

ÖZET

BİR TÜMÖRÜN TEDAVİSİNDE KULLANIMA YÖNELİK PREEKLAMPTİK PLASENTAL MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KOŞULLU ORTAM

5

Sıvı bir kültür ortamında, preeklampitik bir plasentadan plasental mezenkimal kök hücreler kültürlenerek elde edilebilen bir koşullu ortam (CM) açıklanmaktadır. Buluşun amacı olan koşullu ortam, en az IP-10 ve TARC proteinleri kapsamaktadır ve bir tümörün, tercihen bir epitelyal tümörün, terapötik tedavisinde kullanıma yönelik kullanılmaktadır.

10

İSTEMLER

1. Koşullu ortamın, bir tümörün terapötik tedavisinde kullanıma yönelik, en az at interferon gama-indüklenmiş protein 10 (IP-10) ve timus aktivasyonu-regüle kemokin (TARC) içerdiği; serumsuz bazal sıvı bir kültür ortamında preeklampitik bir plasentadan plasental mezenkimal kök bir hücre kültürlenerek elde edilebilen bir koşullu ortam.
2. Tümörün bir epitelyal tümör olduğu, İstem 1'e göre kullanıma yönelik koşullu ortam.
3. Tümörün bir meme tümörü olduğu, İstem 2'ye göre kullanıma yönelik koşullu ortam.
4. Koşullu ortamın ayrıca: çözünür fms-benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-alfa), ve bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen en az bir adet protein de içerdiği; İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik koşullu ortam.
5. Koşullu ortamın ayrıca: ENA-78, GRO, GRO-alfa, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-16, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANJİOGENİN, ONKOSTATİN m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAKSİN 2, EOTAKSİN 3, FLT-3 LİGAND, FRAKTALKİN, GCP-2, GDNF, HGF, IFN-gamma, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, LIF, LIGHT, MCP-3, MCP-4, MIF, MIG, MIP-3alfa, MIP-1beta, MIP-16, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTİN, OSTOPROTEGERİN, PDGFBB, RANTES, SCF, SDF, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TIMP-1 ve TIMP-2, EGF, Trombopoietin, LEPTIN, Eotaksin, FGF-4, FGF-6, FGF-7, FGF-9, IGFBP-3, NT-4, PARC, PIGF, ve bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşan gruptan

seçilen bir veya daha çok protein de içerdği; İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik koşullu ortam.

5 6. Plasental mezenkimal kök hücrenin, koryonik veya amniyotik orijine sahip olduğu; İstemler 1 ila 5'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik koşullu ortam.

7. Hücresiz olan; İstemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre kullanıma yönelik koşullu ortam.

10 8. Preeklampitik bir plasentadan plasental mezenkimal kök hücrenin, insan orijinine sahip olduğu; İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre kullanıma yönelik koşullu ortam.

TARİFNAME

BİR TÜMÖRÜN TEDAVİSİNDE KULLANIMA YÖNELİK PREEKLAMPTİK PLASENTAL MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KOŞULLU ORTAM

5

Mevcut buluş, tümöral patolojiler için terapötik tedaviler alanı ile ilgilidir.

10 Son birkaç on yıllık zaman boyunca, anti-tümöral terapiler önemli ilerlemeler kaydetmiştir; böylece artan sayıda vakanın prognozu, bir zamanlar önlenemez bir şekilde kaygı verici olan, pozitif olarak modifiye etmesine izin vermektedir ve dolayısıyla bunları tedavi edilebilir ve bazen iyileştirilebilir hale getirmektedir. Ancak, eğer tümör alanı ve hastalığın evresi izin verir ise, konvansiyonel tümör terapileri yine öncelikli olarak cerrahi müdahalelere dayanmaktadırlar. Cerrahi 15 müdahaleler genellikle, maalesef şiddetli yan etkiler ile ilişkisi olan kemo-ve/veya radyo-terapi tedavileri de beraberinde getirmektedir. Kemoterapi sistemik olarak uygulanmaktadır; bu nedenle sitotoksik etkileri hem kanserli hem de sağlıklı hücreleri, özellikle de yüksek bir proliferasyon oranı ile karakterize edilen dokularda, ayırım gözetmeksizin hedefleyebilmektedir. Esasında, kemoterapi 20 miyelosüpresyon ve mukozit gibi ek patolojik durumların başlangıcına da neden olabilmektedir. Radyoterapi ayrıca, tümör alanının ısılanması esnasında esasen sağlıklı hücrelerin DNA'sı tarafından neden olunan şiddetli yan etkiler de indükleyebilmektedir. Bu olay, ikincil tümörlerin oluşumuna bile neden olabilmektedir.

25

Dolayısıyla, alternatif terapötik yaklaşımların değerlendirilmesi üzerine odaklanılmış olan klinik onkolojik araştırmalar: örneğin spesifik olarak kanser hücresi büyümesi ve neoplastik hücrelerin metastatik invazyonu esnasında yanı sıra tümör neo-anjiyogenezi esnasında aktive olan hücresel mekanizmalar ile

selektif olarak çatışan terapötik ajanların kullanımı vasıtasıyla, neoplastik hücreler üzerinde daha hedefe yönelik bir etki uygulayabilmektedir.

5 Kök hücre tabanlı terapiler, kök hücreler ve fizyolojik koşullar altında kök hücre tarafından üretilmiş olan faktörleri kullanan yaklaşımlar dahil olmak üzere, daha inovatif çözümler arasında önemli bir rol oynamaktadırlar.

Özellikle, yakın zamandaki deneysel kanıtlar: insan embriyonik kök hücrelerinin, kanser hücrelerinin invitro proliferasyonunu ve tümörijenizini selektif olarak
10 inhibe edebilen trofik faktörleri salgılayabildiklerini ileri sürmektedir. Ayrıca, kemik iliği ve adipoz dokudan izole edilmiş olan yetişkin mezenkimal kök hücrelerinde (MSC-Mesenchymal Stem Cells) anti-tümöral aktivite rapor edilmiştir. Örneğin, in-vivo fareler modellerinde intravenöz olarak uygulanan insan MSC'lerin, tümöral stromaya entegre olmak ve kanser hücrelerinin
15 proliferasyonunu inhibe etmek üzere malign dokuya doğru selektif olarak taşınabildikleri gözlenmiştir. Aktif tümörijeniz alanlarına doğru bu özel MSC'lerin tropizmlerine dayanarak, son zamanlarda MSC'lere yönelik ek terapötik uygulamalar geliştirilmiştir. Bu yöntemler, anti-neoplastik aktiviteye sahip olan biyolojik molekülleri doğrudan tümör alanına selektif olarak teslim
20 etmek için araçlar olarak mezenkimal hücrelerin kullanımını kapsamaktadır.

Yukarıda belirtilen umut verici sonuçlara rağmen, klinik uygulamada insan kök hücrelerinin uygulanması hala bir zorluktur. İnsan embriyonik kök hücreleri, önemli etik ve biyogüvenlik meseleleri teşkil etmektedir çünkü sınırlı
25 karakterizasyonları, ikincil tümörlerin insidansı gibi potansiyel yan etkileri tahmin etmeyi zorlaştırmaktadır. Diğer yandan, MSC'nin terapötik kullanımı: doğal düşük konsantrasyonları dolayısıyla (kemik iliğinde (%0,001 tek çekirdekli hücreler) bu hücreleri zor ve pahalı ex-vivo genleşme yöntemlerine maruz bırakma gerekliliği ile birlikte, yüksek derecede invaziv prosedürler tarafından kemik iliği
30 veya adipoz dokudan hasatlarına işaret etmektedir.

Yakın zamandaki çalışmalar, plasental koryonik villusların mezenkiminde ve plasental mezenkimal kök hücreler (PDMSC) adında belirli bir hücre popülasyonunun amniyotik membranlarında mevcudiyet rapor etmiştir (Huang YC, Yang ZM, Chen XH, Tan MY, Wang J, Li XQ, ve ark. Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. Stem Cell Rev. 2009;5(3):247-55). Plasental dokunun eşsiz özellikleri nedeniyle, bu hücreler kendilerini: yükselmiş bir proliferatif ve diferansiyasyon potansiyeli ile birlikte, iyi tanımlanmış bir yaşam süresine ve kontrollü bir proliferasyon oranına sahip olma yönünde temel özellik ile temin eden bir kök-mezenkimal fenotipe sahiptirler; böylece in-vivo kullanımları ile ilişkili ikincil tümörlerin oluşumu şeklindeki potansiyel riski indirgemektedirler. Ayrıca, PDMSC'ler immünsüpresif ve anti-inflamatuar aktiviteler uygulayabilmektedirler.

Yukarıda belirtilen benzersiz plastik ve diferansiyasyon özelliklerine yanı sıra plasental doku alma ve kullanma kolaylığına dayanarak, plasental mezenkimal kök hücreler esasen rejeneratif tıp alanında yoğun soruşturma konusu haline gelmişlerdir.

Rüster B. ve meslektaşları, MSC'nin onarıcı süreçte dahil olmak üzere hasarlı organlara ve dokulara doğru spontane olarak taşınma kabiliyetine sahip olduğunu rapor etmektedirler (Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistran R, Müller S, Seifried E, ve ark. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. Blood. 2006;108(12):3938-44). Mezenkimal kök hücrelerinin tipine özgü immünojenisitenin olmaması ayrıca, T lenfositleri doğrudan uyarmak ve sitotoksik T lenfositlere lizis direnci vermek için gerekli HLA-II ve eş-uyarıcı moleküllerin (CD80, CD86, CD40) eksikliği nedeniyle, rejeneratif tıpta uygulamalarını da desteklemektedir. Diğer çalışmalar, fizyolojik plasentanın amniyotik membranlarından türetilen PDMSC'lerin tümör hücre

dizileri proliferasyonu üzerinde inhibitör bir etki uygulayabildiklerini göstermiştir (Magatti M, De Munari S, Vertua E, Parolini O. Amniotic Membrane-Derived Cells Inhibit Proliferation of Cancer Cell Lines by Inducing Cell Cycle Arrest. J Cell Mol Med. 2012 Jan 19. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01531.x.) aday anti-proliferatif faktörler olarak yazarların ismi GM-CSF, IL-6, IFNalfa, IFNbeta, TFN alfa ve DKK1. Uluslararası patent başvurusu No. WO 2013/093878, preeklampitik sendromun terapötik tedavisi için fizyolojik insan plasentasının koryonik villuslardan izole edilen PDMSC hücreleri tarafından koşullu bir kültür ortamının kullanımını açıklamaktadır. Preeklampsi: ağırlaşmış bir maternal-plasental inflamatuvar yanıt, genelleştirilmiş endotel hasar ve defektif plasental gelişim ile karakterize edilen insan hamileliği ile ilgili şiddetli bir sendromdur.

Ackerman, W.E. ve ark., IFPA 2011 Toplantısı çalıştay raporu III, PLACENTA, W.B. SAUNDERS, GB, cilt 33, 24 Kasım 2011, sayfalar S-15-S22: makrofaj migratuar inhibitör faktörü (MiF) ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) dahil, preeklampitik plasental mezenkimal kök hücreler tarafından pro-inflamatuvar sitokinlerin artan üretimini açıklamaktadırlar.

Aşağıdaki deneysel bölümde daha fazla ayrıntı ile gösterileceği gibi, mevcut mucitler: bir sıvı kültür ortamda preeklampsiden etkilenmiş olan insan plasentasından izole edilmiş olan plasental mezenkimal kök hücrelerin kültürlenmesi vasıtasıyla üretilmiş olan koşullu ortamın (CM-Conditioned Medium) tümör proliferasyonu ve anjiyogenez üzerinde şaşırtıcı bir inhibitör etki uyguladığını gözlemlemişlerdir. Özellikle, Şekil 1'de gösterildiği gibi, yukarıda bahsedilen koşullu ortam tarafından primer ve metastatik tümöral meme dokusu eksplantlarının tedavisi: tümöral neo-anjiyogenez süreçlerinde dahil olan ana vasküler büyüme faktörü olarak iyi bilinen, kontrollere kıyasla VEGF'nin ("Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü") ekspresyon seviyelerinde ve ekspresyonu meme kanserinin kötü bir prognozu ile doğrudan ilişkili olan Aktivasyon Proteini-1'in (AP-1) onkojen ögesi, transkripsiyonel faktör JunB'de

önemli ve şaşırtıcı bir düşüş indüklemektedir. Bu hücrelerin terapötik etkinliği gerçekten şaşırtıcıdır çünkü fizyolojik plasental mezenkimal kök hücreler kültürlenerek elde edilen koşullu ortam, vaskülojenezi uyararak tümöral eksplantlar üzerinde zıt bir etki uygulamaktadır.

5

Anjiyogenez süreçleri üzerinde ve tümöral hücrelerin proliferasyonu üzerinde uygulanmış olan deneysel olarak gösterilen inhibitör etki, ileri bir aşamadaki kanser dokuları üzerinde de özellikle etkili olduğu da ortaya çıkan, sıvı bir kültür ortamında insan preeklampitik plasentasından plasental mezenkimal kök hücreler 10 kültürleyerek elde edilebilen koşullu ortamın klinik anti-tümöral etkinliğinin kuvvetli bir göstergesidir. Yukarıda açıklanmış olan CM anti-tümöral etkilere uyumlu bir şekilde katkıda bulunan preeklampitik PDMSC'ler tarafından salgılanan proteinleri tanımlamak amacıyla mucitler tarafından izlenen deneysel yaklaşım: birkaç farklı sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerini spesifik 15 olarak ve eşzamanlı olarak tanıyabilen piyasada mevcut bir antikor dizisi kullanılarak bahsedilen ortamın proteomik analizine dayanmıştır. Aşağıda bahsedilmiş olan, IP-10 (Interferon gamma induced protein 10-İnterferon gama indüklenmiş protein 10) ile TARC'ın (Timus ve Aktivasyon Regüle Kemokin-Thymus and Activation Regulated Chemokine) aralarında bulunduğu, birkaç 20 faktörün tanımlanmasına izin veren proteomik analizin sonuçları çok önemlidir.

Bu nedenle, buluşun konusu: preeklampitik bir plasentadan izole edilmiş olan bir plasental mezenkimal kök hücre, serumsuz sıvı bazal bir ortamda, kültürlenerek elde edilebilen ve bir tümörün terapötik tedavisinde kullanıma yönelik, en az IP- 25 10 ve TARC faktörleri içeren bir koşullu ortamdır (CM). Mevcut tarifnamede, "preeklampitik plasentadan plasental mezenkimal kök hücre" terimi preeklampitik sendromdan etkilenmiş olan hamile bir kadının plasentasından türetilen bir mezenkimal kök hücreye işaret etmektedir. Hamile denek tercihen bir insan denektir.

30

Plasental orijinli mezenkimal kök hücreler, plasental dokunun orijinine dayanılarak, farklı popülasyonlara ait olmaktadır. Esasında, insan plasentası: koryon (koryon frondosum ve pürüzsüz koryon) ve amniyon gibi fetal dokuları ve desidua gibi maternal-türevli dokuları kapsayan benzersiz bir yapıya sahiptir.

5

Tercih edilen bir uygulamada, buluşun konusu olan koşullu ortam koryonik orijinli bir plasental mezenkimal kök hücre kültürlenerek elde edilebilmektedir. Tercihen, ama sınırlayıcı olmayan bir şekilde, koryonik mezenkimal kök hücre: sitoflorimetrik analiz vasıtasıyla tespit edilen, aşağıdaki Tablo'da gösterilmiş olan yüzey antijenleri özellikleri ile karakterize edilmektedir.

10

İşaretleyici	Sitoflorimetrik Analiz
HLA I	+
CD105 (Endoglin)	+
CD166 (ALCAM)	+
CD90 (Thy-1)	+
CD73 (5'-nükleotidaz)	+
CD34	-
HLA-DR	-
CD133 (Prominin-1)	-
CD20	-
CD326 (EpCAM)	-
CD31 (PECAM-1)	-
CD45 (PTPRC)	-
CD14	-

Alternatif olarak, koşullu ortamı hazırlamak için, yukarıda bahsedilen tabloda gösterilmiş olan yüzey antijenleri özelliklerini sunan amniyoternal-türevli bir mezenkimal kök hücre kullanılmaktadır.

15

Mevcut buluşun konusu olan koşullu ortam, anti-tümoral aktiviteleri ile meşhur olan en az IP-10 ve TARC, salgılanmış proteinler içermektedir. CXC familyasının üyesi olan IP-10 kemokin, İnterferon gama (IFN gama) anti-tümoral aktivitenin temel bir mediyatörüdür; çünkü IP-10, IFN gama tarafından indüklendikten sonra, CD8+ T lenfositler ve makrofajları tümör alanına çekebilmektedir ve bir anti-anjiyojenik etki uygulayabilmektedir. Benzer şekilde, aktive edilmiş Th2 efektör hücrelerin neoplastik dokulara doğru selektif taşınmasından sorumlu olan TARC kemokin tarafından bir kemotaktik çekim rolü uygulanmaktadır.

10

Yukarıda bahsedilen sitokinler ile birlikte, RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 kit PDMSC tarafından gerçekleştirilmiş olan PDMSC koşullu ortam analizi: bir preeklampitik plasentadan türetilen plasental mezenkimal kök hücreler tarafından salgılanan diğer fonksiyonel modülatörlerin varlığını göstermiştir, böylece farklı bir protein ekspresyon profili tanımlamaktadır.

15

Dolayısıyla, bir diğer uygulamada, buluşun konusu olan koşullu ortam ayrıca: fms-benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin-8 (IL-8) ve/veya tümör nekroz faktörü alfa (TNF-alfa) içermektedir. sFlt-1, güçlü bir anti-anjiyojenik aktivitesi olan çözünür bir moleküldür; IL-6, IL-8 ve TNF-alfa, tümörel hücrelere karşı sitotoksitenin kuvvetli pro-inflamatuvar sitokinler mediatörleridirler.

20

Tercihen, mevcut buluşun konusu olan koşullu ortam: ENA-78, GRO, GRO-alfa, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-16, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANJIOGENİN, ONKOSTATİN m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAKSİN 2, EOTAKSİN 3, FLT-3 LİGAND, FRAKTALKİN, GCP-2, GDNF, HGF, IFN-gama, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, LIF, LIGHT, MCP-3, MCP-4, MIF, MIG, MIP-3alfa, MIP-1beta, MIP-16, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTİN, OSTOPROTEGERİN, PDGFBB, RANTES, SCF, SDF, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TIMP-1

30

ve TIMP-2, EGF, Trombopoietin, LEPTIN, Eotaksin, FGF-4, FGF-6, FGF-7, FGF-9, IGFBP-3, NT-4, PARC, PIGF, ve bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen bir veya daha çok protein içermektedir.

- 5 Mucitler tarafından gerçekleştirilen sitokinler analizi, mevcut buluşun konusu olan koşullu ortamda, aşağıdaki proteinleri bulmamıştır çünkü bunlar mevcut değillerdi veya çok düşük konsantrasyonlarda ve/veya kullanılan dizinin tespit sınırından daha düşük olan konsantrasyonlarda mevcuttur: GM-CSF, 1-309, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, p40p70, IL-13, MIP-1, TNFbeta, IGF-I, 10 IGFBP-4, TGF-beta 3.

Tercih edilen bir uygulamada, koşullu ortam bir epitelyal tümörün –daha çok tercihen bir meme tümörü– terapötik tedavisi için kullanılmaktadır. Mevcut tarifname bağlamında, "epitelyal" terimi neoplastik transformasyonun çoğalan 15 (proliferating) tümör hücreleri alanının histolojik orijinine işaret etmektedir.

PDMSC'ler hücrelerini karakterize eden immünojenesitenin olmaması nedeniyle, buluşa ait koşullu ortam opsiyonel olarak: elde edilmiş olduğu preeklampitik plasentadan plasental mezenkimal kök hücrelerden meydana gelen bir hücresel 20 fraksiyon kapsayabilmektedir. Alternatif olarak, koşullu ortam hücresel fraksiyonlar ihtiva etmemektedir.

Buluşta kullanılan koşullu ortam, aşağıdaki aşamaları kapsayan bir yöntem tarafından üretilmektedir:

25

(i) en az üç saate süresince serumsuz sıvı bazal bir kültür ortamında preeklampitik bir plasentadan plasental mezenkimal bir kök hücrenin kültürlenmesi;

(ii) hücresel fraksiyonun tamamını veya bir kısmını, sıvı kültür ortamından 30 ayırma.

Mevcut tarifname bağlamında, "bazal" terimi: özel beslenme ihtiyaçları olmayan memeli hücrelerinin büyümesini desteklemek için normal olarak gereken inorganik tuzlar, amino asitler ve vitaminleri ihtiva eden bir kültür ortamına atıfta
5 bulunulmaktadır. Örnek yoluyla ve sınırlandırma olmadan, tuzlar ve amino asit içeriklerine yönelik olarak esasen farklı olan, aşağıdaki sıvı kültür ortamına alıntı yapılmaktadır: Basal Medium Eagles (BME), Minimum Essential Medium (MEM), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Nutrient Mixture F-10 (HAM's F-10) ve Nutrient Mixture F-12 (HAM's F-12). Daha fazla uygun kültür
10 ortamının seçimi, teknikte uzman bir kişinin yetenekleri dahilindedir. Açıklanan yönteme göre, kültür ortamı: serumda ihtiva edilen büyüme faktörlerinin, preeklampitik plasentadan PDMSC hücreleri tarafından salgılanan spesifik faktörlerin neden olduğu etkileri ile çatışmasını ve değiştirmesini önlemek amacıyla, serum tarafından tamamlanmamaktadır.

15 Koşullu ortam toplanmadan önce, preeklampitik bir plasentadan plasental mezenkimal kök hücreler: kültür substratına adhezyonlarına, multiplikasyonlarına, ve yukarıda açıklanan ortamı karakterize eden ve bir tümörün terapötik tedavisi için bunu yararlı bir şekilde etkin hale getiren bileşenlerin salgılanmasına olanak
20 sağlamak için yeterli bir süre boyunca kültürlenmektedirler. Bu zaman periyodu: en az 3 saat, tercihen en az 12 saat, en az 24 saat, en az 48 saat, en az 72 saat veya en az 96 saat veya en az 120 saat veya en az 1 hafta veya daha fazla olmaktadır.

Preeklampitik bir plasentadan PDMSC hücrelerinden elde edilen koşullu ortamdan
25 hücresel fraksiyonu tamamen veya kısmen ayırmak amacıyla, kendiliğinden bilinen herhangi bir yöntem kullanılabilir. Örneğin, buluşa ait koşullu ortam: hücresele elemanlar ve süspansiyondaki kalıntıları tutmak için yeterli gözeneklilikte filtreleme kompleksleri kullanılarak filtrelenebilmektedir. Alternatif olarak, elde edildiği PDMSC hücrelerinden koşullu ortamın ayrılması,
30 santrifüjleme ve hücrelerin kendilerinin sedimentasyonu vasıtasıyla

5 sağlanabilmektedir. Dolayısıyla, buluşun tercih edilen bir uygulamasında, buluşa ait koşullu ortamın hücresel bileşenlerden ayrılması filtrasyon veya santrifüjleme veya her ikisinin kombinasyonu vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Ayrılma yönteminin seçimi büyük bir ölçüde, teknikte uzman kişinin bilgisi ve teknik kabiliyetleri dahilindedir.

Mevcut buluşta kullanılan koşullu ortam: mevcut buluşun konusu koşullu ortamın anti-tümöral aktivitesi için esas olarak yukarıda tanımlanan, en az proteinler IP-10 ve TARC içeren bir farmasötik bileşim olarak formüle edilebilmektedir.

10 farmasötik bileşimin isteğe bağlı ek bileşenleri aşağıdaki proteinlerdir: sFlt-1, TNF-alfa, ENA-78, GRO, GRO-alfa, IL-5, IL-7, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-16, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANJİOGENİN, ONKOSTATİN m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAKSİN 2, EOTAKSİN 3, FLT-3 LİGAND, FRAKTALKİN, GCP-2, GDNF, HGF, IFN-gama, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4,

15 LIF, LIGHT, MCP-3, MCP-4, MIF, MIG, MIP-3alfa, MIP-1beta, MIP-16, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTİN, OSTOPROTEGERİN, PDGFBB, RANTES, SCF, SDF, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TIMP-1 ve TIMP-2, EGF, Trombopoietin, LEPTIN, Eotaksin, FGF-4, FGF-6, FGF-7, FGF-9, IGFBP-3, NT-4, PARC, PIGF, ve bunların herhangi bir kombinasyonu. Terapötik olarak aktif

20 moleküllere ek olarak, farmasötik bileşim: alanda ortalama teknisyenin becerileri dahilinde seçilen uygun eksipiyenler, araçlar ve/veya farmasötik olarak kabul edilebilir seyrelticileri kapsamaktadır.

Tercihen, farmasötik bileşim: sistemik kan akışına etkin difüzyonunu sağlamak amacıyla, sistemik uygulama –daha çok tercihen enjeksiyon– için uygun olan bir

25 bir formülasyon halindedir. Elbette, seçimi teknikte uzman kişinin kabiliyetleri dahilinde olan, herhangi bir türde enjektör sistemleri kullanılabilmektedir.

Alternatif bir uygulamada, farmasötik bileşim: seçimi ve hazırlanması teknikte uzman kişinin kabiliyetleri dahilinde olan, oral uygulama için uygun olan herhangi bir farmasötik bileşim olmaktadır.

- 5 Aşağıdaki örnekler, buluşu daha fazla açıklamak için temin edilmektedir.

ÖRNEK 1: Preeklampitik bir Plasentadan Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

- 10 Placenta-türevi Mezenkimal Kök Hücreler (PDMSC'ler), preeklampitik gebeliklerden türetilen plasentanın bazal plakasından izole edilmiştir.

- 15 Preeklampsinin teşhisi: Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanları Cemiyeti (ACOG-American College of Obstetricians and Gynecologists) tarafından oluşturulmuş olan kriterlere göre yapılmıştır: daha önce normotansif kadınlarda 20 haftalık gestasyon sonrasında gebeliğe bağlı hipertansiyon (sistolik ≥ 140 mm-Hg, diyastolik ≥ 90 mmHg) ve proteinüri (≥ 300 mg/24h) varlığı. Konjenital malformasyonlar, kromozomal anomaliler (sayı ve/veya yapı) veya belirgin intrauterin enfeksiyonlar olan gebelikler hariç tutulmuştur.

- 20 Placenta ve sonraki plasental doku numunesi toplanması, hasta bilgilendirme onayının ardından uygulandıktan sonra ve OIRM Sant'Anna - Mauriziano Hospital of Turin etik kurulunun kılavuzları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- 25 Membranlar (amniyon ve koryon ayrımı), placenta plakadan mekanik olarak ayrılmıştır.

- 30 Tam kalınlıkta doku biyopsileri, decidua basalisin (sinsitiotrofoblast ile etkileşimden modifiye edilen maternal endometrial hücrelerden oluşan) mekanik olarak çıkarılmasından sonra plasental bazal plakadan (plasental koryon villus

tarafından oluşturulan ve uterus duvarı ile doğrudan temas halinde olan plasental alan) kesip çıkarılmıştır.

- 5 Daha sonra, plasental biyopsiler kan kalıntılarını tamamen çıkarmak amacıyla steril HBSS (Hank's Buffered Salt Solution, sulu çözelti) (Gibco, Invitrogen by Life Technologies) kullanılarak oda sıcaklığında birkaç defa yıkanmıştır.

- 10 **Biyopsiler:** termostatl bir su banyosunda 3 sat süresince 37°C'de, **DMEM LG'de** (L-glutamin olmadan ve Fetal Bovine Serum-FBS olmadan Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium Low Glucose) çözölmüş Kollajenaz I 100 U/ml (Gibco, Invitrogen by Life Technologies), 5 µg/ml Deoksiribonökleaz I (DNAse I, Invitrogen by Life Technologies) kullanılarak enzimatik sindirim vasıtasıyla mekanik olarak homojenize edilmiş ve işlenmiştir.

- 15 Sonuçta ortaya çıkan hücre süspansiyonu daha sonra, sindirilmemiş doku kalıntılarını gidermek amacıyla 5 saniye süresince 540g'da 4°C'de santriföjlenmiştir. Üst faz toplanmıştır ve 70 mikron çapında gözenekleri olan **Cells** filtresi süzgecinden filtrelenmiştir. Filtrelemeden sonra, çözelti hücreleri pelet haline getirmek için 5 dakika süresince 540g'da 4°C'de santriföjlenmiştir.
- 20 Ardından üst faz atılmıştır ve hücreler, steril HBSS (her 30 gram doku orijini için 30 ml) içinde yeniden askıya alınmıştır.

- 25 Bir Ficoll Paque Premium 1,073 (GE Healthcare Europe) hacmi, başlangıç hacmine ilişkin olarak 1:3 oranında, yukarıda açıklandığı gibi elde edilen hücre çözeltisi altında katmanlandırılmıştır. Preparat 540g, 20°C'de 20 dakika süresince santriföjlenmiştir ve gradyan orta fazda konumlandırılmış olan mononökleer hücreler halkası toplanmış HBSS'de (her gram doku orijini için 50 ml) yeniden askıya alınmış ve Ficoll kalıntılarını gidermek amacıyla 540g, 20°C'de 10 dakika süresince santriföjlenmiştir.

30

Santrifüjlemeden sonra, üst faz atılmıştır ve hücreler, %10 FBS (Gibco, Invitrogen by Life Technologies) ile %0.1 Gentamicin ile tamamlanmış olan DMEM LG'de yeniden askıya alınmıştır. Hücreler daha sonra, hücre kültür şişelerinde kaplanmış ve 37°C ve %5 CO2'de inkübe edilmiştir.

5

Hücreler, 37°C, %5 CO2'de muhafaza edilmiştir. %90 konflüansta, hücreler hücre genişlemesini teşvik etmek için trypsin TrypLE Express (hayvan türevleri olmadan bitkisel orijinli tripsin, GMP sertifikalı, Invitrogen Life Technologies) ile muamele edilerek ayrılmıştır.

10

ÖRNEK 2: Preeklampitik bir plasentadan türetilen PDMSC'ler hücrelerinin karakterizasyonu

Örnek 1'de açıklandığı gibi preeklampsi (bazal plakanın koryonik kısmı) tarafından komplike olan plasentadan izole edilen mezenkimal kök hücreler, bu hücre tipine özgü olan ana yüzey antijenik işaretleyiciler analiz edilerek sitofluorometri ile karakterize edilmiştir.

Bu antijenlerin olması veya olmaması, fluorokromlar ile konjüge edilmiş monoklonal antikorlar kullanılarak değerlendirilmiştir Myltenyi, Bolonya, İtalya). Floresans değerlendirme vasıtasıyla, preeklampitik plasentadan bütün PDMSC hücre dizilerinin: CD105, CD166, CD90 ve CD73 yüzey işaretleyicilerin ekspresyonu için pozitif ve HLAII, CD34, CD133, CD20, CD326, CD31, CD45 ve CD14 ekspresyonu için negatif oldukları ortaya koyulmuştur; böylece uygun bir mezenkimal fenotip gösterilmektedir ve epitelyal/trofoblast hücreler ile hematopoetik progenitörlerden herhangi bir kontaminasyon hariç tutulmaktadır. Üstelik, hücre fenotip analizi: embriyonik kök hücrelere özgü, Oct4 (Oktamer-bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4) ve NANOG (Homeobox protein NANOG) genlerinin PDMSC'ler hücreleri tarafından ekspresyon göstermiş olan RT-PCR deneyleri gerçekleştirilerek yapılmıştır.

PDMSC'lerin sertliğini değerlendirmek amacıyla, kültürün üçüncü geçişinde hücreler üç adet farklı soy: osteoblastlar, adipositler ve kondroblastlar bakımından diferansiyasyon potansiyelleri yönünden incelenmiştir. Diferansiyasyon, spesifik indüksiyon ortamları kullanılarak elde edilmiştir. Osteojenik diferansiyasyon için, hücre kültürleri: %20 FCS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 2 mM L-glutamin, 20 mM β-fosfat-gliserol, 100 nM deksametazon ve 250 µM askorbat-2-fosfat ile tamamlanmış olan α-MEM'de inkübe edilmiştir. Adipogenik diferansiyasyon için, hücre kültürleri: %20 FCS, 100U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 12 mM L-glutamin, 5 µg/ml insülin, 50uM indometasin, 1x10⁻⁶ M deksamethason ve 0.5 uM 3-izobutil-1-metilksantin ile tamamlanmış olan α-MEM ile inkübe edilmiştir. Kondrogenik diferansiyasyon için, kültürler: R3-IGF-1 1mL, bFGF 2.5 ML, 0.5 mL transferrin, bovin insülin 1 M, 25 mL FBS ve gentamisin / amfoterisin-B 0,5 mL ile tamamlanmış olan kondrosit Basal Medium'da inkübe edilmiştir. Ortam, üç hafta boyunca haftada iki kez değiştirilmiştir. Hücresel diferansiyasyon, uygun renklendirmeler kullanılarak değerlendirilmiştir. Osteoblast diferansiyasyon, Alizarin Red S ile boyanarak değerlendirilmiştir. Alizarin, çözünmez ve yoğun renkli kalsiyum plakaların oluşumunu belirlemektedir; dolayısıyla, kemik matriksini vurgulamaya olanak sağlamaktadır. Kondrogenik diferansiyasyon, asit mukopolisakkaritleri polianyonları arasında tuz köprüleri oluşturan Alcian Blue boyama ile değerlendirilmiştir ve glikosaminoglikanların, mavi olarak renklendirilmesini sağlamıştır. Adipogenik diferansiyasyon, boya çözeltisinde mevcut olan solvent tarafından çözülen lipidleri vurgulayan Oil Red boyama ile değerlendirilmiştir ve yağ birikintileri kırmızı renktedir.

ÖRNEK 3. Koşullu ortamın üretimi

Buluşun konusu olan koşullu ortamı elde etmek amacıyla, preeklampitik PDMSC'ler: plasental doku orijinli türetilen trofoblastik ve/veya hematopoetik

kontaminant hücrelerin mevcudiyeti ile gösterildiği gibi, uygun saflık derecesine ulaştıkları zaman, geçişler 3 ila 5 arasında kaplanmaktadır. Spesifik olarak, hücreler: 37°C bir sıcaklıkta ve %5 CO₂'de Fetal Bovin Serum (FBS) olmadan DMEM LG'de 1x10⁵ hücre/ml olan bir yoğunlukta kaplanmıştır. PDMSC, 5 haftada en az 3 saat veya daha fazla kültürlenmiştir. Koşullu ortamlar daha sonra: belirlenen zaman noktalarında toplanmış, ardından santrifüjlenmiş ve/veya konsaminant hücresel döküntüyü gidermek için filtrelenmiştir. Gerektiği zaman, az önce açıklandığı gibi elde edilen koşullu ortamlar -80°C'de dondurularak muhafaza edilebilmektedir.

10

ÖRNEK 4: Sitokin Dizisi vasıtasıyla koşullu ortamın analizi

Aynı numunedeki 80 farklı sitokinin eşzamanlı olarak analizine olanak sağlayan, piyasada mevcut RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 kiti: preeklampitik 15 PDMSC hücreleri tarafından salgılanan ve buluşa ait koşullu ortamda mevcut olan sitokinlerin profilini araştırmak için, imalatçının talimatlarına göre kullanılmıştır. Spesifik olarak, bu prosedür: bir dizi membran üzerinde lekelenen, ve analiz edilen numunede mevcut olduğu zaman sitokinleri tanıyabilen ve yakalayabilen antikorlara dayanmaktadır. Bu deney bağlamında, immün-komplekslerin oluşum 20 alanlarında dizi membranının üzerinde oluşan sinyaller ImageQuant yazılımı kullanılarak dansitometrik analiz vasıtasıyla ölçülmüştür. Tanımlanan sitokinlerin ekspresyons seviyeleri mutlak değerler olarak belirlenmemiştir ama pozitif kontroller için %100 ve negatif kontroller için %0 olan bir değer atayarak, kitte kapsanan bir grup standart kontrole kıyasla yüzde olarak normalize edilmiştir. 25 Yukarıda açıklanan deneyin sonuçları, aşağıdaki tabloda gösterilmektedir:

Protein	standartlara ilişkin %
ENA-78	% 38,1
GRO	% 79,4

GRO-alfa	% 11,1
IL-6	% 105,8
IL-7	% 6,4
IL-8	% 128,9
MCP-1	% 74,1
MCP-2	% 8,7
MCSF	% 6,9
MDC	% 5,1
ANJİOGENİN	% 25,8
ONKOSTATİN m	% 8,5
VEGF	% 27,9
BDNF	% 19,8
BLC	% 10
CKb 8-1	% 4,8
EOTAKSİN 2	% 2,5
EOTAKSİN 3	% 1,3
FLT-3 LİGAND	% 11,6
FRAKTALKİN	% 12,4
GCP-2	% 8,5
GDNF	% 8,3
HGF	% 2,1
IGFBP-1	% 3,8
IGFBP-2	% 14,5
IGFBP-4	% 16,9
IP-10	% 16,7
LIF	% 13,6
LIGHT	% 7,6
MCP-4	% 23,3
MIF	% 11

MIP-3alfa	% 4,3
NAP-2	% 16
NT-3	% 20,2
OSTEOPONTİN	% 43,7
OSTOPROTEGERİN	% 35
TGF-beta	% 29,9
TIMP-1	% 33,4
TIMP-2	% 71,4
MIG	% 7
IL-5	% 2,7
TGF-β3	% 8,7
MIP-1beta	% 13,7
PDGFBB	% 13,8
SDF	% 7,1
IL-10	% 2,7
IL-15	% 5,4
IFN-gama	% 3,5
MCP3	% 13,3
MIP-16	% 1,5
RANTES	% 7,4
SCF	% 5,2
TARC	% 15,4
TGF-beta1	% 6,8
TNF-alfa	% 11,1
EGF	% 4,7
Trombopoietin	% 1,7
LEPTIN	% 14,9
Eotaksin	% 2,3
FGF4	% 2,4

FGF6	% 7
FGF7	% 3,9
FGF9	% 9,8
IGFBP-3	% 3,4
IL-16	% 5,4
NT-4	% 2
PARC	% 9,8
PIGF	% 12,8

Ayrıca, sitokin analizi buluşun konusu olan koşullu ortamda aşağıdaki proteinlerin mevcudiyetinde tespit edilmemiştir çünkü dizinin tespit limitinde yoktular veya altındaydılar: GM-CSF, I-309, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, p40p70, IL-13, MIP-1, TNF-beta, IGF-I, IGFBP-4, TGF-beta 3.

Preeklampitik mezenkimal kök hücreler tarafından üretilen anti-anjiyojenik sFlt-1, Real Time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu (gen ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için, Polymerase Chain Reaction)) ve Western Blot analizi (protein ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için) tarafından tespit edilmiştir. İsteğimiz üzerine Life Technologies-Applied Biosystems Division tarafından üretilmiş olan özel isteğe uyarlanmış bir dizi primer ve prob TaqMan kullanılarak preeklampitik plasentadan türetilmiş olan yukarıda açıklanan plasental hücrelerden izole edilen mRNA (mesajcı RNA) üzerinde Gerçek Zamanlı PCR gerçekleştirilmiştir. Bu primerler ve problemler, Nevo O. ve ark. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008 93:285-292 tarafından daha önce yayınlanmış olan dizilere dayanmıştır. Üreticinin talimatları izlenerek, Life Technologies-Invitrogen'den (katalog numarası 36-1100) satın alınan spesifik bir poliklonal antikor anti.sFlt-1 kullanılarak Western Blot analizi yapılmıştır. Gerçek Zamanlı PCR ve Western Blot analizleri: her iki gen (4,5 Kat Artış, $p<0,001$) ve 3 protein (2 Kat Artış, $p<0,05$) seviyesinde fizyolojik kontroller ile ilgili olarak preeklampitik plasental

mezenkimal kök hücreler tarafından sFlt-1'in üretiminin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir.

ÖRNEK 5: Preeklampitik bir plasentadan kültürlenmiş PDMSC hücrelerinden elde edilen koşullu ortamın terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi

Buluşun amacı olan koşullu ortamın terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla, meme kanseri ve metastazlarının giderilmesi için ameliyat olan hastalardan elde edilen primer ve metastatik tümörlerden kesip çıkarılan tümöral doku eksplantları tarafından temsil edilen in-vitro modeller kullanılarak spesifik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Özellikle, bu gibi eksplantların buluşa ait koşullu ortam ile tedavi edilmesinin: VEGF, JunB ile PARP'nin ekspresyon seviyelerinde bir azalma ve önemli bir anti-anjiyojenik ve anti-tümoral aktivitenin endikasyonu olarak, Caspase 3 (CASP3) ile p16INK4a'nın endikasyonunda bir artış indükleyip indüklemedikleri doğrulanmıştır. Çeşitli klinik ve deneysel kanıtlar göstermiştir ki: VEGF, kanserde aşırı ekspres edilmektedir ve tümöral dokuya besinlere getiren yeni damar oluşumunu indüklediği için bir tümöral agresiflik indeksidir. JunB, ekspresyonu kötü bir meme kanseri prognozu ile doğrudan ilişkili olan bir onkojendir. PARP (Poli-(ADP-riboz)-polimeraz), kemoterapötik ajanların neden olduğu DNA hasarlarını tedavi eden ve dolayısıyla tümöral dokuya kemoterapi direnci sağlayan bir nükleer proteindir. CASP3 ve p16Ink4A, apoptozu indükleyebilen ve hücre proliferasyonunu bloke edebilen iki kuvvetli onko-süpresörlerdir.

25

Deneysel prosedürler için: rutin ameliyat sonrası anatomi-patolojik prosedürler sonrasında üç farklı hastadan alınan dokusal kalıntılardan kesip çıkartılan tümöral doku numuneleri kullanılmıştır. Her bir tümörden, sekiz adet eksplant kesip çıkartılmıştır ve Matrigel-dolu insertler üzerinde kültürlenmiştir. Kültürler, daha

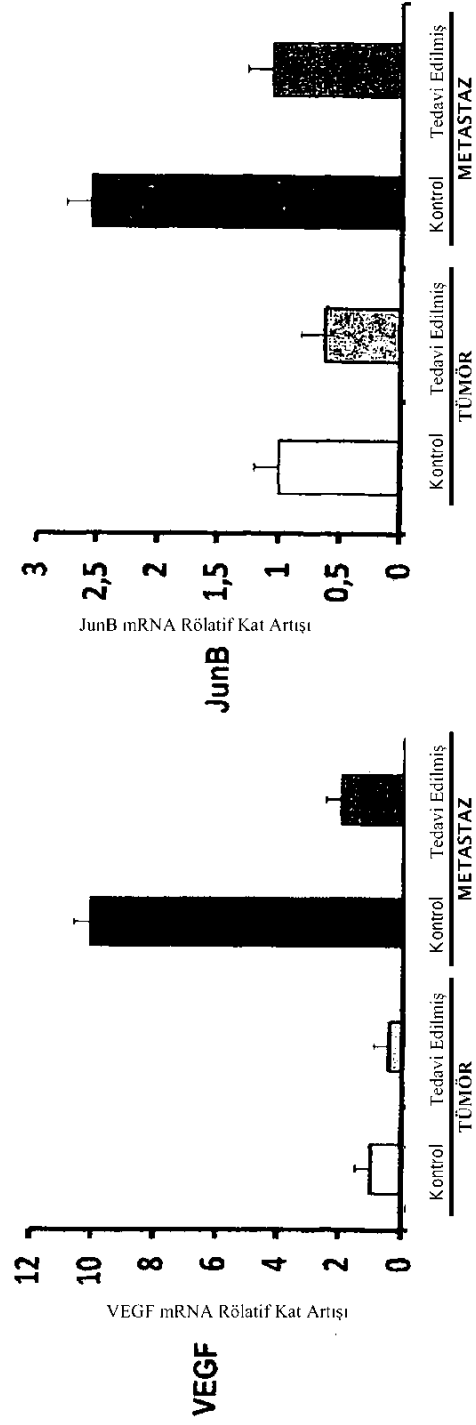
önce tarif edildiği gibi 48 saat süresince preeklampitik PDSMC'ler kültürlenerek elde edilen koşullu ortam kullanılarak 48 saat süresince tedavi edilmiştir.

- 5 Ayrıntılı olarak, korunmuş morfoloji ve yapı ve eşit ağırlığı olan bir primer tümöral dokudan (5mm çapında) meydana gelen eksplantlar kesip çıkartılmış; 150 µl Matrigel ihtiva eden insert üzerine kaplanmış; ve ameliyat-sonrası stres sonrasındaki durumlarını dengelemek amacıyla 37°C, %5 CO₂'de 12 saat süresince FBS olmadan 500 µl HAM F12 ortamında muhafaza edilmiştir. 12 saat sonra, ortam, 500 µl koşullu ortam (12 eksplant) ile veya serum olmadan 500 ml
- 10 DMEM LG ortamı (12 kontrol eksplantı) ile değiştirilmiştir. Kültürler, aynı deney şartları altında 48 saat süresince daha inkübe edilmiştir. Deneyin sonunda, hem tedavi edilmiş hem de kontrol eksplantlar toplanmıştır ve üreticinin talimatları izlenerek TRIzol belirteci (Invitrogen Life Technologies) kullanılarak mRNA izolasyonu için işlenmiştir. İzole edildiği zaman, mRNA, genomik DNA
- 15 kontaminasyonları gidermek amacıyla DNAase (Sigma-Aldrich) işlemi ile saflaştırılmıştır. RNA konsantrasyonu 260nm dalga uzunluğunda spektrofotometre okuması vasıtasıyla belirlenmiştir, RNA saflığı 1,8-2'de A260/A280 absorbans oranı değerlendirilerek belirlenmiştir.
- 20 VEGF, JunB, PARP, CASP3 ve p16INK4a ekspresyon seviyelerini araştırmak için gerçekleştirilen sonraki analiz için yararlı olan cDNA (tamamlayıcı DNA), rastgele bir heksamerler yaklaşımı ve üreticinin protokolüne göre RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Science) kiti kullanılarak daha önce ekstrakte edilmiş olan toplam RNA'nın 5 mikrogramından RT-PCR
- 25 vasıtasıyla sentezlenmiştir.

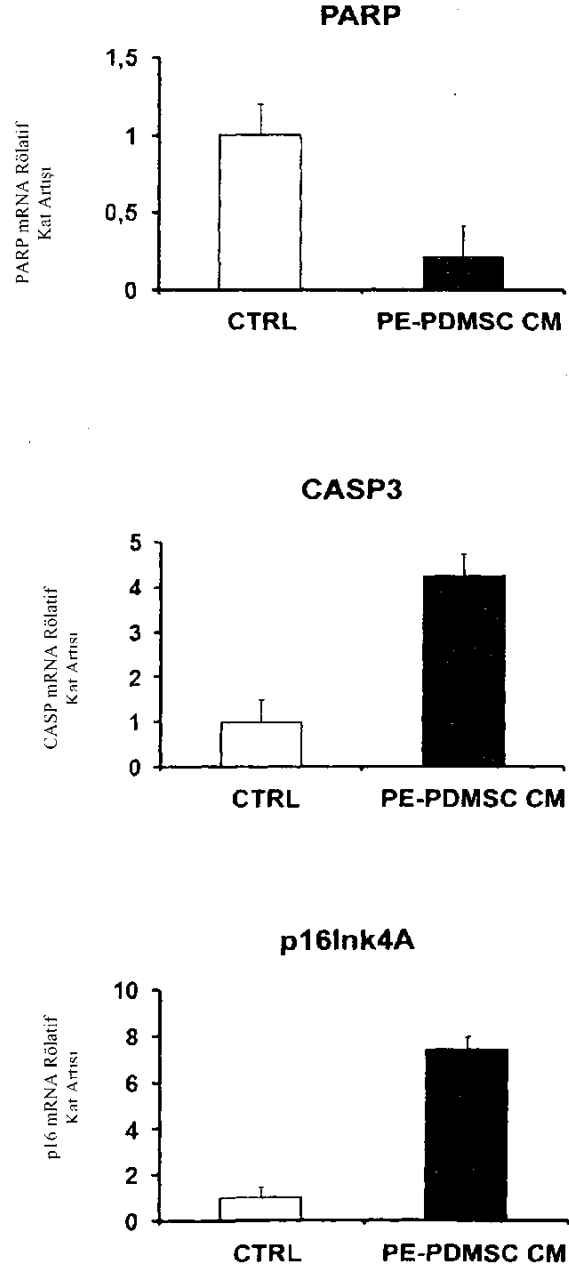
- Tümöral kültürlerin buluşa ait koşullu ortam ile işlenmesinden sonra VEGF, JunB, PARP, CASP3 ve p16Ink4A gen ekspresyonu analizi TaqMan primerler ve prob (Life Technologies-Applied Biosystem Division) kullanılarak Gerçek
- 30 Zamanlı PCR vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Rölatif bir miktar tayini

gerçekleştirmek amacıyla, Gerçek Zamanlı PCR sinyalleri: i referans olarak kullanılan, ribozomal 18S alt birime ait sinyaller ile normalizasyon sonrasında iki numune grubu arasında karşılaştırılmıştır.

- 5 Şekil 1 ve Şekil 2’de rapor edilmiş olan histogramlar tarafından temsil edilen diferansiyel gen ekspresyonu sonuçları açık bir şekilde göstermiştir ki: buluşun amacı olan koşullu ortam (CM) ile tedavi: tümoral eksplantlarda CASP3 ve p16Ink4A gen ekspresyonu seviyelerinin artışının ($p<0.05$) eşlik ettiğİ VEGF, JunB ve PARP gen ekspresyonu seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir azalmasını indüklemiştir.



ŞEKİL 1



ŞEKİL 2