

ÖZET

HÜCRE TERAPİSİ

- 5 Dekstran sülfat, intravenöz olarak enjekte edilen hücrelerin pulmoner alımını azaltmak için kullanılır. Dekstran sülfat, intravenöz olarak enjekte edilen hücrelerin pulmoner alımını, intraarteriyal hücre enjeksiyonu kullanmanın bunlara eşlik eden riskleri ve yan etkileri olmaksızın hücrelerin intraarteriyal
- 10 enjeksiyonu için elde edilen seviyelere indirgeyebilme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle dekstran sülfat, bir denekte metastatik kanseri tedavi etmek için tümöre infiltre eden T-lenfositlerle birlikte bir bileşimde kullanılabilir.

İSTEMLER

1. Dekstran sülfat veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu **olup, özelliği**; bir denekte intravenöz olarak enjekte edilen hücrelerin pulmoner alımının neden olduğu advers solunum yolu etkilerinin riskini azaltmada kullanıma yönelik olmasıdır.
2. İstem 1'e göre kullanıma yönelik olarak dekstran sülfat veya bunun söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu **olup, özelliği**; burada söz konusu enjekte edilen hücrelerin, enjekte edilen otolog hücreler ve enjekte edilen allojenik hücrelerden seçilmesidir.
3. İstem 1 veya 2'ye göre kullanıma yönelik olarak dekstran sülfat veya bunun söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu **olup, özelliği**; burada söz konusu enjekte edilen hücrelerin hematopoetik kök hücreler veya mezenkimal kök hücreler gibi kök hücrelerden; T-hücreleri, T-lenfositleri, Nk hücreleri, B-hücreleri, antijen düzenleyici hücreler ve antijen sunucu hücreler gibi bağışıklık düzenleyici hücrelerden; ve kemik iliği hücrelerinden oluşan gruptan seçilmesidir.
4. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik olarak dekstran sülfat veya bunun söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu **olup, özelliği**; burada söz konusu deneğin bir insan denek olmasıdır.
5. İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik olarak dekstran sülfat veya bunun söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu **olup, özelliği**; burada söz konusu dekstran sülfat veya bunun söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzunun, 8000 Da, 7000 Da, 6000 Da ya da 5000 Da gibi 20000 Da'nın altında, tercihen 10000 Da'nın altında bir ortalama moleküler ağırlığa sahip olmasıdır.
6. İstemler 1 ila 5'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik olarak dekstran sülfat veya bunun söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu **olup, özelliği**; burada söz konusu dekstran sülfat veya bunun söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir

tuzunun ortalama %10 ila %25, tercihen %15 ila %20 arasında, örneğin yaklaşık %17'lik bir kükürt içeriğine sahip olmasıdır.

7. İstemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre kullanıma yönelik olarak dekstran sülfat veya bunun söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu **olup, özelliği**; burada söz konusu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzunun, dekstran sülfatın bir potasyum tuzu olmasıdır.

8. Metastatik kanserin tedavisinde kullanıma yönelik olarak dekstran sülfat veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir akışkan veya sıvı taşıyıcıda sağlanan, tümöre infiltre eden T-lenfositleri içeren intravenöz bir enjeksiyon bileşimi **olup, özelliği**; burada söz konusu intravenöz enjeksiyon bileşiminin intravenöz olarak enjekte edilir olmasıdır.

TARİFNAME

HÜCRE TERAPİSİ

5 BULUŞUN TEKNİK ALANI

Bu buluş genel olarak hücrelerin uygulanması ve akciğerlere intravenöz olarak enjekte edilen hücrelerin istenmeyen alımını önleme teknikleri ile ilgilidir.

10 ÖNCEKİ TEKNİK

Metastatik kanser için adoptif immünoterapi, tümör taşıyan konakçı üzerinde bir anti-tümör etkisine aracılık edebilen immün hücrelerin otolog veya allojenik aktarımı anlamına gelir. Tümöre infiltre eden T-lenfositleri (TIL'ler) tümör dokusundan izole edilir ve ex vivo olarak karakterize edilir ve genişletilir ve kanser hastalarına tekrar aşılanır. Aktarılan hücrelerin in vivo etkilerini arttırmak için büyüme faktörleri ile birlikte bir lenfotüketim rejiminden sonra 10^9 kadar aktive edilmiş hücre infüze edilir. İleri derecede metastatik melanoma sahip olan ve diğer tedavilere dirençli olanların hastaların %50'si, lezyon büyüklüğünün radyolojik ölçümlerine dayanan Solid Tümörlerde Yanıt Değerlendirme Kriterleri'ne (RECIST) göre objektif bir yanıt sergilemiştir.

Hücre taşınımı ve aktarılan hücrelerin in vivo olarak dağıtımının değerlendirilmesindeki zorluk, adoptif terapideki en büyük kaygılardan biridir. Radyoizotop hücre etiketleme, hücrelerin in vivo dağılımlarını incelemek için kullanılan en yaygın yöntemdir. ^{18}F -2-floro-2-deoksi-D-glükoz (^{18}F FDG), Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) [3] ile hücrelerin ve dokuların in vivo görüntülenmesine olanak sağlayan çeşitli hücrelerde glükoz metabolizmasının bir parametresi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kan bileşenlerinin etiketleme çalışmaları, eritrositlerin ve lökositlerin birkaç saat boyunca ^{18}F FDG'yi içerdiğini ve sürdürdüğünü göstermektedir.

Molecular Immunology (2010) 47: 2349-2358, düşük moleküler ağırlıklı dekstran sülfatın, insan monosit türevli dendritik hücrelerin TLR4 uyarımlı olgunlaşmasını inhibe ettiğini, NK hücre aktivasyon markörlerinin yukarı regülasyonunu önlediğini ve NK hücre degranülasyonunu ve IFN- γ salgılanmasını doza bağılı olarak iptal ettiğini açıklar. Düşük moleküler ağırlıklı dekstran sülfatın, NK hücrelerinin doğrudan ve dolaylı TLR aracılı aktivasyonunu inhibe etmek için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

10

BULUŞUN ÖZETİ

Mevcut uygulamalar genel olarak hücrelerin uygulanması ve akciğerlere intravenöz olarak enjekte edilen hücrelerin istenmeyen alımını önleme teknikleri ile ilgilidir.

15 Buluş, istem 1'de tanımlandığı gibi kullanım için dekstran sülfat ve istem 8'de tanımlandığı gibi kullanım için bir intravenöz enjeksiyon bileşimi ile ilgilidir. Buluşun diğer uygulamaları bağımlı istemlerde tanımlanmaktadır.

Tümöre infiltre eden T-lenfositlerinin otolog veya allojenik aktarımı, metastatik kanserler için ümit verici bir tedavidir, ancak en büyük kaygı, adoptif hücre terapisindeki hücre taşınımı ve dağılımının değerlendirilmesindeki zorluktur. Bu belge, bir domuz modelinde, [^{18}F] FDG ve Pozitron Emisyon Tomografisi vasıtasıyla T-lenfoblastların transfüzyonunun izlenmesine yönelik bir yöntem sunar.

20 T-lenfoblastlar, inkübasyon yoluyla pozitron yayan izleyici [^{18}F] FDG ile etiketlenmiştir. T-lenfoblastlar kan dolaşımına verilmiş ve dağılımı 120 dakika boyunca Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) ile takip edilmiştir. Hücreler intravenöz olarak iç juguler vene (n=5) veya intraarteriyel olarak çıkan aorta (n=1) uygulanmıştır. İntravenöz uygulama verilen domuzlardan ikisi dekstran sülfat ile ön işleme tabi tutulmuştur.

30 Hücresel kinetik ve dağılım, 120 dakikaya kadar kolaylıkla ölçülebilirdi. İntravenöz transfüzyon tamamlandıktan sonra yüksek (uygulanan hücrelerin %78,6'sı) heterojen pulmoner alım

bulunmuştur. Pulmoner alım, T-lenfoblastları dekstran sülfat ile önceden inkübe ederek ve birlikte uygulayarak veya bunları intraarteriyel olarak uygulayarak azalmıştır.

Uygulamaların yönleri, farmasötik olarak kabul edilebilir bir akışkan veya sıvı taşıyıcı içinde sağlanan dekstran sülfatı ve tümöre infiltre eden T-lenfositleri içeren bir bileşimle ilgilidir. Bu bileşim bir denekte metastatik kanseri tedavi etmede yararlıdır.

Mevcut çalışma, [18F] FDG etiketli T-lenfoblastların uygulanmasından sonra hücre taşınımı ve dağılımının kantitatif olarak izlenmesinin ve değerlendirilmesinin uygulanabilirliğini göstermektedir. Protokol potansiyel olarak, birkaç değişiklikle beraber klinik ortama aktarılabilir.

15 ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, buluşun başka amaçları ve avantajlarıyla birlikte, yer verilen çizimlerle birlikte yapılan aşağıdaki açıklamalar referans alınarak anlaşılabilir, bu doğrultuda;

Şekil 1, intravenöz uygulamadan 30 dakika sonra [18F] FDG etiketli T-lenfoblastların akciğer dağılımını göstermektedir. Soldan sağa: koronal, sagittal ve transaksiyel görünüm. Renk, 0-106 hücre/cc arasında değişen hücre yoğunluğunu belirtir.

Şekil 2, uygulama modları arasında değişen akciğer alım kinetiklerini (uygulanan T-lenfoblastların yüzdesi olarak) göstermektedir. Başlangıç alımı, T-lenfoblastlar, intraarteriyel (n=1) veya intravenöz olarak düşük moleküler ağırlıklı dekstran sülfat (LMW-DS) (n=2) ile birlikte uygulandığında, intravenöz uygulama sonrasına (n=3) göre daha düşüktü. Değerler, ortalamalar $\pm$ OSH olarak verilmiştir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Mevcut uygulamalar genel olarak, dekstran sülfatın (DS), pulmoner alımı ve intravenöz olarak uygulanan hücrelerin

birikimini inhibe etmek veya en azından azaltmak için kullanmasıyla ilgilidir.

Hücre terapisi, insan ve hayvan, tercihen memeli vücudunda çok farklı tıbbi tedavi alanlarında uygulama bulabilir. Örneğin, T-lenfositlerin veya diğer bağışıklık düzenleyici hücrelerin uygulandığı hücre terapisi, metastatik kanserler için umut verici bir tedavidir. Bu tür hücreler genellikle intravenöz veya intraarteriyel olarak uygulanabilir. Bununla birlikte, intraarteriyel hücre enjeksiyonları, genel olarak, ağır kanama riski ve buna eşlik eden komplikasyonlar ile birlikte atardamarın zarar görme riski nedeniyle tercih edilmez. Bu nedenle, genellikle hücrelerin intravenöz enjeksiyonu tercih edilir. Bununla birlikte ve burada gösterildiği üzere, hücrelerin intravenöz enjeksiyonu tipik olarak yüksek bir pulmoner alıma ve enjekte edilen hücrelerin akciğerlerde birikmesine neden olur. Bu, hücreler akciğerlere gönderilmiş olmadıkça, çoğu zaman avantajlı değildir. Bu nedenle, intravenöz olarak enjekte edilen hücrelerin büyük bir kısmı, tipik olarak yaklaşık %80'i akciğerlere alınacaktır ve bu nedenle hücrelerin istenen terapötik etkisine katkıda bulunmaz.

Buluş sahipleri şaşırtıcı bir şekilde dekstran sülfatın, hücrelerin intravenöz enjeksiyonu ile bağlantılı olarak bu pulmoner alımı azaltmak için kullanılabileceğini keşfetmişlerdir. Dekstran sülfat ile tedavi, gerçekten de pulmoner alımı, intraarteriyel enjeksiyonlarla bağlantılı olarak ortaya çıkan ancak intraarteriyel enjeksiyonlarla ilişkili sağlık riski taşımayan seviyelere indirecektir.

Mevcut uygulamalar, köken ve hücre tipinden bağımsız olarak herhangi bir intravenöz hücre enjeksiyonu ile bağlantılı olarak kullanılabilir. Dolayısıyla uygulamalar, hücrelerin hem otolog, hem de allojenik veya ksenojenik enjeksiyonu ile bağlantılı olarak kullanılabilir, ancak özellikle hücrelerin otolog veya allojenik intravenöz enjeksiyonu için uygundur.

Enjekte edilebilecek ve mevcut uygulamaların uygulanabileceği sınırlayıcı olmayan hücre tipi örnekleri, hematopoetik kök

hücreler, mezenkimal kök hücreler, bağışıklık düzenleyici hücreler ve özellikle dalaktan izole edilen bağışıklık düzenleyici hücreler gibi kök hücreleri içerir. Bu bağışıklık düzenleyici hücreler, T-lenfositler, Nk hücreleri, B hücreleri, antijen düzenleyici hücreler, antijen sunucu hücreler vb. gibi T-hücrelerini, kemik iliği hücrelerini içerir. Diğer örnekler arasında hepatositler, lenfositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi karaciğer hücreleri bulunur. Ayrıca modifiye edilmiş hücreler ve özellikle de geni modifiye edilmiş hücreler ve geni modifiye edilmiş kök hücreler bu buluştan faydalanabilir. Bu tür modifiye edilmiş hücreler bu durumda, bir hastada, geni modifiye edilmiş hücreler tarafından eksprese edilecek bir hedef proteini kodlayan en az bir dahil edilmiş gene sahiptir. Hücre tipinin bir başka varyantı, terapötik moleküllerin, partiküllerin, bileşiklerin, virüslerin, vb. bağlandığı hücrelerdir. Bu bağlı moleküller, partiküller, bileşikler, virüsler, vb. daha sonra hasta vücudunda terapötik fonksiyon gibi amaçlanan bir fonksiyonu yerine getirebilir. Uygulamalar gerçekten de, bir insan veya hayvan vücuduna intravenöz enjeksiyon yoluyla verilmesi istenen herhangi bir hücre tipi ile bağlantılı olarak kullanılabilir. Genel olarak, hücrelerin boyutu, yani hücre yüzeyindeki herhangi bir ek de dahil olmak üzere hücre çapı büyüdükçe, akciğerler tarafından hücrelerin daha büyük miktarları alınacaktır. Dolayısıyla mevcut uygulamalar, bu tür daha büyük hücre tipleriyle kullanım için özellikle uygundur. Hücreler genel olarak bir akışkan veya sıvı araç içine, yani bir enjeksiyon çözeltisine enjekte edilir. Bilinen ve canlı hücreler ile birlikte kullanılabilecek bu tür enjeksiyon çözeltilerini kullanmış olan önceki tekniklerden herhangi biri, uygulamalara göre kullanılabilir. Kullanılabilecek bilinen enjeksiyon çözeltileri örnekleri arasında fizyolojik salin (NaCl (sulu)), fosfat tamponlu salin (PBS) veya bir sitrik asit tamponu, vs. gibi tampon çözeltiler yer alır. Örneğin, uygulamaların dekstran sülfatı, %0,9 NaCl salin gibi salin içerisinde çözünebilir ve

daha sonra 75 mM sitrik asit ile tamponlanır ve pH'ı, sodyum hidroksit kullanarak yaklaşık 5,9'a ayarlar.

Memelilerin ve özellikle insanların terapötik tedavisinde, dekstran sülfat ve bunun tuzları tek başlarına uygulanabilir,

5 ancak genel olarak, amaçlanan uygulama yoluna ve standart farmasötik uygulamaya göre seçilebilecek olan, farmasötik olarak kabul edilebilir bir adjuvan, seyreltici veya taşıyıcı ile karışım halinde farmasötik bir formülasyon olarak uygulanacaktır. Yukarıda belirtildiği üzere, dekstran sülfat
10 avantajlı bir şekilde enjeksiyondan önce, hücrelerle dolu enjeksiyon çözeltilerine eklenir ve dolayısıyla hücrelerle birlikte uygulanır. Böyle bir durumda dekstran sülfat, gerçek enjeksiyon durumundan evvel önceden karıştırılacak ve hücrelerle birlikte inkübe edilecektir.

15 Dekstran sülfat, çeşitli uygulamalara göre uygulanabilir. Halen tercih edilen bir uygulamada, dekstran sülfat, enjeksiyon çözeltilisine hücrelerle birlikte ilave edilir, böylece hücreler dekstran sülfat ile birlikte intravenöz olarak uygulanır. Alternatif bir yaklaşımda, hücreler, hücreler için kullanılmış
20 olan ile aynı enjeksiyon çözeltisi gibi uygun bir çözelti içinde çözülmüş dekstran sülfatın bir intravenöz enjeksiyonundan ayrı olarak intravenöz olarak enjekte edilir. Dekstran sülfat daha sonra avantajlı bir şekilde hücrelerle aynı bölgeye ve tercihen intravenöz enjeksiyondan hemen önce ve/veya hemen sonra enjekte
25 edilir.

Ek olarak veya alternatif olarak, dekstran sülfat belirli bir süre içinde, hücre enjeksiyonu ile aynı zamanda, hücre enjeksiyonundan kısa bir süre sonra veya hatta hücre enjeksiyonundan bir saat veya birkaç saate kadar bir süre önce,
30 sürekli bir infüzyon formunda uygulanabilir. İnfüzyon, hücre enjeksiyonunu takiben örneğin on dakikadan 10 saate kadar, tipik olarak 20 dakikadan 5 saate kadar veya daha da kısa sürebilir. Sürekli bir infüzyon kullanmak yerine dekstran sülfat, hücre enjeksiyonundan önce ya da aynı zamandan başlayarak ve daha sonra
35 hücre enjeksiyonundan birkaç saat sonraya kadar münferit

dekstran sülfat uygulamalarına devam ederek birden fazla ayrı zaman noktalarında uygulanabilir.

Dekstran ve hücrelerin birlikte uygulanması, dekstran sülfat ve hücrelerin intravenöz birlikte enjeksiyonundan önce ve/veya sonra dekstran sülfat uygulaması ile tamamlanabilir veya dekstran sülfatın yukarıda açıklandığı gibi bir infüzyonu ile tamamlanabilir.

Dekstran sülfat ve bunun tuzları, etken bileşeni farmasötik olarak kabul edilebilir bir dozaj formunda içeren farmasötik bir terkip şeklinde oral, intravenöz, intraperitonal, subkütan, bukkal, rektal, dermal, nazal, trakeal, bronşal, topikal, herhangi başka bir parenteral yoldan veya inhalasyon yoluyla uygulanabilir.

Tercih edilen uygulama protokolleri, intravenöz enjeksiyonları ve daha uzun infüzyonları içerir.

Uygulamalara göre kullanılan dekstran sülfat veya bunun tuzları, örneğin birkaç yüz veya bin Dalton (Da) gibi düşük moleküler ağırlıklı dekstran sülfattan (LMW-DS), genellikle 500000 Da'nın üzerinde ortalama bir moleküler ağırlığa, örneğin > 1000000 Da

moleküler ağırlığa sahip yüksek moleküler ağırlıklı dekstran sülfata (HMW-DS) kadar bir moleküler ağırlığa sahip olabilir.

Dekstran sülfatın avantajlı etkisi, LMW-DS için özellikle belirgindir. LMW-DS genel olarak 20000 Da'nın altında, örneğin 10000 Da'nın altında ve örneğin yaklaşık 8000 Da, 7000 Da, 6000

Da veya tercihen yaklaşık 5000 Da gibi bir ortalama moleküler ağırlığa sahiptir. LMW-DS için ortalama kükürt içeriği, glukosil kalıntısı başına yaklaşık 2 sülfat grubuna karşılık gelecek şekilde yaklaşık %10 ila %25, örneğin %15 ila %20, örneğin yaklaşık %17 olabilir. Ortalama molekül ağırlığı 20000 Da'dan

daha yüksek olan dekstran sülfat için daha büyük bir kükürt içeriği kullanılabilir. Teknikte uzman kişi tarafından, dekstran sülfat için olan bir moleküler ağırlığın, ortalama bir ağırlık olduğu iyi bilinmektedir. Bu, münferit dekstran sülfat moleküllerinin ağırlıklarının ortalama ağırlık etrafında dağıtılacağı anlamına gelir.

Uygulamalardaki dekstran sülfat, dekstran sülfatın farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olarak sağlanabilmektedir. Bu farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar, dekstran sülfatın bir sodyum tuzunu içerir.

- 5 Dekstran sülfat için uygun doz aralıkları, hastanın boyutuna ve ağırlığına, hastanın tedavi edildiği duruma ve diğer hususlara göre değişebilmektedir. Dekstran sülfat, yaklaşık 0,1 ila 25 mg/kg, tercihen 0,5 ila 20 mg/kg konsantrasyonda uygulanabilir. Sınırlayıcı olmayan örnekler, yaklaşık 1,5 mg/kg vücut ağırlığı
10 gibi, 1 ila 2,5 mg/kg aralığındaki vücut ağırlığını içerir. Bununla birlikte, 5-15 mg/kg gibi 5 mg/kg'dan daha büyük konsantrasyonlar da mümkündür.

- Uygulanan ilaçtaki ilgili dekstran sülfat konsantrasyonu ve bir deneğe verilecek dekstran sülfat miktarı doktor tarafından
15 belirlenebilir. Teknikte iyi bilindiği gibi, aktive edilmiş kısmi tromboplastin süresi (APTT), deneğin kanı veya plazmasında olduğu gibi denekteki dekstran sülfat konsantrasyonunun bir temsili olarak kullanılır. APTT daha sonra bir güvenlik önlemi olarak kullanılabilir, böylece bu buluşun dekstran sülfatının
20 uygulanması, güvenli olarak kabul edilen önceden tanımlanmış APTT seviyelerini aşmayacaktır. Örneğin, bir dekstran sülfat uygulamasının ardından, yaklaşık 250 s'lik bir APTT, insan hastalarda güvenli bir şekilde elde edilir. Ayrıca, ksenotransplantasyon ortamlarında, teknik alanda, 250 s'den daha
25 yüksek bir APTT'ye neden olan dekstran sülfat uygulamaları kullanılmıştır. Ek olarak, deneysel bölümde gösterildiği üzere, 150 s'lik bir APTT seviyesi elde etmek için dekstran sülfat infüzyonu, yaklaşık 5 saatlik uzun infüzyon sürelerinde bile güvenle kullanılabilir.

- 30 Uygulamaların bir yönü, intravenöz olarak enjekte edilen veya uygulanan hücrelerin pulmoner alımını azaltmak, önlemek veya inhibe etmek için kullanıma yönelik dekstran sülfat veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ile ilgilidir.

- Mevcut çalışmada, infüze edilen [¹⁸F] FDG etiketli T-
35 lenfoblastların akciğerlerde biriktiği ve alımın, uygulama

şeklini değiştirerek ya da LMW-DS ile birlikte uygulanarak azaltılabileceği gösterilmiştir. T-lenfositlerin, adoptif aktarımdan sonra pulmoner dokuya benzer bir yapışması, bir murin modelinde gösterilmiştir; buradaki Th1 hücrelerinin pulmoner lokalizasyonunun, hücre içi yapışma molekülü-1'e (ICAM-1) [4] kısmen bağlı olduğu gösterilmiştir.

İntravenöz uygulamadan sonra akciğerlerdeki büyük başlangıç alımı, bir ilk geçiş etkisi gibi görünmektedir. Uygulanan T-lenfoblastlar, pulmoner sistemden ilk geçişi sırasında, tüm vücuda dağıtılması olanağına sahip olmadan önce akciğerlerde tutulmuştur. İntraarteriyel infüzyon modu, bu işlemi atlamak için tasarlanmış, böylece daha fazla miktarda T-lenfoblastın vücudun geri kalanına dağıtılmasına izin verilmiştir. Bu uygulama şeklinin akciğerdeki birikimi azaltması gerçeği, ilk geçiş etkisi hipotezini desteklemektedir.

T-lenfoblastları, önceden işlem görmüş bir domuza intravenöz olarak LMW-DS ile birlikte uygulandığında benzer bir etki elde edilmiştir. DS ilavesinin, plazmadaki homing ve kemokin ile ilişkili ligandların ekspresyonunu arttırdığı, bunun da diğerleri arasında CXCR4, VLA 4, 5 ve P-selektin gibi hücre yüzeyi reseptörlerinin ekspresyonunu yukarı regüle ederek gelişmiş hücre mobilizasyonuna yol açtığı tahmin edilmektedir. Bu, burada bulunan LMW-DS ile tedavi edilen T-lenfoblastların daha kısa pulmoner tutulmasını açıklayabilir.

Tümöre özgü lenfositler, çok sayıda kemokin ve homing (yerleşme) reseptörü eksprese eder ve hücrelerin, adoptif aktarımdan önce LMW-DS ile ön koşullandırılması, efektör hücrelerin periferik dokuya yerleşme kabiliyetlerini arttırmanın bir yolu olabilir. Akciğer dağılımının iki farklı heterojenite seviyesi vardı. İlk olarak, akciğerin ventral ve dorsal yönleri arasında alımda büyük bir fark vardı. İkinci olarak, dorsal alım homojen değildi, bunun yerine, uygulama moduna bağlı olarak yüksek hücre yoğunluğuna sahip etkin noktalarda, akciğerlerdeki T-lenfoblastların önemli bir yüzdesi bulunmuştur.

Ventral-dorsal asimetrisi, inceleme prosedürü sırasında hayvan miskin olduğu için basitçe yerçekimsel etkilerden kaynaklanıyordu. İkinci tip heterojenite, T-lenfoblastların etki noktalarında birikme eğilimi, toplam akciğer alımı ile orantılı olarak artmıştır ve akciğer dokusuna hücresel yapışma mekanizmalarının kendine özgü bir özelliği ile ilişkili olabilir.

Akciğer alımının genliği, uygulama şekilleri arasında değişmiş olsa da, arınma kinetikleri benzerdi ve konsantrasyona bağlıydı.

10 Akciğerlerden gelen arınma esas olarak, transfüze edilmiş T-lenfoblastlarda [^{18}F] FDG'nin tutulmasının in vitro olarak ölçüldüğü kadar yüksek olduğu varsayılarak, yapışma kaybı ile pulmoner kanalı kan akışı yoluyla bırakan T-lenfoblastlardan kaynaklanmıştır.

15 Sonuç olarak, bu sonuçlar adoptif TIL aktarımı ile ilgili olarak değerlendirildiğinde, başlangıçtaki akciğer alımının azalması, vücudun geri kalanına daha büyük miktarda hücre dağılmasına neden olur. Bu, özellikle akciğer metastazı dışındaki hedef dokuları göz önüne almanın yanı sıra, ters solunum yolu etkileri potansiyelini azaltıyorsa önemlidir. Protokol potansiyel olarak, birkaç değişikliklerle beraber klinik ortama aktarılabilir.

Uygulamaların bir başka yönü dolayısıyla, farmasötik olarak kabul edilebilir bir enjeksiyon çözeltisi gibi farmasötik olarak kabul edilebilir bir akışkan veya sıvı taşıyıcı içinde sağlanan dekstran sülfatı veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve tümöre infiltre eden T-lenfositleri içeren bir bileşimle ilgilidir. Bu bileşim, metastatik kanser tedavisinde kullanım için uygundur ve bu nedenle metastatik kanser tedavisi için bir ilacın üretiminde kullanılabilir.

30 Bileşimin, tedavi veya inhibe etmek için kullanılabileceği metastatik kanserlerin sınırlayıcı olmayan örnekleri arasında akut miyeloid lösemi (AML), akut lenfoblastik lösemi (ALL), kronik miyeloid lösemi (CML), miyelodisplastik sendromlar (MDS), miyeloproliferatif bozukluklar (MPD), Hodgkin dışı lenfoma (NHL), Hodgkin hastalığı (HD), kronik lenfositik lösemi (CLL),

çoklu miyelom (MM), genç kronik miyeloid lösemi, nöroblastom, yumurtalık kanseri ve germ hücreli tümörler bulunur. Diğer kanser hastalıkları arasında kıllı hücre lösemisi (HCL), akut promyelositik lösemi (APL) ve diğer miyelomlar, lösemiler ve lenfomalar bulunur.

Metastatik kanserlerin diğer varyantları, bunlarla sınırlı olmamak üzere, aşağıda sunulan örneklerden seçilebilir: insan sarkomları ve karsinomları, örneğin, fibrosarkom, miksosarkom, liposarkom, kondrosarkom, osteojenik sarkom, kordoma, anjiyosarkom, endoteliosarkom, lenfanjiyosarkom, lenfanjiyoendotelyosarkom, sinoviyom, mezotelyoma, Ewing tümörü, leiomyosarkom, rabdomyosarkom, pankreas kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, skuamöz hücreli karsinom, bazal hücreli karsinom, adenokarsinom, ter bezi karsinomu, yağ bezleri karsinomu, papiller karsinom, papiller adenokarsinom, sistadenokarsinom, medüller karsinom, bronkojenik karsinom, hepatom, safra kanalı karsinomu, koriokarsinom, seminoma, embriyonal karsinom, Wilms tümörü, servikal kanser, testis tümörü, akciğer kakinoma, küçük hücreli akciğer karsinomu, mesane karsinomu, epitelyal karsinom, glioma, astrositom, medulloblastom, kraniyofarengioma, ependymoma, hemangioblastom, oligodendroglioma, melanom, nöroblastom ve retinoblastom, lösemiler, örn., akut lenfositik lösemi (ALL) ve akut miyelositik lösemi (miyeloblastik, promyelositik, miyelomonositik, monositik ve eritölösemi), kronik lösemiler (kronik miyelositik lösemi, kronik granülositik lösemi ve kronik lenfositik lösemi), polisitemi vera, lenfoma (Hodgkin hastalığı ve Hodgkin dışı hastalık), çoklu miyelom, Waldenstrom's makroglobulinemi ve ağır zincir hastalığı.

Bir metastatik kanseri tedavi etmek veya inhibe etmek aynı zamanda, metastatik kanser hücrelerinin sayısını azaltma ve/veya bu kanser hücrelerinin metastatik ve/veya hücre bölme kapasitesini azaltma bileşiminin kapasitesini de kapsar.

DENEYLER

Bu çalışmada PET-görüntüleme ile bir domuz modelinde T-lenfoblastların in vivo transfüzyonunu izlemek için bir yöntem sunuyoruz. Domuz T-lenfoblastları, uygulamadan önce [^{18}F] FDG ile etiketlenmiş ve hücrelerin kinetikleri ve biyo-dağılımı, 2 saate kadar izlenmiştir. [^{18}F] FDG, glukozu fonksiyonel bir analogdur, ancak heksokinaz ile başlangıç fosforilasyonundan daha fazla metabolize edilemez ve hücre sitoplazmasında tutulur. Aynı kavram, grubumuz tarafından Langerhans adacıklarının bir domuz modelinde [1] ve klinik ortamda [2, 3] görüntü nakli için de uygulanmıştır.

Bu çalışmada, üç uygulama şekli karşılaştırılmıştır; tamamlayıcı ve pıhtılaştırıcı inhibitör düşük moleküler ağırlıklı dekstran sülfatın (LMW-DS) birlikte uygulanmasıyla veya bu olmaksızın intravenöz uygulama ve intraarteriyel uygulama.

Malzemeler ve yöntemler

Domuz T-lenfoblastlarının izolasyonu

Üç aylık domuzlardan alınan dalaklar cerrahi olarak kesilip çıkarılmış ve acil hazırlık için PBS'de saklanmıştır. Dalaklar daha küçük parçalara bölünmüş ve ilk önce 1 mm çelik ağı ve ikinci kez, şırıngalı lastik piston ile ince bir naylon ağı karşı ezilmiştir. Doku PBS içinde yeniden süspanse edilmiş ve T-lenfoblastlar, Ficoll-Paque (GE-Healthcare Uppsala, İsveç) yoğunluk gradyan santrifüjlemesi kullanılarak izole edilmiştir. Tüm T-lenfoblastlar, adaptif olarak aktarılan, tümöre infiltre eden lenfositlerinin klinik ortamını simüle etmek için PHA (1 $\mu\text{g/mL}$) (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) ile aktive edilmiştir.

T-lenfoblastların transfüzyonu

T-lenfoblastlar, 10-15 mL PBS içerisinde süspanse edilmiş ve 10 dakika boyunca ya intravenöz olarak iç juguler vene (n=5) ya da intraarteriyel olarak artan aorta (n=1) uygulanmıştır. İntravenöz uygulama verilen domuzlardan ikisi LMW-DS (4,5 mg/kg) (Apoteket AB, Umeå, İsveç) ile ön işleme tabi tutulmuştur. T-lenfoblastlar bu iki durumda LMW-DS ile birlikte intravenöz

olarak uygulanmıştır (9 mg/kg, ardından 7,2 mg/kg/saat sürekli infüzyon).

T-lenfoblastların etiketlenmesi ve in vitro tutulma

- 5 [18F] FDG ($t_{1/2}$ =109,8 dk) standart prosedürlere göre hazırlanmıştır (TRACERlab FxFDG, GE Medical Systems, ABD). Hücreler, fazla radyoaktiviteyi gidermek için yıkanmadan önce 7-10 mL PBS içerisinde 60 °C'de [18F] FDG ile inkübe edilmiştir.
- 10 Tutulma ([18F] FDG-6P'nin defosforilasyonundan sonra izleyicinin GLUT'lerden arınma hızı), 120 dakika boyunca 6 farklı zaman noktasında üçlü olarak ölçülmüş ve tutulma yarı ömrü, verileri bir mono-üstel eğriye uyarlayarak hesaplanmıştır.

PET incelemeleri

- 15 [18F] FDG etiketli T-lenfoblastların uygulanmasından sonra altı domuz PET ile incelenmiştir. Bir GE Discovery ST PET/CT tarayıcı (n=3) veya bir Hamamatsu SHR-7700 tarayıcı (n=3) kullanılmıştır. Akciğerler ve karaciğer üzerinde 120 dakikaya kadar dinamik diziler elde edilmiştir. Elde edilen kinetik veri, mutlak hücre
- 20 sayısı veya uygulanan hücre yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar, ortalamalar $\pm$ OSH olarak verilmiştir.

Sonuçlar

T-lenfoblast izolasyonu, etiketlenmesi ve in vitro tutulma

- 25 Açıklanan yöntem ile her bir dalaktan 10^9 adede kadar T-lenfoblast geri kazanılabilir. 500-1000 milyon T-lenfoblast, $25,6 \pm 6,7$ MBq olan bir ortalama ile $10,6-53,1$ MBq [18F] FDG ile etiketlenmiştir. Domuz T-lenfoblastları, 319 dakikalık bir [18F] FDG tutulma yarı ömrüne sahipti ($R^2 = 0,99$). Örneğin, etiketin
- 30 %94'ü 30. dakikada ve %77'si 120. dakikada bulunuyordu.

Transfüze edilmiş T-lenfoblastların PET incelemesi

- 6 transfüzyonun ardından, başlangıç alımının büyük çoğunluğu esas olarak akciğerlerde bulunuyordu. Etiketli T-lenfoblastların
- 35 akciğerlerdeki dağılımı, yüksek hücresel yoğunluğa sahip küçük

etkin noktalarda bulunan greft kısımları ile 30 dakika sonra heterojen olmuştur (Şekil 1). Toplam alım düşmüş olsa da etkin noktalar 120 dakika sonra kalmıştır. Esas akciğer alımı dorsal olarak bulunmuş ve dağılımdaki bu asimetri, üç uygulama şekli için de benzer bulunmuştur.

Transfüzyonları takiben akciğerlerde etiketli T-lenfoblastların kinetikleri, Şekil 2'de sunulmaktadır. Göreceli akciğer alımı, tamamlanmış transfüzyonda intravenöz uygulamadan sonra en yüksek ortalama alım (uygulanan T-lenfoblastların %78,6'sı) ile uygulama modları arasında değişmiştir. LMW-DS'nin intravenöz uygulama sırasında birlikte uygulanması, alım miktarını %36,6'lık bir ortalama düşürmüştür. İntraarteriyel uygulamadan sonra T-lenfoblastların akciğer alımı en düşüktü (%29,4).

Akciğer dokusunda yakalanan hücrelerin konsantrasyonu ve toplam miktarı ölçülebilir. Tablo 1, 30. dakikada akciğerlerdeki T-lenfoblast miktarını göstermektedir. Uygulamadan sonra 80 ila 635 milyona kadar hücre (greftlerin %16 ila %79'u) akciğer dokusunda tutulmuştur. Etkin noktalarda yakalanmış hücre miktarını ölçmek için iki yoğunluk seviyesi tanımladık: 250.000 hücre/cc (orta yoğunluklu) veya 500.000 hücre/cc (yüksek yoğunluklu) üzerinde hücresel yoğunluğa sahip etkin noktalar.

Tablo 1 - 30. dakikada akciğerlerdeki T-lenfoblast yoğunluğu ve heterojenliği, uygulama şekli ile değişmiştir. Etkin noktaların varlığı, toplam akciğer alımına paralel olarak artmıştır.

Mod	Uygulan (10 ⁶ hücre)	Akciğerle rdeki toplam miktar (10 ⁶ hücre)	Akciğerle rdeki hücre yüzdesi	Orta yoğunlu klu bölgele r (10 ⁶ hücre)	Yüksek yoğunlu klu bölgele r (10 ⁶ hücre)	Maksim um yoğunl uk (10 ⁶ hücre/ cc)
İntravenöz	520	411,51	79,1	184,6	170,62	2,05
İntravenöz	1000	635,43	63,5	441,79	389,55	2,23
İntravenöz	560	172,36	30,8	101,74	67,75	0,99
İntraarteriyel	560	96,68	17,3	26,08	0	0,42
LMW-DS	500	81,47	16,3	27,7	0	0,49
LMW-DS	900	285,77	31,8	155,21	111,3	1,14

İntravenöz uygulamadan sonra yüksek yoğunluklu etkin noktalarda 67-389 Milyon hücre (akciğer alımının %39 ila %61'i) bulunmuştur. Yüksek yoğunluklu etkin noktalardaki hücrelerin miktarı, LMW-DS'nin (0-111 milyon hücre veya %0 ila %39) birlikte uygulanmasından sonra daha düşüktü ve intraarteriyel uygulamadan sonra hiç bulunmuyordu. Orta yoğunluklu etkin noktalar için benzer bir model görülmüştür. Gözlenen maksimum yoğunluk, 2 milyon hücre/cc'den fazlaydı.

- 10 Yukarıda tarif edilen uygulamaların, bu buluşun birkaç açıklayıcı örneği olarak anlaşılması gerekir. Teknikte uzman kişiler tarafından, mevcut buluşun kapsamından ayrılmadan uygulamalarda çeşitli modifikasyonların, kombinasyonların ve değişikliklerin yapılabileceği anlaşılabilecektir. Özellikle,
- 15 farklı uygulamalardaki farklı parça çözümleri, teknik olarak mümkün olduğunda başka uygulamalarla birleştirilebilir.

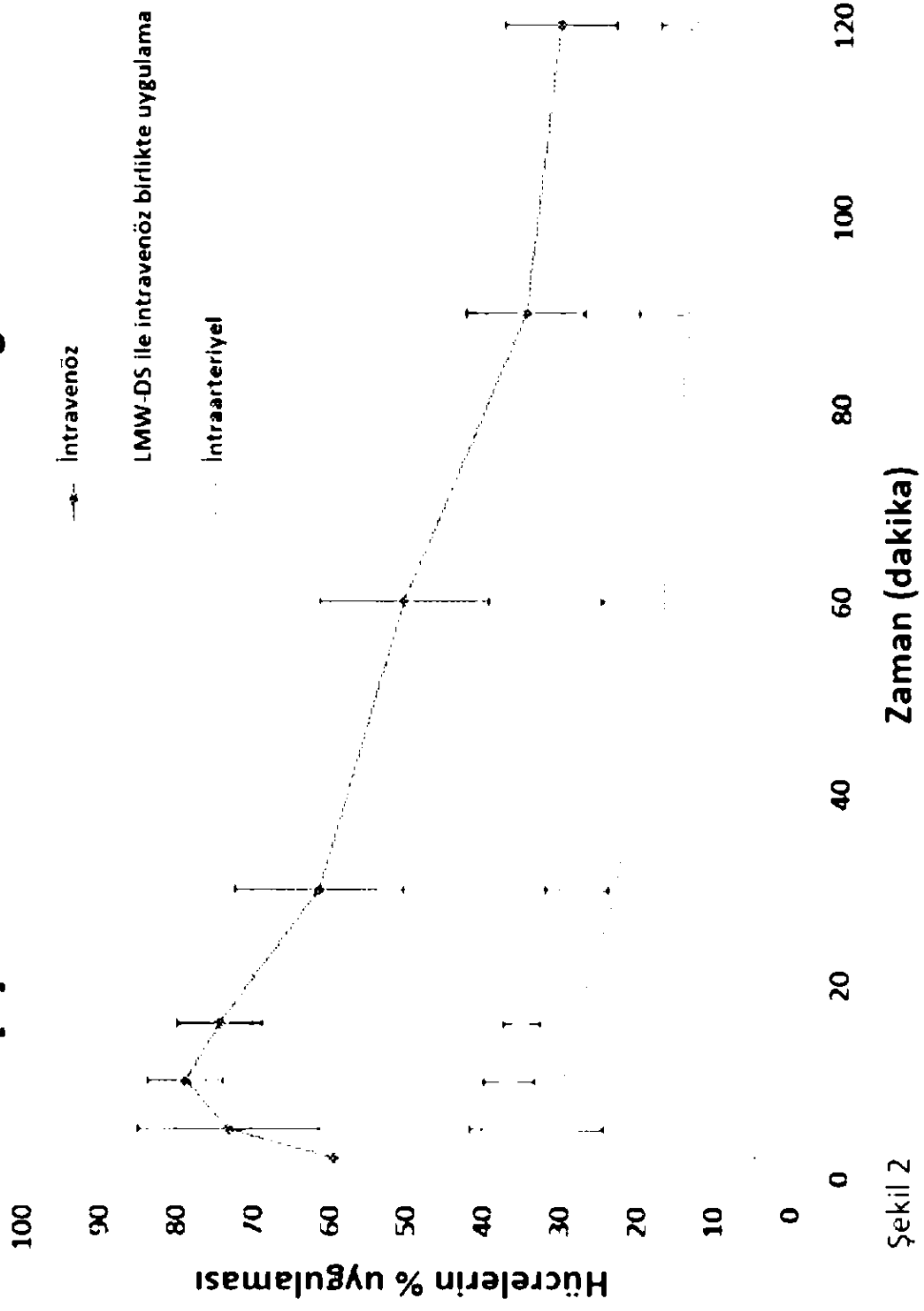
REFERANSLAR

- [1] Eich, T., Eriksson, O., Sundin, A., ve diğ erleri, Positron emission tomography: a real-time tool to quantify early islet engraftment in a preclinical large animal model. Transplantation, 2007. 84(7): s. 893-8
- [2] Eich, T., O. Eriksson ve T. Lundgren, Visualization of early engraftment in clinical islet transplantation by positron-emission tomography. N Engl J Med, 2007. 356(26): s. 2754-5
- [3] Eriksson, O., Eich, T., Sundin, A., ve diğ erleri, Positron Emission Tomography in Clinical Islet Transplantation. Am J Transplant, 2009. 9(12): s. 2816-24
- [4] Dixon, A.E., Mandac, J.B., Martin, P.J., ve diğ erleri, Adherence of adoptively transferred alloreactive Th1 cells in lung: partial dependence on LFA-1 and ICAM-1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 279(3): s. L583-91



Şekil 1

[¹⁸F]FDG etiketli T-lenfoblastların akciğer alımı



Şekil 2