

ÖZET

SÜLFATLANMIŞ POLİGULONİK ASİT POLİSAKKARİT VEYA BUNUN FARMASÖTİK TUZU, BUNUN PREPARASYON YÖNTEMİ VE BUNUN KULLANIMI

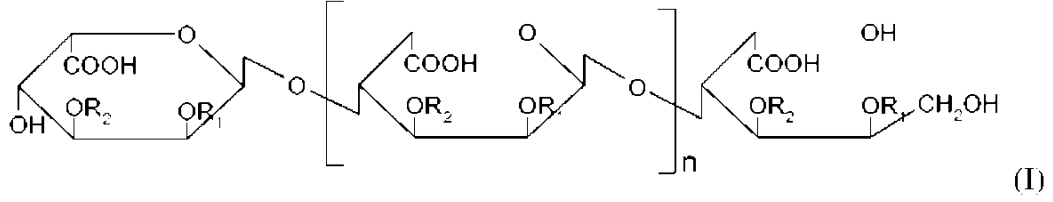
5

10

Bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu, bunun preparasyon yöntemi ve tümör büyümesi ve/veya metastaz inhibitörlerinin preparasyonunda bunun kullanımı açıklanmaktadır. Mevcut buluşun poligulonik asit sülfatı veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu, tümör büyümesi inhibitörleri, tümör metastaz inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri, heparanaz inhibitörleri, C-Met enzimi inhibitörleri, mikrotübül polimerizasyon inhibitörleri, aktin-depolimerleştirme faktörü aktivitesi inhibitörleri ve aktin-agregasyon inhibitörlerinin birinin veya daha fazlasının preparasyonunda kullanılabilmektedir.

İSTEMLER

1. Bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu olup, burada L-guluronik asit birimi, birbirine 1,4-glikosidik bağlar aracılığıyla indirgen ucun konum 1'inde yer alan bir hidroksil ile bağlanmaktadır ve C-2 konumunda tamamen sülfatlanmış şeker halkaları olup, burada poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu aşağıdaki genel formül (I)'in bir yapısına sahiptir:



burada,

n, 0' veya 1 ile 23'ün bir tamsayı olarak temsil etmektedir,

R₁, SO₃H'dir,

R₂, birbirinden bağımsız olarak, H ve SO₃H'yi temsil etmektedir,

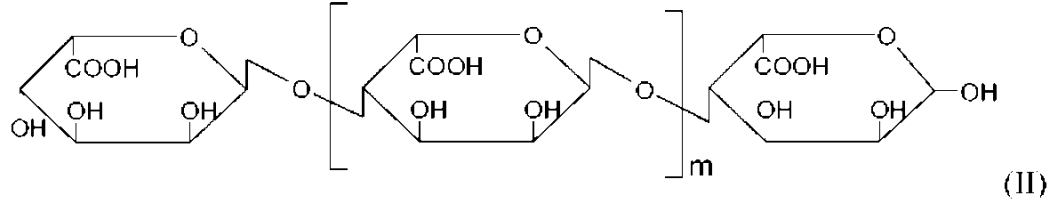
poligulonik asit sülfatın sülfür içeriği olarak hesaplanan sülfatlaşma derecesinin ağırlık cinsinden %5 ile 20 olması koşuluyla geçerlidir.

2. Genel formül (I)'de n'nin, 2 ile 13'ün bir tamsayı olarak tercihen 3, 4, 5, 6, 7 veya 8 olduğu, İstem 1'e göre poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu.

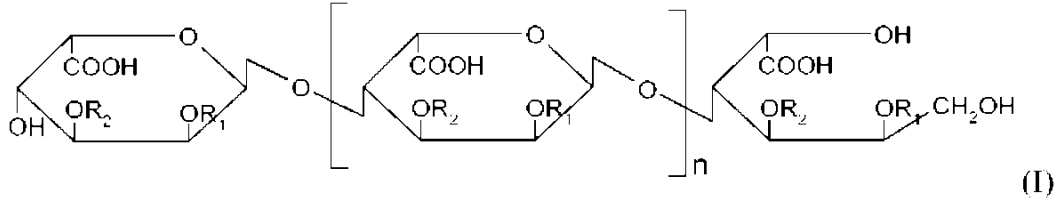
3. Sülfür içeriğinin, ağırlık cinsinden %7 ile 15, tercihen ağırlık cinsinden %9 ile 13 olduğu, İstem 1 veya 2'ye göre poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu.

4. İstem 1'e göre poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun hazırlanması yönelik bir yöntem olup, aşağıdakileri içermektedir:

aşağıdaki yapısal formül (II)'de gösterildiği üzere bir poligulonik asidin bir sülfonatlaştıran reaktif ile tepkimeye girmesini müteakip genel formül (I)'de gösterildiği üzere poligulonik asit sülfat vermesi için bir indirgen madde aracılığıyla indirgenmesi,



yapısal formül (II)'de m, 0' veya 1 ile 48'in bir tamsayı olarak temsil etmektedir;



genel formül (I)'de, n, R₁ ve R₂, İstem 2'de açıklandığı gibidir.

5

5. Sülfonatlaşmış reaktifin, klorosülfonik asit olduğu; sülfonatlaşmış sıcaklığı, 45 ila 85°C, tercihen 60 ila 75 °C olduğu; tepkime süresinin, 1.5 ila 4.5 saat, tercihen, 2 ila 3.5 saat, en fazla tercihen 3 saat olduğu; ve/veya indirgen maddenin, sodyum borohidür, sodyum siyanoborohidür, nikel-hidür reaktifler veya halojen-tabanlı indirgen maddeler olduğu, İstem 4'e göre yöntem.

10

6. Tümör büyümesi ve/veya metastazın önlenmesine yönelik bir ilaç preparasyonunda, İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun kullanılması.

15

7. Tümörün, karaciğer kanseri, mide kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri, meme kanseri, pankreas kanseri, böbrek kanseri, mesane kanseri, prostat kanseri, melanom ve beyin kanserini içeren gruptan seçildiği, İstem 6'ya göre kullanılması.

20

8. Tümör büyümesi inhibitörleri, tümör metastaz inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri, heparanaz inhibitörleri, C-Met enzimi inhibitörleri, mikrotübül polimerizasyon inhibitörleri, aktin-depolimerleştirme faktörü aktivitesi inhibitörleri ve/veya aktin-agregasyon inhibitörlerinin preparasyonunda, İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun kullanılması.

25

9. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarı içeren bir farmasötik bileşim.

10. Tümör büyümesi ve/veya metastaz inhibitörlerinin preparasyonunda, İstem 9'a göre farmasötik bileşim kullanılır.

5 **11.** Tümör büyümesi inhibitörleri, tümör metastaz inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri, heparanaz inhibitörleri, C-Met enzimi inhibitörleri, mikrotübül polimerizasyon inhibitörleri, aktin-depolimerleştirme faktörü aktivitesi inhibitörleri ve/veya aktin-agregasyon inhibitörlerinin preparasyonunda, İstem 9'a göre farmasötik bileşim kullanılır.

TARİFNAME

SÜLFATLANMIŞ POLİGULONİK ASİT POLİSAKKARİT VEYA BUNUN FARMASÖTİK TUZU, BUNUN PREPARASYON YÖNTEMİ VE BUNUN KULLANIMI

5

TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, tıbbi alanla özellikle de bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu, bunun preparasyon yöntemi ve tümör büyümesi ve/veya metastaz inhibitörlerinin preparasyonunda bunun kullanımı ile ilgilidir.

ÖNCEKİ TEKNİK

Tümörler, insan hayatı ve sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Habis tümörler, kentsel bölgelerde bir numaralı kansal bölgelerde ise iki numaralı ölüm sebebi haline gelmiştir ve çeşitli hastalıklarda ölüm oranında birinci sıradadır. Tümör metastaz, habisliğin bir işaretidir ve habis tümörlerin metastaz ve nüksetmesi, tedavinin başarısız olmasının temel sebepleridir. Bu nedenle günümüzde, tümör büyümesini ve metastaz önleyebilen anti tümör ilaçların bulunması önem verilmektedir.

20

Yakın zamandaki çalışmalara göre, sakkaritler yalnızca önemli yapısal oluşumları ve enerji kaynakları bir sınıfı değildir ayrıca önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Hücreden hücreye tanıma ve sinyalleşmeye dâhillerdir ve bir organizmadaki nükleik asitlere ilaveten önemli sinyal moleküllerinin bir sınıfı oldukları düşünülmektedir. Ayrıca, hücre yüzeylerinde sinyal tanıma, antikor-antijen tepkimeler, hücre sinyal transdüksiyonu ve hissetmede genellikle kilit unsur oldukları için, biyolojik aktiviteler sahip aktif polisakkaritlerin araştırılmasına çok daha fazla ilgi gösterilmektedir. Ancak sakkaritlerin kompleks yapı ve ayrılması ve yapısal karakterizasyonundaki zorluklardan dolayı, günümüze kadar klinik amaçlar için yalnızca koriolus mantar polisakkaritleri, poliporus polisakkaritler, mantar polisakkaritleri, şizofilan polisakkaritleri, Poria cocos polisakkaritleri ve benzeri kullanılmaktadır. Teknikte, biyolojik aktiviteler sahip daha fazla polisakkarit türü elde edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapısal olarak ilgili bileşikler, CN 1544475 numaralı patent dokümanında açıklanmaktadır.

35 BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Yapısal ayrışma ve karbonhidratların preparasyonundaki zorluklara ve doğal şekerlerin düşük aktivite problemlerinin yanı sıra tümördeki şiddetli hadiselerin pratiğe ilişkin problemlerine ve tedavideki zorluklara rağmen mevcut buluşu yapan kişi, kapsamlı ve yoğun çalışmalara dayanarak mevcut buluşu tamamlamıştır. Mevcut buluşu yapan kişi, oligo-guluronik asidin bir sülfatlanmış türevini vermek için uygun bir süre boyunca uygun sıcaklık altında poligulonik asidin bir sülfonatlaştıran madde ile tepkimeye girmesi ile ve sonrasında indirgenme için bir indirgen madde eklenmesiyle, böylelikle İstem 1'e göre bir poligulonik asit sülfat (bundan böyle "PGAS" olarak anılacaktır) elde edilmesiyle mevcut buluşu tamamlamıştır.

10

Buna göre mevcut buluşun bir amacı, bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunu sağlamaktır. Mevcut buluşun poligulonik asit sülfat veya farmasötik olarak uygun tuzu, tümör büyümesi ve metastazda önemli bir önleme etkisine sahiptir ve etki mekanizması, heparanaz aktivite, C-Met enzim aktivite, anjiyogenez, mikrotübül polimerizasyon, aktin depolimerize edici faktörler ve benzerini önleme yeteneği ile bağlantılıdır. Mevcut buluş, L-guluronik asit birimlerinin, birbirine 1,4-glikosidik bağ araçlarıyla indirgen ucun konum 1'inde yer alan bir hidroksil grup ile bağlandığı bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu ve bunun C-2 konumlarında tamamen sülfatlanmış şeker halkalarını sağlamaktadır.

20

Mevcut buluşun bir başka amacı, bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun hazırlanmasını yönelik bir yöntem sağlamaktır. Mevcut buluşun bir başka amacı, tümör büyümesi ve/veya metastaz inhibitörlerinin preparasyonunda bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun bir kullanımı sağlamaktır.

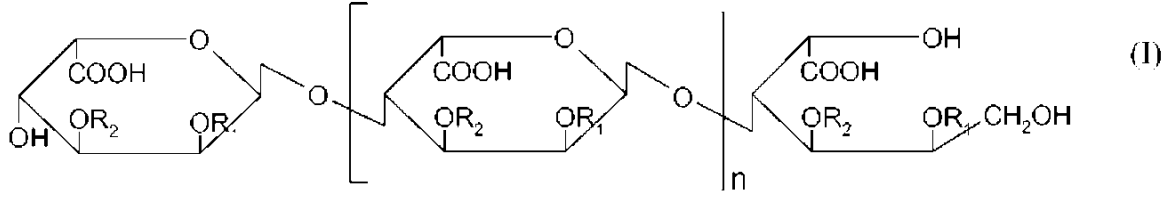
25

Mevcut buluşun yine bir başka amacı, mevcut buluşa göre bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarı içeren bir farmasötik bileşim sağlamaktır.

30

Mevcut buluşun bir başka amacı, tümörlerin tedavisine yönelik bir yöntem sağlamaktır.

Mevcut buluşun bir açısına göre, aşağıdaki genel formül (I)'in bir yapısına sahip bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu sağlanmaktadır.



poligulonik asit sülfatın sülfür içeriği olarak hesaplanan sülfatlaşma derecesinin ağırlık cinsinden %5 ila 20 olması koşuluyla, genel formül (I)'de n, 0 veya 1-23'ün bir tamsayı olarak temsil etmektedir; R₁, SO₃H'dir; R₂, birbirinden bağımsız olarak H veya SO₃H'dir.

5

Mevcut buluşun genel formül (I) ile temsil edilen poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunda, poligulonik asit, 1,4-glikosidik bağ aracılığıyla indirgen ucun konum 1'inde yer alan bir hidroksil grup ile L-guluronik asitlerden ve bunun C-2 konumunda tamamen sülfatlanmış ve bunun C-3 konumunda kısmen sülfatlanmış şeker halkarından oluşturulmaktadır

10

Yukarıdaki genel formül (I)'de, n, 0 veya 1-23'ün bir tamsayıdır, örneğin, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 veya 23; tercihen, n, 2-13'ün bir tamsayıdır, daha tercihen, n, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veya 10'dur ve en fazla tercihen, n, 4, 5, 6, 7 veya 8'dir. Tercihen sülfür içeriği, ağırlık cinsinden %7-15, daha tercihen ağırlık cinsinden %9-13'tür. Mevcut buluşta, muhtemelen bu polisakkaritler vücut hücreleri tarafından daha kolay tanınır ve kabul edildiği için, dodekasakkarite tetrasakkarit (özellikle de dodekasakkarite heksasakkarit) kullanarak ve/veya sülfür içeriği ağırlık cinsinden %7-15 (özellikle ağırlık cinsinden %9-13) olduğunda daha iyi biyolojik etkiler elde edilmektedir.

20

Mevcut buluşta poligulonik asit sülfatların farmasötik olarak uygun tuzları, örneğin sodyum, potasyum, kalsiyum veya tercihen sodyum tuzlar olmak üzere bu bileşiklerin magnezyum tuzları olabilmektedir. Farmasötik olarak uygun tuzlar, klasik yöntemlerle hazırlanabilmektedir.

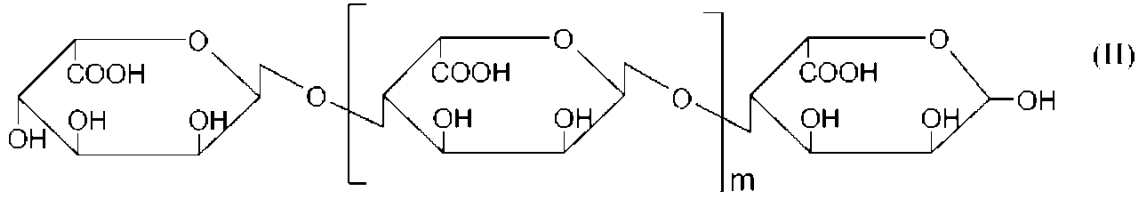
25

Mevcut buluşun bir başka açısına göre, poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun hazırlanmasına yönelik bir yöntem sağlanmakta olup, yöntem aşağıdakileri içermektedir:

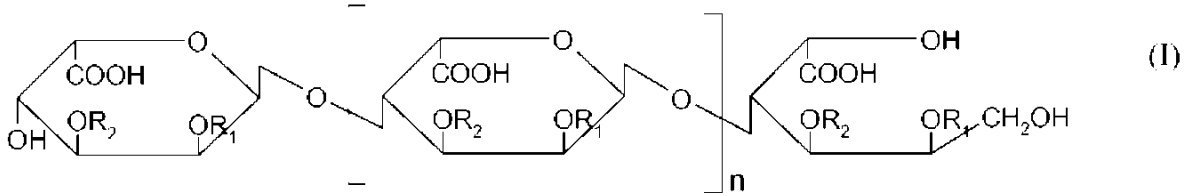
30

aşağıdaki yapısal formül (II)'de gösterildiği üzere bir poligulonik asidin bir sülfonatlaştıran reaktif ile tepkimeye girmesi, ardından genel formül (I)'de gösterildiği üzere poligulonik

asit sülfat vermek için bir indirgen madde aracılığıyla indirgenmesi,



formül (II)'de m, 0' veya 1-48'in bir tamsayı olarak temsil etmektedir;



5 genel formül (I)'de n, R₁ ve R₂, yukarıda açıklandığı gibidir.

Mevcut buluşta sülfonatlaştıran reaktif tercihen klorosülfonik asit olabilmektedir; tercihen sülfonatlaştıran sıcaklık 45-85°C, daha tercihen 60-75 °C olabilmektedir ve tepkime süresi 1.5-4.5 saat, daha tercihen, 2-3.5 saat, en fazla tercihen 3 saat olabilmektedir; indirgen
10 madde tercihen sodyum borohidrür, sodyum siyanoboro-hidrür, nikel-hidrür reaktifler, halojen-tabanlı indirgen maddeler ve benzeridir.

Mevcut buluşun bir başka amacı tümör büyümesi ve/veya metastaz inhibitörlerinin preparasyonunda bir poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzunun
15 kullanılması sağlamaktır.

Mevcut buluşta "tümörler" terimi, habislikler ve örneğin, karaciğer kanseri, mide kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri, meme kanseri, pankreas kanseri, böbrek kanseri, mesane kanseri, prostat kanseri, melanom, beyin kanseri ve benzeri dahil olmak üzere tümörlerin her
20 türüne atıfta bulunulmaktadır.

Mevcut buluşta tercihen poligulonik asit sülfat veya bunun farmasötik olarak uygun tuzu, tümör büyümesi inhibitörleri, tümör metastaz inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri, heparanaz inhibitörleri, C-Met enzimi inhibitörleri, mikrotübül polimerizasyon inhibitörleri,
25 aktin-depolimerleştirme faktörü aktivitesi inhibitörleri ve/veya aktin-agregasyon inhibitörleri olarak kullanılabilir.

Yukarıdakiler göz önünde bulundurulduğunda, tümörlerin tedavisi için etkili ilaçların eksikliğine dair mevcut problemin çözülmesi amacıyla tümörlerin tedavisi ve tümör metastazı için bir ilacın preparasyonunda mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatı veya farmasötik olarak uygun tuzunun kullanılması oldukça önemlidir.

5

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

ŞEKİL 1, mevcut buluşun poligulonik asit sülfatının ilgili bileşenlerine yönelik kolon ayırma sonucunu göstermektedir.

10 ŞEKİL 2, insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerin büyümesinde mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatının önleme etkisini göstermektedir.

ŞEKİL 3, insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerin akciğer metastazında mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatının önleme etkisini göstermektedir. Panel A, H&E boyamasıyla akciğerdeki metastazın genel bir resmini (büyütme: 200X) göstermektedir; panel B, MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerin akciğer metastazındaki PGAS'nin önleme etkisinin nicel bir görünümüdür. Şekildeki veriler, genel bir deneyde ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmektedir.

15 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, tedavi grubuna karşı kontrol grubu.

ŞEKİL 4, insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerde mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatının anjiyogenez önleme etkisini göstermektedir. Panel A, pozitif boyamayı gösteren oklarla birlikte CD31 boyamasının genel bir resmini göstermektedir (büyütme: 200X) (Panel A'da: "C" kontrol grubudur, "P" ise PGAS tedavi grubudur); panel B, insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerdeki PGAS'nin anjiyogenez önleme etkisinin nicel bir görünümüdür. Şekildeki veriler, bir deneyde ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmektedir. ** $P < 0.01$, tedavi grubuna karşı kontrol grubu.

ŞEKİL 5, murin melanom B₁₆F₁₀ hücrelerinin deneysel akciğer metastazında mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatının önleme etkisini göstermektedir. Panel A, akciğerdeki metastazın genel bir resmini göstermektedir; panel B, B₁₆F₁₀'nin deneysel akciğer metastazındaki PGAS'nin önleme etkisinin nicel bir görünümüdür. Şekildeki veriler, genel bir deneyde ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmektedir. Benzer sonuçlar, en az iki bağımsız deneyden elde edilebilmektedir.

30 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, tedavi grubuna karşı kontrol grubu.

ŞEKİL 6, tavuk embriyo koryoallantoik membranı (CAM) neovaskülarizasyonunda mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatının önleme etkisini göstermektedir. Panel A, bir çözücü kontrol grubunu göstermektedir; panel B, bir 200 µg/yumurta PGAS grubunu

35

göstermektedir; panel C, bir 400 µg/yumurta PGAS grubunu göstermektedir; panel D, bir 800 µg/yumurta PGAS grubunu göstermektedir (büyütme: 40X).

ŞEKİL 7, heparanaz aktivitesinde mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatın önleme etkisini göstermektedir. Panel A, mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatın heparanaz aktivitesinin önlenmesini gösteren HPLC spektrumu göstermektedir; panel B, yukarıdaki panel A spektrumundan hesaplanan sonuçlardan mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatın heparanaz aktivitesinin önleme oranını göstermektedir.

ŞEKİL 8, bir hücresiz sistemdeki tubulin polimerizasyonunda mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatın önleme etkisini göstermektedir. Panel A, zamana bağlı olarak göstermektedir, panel B ise doza bağlı olarak göstermektedir.

ŞEKİL 9, bir hücresiz sistemdeki aktin depolimerizasyonunda mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatın önleme etkisini göstermektedir.

ŞEKİL 10, aktin-depolimerize edici faktörünün aktin depolimerize etme/yapıma aktivitesinde mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatın önleme etkisini göstermektedir.

##P<0.01, Kofilin grubuna karşı kontrol grubu; **P<0.01, tıbbi gruba karşı Kofilin grubu.

ŞEKİL 11, mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatın ilgili bileşenlerinin tümör metastaz önleme aktivitesini göstermektedir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, yapılarındalarla daha ayrıntılı bir şekilde aşağıda açıklanacaktır. Ancak aşağıdaki yapılarındalar, yalnızca örnekleme amacıyla sağlanmaktadır ve mevcut buluşun kapsamı bunlarla sınırlanmamaktadır.

Malzemeler ve reaktifler

Poliguluronik asit, Çin Ocean Üniversitesi'nin Lan Tai Pharmaceuticals Co.Ltd'den alınmıştır. Dekstrana göre 10000 Da ağırlığında bir ortalama moleküler ağırlığa sahiptir. Formamit, klorosülfonik asit, vb., Sinopharm Group Chemical Reagent Company, A.R. grade tarafından sağlanmıştır. Dekstran moleküler ağırlık standart, Fluka Company'den alınmıştır. Doksorubisin enjeksiyonu (Adriamisin, ADM), Zhejiang Haimen Pharmaceutical Factory tarafından üretilmiştir, Zhejiang sağlık ilaç kesin (1996) No. 135501, içerik: 10 mg/viyal, çözücü: normal salin, formülasyon : her bir uygulamadan önce normal salin ile istenilen konsantrasyona seyreltilmiştir. TSK gel2000SWXL, TSK gel G3000SWXL, Japonya TOSOH Company'den temin edilmiştir; Bio-Rad Company'den Bio-Gel-P6, Bio-Gel-P10 ; Pharmacia Company'den

Sephadex G-10, Sepharose CL-4B, ; tubulin, aktin, SIGMA Company'den alınmıştır

Cihazlar

- 5 NICOLET Company'den NEXUS-470 aklıkzitesi spektrometre; Bruker Company'den DPX-300 NMR spektrometre; Beijing Longzhida Co., Ltd.'den Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC); Unocal Corporation, US'den UV-2102 ultraviyole ve görünür spektrofotometre.

Deneyisel Hayvanlar

10

Çıplak fareler, BALB/cA, 18-22 g, Şanghai İlaç Bilimleri Enstitüsü, Çin Bilim Akademisi tarafından sağlanmıştır C₅₇BL/6 fareleri, 6-7 hafta, Şanghai Hayvan Merkezi, Çin Bilim Merkezi tarafından sağlanmıştır Taze yumurtalar, Şanghai Shenbao Tavuk Çiftliği'nden alınmıştır

15

Örnek 1: Poligulonik asit sülfat'ın (PGAS) preparasyonu

- 5°C'nin altında bir sıcaklık sürdürürken 10 ml formamide 3 ml klorosülfonik asit damlalar halinde eklenmiştir. 20 dakikalık tepkimeden sonra, 1 g poliguluronik asit eklenmiştir ve 65-70°C bir sıcaklıkta 3 saat boyunca tepkimeye girmiştir. %80 etanol solüsyonunun 2 hacmi, tepkime ürününe eklenmiştir ve yapışkan bir madde vermesi için devamlı olarak sallanmıştır Fazladan %80 etanol solüsyonu eklenmiştir ve yukarıdaki adımlar 2 defa tekrarlanmıştır Solüsyon, boşaltılmış ve yapışkan bir madde vermesi için su eklenmiştir. Yapışkan madde, bir %1 Na₂CO₃ solüsyonu ile pH 7.0'a ayarlanmıştır ve bir %95 etanol solüsyonun 2 hacmiyle alkol çöktürmesine maruz bırakılmıştır Ortaya çıkan çökelti, poliguluronik asidin sülfatlanmış bir türevini vermesi için 50-60°C bir sıcaklıkta kurutulmuştur. Türev, bir 4 mg/ml sodyum asetat solüsyonuna (pH7.0) formüle edilmiştir ve solüsyona 50 mM'ye kadar sodyum borohidür eklenmiştir. Tepkime, 30-40°C bir sıcaklıkta 30 dk boyunca gerçekleştirilmiştir ve bir buz banyosu ile sonlandırılmıştır *pH, 0.1M asetik asit ile ayarlanmıştır tepkimeyen sodyum borohidür serbest bırakılmış ve pH nötr olacak şekilde ayarlanmıştır Ortaya çıkan solüsyon, devamlı olarak çöktürülmüş ve etanol ile yıkanmış ve kurutulmuştur, böylece bir ham poligulonik asit sülfat (PGAS) vermiştir. Ham PGAS, bir %10 solüsyona formüle edilmiştir ve bir %95 etanol solüsyonu ile çöktürmeye maruz bırakılmış Ortaya çıkan çökelti, mutlak etanol ile yıkanmış, kurutulmuş ve bir %5 solüsyona formüle edilmiştir. Solüsyon, safsızlıklar kaldırmak için bir 3mm membran ile filtrelenmiştir ve bir hareketli faz olarak ve fraksiyon

koleksiyonu kullanarak Sephadex G-10 kolonda (153 100 cm) tuzundan arındırılmıştır. Sülfürik asit-karbazol yöntemiyle eluatlar tespit edilmiştir ve indirgenmiş basıncıta konsantre edilen, tuzundan arındırılan ve dondurarak kurutulan şeker içeren bileşenler birleştirilmiştir, böylece rafine edilmiş bir poligulonik asit sülfat vermiştir.

5

Yukarıda hazırlanan poligulonik asit sülfatın sülfür miktarı oksijen cam şişe yanma yöntemi ile belirlenmiştir. 25 mg civarında bir numune alınmıştır kesin olarak tartılmıştır ve oksijen cam şişe yanma yönteminin ardından organiklerin tahribine maruz bırakılmıştır. Bir 1000 ml yanma cam şişesi kullanılmıştır, emici sıvı olarak 0.1 ml konsantre hidrojen peroksit solüsyonu ve 10 ml su kullanılmıştır. Oluşturulan duman tamamen emildiğinde, ortaya çıkan madde, 15 dakika boyunca bir buz banyosuna konulmuş, 2 dakika boyunca hafif kaynamaya kadar ısıtılmış, soğutulmuş, indikatör olarak 50 ml etanol-amonyum asetat tampon (pH3.7), 30 ml etanol ve 0.3 ml bir %1 Alizarin kırmızı solüsyon eklenmiş ve bir baryum perklorat titrasyon solüsyonu (0.05 mol/L) ile açık turuncu-kırmızıya titre edilmiştir. 1 ml baryum perklorat titrasyon solüsyonu (0.05 mol/L), 1.603 mg S'ye eşdeğerdir. Test sonuçları kurutulan ürüne dayanarak poligulonik asit sülfatın sülfür içeriğinin yaklaşık cinsinden %11.2 olduğunu göstermektedir.

10

15

Örnek 2: Poligulonik asit sülfat'ın (PGAS) yapısal karakterizasyonu

20

Yapısal karakterizasyon, poligulonik asit sülfatın preparasyonundan ortaya çıkan fraksiyondaki sakkarit bileşenlerinde gerçekleştirilmiştir.

1. UV absorpsiyon spektrumu

25

Yukarıdaki poligulonik asit sülfat, uygun bir konsantrasyona seyreltilmiştir ve ham metal olarak damıtılmış su ile 190 nm-400 nm arasında UV-2012 ultraviyole-görünür spektrofotometre ile taranmıştır. Fraksiyonun, ultraviyole bölgesinde belirli bir absorpsiyon pikine sahip olmadığı bulunmuştur, bu da yapıda hiç konjuge çift bağ olmadığı göstermektedir. Ancak, 190-200 nm'de nonspesifik absorpsiyon vardır.

30

2. Kızılötesi spektroskopi

0.5 mg PGAS, Kbr peletler olması için preslenmiştir ve kızılötesi spektroskopi, NEXUS-470 akıllı kızılötesi spektrometre ile gerçekleştirilmiştir. Hidroksil grupları simetrik gerilme

35

titreşiminin, 3219.53 cm^{-1} 'de mevcut olduğu, karbonil grupları simetrik gerilme titreşiminin, 1612.58 cm^{-1} 'de mevcut olduğu, hidroksil grupları makaslama titreşiminin, 1414.33 cm^{-1} 'de mevcut olduğu, karboksik gruplarıdaki karbon-oksijen bağları simetrik gerilme titreşiminin, 1103.97 cm^{-1} 'de mevcut olduğu, C-O-S'nin gerilme titreşimi pikinin, 823.30 cm^{-1} 'de mevcut olduğu ve sülfatlaşmadan sonra sülfattaki S=O'nun gerilme titreşimi pikinin, 1274.62 cm^{-1} 'de mevcut olduğu bulunmuştur, bu da bileşiğin, karboksil, hidroksil ve sülfonik gruplar içeren bir destek yapısına sahip olduğunu göstermektedir.

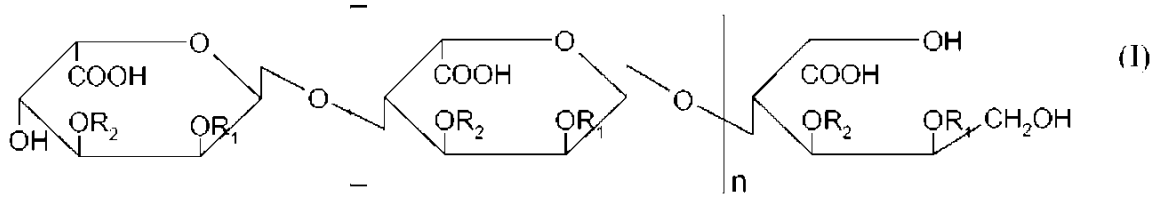
3. PGAS'nin NMR spektroskopisi

PGAS'nin NMR spektroskopisi (^{13}C -NMR), Bruker Avance DPX-300 NMR spektrometre ile belirlenmiştir. Spektrumda, sülfonlu olmayan C-3 sinyal pikleri hala mevcut iken sülfonlu olmayan C-2 sinyal piklerinin, büyük ölçüde görülmeyeceği bulunmuştur. C-2 konumundaki hidroksil grupları, görece tamamen sülfatlanmış olduğu ve C-3 konumundaki hidroksil grupları, yalnızca kısmen sülfatlanmış olduğu belirtilmektedir.

4. PGAS'nin moleküler ağırlığı ve moleküler ağırlık dağılımı

PGAS'nin moleküler ağırlığı GPC yöntemi ile belirlenmiştir. Tespit, bir moleküler ağırlık standardı olarak Fluka Company'den dekstrana, bir kromatografik kolon olarak TSK gel2000SWXL kolona ve 0.5 ml/dk bir akış hızında, 35°C bir sıcaklıkta ve 25 ml bir enjeksiyon hacmi olan bir hareketli faz olarak %0.2 sodyum asit ve 2.84 Na_2SO_4 içeren bir sulu çözeltiye sahip Kromat İndisi Detektörü kullanarak gerçekleştirilmiştir. Dekstrana göre PGAS'nin moleküler ağırlığı ortalama olarak 2513 Da olduğu bulunmuştur ve numunelerin çoklu kümelerinin belirleme sonuçları, dekstrana göre moleküler ağırlığı 1500-8500 Da arasında olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar birlikte, yukarıdaki fraksiyonun, poligulonik asidin indirgen ucundaki konum 1'de bir hidroksil grubuna sahip olan bir poligulonik asit sülfat olduğunu ve C-2 konumunda tamamen sülfatlanmış ve C-3 konumunda kısmen sülfatlanmış olduğunu, aşağıdaki kimyasal formül (I)'e sahip olduğunu doğrulamaktadır.



genel formül (I)'de, n, R₁ ve R₂, yukarıda açıklandığı gibidir.

Örnek 3: PGAS'nin bileşenlerinin ayrılması ve preparasyonu

5

Yukarıda hazırlanan PGAS'nin bir numunesi alınmış, bir %5 solüsyona formüle edilmiş, safsızlıklarını kaldırmak için bir 3 mm membran ile filtrelenmiş ve bir hareketli faz olarak 0.2 mol/L NH₄HCO₃ ile Bio-Gel-P6 jel kolonda (1.63180 cm) ayrılmıştır ve fraksiyonlar toplanmıştır. Eluatlar, sülfürik asit-karbazol yöntemi ile tespit edilmiştir, şeker içeren bileşenler, toplanmıştır ve boş hacimli bileşenler, Bio-Gel-P10 jel kolonda (1.63180 cm) daha da ayrılmıştır. Ortaya çıkan ürünler, kütle spektrometrisi ile tanımlanmış olan bir dizi PGAS sakkarit bileşeni vermesi için dondurarak kurutulmuştur. Sonuçlar, PGAS'nin di-, tri-, tetra-, penta-, hekza-, hepta-, okta-, nona-, deka-, undeka- ve diğer sakkarit bileşenlerin üretimini onaylamaktadır.

15

Aşağıdaki deneylerde, Örnekler 4-11, Örnek 1'de hazırlanan ürünü kullanırken, Örnekler 12 ve 13, Örnek 3'te hazırlanan ürünleri kullanmaktadır.

Örnek 4: Poligulonik asit sülfat'ın (PGAS) tümör büyümesini önleme etkinliğinin değerlendirilmesi

20

Bir 2.5310⁷ hücre/ml konsantrasyonunda bir üstel büyüme evresinde insan meme kanseri MDA-MB-435 hücreleri (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, ABD'den), 4-5 haftalık dişi çanak farelerin ikinci sol meme yağ pedine aşılanmıştır (BALB/cA, Şanghay İlaç Bilimleri Enstitüsü, Çin Bilim Akademisi tarafından sağlanmıştır). Tümörler, 100-200 mm³ boyutuna büyütüldüğünde hayvanlar, tümör hacimlerine göre negatif bir kontrol grubuna, bir doksorubisin enjeksiyonu (Adriamisin, ADM) tedavi grubuna (pozitif kontrol grubu) ve 5 mg/kg ve 20 mg/kg PGAS tedavi gruplarına (PGAS deneysel gruplar), 20 fare/grup şeklinde eşit olarak bölünmüştür. PGAS deneysel grupları ve pozitif kontrol grubuna, 7 kesintisiz hafta boyunca haftada bir defa intravenöz enjeksiyon verilmiştir ve negatif kontrol grubuna, normal salinin bir eşit miktarı verilmiştir. Deneylerde, iki haftada bir tümörlerin çapını ölçmek için bir

30

vernierli kumpas kullanılarak ve tümör hacmi (V), aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır

$$V = 1/2 \times a \times b^2$$

5 burada, a ve b, sırasıyla tümörlerin uzunluğunu ve genişliğini temsil etmektedir. İlgili tümör hacmi (RTV), ölçülen sonuçlara göre hesaplama formülü kullanılarak hesaplanmıştır $RTV_t = V_t/V_0$; burada V_0 , hayvanlar farklı dozda ilaç (örneğin d_0) verilmek üzere ayrıldığında ölçülen tümör hacmidir ve V_t , ölçüm gününde tümör hacmidir. Anti-tümör aktivitesinin farmakodinamik değerlendirme indikatörü, ilgili tümör proliferasyon oranı T/C (%), bunun hesaplama formülü aşağıdaki şekildedir:

10

$$T/C (\%) = \frac{T_{RTV}}{C_{RTV}} \times 100\%$$

T_{RTV} : Tedavi grubunun RTV'si; C_{RTV} : Negatif kontrol grubunun RTV'si. Etkinlik Değerlendirmesi: $T/C \% > \%60$, etkisiz anlamda gelmektedir; $T/C \% \leq \%60$ ile birlikte $P < 0.05$ 'in istatistiksel önemi, etkili anlamda gelmektedir.

15 Hayvanlar, ilaç verilmesi kesildikten 1 hafta sonra feda edilmiştir. Akciğer dokuları 24 saatten daha uzun bir süre boyunca Bouin'in solüsyonuna (doygün pikrik asit: formaldehit: glasiyal asetik asit=75:25:5) sabitlenmiştir ve akciğer metastazlar beyaz nodlar şeklinde görünene ve akciğer dokuları normal rengine geri dönene kadar mutlak etanolde bekletilmiştir. Akciğer başında akciğer metastaz nodları sayılmış gözlemlenmiştir ve bir teşrih mikroskobunun altında

20 kaydedilmiştir. Ortotopik tümör dokuları bir parçası nitrojene yerleştirilmiştir, toplam RNA ve proteinin çıkarılması için dondurarak muhafaza edilmiştir. Akciğerlerin bir parçası ve ortotopik tümör dokuları %10 formaline sabitlenmiştir ve tümör dokularındaki anjiyogenezler, H&E boyama ve immüno-histokimya ile belirlenmiştir.

25 Tümör inokülasyonundan sonra 15-20. günlerde insan meme kanseri MDA-MB-435 ksenograftlerinin, bir %100 inokülasyon başarıyla 100-200 mm³ civarında büyüdüğü; inokülasyondan sonra 8-9. haftalarda tümör taşıyan çanak farelerin akciğer dokularında %100 bir metastaz oranıyla çok sayıda metastaz ortaya çıktığı bulunmuştur. Bu noktada hayvanlar feda edilmekte ve anti-tümör etki değerlendirmesine maruz bırakılmaktadır 7

30 kesintisiz hafta boyunca haftada bir defa intravenöz enjeksiyon ile PGAS tedavisi uygulanmıştır 5 mg/kg PGAS tedavi grubu, ortotopik tümörlerin büyümesini önleme özelliği göstermektedir ancak tümör önleme etkisi, %67.3 bir T/C değeri ile önemsizdir; 20 mg/kg PGAS tedavi grubu, çanak farelerde insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik

ksenogreftlerin büyümesini, %37.6'ya kadar bir T/C değeriyle önemli ölçüde önleme özelliği göstermektedir. Pozitif kontrol ilacı ADM, insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik tümörlerin büyümesini önemsiz ölçüde önleme özelliği göstermektedir ve 5 mg/kg ADM tedavi grubu, %21.8 bir T/C değerine sahiptir. Bu, PGAS'nin insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerinin büyümesini önemli ölçüde önleyebileceğini göstermektedir (ŞEKİL 2). 7 kesintisiz hafta boyunca haftada bir defa, intravenöz enjeksiyon ile 5 mg/kg ve 20 mg/kg dozaj rejimi altında, insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerin akciğer metastazındaki PGAS'nin önleme oranları sırasıyla %60.2 ve %88.4. Akciğer metastazındaki doksorubisinin (5 mg/kg) önleme oranı %89.8'dir. Bu, PGAS'nin insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerinin akciğer metastazındaki önemli ölçüde önleyebileceğini göstermektedir (ŞEKİL 3). Ayrıca, anjiyogenez in vivo da PGAS etkisi, immüno-histokimyasal boyama ile değerlendirilmiştir. Endotelial hücreye özgü belirteç CD31'in belirlenmesi, insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerinde çok sayıda küçük damar oluşturulduğunu göstermektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5 mg/kg PGAS tedavi grubu için ksenogreftlerdeki küçük damar sayısında önemli bir değişiklik olmazken, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 20 mg/kg PGAS tedavi grubundaki ksenogreftlerdeki küçük damar sayısında, %42.1 bir önleme oranıyla önemli bir azalma olmaktadır. Bu, PGAS'nin insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenogreftlerindeki anjiyogenezi önemli ölçüde önleyebileceğini göstermektedir (ŞEKİL 4).

Örnek 5: Poligulonik asit sülfat'ın (PGAS) tümör metastazını önleme etkinliğinin değerlendirilmesi

6-7 haftalık C57BL/6 fareleri (Şanghay Hayvan Merkezi, Çin Bilim Akademisi tarafından sağlanmıştır), bir normal salin negatif kontrol grubuna ve bir 5 mg/kg PGAS tedavi grubuna ve bir 20 mg/kg PGAS tedavi grubuna rastgele bölünmüştür. 2.5×10^6 hücre/ml konsantrasyonunda bir üstel büyüme evresinde murin melanom B₁₆F₁₀ hücreleri (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, ABD'den), farelerin kuyruk damarına aşılanmıştır. Hücre inokülasyonundan 20 dakika önce PGAS gruplarına, bir intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon verilmiştir ve negatif kontrol grubuna, normal salinin bir eşit miktarı verilmiştir. 11 gün sonra akciğerler, farelerden alınmıştır ve akciğer dokuları 24 saatten daha uzun bir süre boyunca Bouin'in solüsyonuna (doğru pikrik asit: formaldehit: glasiyal asetik asit = 75:25:5) sabitlenmiştir. Akciğer başına akciğer metastaz nodları sayılarak gözlemlenmiştir ve bir teşrih mikroskobunun altında kaydedilmiştir. Bunun yerine, akciğer dokuları normal rengine geri dönene kadar akciğer dokuları iki gün boyunca daha mutlak

etanolda bekletildikten sonra böyle bir gözlemlene gerçekleştirilmiştir. İnokülasyondan 11 gün sonra, farelerin akciğer dokularında %100 bir metastaz oranıyla çok sayıda metastaz ortaya çıkmıştır ve tekli i.p. enjeksiyonunun dozaj rejiminde 5 mg/kg PGAS tedavi grubu, %40.81'e kadar bir önleme oranıyla önemli tümör metastaz önlemesi göstermektedir ve 20 mg/kg PGAS tedavi grubu, %82.20'ye kadar bir önleme oranıyla melanom B₁₆F₁₀ hücrelerinin akciğer metastazında daha önemli bir önleme göstermektedir. Sonuçlar, PGAS'nin melanom B₁₆F₁₀ hücrelerinin akciğer metastazında önemli ölçüde önleyebileceğini göstermektedir (ŞEKİL 5).

10 Buluşu yapan kişi ayrıca, PGAS'nin etki mekanizmasını araştırmıştır

Örnek 6: PGAS ile anjiyogenez önleme testi

15 Taze yumurtalar (Şanghay Shenbao Tavuk Çiftliği'nden alınmıştır), 39°C'de ve %50 nemde (gaz hücresi yukarı gelecek şekilde) bir inkübatör Roll-X bazında (Lyon Electric Company, CA, ABD) yerleştirilmiştir. 7 gün boyunca kesintisiz inkübasyondan sonra, tavuk embriyosunun canlı olup olmadığını belirlemek için yumurtalar aydınlatılmış ve koryoallantoik membranın konumu belirlenip işaretlenmiştir. Yumurtaların hava kesesi ucunda küçük bir delik açılmış ve tavuk embriyosu, yatay bir şekilde yerleştirilmiştir (koryoallantoik membran yukarı gelecek şekilde). Hava kesesi, lastik bir pipetin haznesiyle yavaşça emilmiştir, böylece koryoallantoik membran yırtılmış ve yumurta kabuğundan ayrılmıştır ve bir süre boyunca ayakta kalmaları sağlanmıştır. Sonrasında civciv embriyosunun üzerine 1 cm² bir açığı pencere konumu yapılmıştır ve açığı pencere, temellendirilmiş ve bir makas ile kesilmiştir, toz, yumurta kabuğundan uçmuştur, açığı penceredeki yumurta kabuğu soyulmuştur ve koryoallantoik 25 membran açığına görünür hale gelmiştir. 0,25 x 0,25 x 0,25 (uzunluk x genişlik x yükseklik) cm³ bir boyuta sahip jelatin süngerler, 200, 400, 800 µg/yumurtanın bir nihai konsantrasyonunda ve bir araç kontrolünde 10 µg PGAS ile tedavi edilmiştir ve sonrasında büyük damarların olmadığı koryoallantoik membrandaki alana yavaşça yerleştirilmiştir. Küçük pencere, steril şeffaf bant ile kapatılmış ve yumurtalar, 48 saat daha inkübe edilmiştir. 30 Gözlemek için bant çıkarılmış ve fotoğraflar çekilmiştir (büyütme: 403) ve tabuk embriyo koryoallantoik membranın anjiyogenezinde PGAS'nin önleme etkisi değerlendirilmiştir. PGAS içeren süngerin yanındaki koryoallantoik membranda, damar derinliğinin, önemli ölçüde azaltıldığı bulunmuştur (ŞEKİL 6) ve konsantrasyon bağlı olarak önleme eğilimi gösterilmiştir. Bu, PGAS'nin, anjiyogenez önleme etkisine sahip olduğunu göstermektedir.

Örnek 7: PGAS ile heparanaz aktivite önleme testi

Heparanazın serumsuz böcek ifade sistemi ve afinite kolon saflaştırma sistemi, PCR amplifikasyonu ve gen rekombinasyonu ile insan plasentasından elde edilen insan heparanazın cDNA'sını kullanarak kurulmuştur ve %95 veya daha fazla bir saflığa sahip oldukça aktif heparanaz elde edilmiştir. 150 µl'ye kadar bir tepkime tamponu (50 mM sodyum asetat, pH4.2), 0.5 µg FITC-HS (fluoresin izotiyosiyanat-etiketli heparan sülfat) ve 25 ng/ml bir nihai konsantrasyonda heparanaz ve ayrıca çeşitli konsantrasyonlarda PGAS eklenmiştir ve 3 saat boyunca 37°C'de tepkimeye girmiştir. 100°C'de 5 dakika sonra, pelet çözünmeyen malzemelere 20 dakika boyunca 10000 rpm'de santrifügasyon gerçekleştirilmiştir. Üst faz, bir 0.45 µm filtre membranıyla filtrelenmiştir ve sonrasında 20 µl'lik bir yüklemede, bir tampon 50 mM Tris/150 mM NaCl, pH7.5 ve 0.8 ml/dk bir akış oranı kullanarak TSK jel G3000SWXL kolona enjekte edilmiştir. FITC-HS ürünün flüoresan yoğunluğu, bir flüoresan detektörü (Ex: 485 nm, Em: 538 nm) ile belirlenmiştir. Enzimin görelî aktivitesi, heparanaz aktivitede PGAS'nin etkisini belirlemek için intakt FITC-HS pikinin ön yarığını azaltmasıyla değerlendirilmiştir. PGAS'nin bir 6.55 ng/ml ile doza bağımlı bir şekilde heparanaz aktiviteyi önlediği bulunmuştur ve doz, 40 ng/ml olduğunda aktivite, pozitif kontrol heparininkinden daha iyidir (ŞEKİL 7).

Örnek 8: PGAS ile C-Met enzim aktivite önleme testi

Enzim tepkime alt tabaka Poly (Glu, Tyr), bir mikrotitre plakaya kaplanmıştır uygun konsantrasyonlarda ATP solüsyonu ve poligulonik asit sülfat ve c-Met enzim solüsyonu eklenmiştir ve 37°C 1 saat boyunca tepkime için bir çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. Sonrasında, 5 mg/ml BSA içeren T-PBS seyreltilmiş PY99 antikör çalkalayıcıya eklenmiştir ve 37°C'de 0.5 saat boyunca tepkimeye girmiştir. Ayrıca, yabancurpu peroksidaz-etiketli keçi anti-fare IgG, çalkalayıcıya eklenmiştir ve 37°C'de fazladan bir 0.5 saat boyunca tepkimeye girmiştir. Nihayetinde 2 mg/ml OPD gelişen solüsyon eklenmiştir, 25°C, karanlıkta 1-10 dakika boyunca tepkimeye girmiştir ve tepkimeyi sonlandırmak için 2M H₂SO₄ eklenmiştir. 490 nm'de absorpsiyon, mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür ve enzim aktivite önleme oranı hesaplanmıştır.

$$\text{Önleme oran (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Bileşimin OD değeri} - \text{Enzimsiz kontrol çukurcuğunun OD değeri}}{\text{Negatif kontrol çukurcuğunun OD değeri} - \text{Enzimsiz kontrol çukurcuğunun 3D değeri}} \right) \times 100$$

c-Met'te 10 µg/ml bir konsantrasyonda poligulonik asit sülfatın enzim aktivite önleme oranının %71.1 olduğu bulunmuştur, bu da poligulonik asit sülfatın c-Met enzim aktivitesini önleme etkisine sahip olduğunu göstermektedir.

5

Örnek 9: PGAS ile tubulin polimerizasyon önleme testi

Çeşitli konsantrasyonlarda 10 µl PGAS, bir 96-çukurcuk plağa eklenmiştir ve 37°C'de 10 dakika boyunca önceden hazırlanmış Tubulin liyofilize toz, PEM tampon (10 mM BORULAR, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) artı 1 mM GTP, %5 gliserinde 12 µM bir konsantrasyona seyreltilmiştir. Bu solüsyonun 90 µl'si, 96-çukurcuk plağa eklenmiştir ve bir mikrolaka okuyucu başlatılmıştır. Sıcaklık 37°C'de ayarlanmıştır ve belirleme dalga boyu, 340 nm'de ayarlanmıştır. Düzgünce karıştırılmış ve bir kesintisiz 30 dakika boyunca dakika başına bir defa okunmuştur. Sonuçlar, PGAS'nin, hücresiz sistemde tubulin polimerizasyonunu önemli ölçüde önleyebildiğini göstermektedir ve PGAS'nin konsantrasyonu 2.5 µM'den 40 µM'ye arttıkça önleme oranı bir 8.58 µM IC₅₀ ile doz bağımlı olan %18.26'dan %73.44'e artmıştır.

15

Örnek 10: PGAS ile aktin depolimerizasyon önleme

20

Pirenil-etiketli aktin, agregasyon tamponuna (100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.5) eklenmiştir ve telciklere toplanması için 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında aktin depolimerizasyon tamponu (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, pH 8.0) ve depolimerize olmasını amaçlayarak farklı konsantrasyonları PGAS'si seyrelme için eklenmiştir. Bir flüoresan mikrolaka okuyucu, 360 nm bir emisyon dalga boyunda ve 410 nm bir absorpsiyon dalga boyunda ve 37°C bir sıcaklıkta ayarlanmıştır. Düzgün bir şekilde karıştırılmış ve kesintisiz 30 dakika boyunca dakika başına bir defa okunmuştur. Sonuçlar, PGAS'nin, hücresiz sistemdeki aktin depolimerizasyon prosesini önemli ölçüde önleyebildiğini ve doza bağımlı (IC₅₀, 10.6 µM'dir) sergilediğini göstermektedir. (ŞEKİL 9).

30

Örnek 11: Kofilinin aktin depolimerize etme/yapıma aktivitesinde PGAS'nin önlenmesi

35 Poligulonik asit sülfat, poligulonik asit sülfatın bir afinite kromatografi kolonunu hazırlamak

için Sepharose CL-4B ile birleştirilmiştir. Bu kromatografi kolonunu kullanarak, akciğer kanseri hücre hattı A549'daki poligulonik asit sülfatın bağlayıcı proteinleri çıkarılmış ve ayrılmıştır. Kütle spektrometrik tanımlama ile, kofilinin, poligulonik asit sülfata güçlü bir şekilde bağlanan proteinlerden biri olduğu bulunmuştur. Diğer çalışmalar, poligulonik asit sülfatın, kofilinin aktin depolimerize etme/yapıma aktivitesini önemli ölçüde önleyebildiğini göstermektedir (ŞEKİL 10). Bu, poligulonik asit sülfatın, kofilinin aktin depolimerize etme/yapıma aktivitesini önlemek için kofiline bağlanabildiğini ve böylece tümör hücrelerinin hücre göçünü engelleme işlevi gösterdiğini belirtmektedir.

10 Örnek 12: PGAS'nin şeker bileşenlerinin aktivite belirlenmesi

Yapılan 3'te hazırlanan PGAS şeker bileşenlerinin anti-tümör aktivitesi test edilmiştir. PGAS'nin 15 mg/kg'den daha az bir intravenöz enjeksiyon dozunda dodekasakkarit bileşenlerin (genel formül (I)'de n, 2-10 olanlara karşılık gelen) tetrasakkarit'inin, çökek farelerde insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenograftların büyümesinde %30 veya daha az bir T/C değere sahip olduğu ve bunun akciğer metastazında %95 veya daha fazla bir önleme oranına sahip olduğu; 10 mg/kg'den daha az bir dozda dodekasakkarit bileşenlerin (genel formül (I)'de n=4-8) heksasakkarit'inin, çökek farelerde insan meme kanseri MDA-MB-435 ortotopik ksenograftların büyümesinde %30 veya daha az bir T/C değere sahip olduğu ve bunun akciğer metastazında %95 veya daha fazla bir önleme oranına sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, sülfür içeriği, ağırlık cinsinden %7-15 olduğunda daha iyidir ve ağırlık cinsinden %9-13 olduğunda en iyidir.

25 Örnek 13: PGAS'nin şeker bileşenlerinin tümör metastaz önleyici aktivitesinin belirlenmesi

Tümör metastazda Örnek 3'te ayrılan farklı PGAS şeker bileşenlerinin etkisi, Transwell hücre tahlili ile belirlenmiştir. Tripsin, üstel büyüme aşamasında in vitro kültürlenmiş geçiş olan meme kanseri MDA-MB-435 hücrelerini parçalamak için kullanılmaktadır. Bunu, üç defa serumsuz kültür ile yıkanması ve 2×10^6 /ml'ye seyreltilmesi izlenmektedir. 100 µl hücre seyrelmesi, Transwell hücrelerindeki çukurcukların üst haznelere eklenmiştir ve %10 FBS içeren kültürden 600 l, alt haznelere eklenmiştir ve 100 µl/ml farklı PGAS bileşenleri, hem üst hem alt haznelere eklenmiştir. Hücreler, 37°C'de 12 saat boyunca bir %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir, kültür ortamı çıkarılmış ve hücreler, 30 dakika boyunca bir %90 etanol solüsyonda sabitlenmiştir. Hücreler, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca %0.1

kristal mor solüsyon (0.1 M borik asit, %0.1 (ağırlık/hacim) kristal mor, %2 etanol) ile boyanmıştır. Berrak su ile durulanmıştır ve üst tabakadaki göç etmeyen hücreleri kaldırmak için pamuklu çubuk ile silinmiştir. Hücreler gözlemlenmiş, fotoğraflanmış ve bir mikroskop altında kaydedilmiştir. Nihayetinde çözüme, 100 µl/çukurcukta 10 dakika boyunca %10 asetik asit solüsyon ile gerçekleştirilmiştir, OD değerleri, 595 nm’de belirlenmiştir ve meme kanseri hücrelerindeki farklı şeker bileşenlerinin göç önleme oranları hesaplanmıştır.

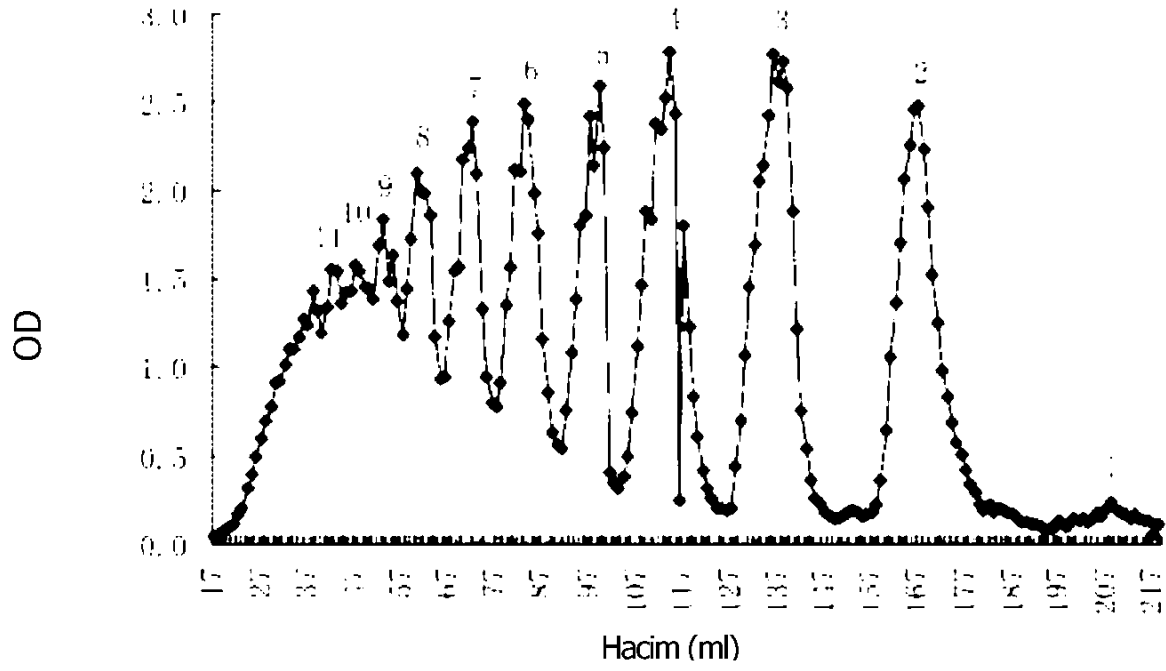
$$\text{Göç Önleme Oranı} = \left(\frac{OD}{OD_{\text{kontrol}}} - (1 - OD_{\text{tedavi}}) \right) \times 100\%$$

- 10 Kontrol grubundaki MDA-MB-435 hücrelerinin, FBS’nin konsantrasyon gradyanı boyunca 12 saat içinde üstten alt haznelere serbest bir şekilde göç edebildiği bulunmuştur. Kristal mor boyamanın fotoğrafik sonuçlarından, tetrasakkaritten (genel formül I’de, n=2) undekasakkarite (genel formül I’de, n=9) ve daha büyük polisakkaritlere değişiklik gösteren farklı PGAS şeker bileşenlerinin, tümör hücre göçünü önemli ölçüde önleyebilirken disakkarit
- 15 bileşeninin (genel formül I’de, n=0) ve trisakkarit bileşeninin (genel formül I’de, n=1) daha düşük önleme oranlarına sahip olduğu bulunmuştur (ŞEKİL 11), bu da çeşitli PGAS bileşenlerinin (özellikle de tetrasakkaritten undesakkarite ve daha büyük polibileşenlere) tümör hücrelerinin metastaz önleme etkisine sahip olduğunu göstermektedir.

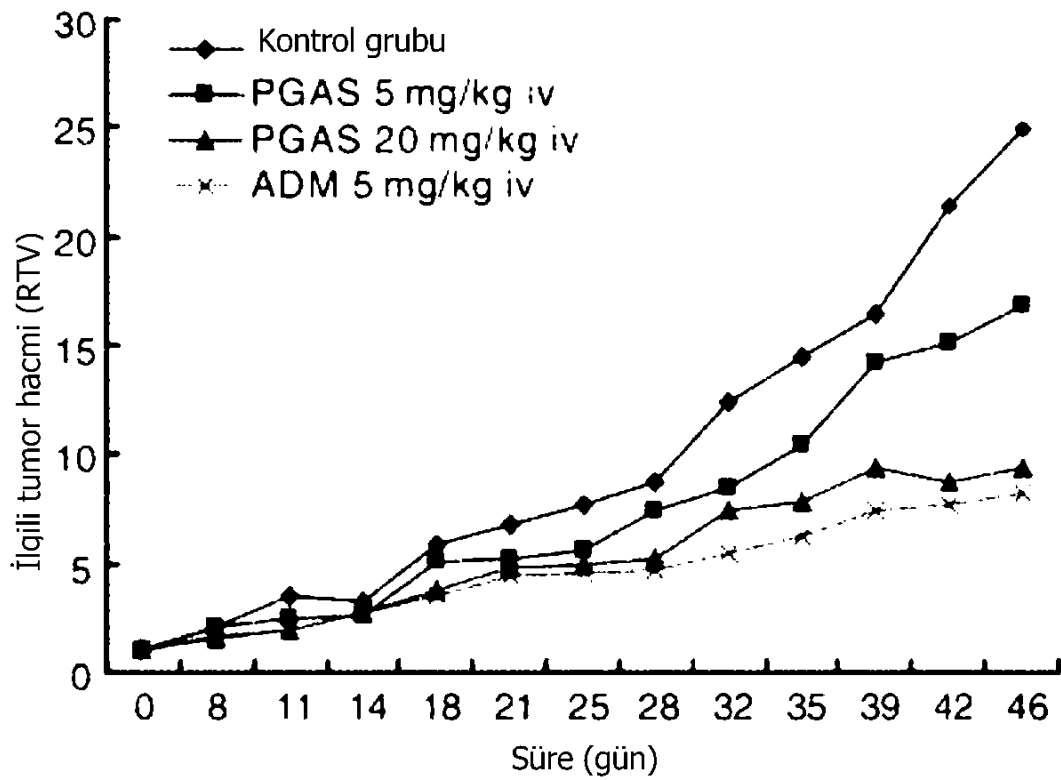
20 İstatistik işleme

Yukarıdaki veriler, Startview yazılımı ile istatistiksel analize tabi tutulmuştur, sonuçlar, “Ortalama değerler ± SE” olarak ifade edilmiştir ve karşılaştırma için ANOVA kullanılmıştır.

- 25 Yukarıdaki farmakolojik sonuçlara göre, mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatının etkili bir miktarın bir farmasötik taşıyıcı ile karşılaştırarak klasik formülasyon yöntemlerini kullanarak bir farmasötik bileşim hazırlanabilmektedir. Farmasötik bileşim, tümör tedavi ilaçları ve tümör metastaz tedavi ilaçları olarak kullanılabilir ve ayrıca anjiyogenez inhibitörleri, heparanaz inhibitörleri, C-Met enzimi inhibitörleri, mikrotübül polimerizasyon inhibitörleri,
- 30 aktin-depolimerizasyon inhibitörleri olarak kullanılabilir. Tümörlerin tedavisi ve tümör metastazı için bir ilacın preparasyonunda mevcut buluşun bir poligulonik asit sülfatının kullanılması oldukça önemlidir.



ŞEKİL 1



ŞEKİL 2

A

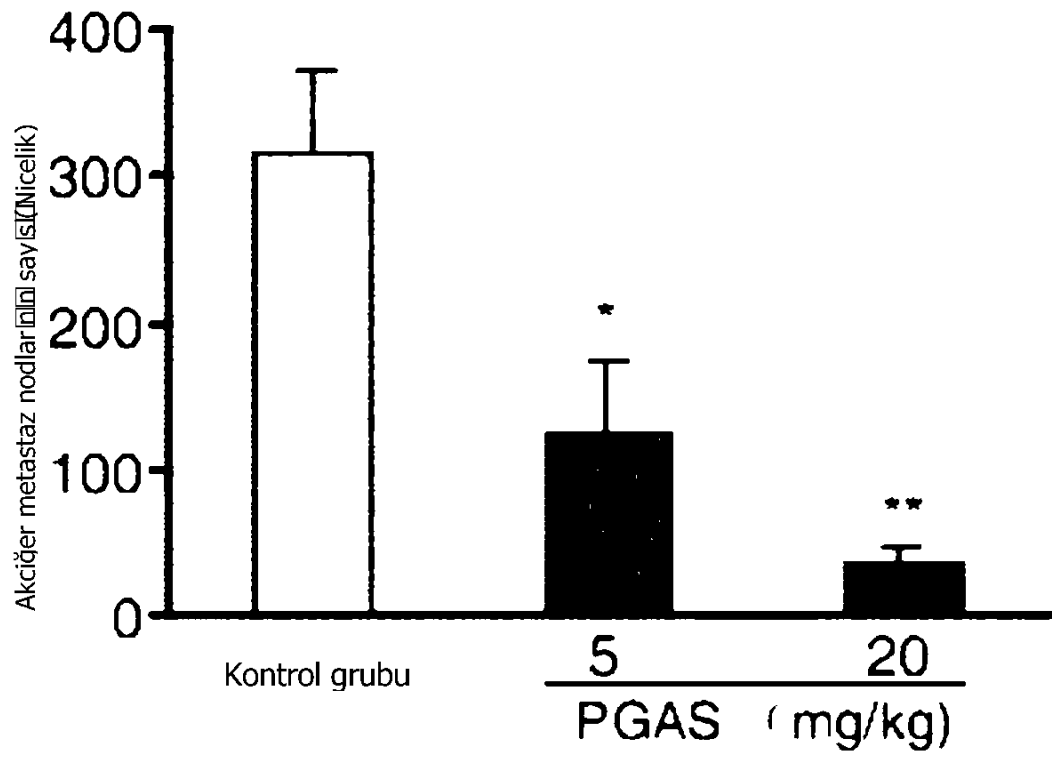


Kontrol grubu

Model grubu

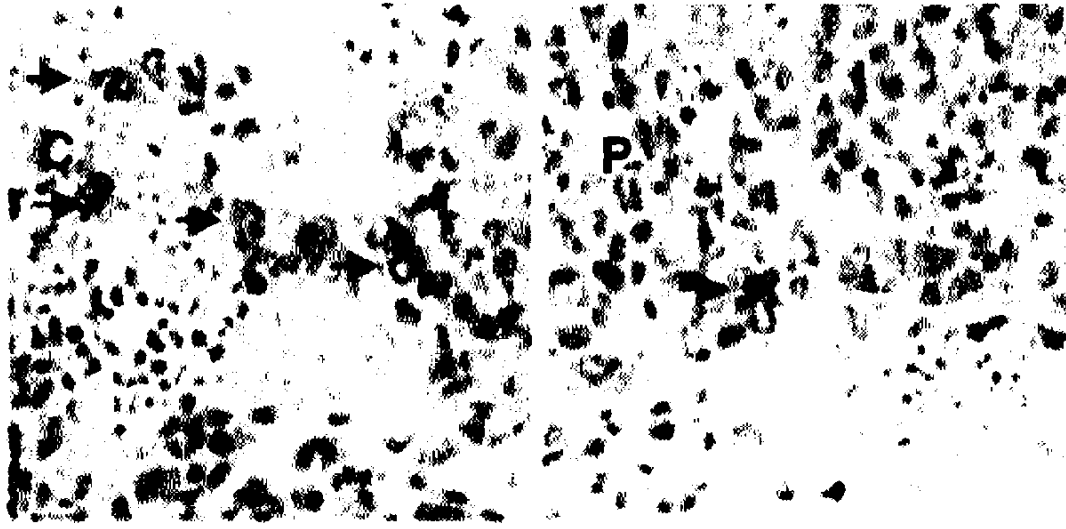
PGAS 20 mg/kg

B



ŞEKİL 3

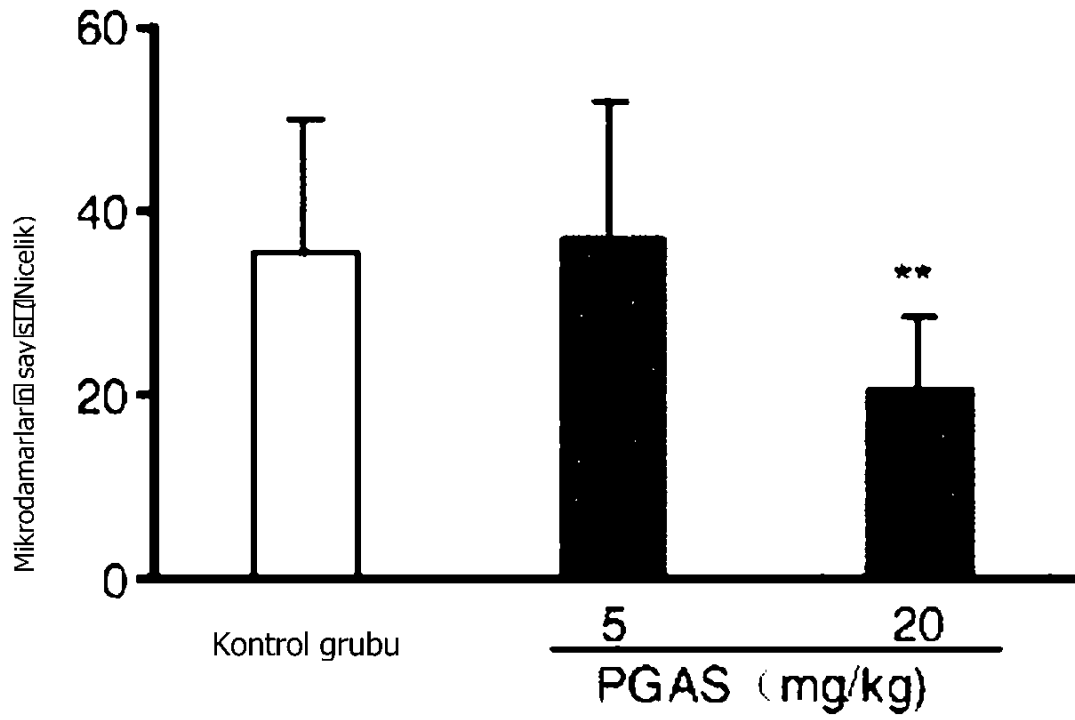
A



Kontrol grubu

PGAS 20 mo/kg

B



ŞEKİL 4

A

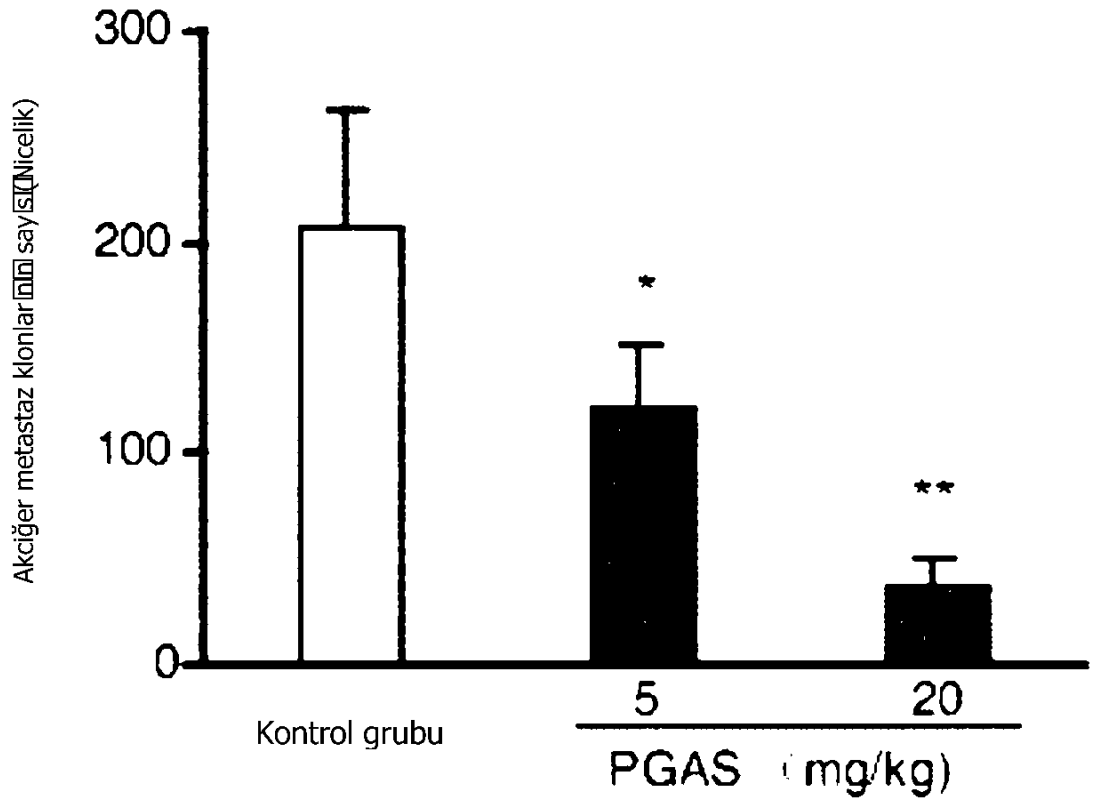


Kontrol grubu

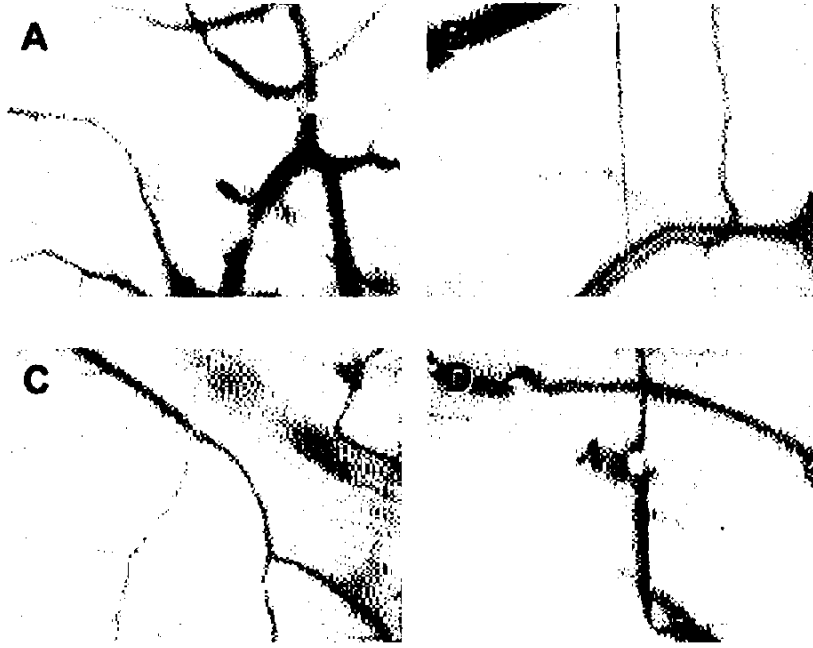


PGAS 20 mg/kg

B

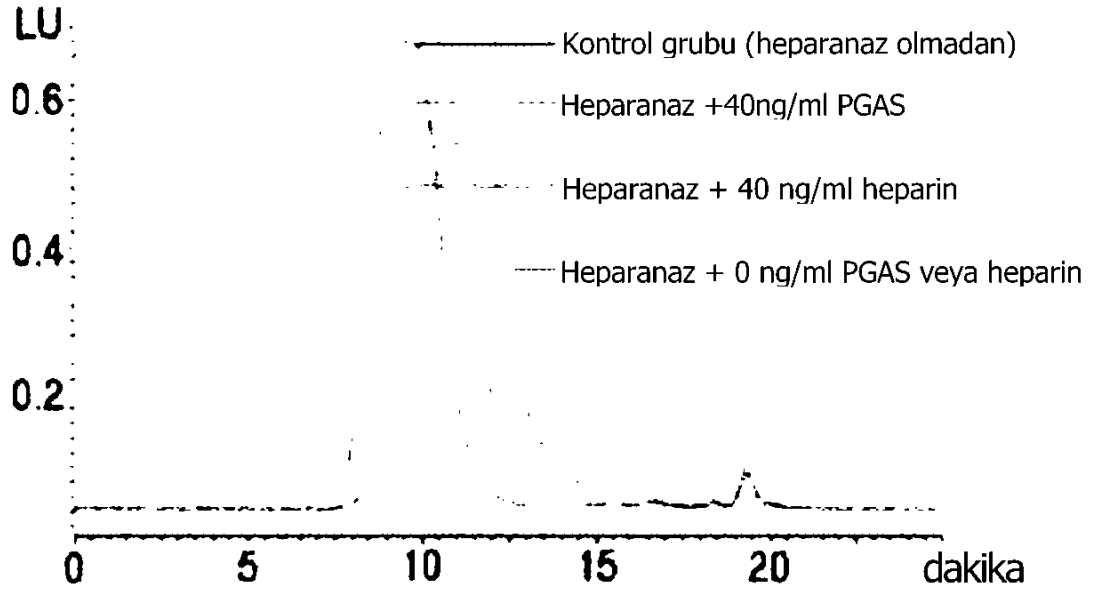


ŞEKİL 5

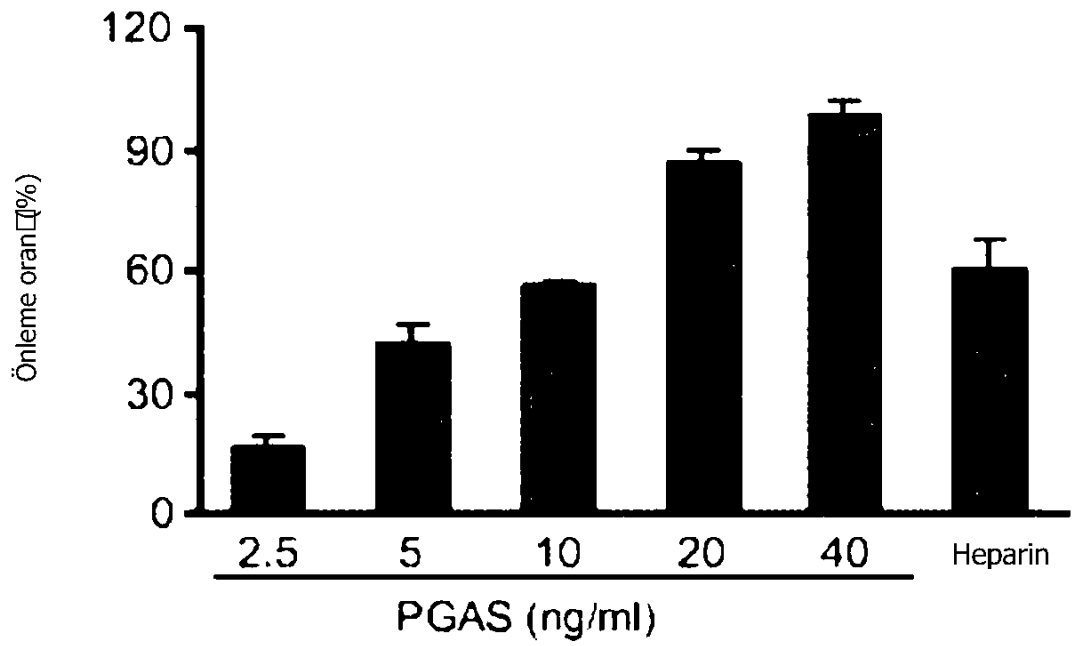


ŞEKİL 6

A

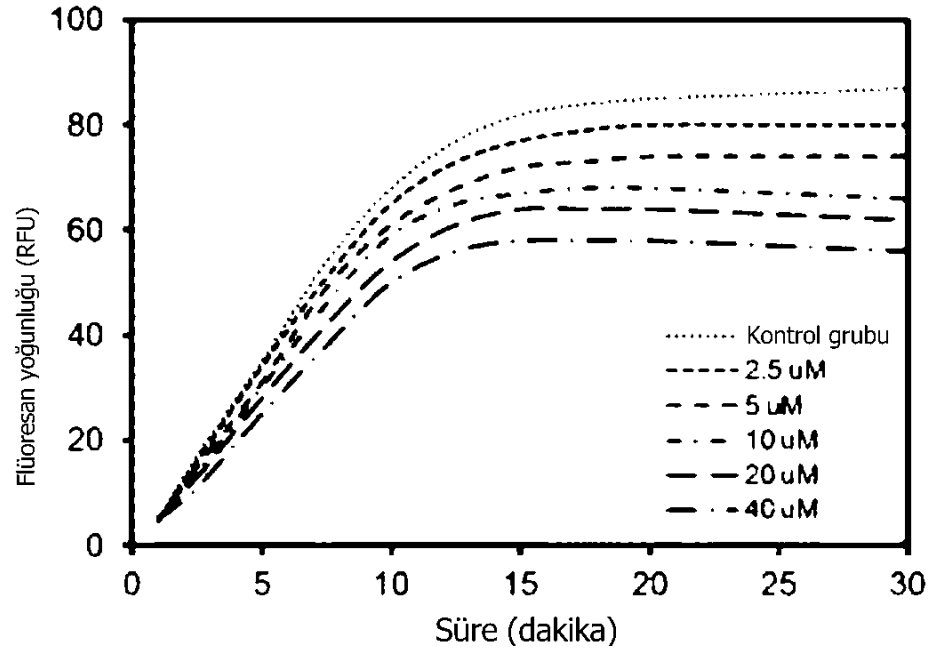


B

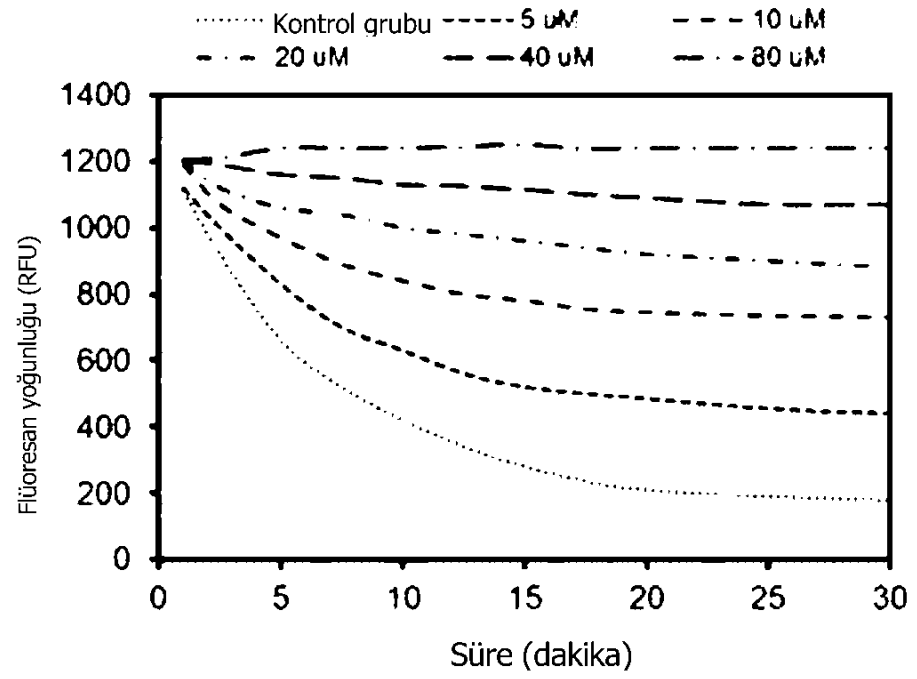


ŞEKİL 7

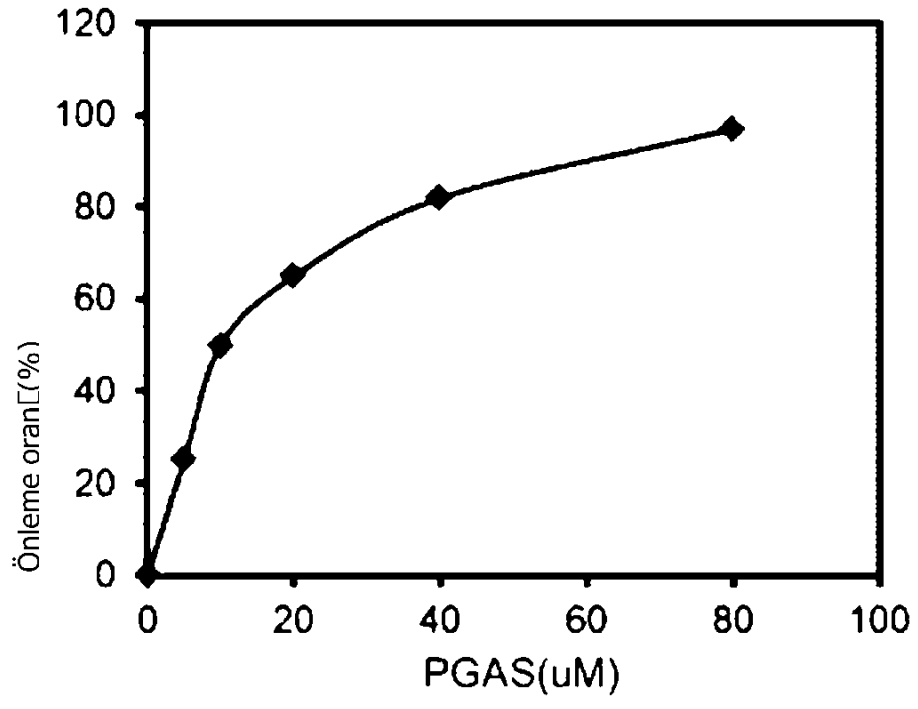
A



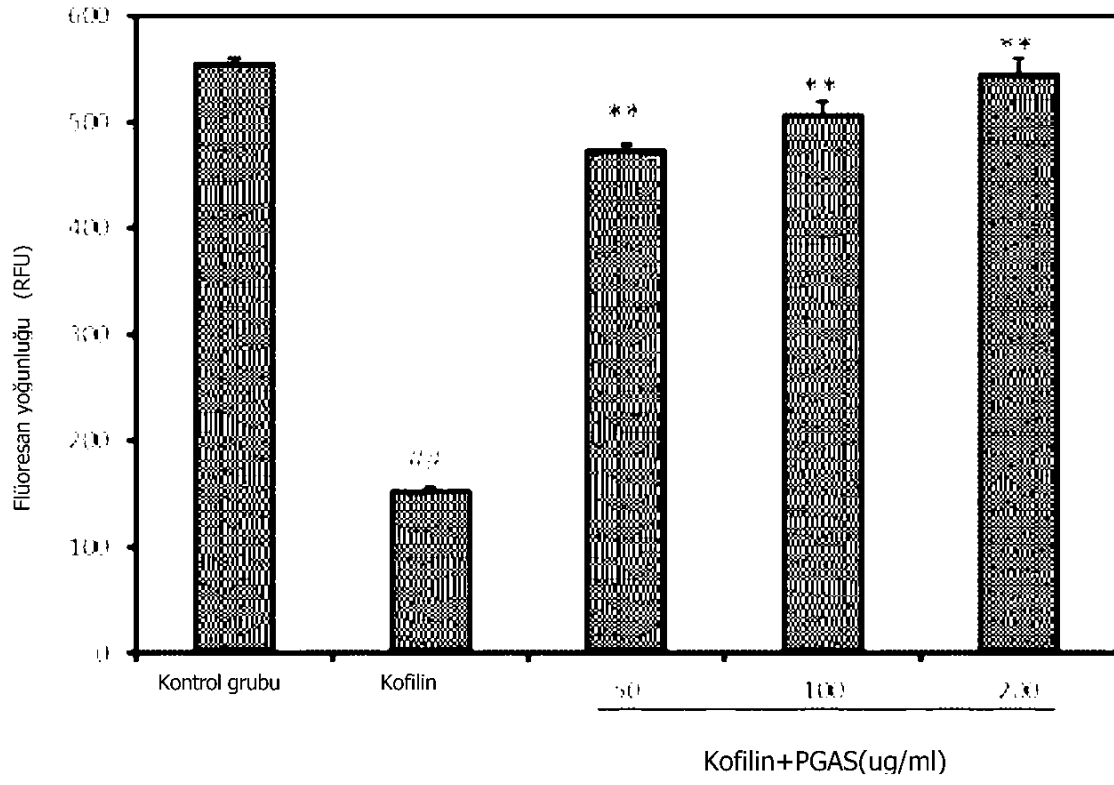
B



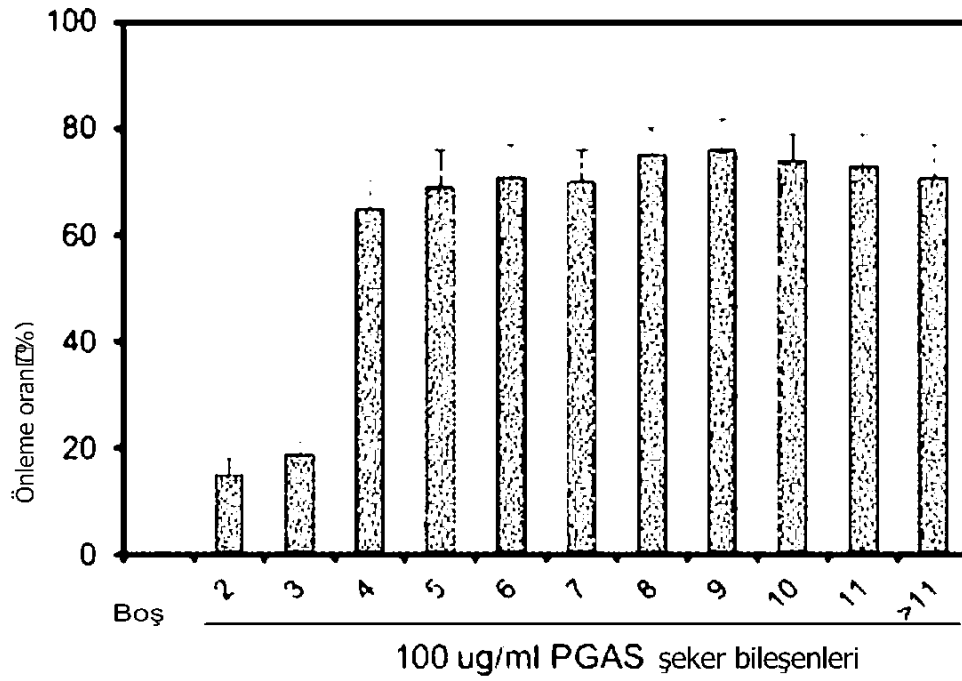
ŞEKİL 8



ŞEKİL 9



ŞEKİL 10



ŞEKİL 11