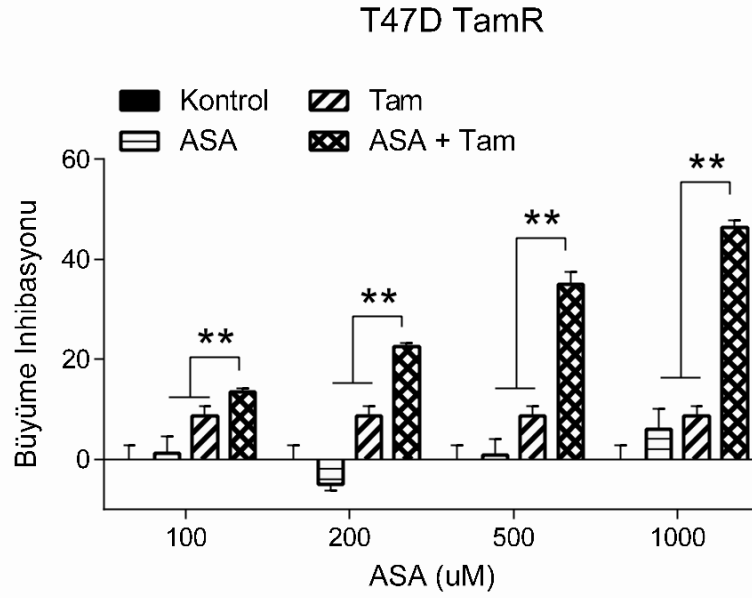
T47D TamR



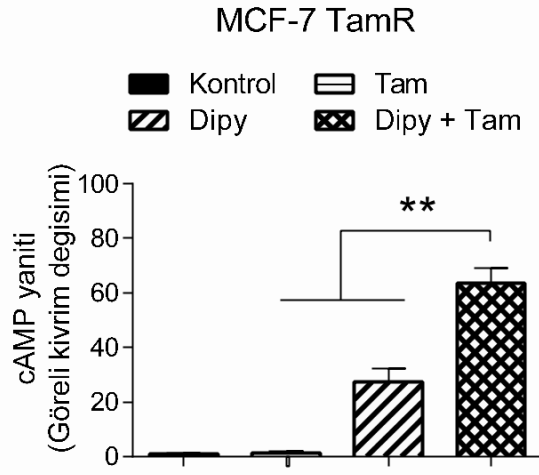
Şekil 5B



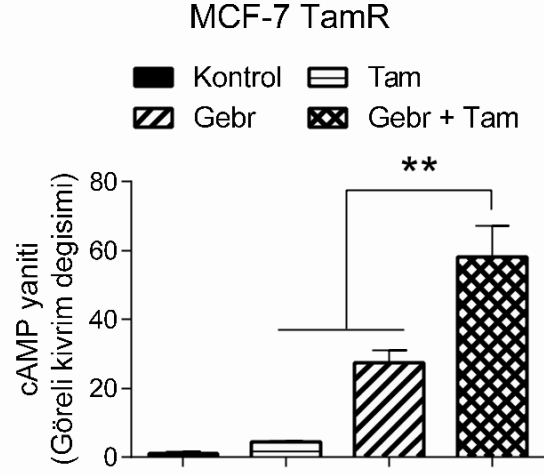
Şekil 6A



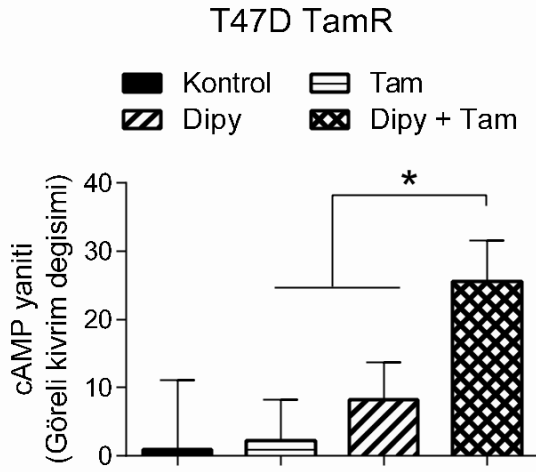
Şekil 6B



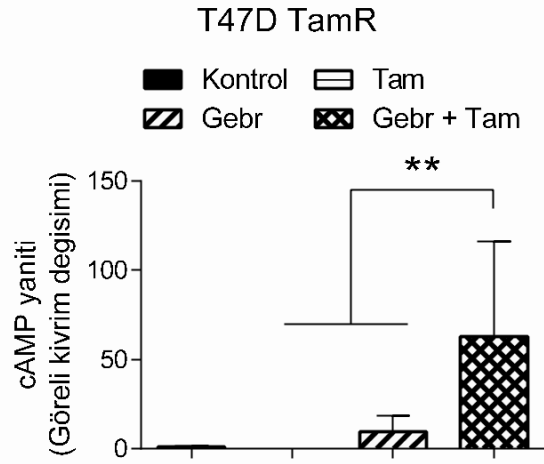
Şekil 7A



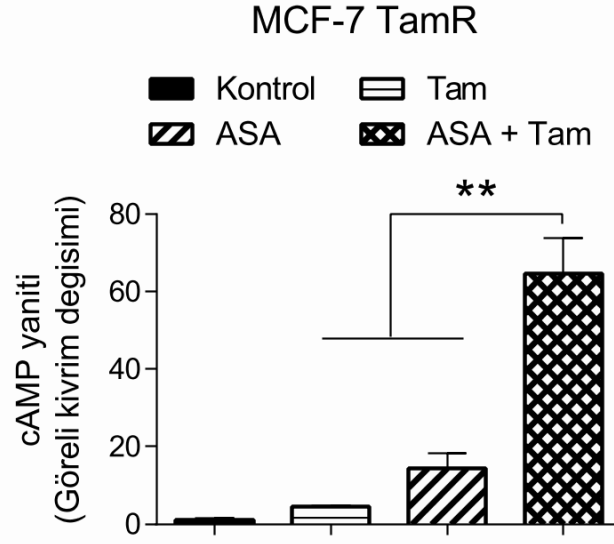
Şekil 7B



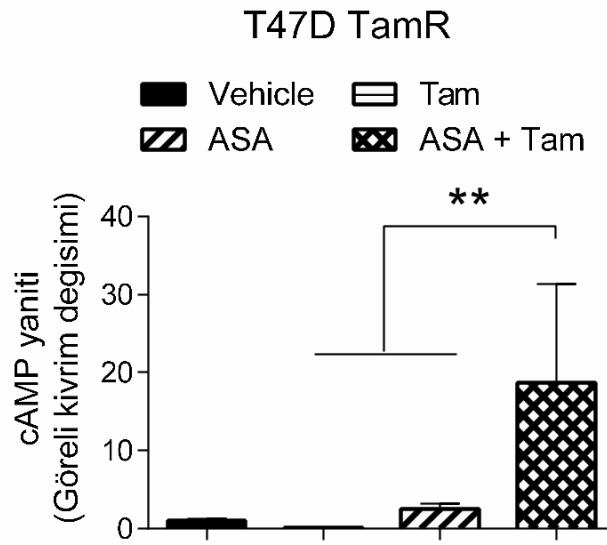
Şekil 7C



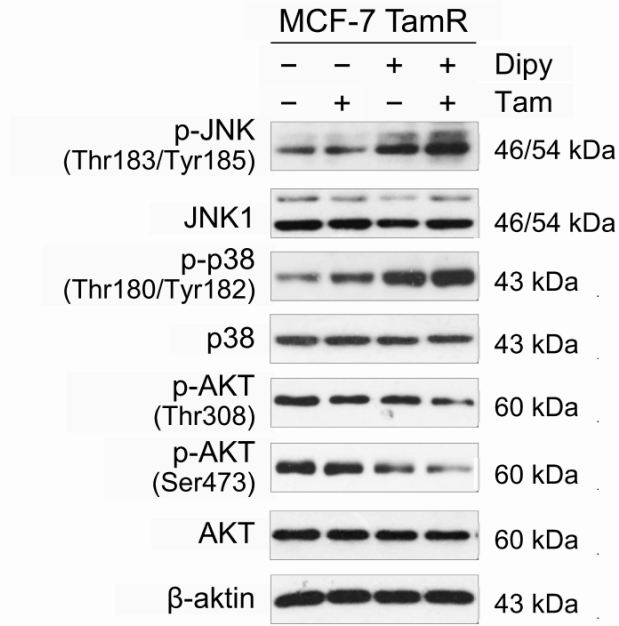
Şekil 7D



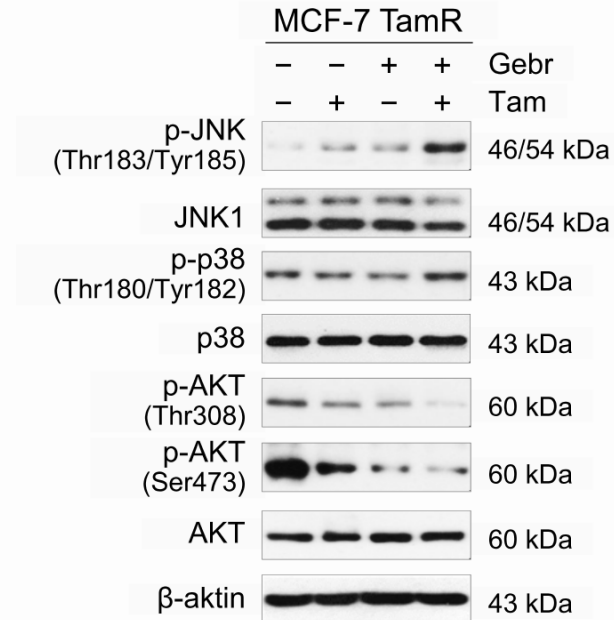
Şekil 8A



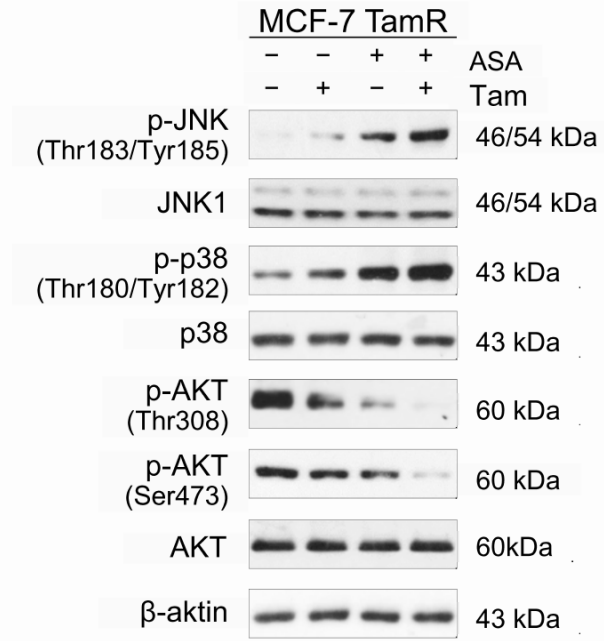
Şekil 8B



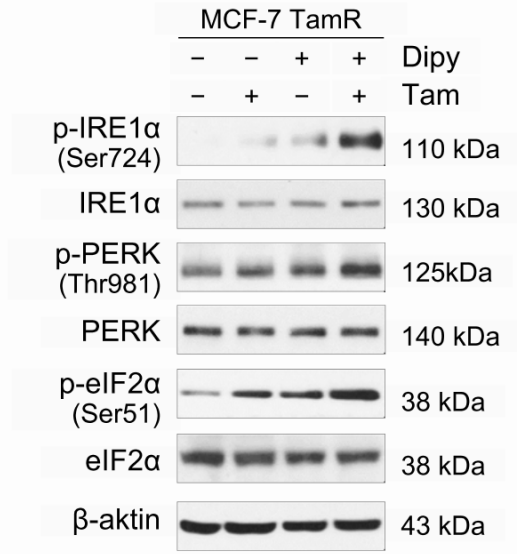
Şekil 9A



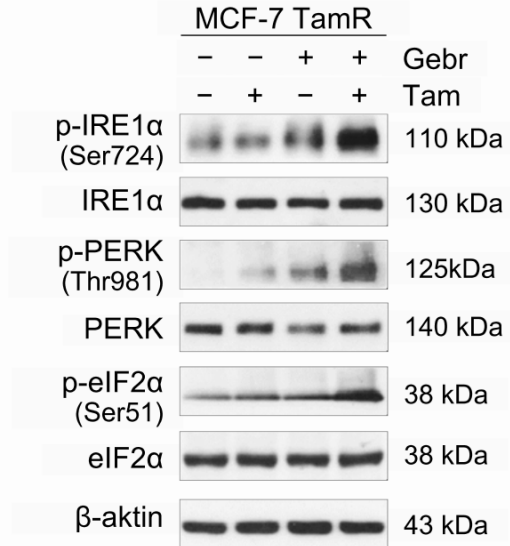
Şekil 9B



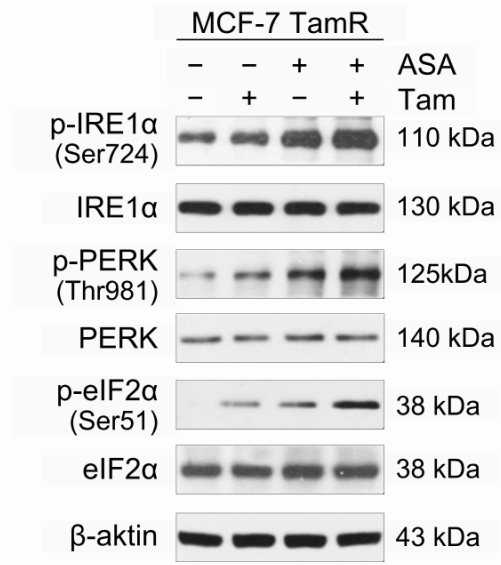
Şekil 10



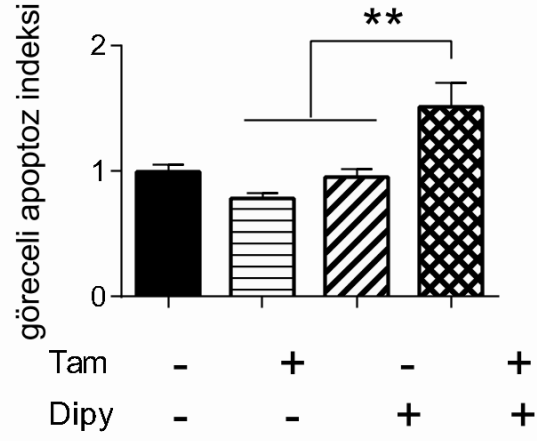
Şekil 11A



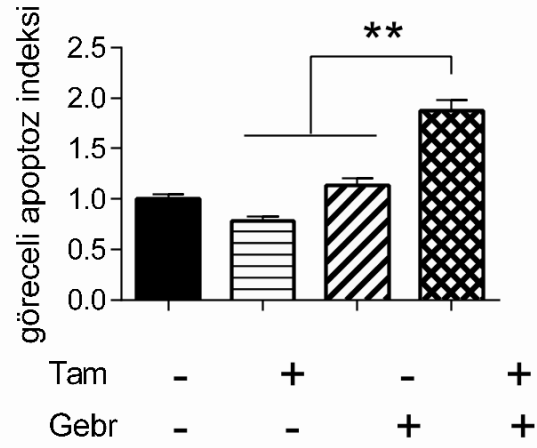
Şekil 11B



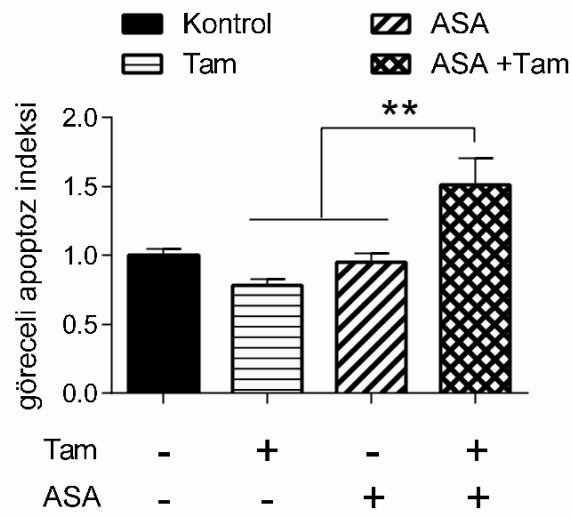
Şekil 12



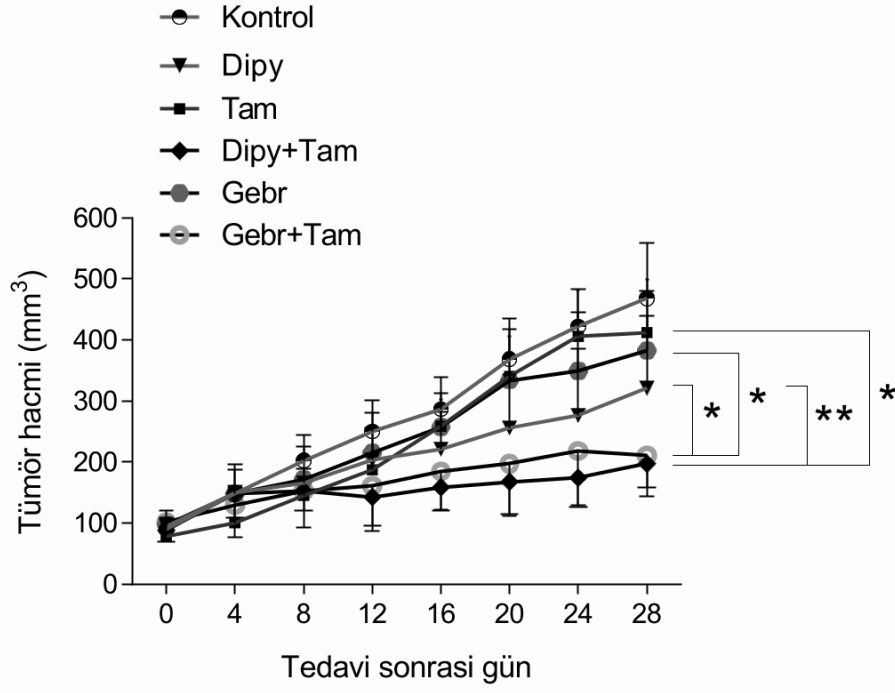
Şekil 13A



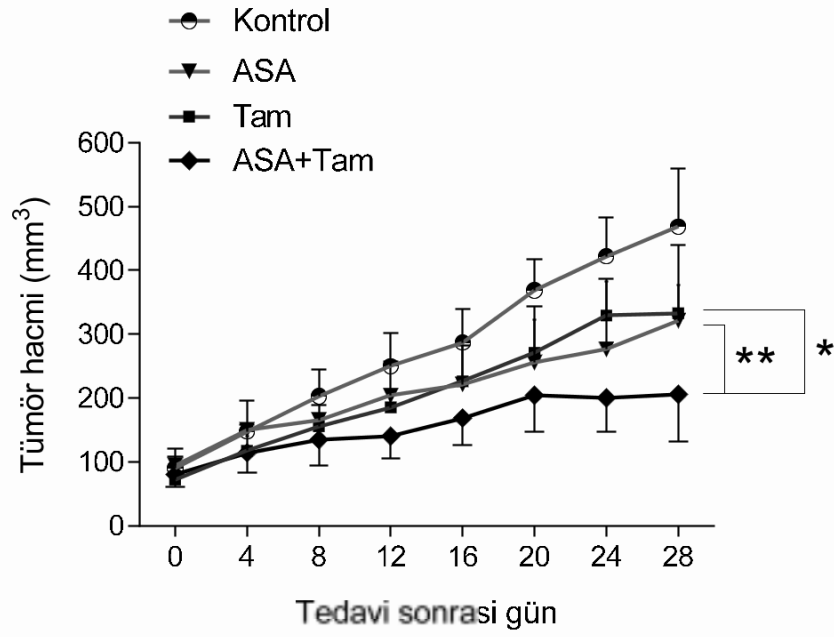
Şekil 13B



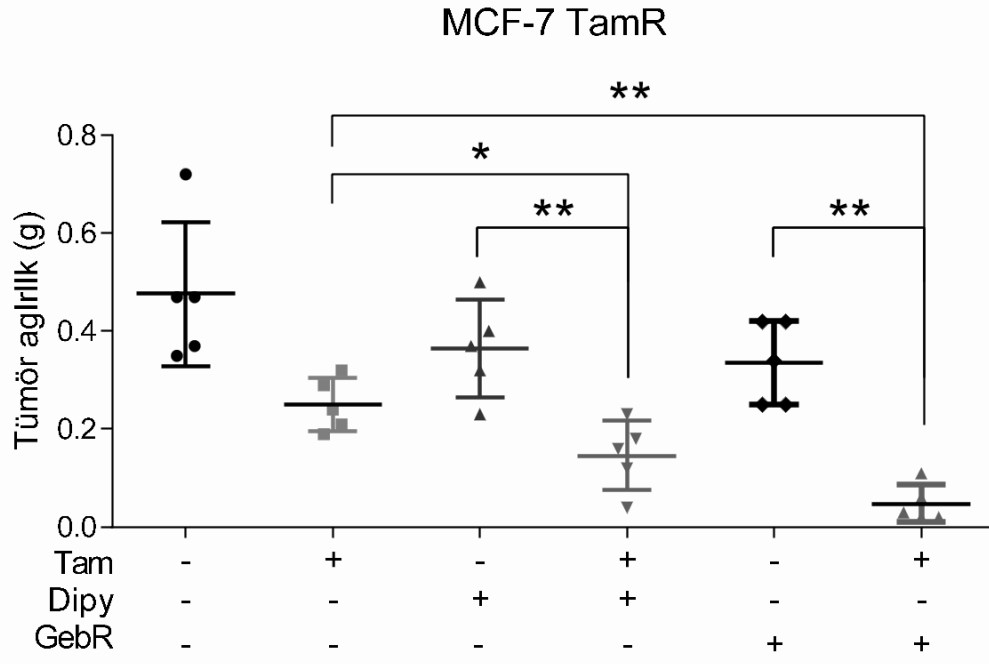
Şekil 13C



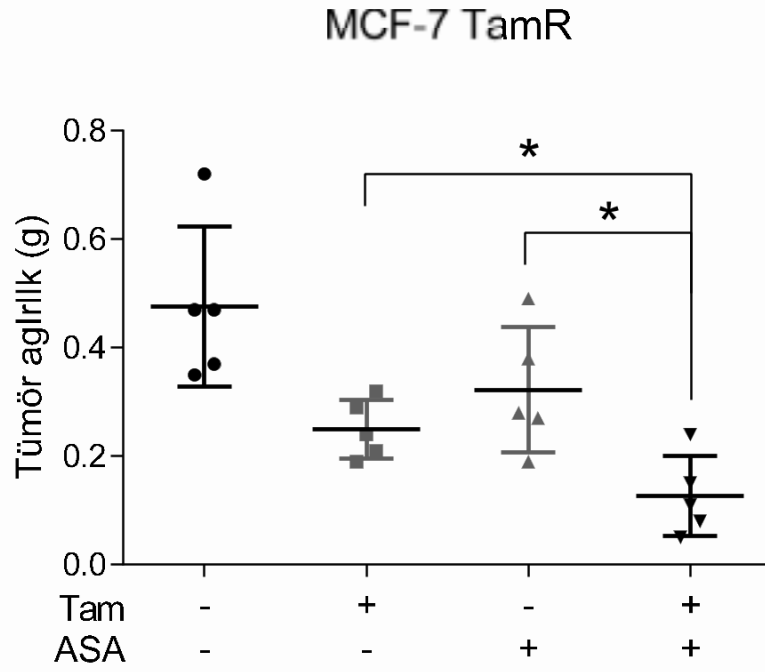
Şekil 14A



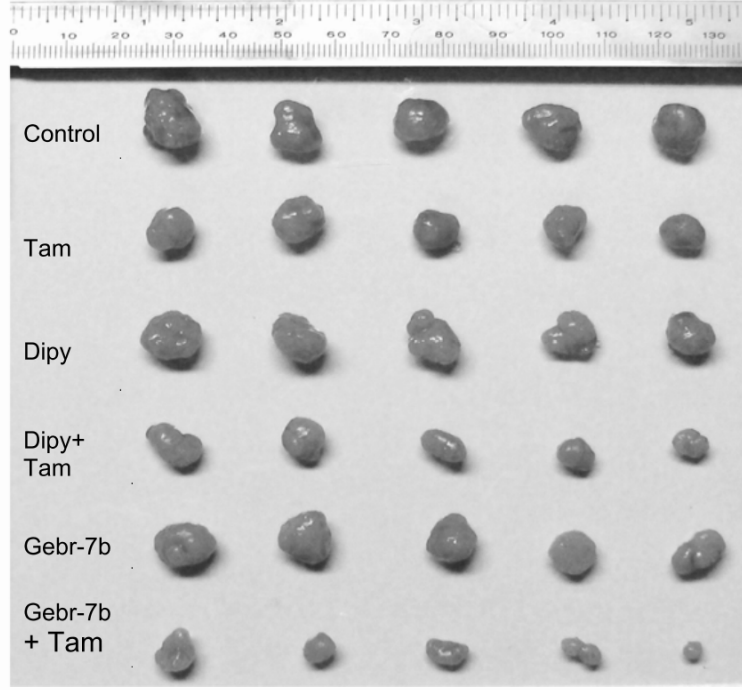
Şekil 14B



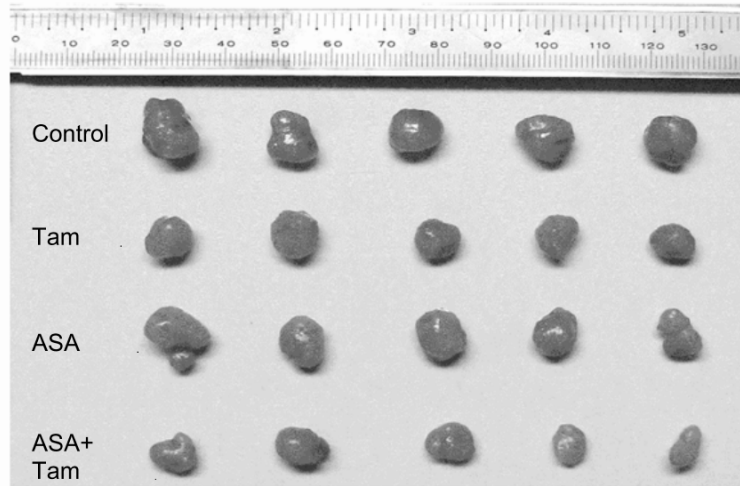
Şekil 15A



Şekil 15B



Şekil 16A



Şekil 16B