

ÖZET

ANTİNEOPLASTİK ETKİYE SAHİP İMMÜNOSTİMÜLATÖR VE SÖZ KONUSU İMMÜNOSTİMÜLATÖRÜN ÜRETİLMESİNE YÖNELİK USUL

- Genellikle insanların bağırsak yollarından izole edilebilen ECHO Picornaviridae Enterovirus tipinde bir enterovirüs suşunun tümör dokusuna adapte edilmesiyle üretilen, patojenik olmayan viral kültürden oluşan, antitümoral etkiye sahip bir immünostimülatör açıklanmıştır. Özelliği bu enterovirüs suşunun genellikle 2-5 yaşında çocukların bağırsak yolundan izole edilmesi ve altkültürlemenin çeşitli hastaların tümör dokusunda gerçekleştirilmesi, akabinde adapte edilmiş suşun insan embriyonik fibroblast kültüründe altkültürlemeyle çoğaltılmasıdır.
- 10 Geliştirilen usul, terkinin azami şekilde bağırsıklığı uyarmasını sağlar. Söz konusu immünostimülatör hastalığın nüksetmesi durumunda malign büyümesini aktif olarak baskılar, yayılma süresini uzatır. Bundan başka metastazlar ağırlıklı olarak deri altında ve lenf nodüllerindedir, bu da bunların diğer metastazlara kıyasla daha kolay çıkarabilmesi demektir.

İSTEMLER

1. Patojenik olmayan virüs suşu içeren, antitümöral etkiye sahip bir immünostimülatörün hazırlanmasına yönelik bir usul olup, **özellği** bu suşun aşağıda belirtilen şekilde elde edilmesidir:

- 5 - ECHO-7 tipi enterovirüs (Picomaviridae Enterovirus tür Ekovirus) olan virüsün izole edilmesi, akabinde
- çeşitli hastalardan alınan melanoblastom olan tümör dokusuna virüsün birbirini izleyen şekilde altkültürlenmesiyle virüsün tümör dokusuna adapte edilmesi ve tümöre afinitesi olan suşun seçilmesi, burada virüsün tümör dokusuna adapte edilmesi insan
- 10 embriyonik fibroblast hücrelerinin test kültüründe tümör dokusu içinde çoğalan virüsün çoğaltılması ve yine virüsün tümör dokusunda altkültürlenmesi programına göre gerçekleştirilir, burada 3-10 ardışık altkültürleme dönüşümlü olarak ayrı ayrı tümörlerden elde edilen sınırlı kültürlerde ve test kültürlerinde gerçekleştirilir, ve
- bu adapte edilmiş suşun insan embriyonik fibroblast kültüründe ECHO-7 tipi
- 15 entovirüsün 5-7 log TCD 50 / 0.1 ml titreye kadar altkültürlenmesiyle ardışık olarak çoğaltılması, bundan sonra çoğaltılmış viral kültür izole edilir,
- elde edilen ECHO-7 tipi enterovirüsün tümör büyümesini *in vivo* baskılamada etkin olması.
2. İstem 1'e göre usul olup, **özellği** söz konusu enterovirüs suşunun 2-5 yaşında çocukların
- 20 bağırsak yolundan izole edilmesidir.
3. İstem 1 veya 2'deki usulle elde edilen ECHO-7 tipi patojenik olmayan bir enterovirüs (Picornaviridae Enterovirus tür Echovirus).

TARİFNAME

ANTİNEOPLASTİK ETKİYE SAHİP İMMÜNOSTİMÜLATÖR VE SÖZ KONUSU İMMÜNOSTİMÜLATÖRÜN ÜRETİLMESİNE YÖNELİK USUL

İleri sürülen buluş tıp alanıyla, malign tümörlerde, ör. malign melanomda aktif bağışıklık
5 sağlama tedavisine yönelik terkiplerin üretilmesi usulleriyle ilgilidir.

Halihazırda tümör antijenleri ve Mn^{++} (manganez iyonları) karışımından oluşan
immünostimülatörler (bağışıklık sistemini uyarıcı) bilinmektedir (Birleşik Krallık Patent
No.1592496, 24.11.1977 ve Fransız Patenti No. 2423223, 20.05.1979 /Uluslararası Sınıf.
A61K39/00/). Bu tür immünostimülatörlerin hastalığın erken evrelerinde veya ilk tedaviden
10 sonra geriye kalan az miktarda hücrelerle ikinci tedavi durumunda etkili olduğu
kanıtlanmıştır.

Bununla birlikte eğer önemli büyüklükte bir tümöre uygulama yapılması gerekiyorsa
enjeksiyon işe yaramayabilir veya hatta dolaşımda olan tümör antijenlerinin sayısındaki artışa
bağlı olarak durumu daha da kötüye götürebilir, dolayısıyla bağışıklık hücrelerini bloke
15 edebilir.

Ayrı ayrı tümörlerden spesifik aşılardan hazırlanması olasılığı zamanla ve mevcut malzeme
miktarıyla sınırlıdır.

Ayrıca, diizosiyanat ile eşleşmiş ölü B.Pertussis NRRL-11,232 suşundan primer antijen ile
canlı adenokarsinom hücrelerinden ikinci bir antijen içeren bağışıklığı uyarıcı yardımcı
20 maddeler bilinmektedir (A.B.D. Patent No.4285930, 13.11.1979/ Uluslararası Sınıf
A61K39/12/).

Söz konusu stimülatörlerin uygulanması kompleks tedavinin etkisini arttırmıştır. Aynı
zamanda bu tür terkiplerin uygulanmasına hem lokal hem genel yan etkiler, ör. granülomların
enflamasyonu, ülserler, lenfadenopati, hipersensitivite olguları, vb. eşlik eder.

Bilinen stimülatörler içinde önerilen antitümöral etkiye sahip, hücrel bağışıklığı stimüle
eden ajan Vaksinia virüsü, suş AS ATTC No. VR 2010'un azaltılmış viral kültürünü içeren
stimülatördür (A.B.D. Patent No. 4315914, 04.04.1980 /Uluslararası Sınıf A61K45/05/).
İmmünostimülatör, patojenik olmayan Vaksinia virüsünün izole edilmesi, bunun sıçanın
börek hücrelerinden oluşan tek katmanlı kültüre altkültürlenmesi (pasajlanması) ve bunun
30 civeiv embriyosunun tek katmanlı kültüründe çoğaltılmasıyla üretilir.

Bu immünohistimülatör, kendini bağışıklık sisteminin poliklonal histimülatörü olarak eksprese eden, çoğunlukla hücrese bağışıklığı etkileyen en büyük ve antijenik olarak kompleks DNA-genomik virüsle temsil edilir. Bu immünohistimülatörün kalıcı parenteral uygulaması durumunda çeşitli yan etkiler, ör. aynı zamanda bakteriyel spesifik olmayan

5 immünohistimülatörler içinde tipik olan hipersensitivite reaksiyonları ortaya çıkabilir.

Bu yan etkiler, hedefi ameliyattan sonra ortaya çıkan tümörün gelişmesini baskılamak olan terkinin uygulamada etkinliğini azaltır.

Birçok durumda söz konusu yan etkiler genel olarak bu terkinin uygulanmasını olanaksız kılar.

10 Coxsackie A.grubu virüslerin *in vitro* ve *in vivo* ve Ekovirus tip 7'nin *in vitro* malign hücrelere karşı aktif olduğu ortaya konmuştur (Uluslararası Yayın WO 01/37866 31.5.2001 /Uluslararası Sınıf A61K39/12/), ancak Ekovirüsün terkin ele alınmamıştır. Virüsler aynı familyaya ait olsalar dahi, bunların tümünün kendiliğinden eşit derecede onkotropik ve onkolitik olmaları söz konusu değildir.

15 Ferdats ve diğerleri tarafından Melanoma Research 9: 329-330 (1999)'da bir ekovirüs aşısının geliştirildiği ve test edildiği belirtilmiştir, ancak tip E7 kullanılarak bu tür bir aşı ürününün geliştirilmesi ve üretilmesi konusunda hiçbir teknik detay verilmemiştir.

Sinkovics ve diğerleri tarafından Journal of Clinical Virology 16: 1-15 (2000)'de temel olarak Newcastle hastalığı (Yalancı Veba) (NDV) virüsünün onkolitik özellikleri ele alınmış ve

20 kısaca melanomun yeniden nüksetmesini önlemek için aşı olarak kullanılan bir ekovirüs suşu belirtilmiş, ancak aşının hazırlanmasına yönelik aşamalar tam tamına belirtilmemiştir.

Kelly ve diğerleri tarafından Journal of Medical Virology 11: 257-264 (1983)'de insan fibroblast hücreleri ve melanom hücreleri dahil çeşitli memeli hücre tiplerinde *in vitro*, Picornaviridae familyasına ait ensofalomiyokardit virüsünün çoğalması incelenmiştir.

25 Bu buluşun amacı, uzun süreli uygulama durumunda, ameliyattan sonra kötücül büyümenin *in vivo* baskılanma etkinliğinin arttırılması için patojenik olmayan virüsler içeren, antitümöral etkiye sahip bir immünohistimülatörün hazırlanmasına yönelik bir usulün sağlanmasıdır.

Buluşun amacına, immünohistimülatörün üretilmesine yönelik usulde patojenik olmayan virüs suşunun aşağıda belirtildiği şekilde elde edilmesi olgusuyla ulaşılmıştır:

30 • ECHO-7 tipi enterovirüs (Picomaviridae Enterovirus tür Ekovirus) olan virüsün izole edilmesi, akabinde

- çeşitli hastalardaki melanoblastom olan tümör dokusuna virüsün birbirini izleyen şekilde altkültürlenmesiyle virüsün tümör dokusuna adapte edilmesi ve tümöre afinitesi olan suşun seçilmesi, burada virüsün tümör dokusuna adapte edilmesi insan embriyonik fibroblast hücrelerinin test kültüründe tümör dokusu içinde çoğalan virüsün çoğaltılması ve yine virüsün tümör dokusunda altkültürlenmesi programına göre gerçekleştirilir, burada 3-10 ardışık altkültürleme dönüşümlü olarak ayrı ayrı tümörlerden ve test kültürlerinden elde edilen sınırlı kültürlerde gerçekleştirilir,
- bu adapte edilmiş suşun insan embriyonik fibroblast hücresinde ECHO-7 tipi entovirüsün 5-7 log TCD 50 / 0.1 ml titreye kadar altkültürlenmesiyle ardışık olarak çoğaltılması, bundan sonra çoğaltılmış viral kültür izole edilir,
- elde edilen ECHO-7 tipi enterovirüsün tümör büyümesini *in vivo* baskılamada etkin olması.

Enterovirus (familya Picomaviridae, cins Enterovirus, tür Echovirus) en basit RNA virüslerin biri olarak bilinir. Yalnızca 4 yapısal polipeptide sahiptir ve dolayısıyla bağışıklık sistemi sağlam olan hücrelerin çeşitli klonlarıyla etkileşim için çok da antijenik belirleyici (aktif merkezler) değildir.

Bu immünostimülatörün antitümöral etkisi esas olarak bağışıklık tepkisinin humoral aşamasına (B-hücreleri) tesir eder. Malign sürecin başlaması durumunda B hücrelerinin işlevsel aktivitesinin T-hücrelerinininkinden önce baskılandığı bilinmektedir.

Usulün bir grup spesifik özelliği, izole edilmiş patojenik olmayan kültürün çeşitli hastaların tümör dokusuna adapte edilmesine ve yanı sıra kültürün çoğalmasına olanak sağlar. Virüs titresinin 5 log TCD 50/0.1ml'den düşük olması durumunda bağışıklığı uyarıcı etki gözlemlenmez, zira kültürün aktivitesi çok zayıftır.

Eğer titreler 7 log TCD 50/0.1ml'den yüksekse kültürün aktivitesinde düşme gözlemlenir.

Enterovirüsler erkeklerin, esas olarak 2-5 yaşında sağlıklı çocukların bağırsak yolundan elde edilir ve insan embriyonik primer kültüründe izole edilir. Daha sonra patojenik olmayan serotip Picomaviridae Enterovirus ECHO-7 seçilir. Virüsün yeniden geri kazanılmasında dışkı kullanılır.

Başlangıç kültürü üretildikten sonra melanoblastom veya başka tümörler için kültürün onkolojik yönelimi tümörlerden elde edilen kısa süreli sınırlı kültürlerde saptanır.

Seçilen kültür, etkinin özgüllüğünün artırılması için çeşitli hastalardaki melanoblastomun

tümör dokusunda ardışık altkültürlenmesiyle adapte edilir.

Altkültürlenen suş, insan embriyonik fibroblast kültüründe 5-7 log TCD 50/0.1ml titreye çoğaltılır.

Usulün detaylı açıklaması aşağıda verilmiştir.

- 5 Picomaviridae Enterovirus tip ECHO-7'nin başlangıç, patalojik olmayan kültürü 2-5 yaşlarındaki sağlıklı çocukların bağırsak yolundan geri kazanılır. Virüsün ilk geri kazanımı için dışkı numuneleri kullanılır. Steril şişelerdeki dışkı numunesi saklanmak üzere derhal -10°C'lık soğutucu içine konur. Virüsün geri kazanımında Hankss' dengelenmiş tuz çözeltisi içinde %20 süspansiyon kullanılır. Süspansiyon 3000 devir/dakikada 30 dakika santrifüjlenir.
- 10 Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı dondurulur ve bu sıcaklıkta 24 saat saklanır. Daha sonra süspansiyonun buzu çözülür, antibiyotikler ilave edilir: penisilin - 1000 U/ml, streptomisin - 250 U/ml, ve 1-2 saat inkübe edilir. Elde edilen süspansiyon 1-2 kez 3000 devir/dakikada 30 dakika santrifüjlenir. Santrifüj sonrası üstte kalan nihai sıvı sterillik açısından teste tabi tutulduktan sonra yeniden dondurulur ve -10°C ila -20°C'da saklanır.
- 15 Üretilen virüs içeren malzeme insan embriyonik fibroblast hücrelerinin tripsinlenmiş kültürünün tek katmanına aşılır. Aşılanmış kültürler için koruma buyonu olarak %2 buzağı serumu içeren Medium 199, büyütme buyonu olarak %10 buzağı serumu içeren Medium 199 kullanılır.
- Hücrelerle 1 saat temastan sonra süspansiyon çıkarılır ve koruma buyonu ilave edilir. Daha sonra hücre kültürü tüpleri 37°C'da 1-10 gün inkübe edilir. Bu sürede insan embriyonik fibroblast kültürlerindeki maddenin 2-3 ardışık altkültürlenmesi gerçekleştirilir.
- Altkültürlemenin herhangi birinde tüplerin inkübasyonu hücreler tamamen dejenere olana kadar sürer.
- Sitopatojenik virüsün izole edilmesinden sonra üretilen malzeme titre edilir ve serotiplenir.
- 25 Virüs içeren malzeme 3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüjlenir, daha sonra dondurulur ve -20°C -ila -70°C'da saklanır.
- İnsan embriyonik fibroblast kültüründe virüs titresi 5-7 log TCD 50/0.1 ml'dir.
- İzole etme işleminden sonra virüs suşları sınırlı tümör kültürlerinde onkotropizm açısından test edilir.
- 30 İzole edilmiş virüs kültürünün adaptasyonu, hiçbir bir tedavi görmemiş çeşitli hastaların

ameliyatla alınan materyalinden elde edilen tümör dokusunda gerçekleştirilir. Tümör dokusu yağ dokusu, nekrotik lezyonlar ve kandan ayrılarak saflaştırılır. Saflaştırılmış tümör dokusu 18-20 saat, 0°C'da izole edilir, daha sonra 0.1-0.2 mm parçacıklar halinde ince kıyılır, serum içermeyen Medium 199 veya Eagles buyonu içine gömülür (100 mg doku/4ml buyon).

- 5 Doku, virüs kültürü 10^5 - 10^6 TCD 50 ile enfekte edilir ve ilave CO₂ girdisi olmadan 37°C'da ısı deneticisi içinde inkübe edilir. 5 ml taze buyon hergün değiştirilir. Tümör parçacıklarının ölümü gerçekleştiğinde kültürasyon sonlandırılır, tümör ölümü buyon renginin değişmesine göre morfolojik ve görsel olarak denetlenir.

- 10 Virüsün çoğalma yoğunluğunun tespiti için virüs titrasyonu tümör kültürünün sıvı fazında gerçekleştirilir, tümör kültürü için hergün numune alınır. Virüs üreme yoğunluğu, enfeksiyon dozuna karşı enfekte kültürde saptanan virüs miktarı %'si hesabıyla değerlendirilir. Tümör dokusunda virüs çoğalması durumunda azami çoğalmanın olduğu günden alınan materyal 3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüjlenir.

- 15 Kültürün adaptasyonu izleyen programa göre gerçekleştirilir: tümör dokusunda çoğaltılan virüs insan embriyonik fibroblast hücrelerinin test kültüründe altkültürlenir ve yeniden tümör dokusunda altkültürlenir. 3-10 ardışık altkültürlemenin tamamı değişimli olarak kişinin tümöründen elde edilen sınırlı kültürlerde ve test-kültürlerinde gerçekleştirilir.

Başlangıç virüs suşu dondurulmuş halde -20°C ila -70°C'da saklanır.

- 20 Suşun çoğaltılması insan embriyonik fibroblast kültüründe, titre serum olmadan 5-7 log TCD 50/0.1 ml'ye gelene kadar ve antibiyotiklerin (penisilin 100 U/ml, streptomisin 50 U/ml) ilave edilmesiyle gerçekleştirilir.

pH göstergesi fenol kırmızısı %0.002'lik bir konsantrasyonda buyona eklenebilir.

Hücrelerin tamamen dejenere olmasından sonra insan embriyonik fibroblast hücrelerinin enfekte kültürünün sıvı fazı 3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüjlenir.

- 25 Üretilen antitümöral etkiye sahip immünostimülatör rengi roze (pembe) olan bir steril sıvıdır. Bu sıvı 2ml'lik (2×10^7 TCD 50) viyallere doldurulur- bu bir enjeksiyonun dozudur. Terkip dondurulmuş halde saklanır.

- 30 Üretilen immünostimülatör primer tümörün veya bölgedeki lenf nodülleriyle birlikte primer tümörün ameliyatla alınmasından sonra malign cilt tümörü (T₁₋₃ N₀ M₀) olan hastaların tedavisinde uygulanır.

Terkip, ameliyattan 2-4 hafta sonra parenteral (kas içine) enjeksiyon şeklinde üst lateral gluteal bölgeye uygulanır.

Uygulama programı izleyen şekildedir: ilk 3 ay, art arda 3 gün 2 ml'lik (2×10^7 TCD 50/gün) bir enjeksiyon; her bir tedavi küründen sonra üç ay ara; bir sonraki 3 ay ayda bir enjeksiyon.

- 5 Daha sonra üç aylık bir zaman aralığı vardır ve aylık enjeksiyonlar ameliyattan sonra 9uncu-12nci ay içinde tekrarlanır.

Terkibin uygulanması primer tümörün alınmasından önce- ameliyattan 1-2 hafta önce art arda 3 gün 2 ml'lik (2×10^7 TCD 50 /gün) bir enjeksiyondur.

- 10 Terkibin, 2 ml'lik aylık enjeksiyonlarla ameliyattan sonra 2-3 seneye kadar, daha uzun bir süre uygulanması da mümkündür.

Terkibin uygulanması uygulamada hiçbir yan etkiye yol açmaz.

Aşağıda, malign melanom hastaları için, önerilen bağışıklık uyarıcı terkinin (ISVO – viral orijinli immnostimülatör), bakteri orijinli C.P. (*Corinebacterium Parvum*) terkininin ve bir kimyasal terkip Decaris'in (Levamisole) klinik deney sonuçları gösterilmiştir.

- 15 Decaris aşağıdaki programa göre uygulanmıştır: primer tümörün alınmasından sonraki 2nci-4üncü haftadan itibaren 8 ay içinde, 3 günlük zaman aralıklarıyla hafta iki kez ağızdan alınan tabletler.

- 20 Terkip C.P. aşağıdaki programa göre uygulanmıştır: Bağışıklığın uyarılması radikal ameliyattan 1-4 hafta sonra başlatılmıştır. İlk beş günde terkip damar içinden gittikçe yükselen günlük 1-4 mg'lık bir dozda uygulanmıştır. Daha sonra, bir yıl boyunca terkip, karın bölgesine 4 noktadan haftada bir kez 1 ml'lik dozda deri altından uygulanmıştır.

3 yıldan az olmayan bir süre gözlem altında tutulan hastaların bulguları incelenmiştir.

Aşağıda Tablo 1'de radikal ameliyattan sonra cilt tümörü olan hastalarda hayatta kalma ve süreç dinamikleri verisi sunulmuştur.

25

Tablo 1

Gözlemlenen parametreler	İmmünostimülatör			Yalnızca ameliyat
	C.P.	Decaris	ISVO	
Hayatta kalma	<u>13:21</u> *	<u>22:28</u>	21:25	%54.5

Gözlemlenen parametreler	İmmünostimülatör			Yalnızca ameliyat
	C.P.	Decaris	ISVO	
	%62	%78.6	%84	
Sürecin stabilizasyonu	<u>10:21</u>	<u>17:28</u>	<u>16:25</u>	%25.7
	%47	%60.7	%64	

*- rakamsal bölümde gözlemlenen hastaların toplam sayısına karşı pozitif bulgulu hasta sayısı belirtilmiştir; payda kısmında söz konusu oranın yüzdesi belirtilmiştir.

Veri, hayatta kalmada en iyi sonuçların önerilen enterovirüs kültürü bazı immünostimülatörün uygulanması durumunda elde edildiğini ispatlamaktadır.

Tablo 2’de ameliyattan ve bağışıklığın uyarılmasından sonra melanom hastalarının ölüm dinamikleriyle ilgili veri sunulmuştur.

5

Tablo 2

Gözlemlenen hastaların grubu	Aşağıda belirtilen yıl içinde ölen hasta sayısı:		
	1inci yıl	2nci yıl	3üncü yıl
C.P.	<u>1: 21</u>	<u>6: 21</u>	8: 21
	%5	%29	%38
Decaris	<u>2: 28</u>	<u>6: 28</u>	<u>6: 28</u>
	%7	%21	%21
ISVO	<u>0: 25</u>	<u>2: 25</u>	4: 25
	%0	%8	%16
Yalnızca ameliyat			%54.5

* rakamsal bölümde gözlemlenen hastaların toplam sayısına karşı ölen hasta sayısı belirtilmiştir; payda kısmında söz konusu oranın yüzdesi belirtilmiştir.

Elde edilen veriden, önerilen immünohistimülatörle sağlanan immünohistimülasyonun hastaların hayatta kalma süresini önemli derecede uzattığı sonucu çıkarılabilir, zira diğer gruplarda hastaların sırasıyla %5 ve %7'si ölürken ISVO ile tedavi edilmiş grupta ilk yılda hiçbir hasta ölmemiştir.

- 5 Ayrıca ölüm oranında fark, ikinci en iyi terkip Decaris'e kıyasla iki yıldan sonra gözlemlenmiştir; ISVO sonuçları 1.3 kat daha iyi indüklemiştir.

Önerilen terkip ayrıca radikal ameliyattan sonra sürecin ilerleme sıklığı derecesini azaltmıştır.

Aşağıda Tablo 3'de radikal ameliyattan ve immünohistimülasyondan sonra melanom hastalarında sürecin ne sıklıkta ilerlediğiyle ilgili veri yer almaktadır.

10

Tablo 3

Zaman dönemi	Terkip			Yalnızca ameliyat
	C.P.	Decaris	ISVO	
3 yıl	11: 21	11: 28	<u>9:25</u>	%74.3
	%53	%39	%36	

*- rakamsal bölümde gözlemlenen hastaların toplam sayısına karşı sürecin ilerlediği hasta sayısı belirtilmiştir; payda kısmında söz konusu oranın yüzdesi belirtilmiştir.

Tablodan görülebileceği gibi en yavaş ilerleyen süreç önerilen terkip ile tedavi durumundadır.

Kullanılan terkipten bağımsız olarak radikal ameliyattan sonra tümör-cilt melanomunun yayılma modeli Tablo 4'de gösterilmiştir.

15

Tablo 4

İmmünohistimülatör	Nüksetme	Metastazlar			
		Deri altında	Lenf nodülleri	Akciğerler	Beyin
C.P.	<u>1:11</u>	<u>4: 11</u>	<u>6: 11</u>	<u>7: 11</u>	<u>3: 11</u>

İmmünostimülatör	Nüksetme	Metastazlar			
		Deri altında	Lenf nodülleri	Akciğerler	Beyin
	%9	%36	%55	%63	%27
Decaris	yok	<u>1: 8</u>	<u>4: 8</u>	<u>2: 8</u>	<u>1: 8</u>
		%12.5	%50	%25	12.55
ISVO	yok	<u>3: 9</u>	<u>4: 9</u>	<u>1: 9</u>	<u>1: 9</u>
		%33	%45	%11	%11

*- rakamsal bölümde gözlemlenen hastaların toplam sayısına karşı hastalığın nüksettiği (metastazlı) hasta sayısı belirtilmiştir; payda kısmında söz konusu oranın yüzdesi belirtilmiştir.

Tablo 4’de gösterilen veri önerilen terkipte tedavi durumunda metastazların çoğunlukla, görece kolayca saptanabilen ve çıkarılabilen deri altında ve lenf nodüllerinde olduğuna işaret etmektedir. Akciğerlerde metastaz, bilinen diğer terkiplerle tedavi durumunda bulunandan 6 ile 2.5 kez daha nadir bulunmuştur. Ölen hastalar arasında hastalığın ilerleme modeli Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5

Gözlemlenen Hasta Grup	Hasta sayısı	Stabilizasyon süresi (ay)	Yayılma süresi (ay)	Hayatta kalma süresi (ay)
C.P.	9	13	9	22
Decaris	6	10	5	15
ISVO	10	17	12	29

Tablo 6’da sunulan veri, önerilen terkipten stabilizasyon süresini ve yayılma süresini önemli derecede uzattığını göstermektedir; ancak hayatta kalma süresi, Decaris terkipteki hayatta kalma süresinden 12 ay fazla ve *Corinebacterium Parvum* bazlı terkipteki hayatta kalma süresinden 7 ay daha fazladır.

Aşağıda Tablo 6’da hastalığın 3üncü evresinde radikal ameliyattan sonra mide kanseri hastalarının hayatta kalma verisi sunulmuştur.

Tablo 6

Gözlem süresi	Hastaların hayatta kalması (sıklık %’si)	
	Ameliyat+ISVO	Ameliyat
2 yıl	<u>15: 21</u> *	45.8
	71.41	
5 yıl	<u>10: 21</u>	24.2
	47.6	

*- rakamsal bölümde gözlemlenen hastaların toplam sayısına karşı yaşayan hastaların sayısı belirtilmiştir; payda kısmında söz konusu oranın yüzdesi belirtilmiştir.

Sunulan veriden, önerilen terkip ile tedavi edilmiş hastalarda hayatta kalma sıklığının yalnızca ameliyat edilmiş hastalara kıyasla 1.5-2 kat daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir.

Aşağıda Tablo 7’de radikal ameliyattan sonra rektum kanseri hastalarının hayattta kalma verisi sunulmuştur.

Tablo 7

Gözlem süresi	Hastaların hayatta kalması (sıklık %’si)	
	Ameliyat+ISVO	Ameliyat
5 yıl	<u>10: 14</u> *	58.2
	71.2	

*- rakamsal bölümde gözlemlenen hastaların toplam sayısına karşı yaşayan hastaların sayısı belirtilmiştir; payda kısmında söz konusu oranın yüzdesi belirtilmiştir.

Sonuçlardan görülebileceği gibi önerilen terkinin uygulanması hayatta kalmayı %14

arttırmıştır.

Aşağıda, önerilen immünostimülatör ile tedavi sırasında bağışıklık durumunun kontrolünün sonuçları açıklanmıştır.

1. DTH'ın tümörle ilişkili melanom antijenine reaksiyonu

5 İlk 6 aylık sürede ISVO ile tedavi edilmiş hastalarda pozitif DTH reaksiyonunun sıklığında önemli bir değişiklik yoktur (%50-%60). İmmünostimülasyonun yeniden başlatılmasından sonra (9-12 ay) bu indeks hastaların %10'unda artmıştır, bu da DTH'ın normal reaksiyon sıklığının ISVO ile stimülasyon sırasında değişmediğini veya artmadığını belirtir.

Decaris ile tedavi durumunda DTH'ın normal reaksiyonlarının sıklığı değişim gösterir, 2
10 aydan sonra hastaların %35'inde reaksiyon yoktur. Hastaların bir kısmında bu reaksiyonun sıklığı önemli derecede değişim gösterir (%20-%30).

DTH'nin reaksiyonu organizmanın tümörle ilişkili antijeni ayırt etme, reaksiyon gösterme ve reddetme kabiliyetini gösterdiğinden, bu indeksin stabilizasyonu veya yükseltilmesi olumlu göstergelerdir, ancak keskin dalgalanmalar ve bu reaksiyonun azalması immünostimülasyon
15 sırasında bağışıklık durumuyla ilgili olumsuz göstergelerdir. Dolayısıyla, bu indekse göre ISVO Decaris'e nazaran işlevini daha iyi yerine getirir.

2. Tümörle ilişkili melanom antijeni için RILA

Ameliyat sonrası dönemde ISVO ile tedavi reaksiyonlarda keskin dalgalanmalara neden olmaz. İmmünostimülasyon boyunca bu reaksiyonun saptanma sıklığı artmaya eğilimlidir.
20 Decaris'le tedavi edilmiş hastalar arasında stimülasyon boyunca bu reaksiyonun saptanma sıklığı %80'den %30'a düşmüştür, bu da sürenin sonunda hastaların yalnızca %30'unda lökositlerin teşhis edildiğini ve melanom antijenine reaksiyon gösterdiğini belirtir. DTHR kadar RILA da T-lenfositlerin tümörle ilişkili antijeni ayırt etme ve reaksiyon gösterme kabiliyetini gözler önüne serer. Bu reaktivitenin yokluğu veya azalması tümör direncinin
25 zayıflaması olarak kabul edilmelidir.

Decarisle tedavi sona erdikten sonra bu indeksin başlangıç değerine geri döndüğünü belirtmek gerekir.

3. Serum içindeki lökositlerin aderans inhibitörü

ISVO ile immünostimülasyon sırasında bu indeksin saptanma sıklığı sürenin başlangıcında
30 %35'den sürenin sonunda %80'e yükselir. Decaris'le tedavi edilmiş hasta grubunda bu

indeksin saptanma sıklığı sürenin başında %40'dan stimülasyon süresinin sonunda %20'ye düşer.

RILA'da saptanan lökositlerin aderans inhibitörü sağlıklı insanların %60-%80'inde saptanır. Aynı indeks radikal ameliyattan ve ISVO ile tedaviden sonra ve stabilizasyon aşamasında melanom hastalarında görülür. İnhibitör yayılma sürecinde kaybolur, bu da serum içinde lökositlerin aderans inhibitörünün mevcudiyetinin normal bağışıklık durumunun göstergelerinden biri olduğunu belirtir. Bunun ISVO ile tedavi edilmiş hastaların %45'inde görünmesi immünoestimülasyonun pozitif etkisi olarak kabul edilir.

Bununla karşılaştırıldığında Decarisle tedavi edilmiş grupta tedaviden 4 ay sonra inhibitör hastaların yalnızca %20'sinde bulunur.

4. RILA'da saptanan serum içindeki engelleyici faktör

Engelleyici faktör, antitümöral bağışıklık süreçlerine katılan immünokompetan hücrelerin blokaj durumunu gösterir.

Bu faktör, primer melanom lezyonu çıkarıldıktan sonra hastaların %25-%30'unda saptanır. ISVO ile tedavi edilmiş hastalarda immünoestimülasyondan 6 ay sonra bu faktör hastaların yalnızca %10'unda saptanır.

Ayrıca serumdaki engelleyici faktör de Decarisle stimülasyonun ilk 2 ayında azalır ve hastaların %10'unda saptanır, ancak 6ncı ayda engelleyici faktör, tümör alındıktan sonra herhangi bir engelleyici faktörün bulunmadığı hastalar dahil olmak üzere hastaların %30-%40'ında saptanır.

5. Serumdaki antiviral antikorlar

ISVO ile immünoestimülasyonun ilk aylarında serumda bulunan antiviral antikorlarda keskin bir artış olur; antiviral antikorlar alyuvar kümeleşmesinin nötrleştirilme reaksiyonuyla ve inhibisyon reaksiyonuyla saptanır. Bu süre zarfında antiviral antikorların titreleri 1:20'den 1:5000-10000'e yükselir. İmmünoestimülasyon sona erdirildikten sonra (6-9 ay) antikorların titreleri düşer ve daha sonra immünoestimülasyonun yeniden başlatılmasıyla stabil hale gelir.

Bu da hastaların organizmalarında aktif viral bağışıklığın meydana geldiğini gösterir. Viral bağışıklığın meydana gelme süresi, anti tümöral bağışıklığın, tümörün büyümesiyle bloke edilmiş olan süreçlerin yeniden başlaması ve normalleşmesi yoluyla ekspresyonu açısından olumludur.

Bu da, primer melanom lezyonunun radikal ameliyatla çıkarılmasından sonraki ameliyat sonrası dönemde ISVO'nun uygulanmasının organizmanın bağışıklık reaksiyonlarını stabil hale getirdiği veya aktive ettiği anlamına gelir.

5 Bunun yanı sıra, otoimmün reaksiyonların hiperstimülasyonun hiçbir belirtisi gözlemlenmemiştir. Bağışıklık durumunun indeksleri, ISVO'nun kalıcı parenteral uygulaması sırasında toksik etkilerin gözlemlenmemiş olduğunun delilidir.

Patojenik olmayan, tümöre adapte edilmiş ECHO tipi Picomaviridae Enterovirus'ün entovirüs suşu tümör büyümesinin baskılanmasında etkilidir.

10 Virüslerin bu tipi sarılmamış (zarflanmamış) virüsler grubuna aittir ve bu nedenle otoimmün reaksiyonları başlatabilen hücresel orijinli antijenler taşımazlar.

Bundan başka virüslerin bu tipinin özelliği, konukçu hücre genomuna entegre olmayan ve diğer virüslerin genomlarıyla birleşmeyen genomun organizasyonu temelinde genetik açıdan güvenli olmasıdır.

15 İmmünostimülatör üretilmesi için geliştirilmiş usul elde edilen terkinin azami aktivitesini temin eder.

Önerilen immünostimülatör nüksetme durumunda malign büyümesini aktif olarak baskılar, stabilizasyon süresini ve yayılma süresini uzatır. Ayrıca, metastazlar ağırlıklı olarak deri altında ve lenf nodüllerindedir, bunlar diğer metastazlara kıyasla daha kolay çıkarılabilir.