

ÖZET

TRANSFERRİN-TUMSTATİN FÜZYON PROTEİNİ VE BU PROTEİNİN ÜRETİLMESİNE VE KULLANILMASINA YÖNELİK YÖNTEMLER

5

Mevcut buluş, tumstatine veya diğer antianjiyojenik proteine bağli transferrini içeren rekombinant proteinler ve bunların kullanılması ve üretilmesine yönelik yöntemler sağlamaktadır. Mevcut buluş, aynı zamanda bu tür rekombinant proteinleri eksprese etme kabiliyetine sahip bir hücre, bir plazmid, bir ekspresyon sistemi ve bunların kullanılması ve üretilmesine yönelik yöntemler sağlamaktadır.

10

İSTEMLER

- 5 **1.** Tumstatine bağılı transferrin içeren bir rekombinant protein.
- 2.** Transferrin ve tumstatinin doğrudan birbirine bağlandığı sistem 1'e göre rekombinant protein.
- 10 **3.** Transferrin ve tumstatinin bir bağlayıcı vasıtasıyla birbirine eş değerli bir şekilde bağlandığı sistem 1'e göre rekombinant protein.
- 4.** İstem 1'e göre tumstatine bağılı transferrini içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asit sekansı içeren bir plazmid.
- 15 **5.** Rekombinant proteini kodlayan nükleik asit sekansı faal olarak ekspresyon kontrol sekansı ile bağlandığı sistem 4'e göre plazmid.
- 6.** İstem 1'e göre tumstatine bağılı transferrini içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asit sekansı içeren bir rekombinant nükleik asit molekülü.
- 20 **7.** Nükleik asit sekansı faal olarak ekspresyon kontrol sekansı ile bağlandığı sistem 6'ya göre rekombinant nükleik asit molekülü.
- 25 **8.** İstem 6'ya göre tumstatinle bağılı transferrini içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asit sekansı içeren rekombinant nükleik asit molekülüyle transfekte olan ve bu molekülü eksprese eden bir rekombinant konakç hücre.
- 9.** İstem 1'e göre tumstatinle bağılı transferrini içeren bir rekombinant proteinin üretilmesine yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem, aşağıdaki adımları içermektedir:
- 30

rekombinant konakç hücrenin istem 6'ya göre tumstatine bağılı transferrin içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asidi içeren rekombinant nükleik asit molekülüyle transfekte edilmesi;

- 35 transfekte edilmiş konakç hücrenin, tumstatine bağılı transferrin içeren rekombinant protein üretmek için yeterli olan koşullar altında kültürlenmesi; ve rekombinant proteinin büyük ölçüde saflaştırılmış rekombinant protein şeklinde geri kazanılması

10. Rekombinant proteinin istem 2'ye göre doğrudan tumstatine bağlanan transferrini içerdiği istem 9'a göre yöntem.

5 **11.**Koroid neovaskülarizasyonla (CNV) ilişkilendirilmiş bir klinik durumun tedavisinde kullanılabacak istem 1'e göre tumstatine bağlanan transferrini içeren bir rekombinant protein.

12.CNV ile ilişkilendirilmiş klinik durumun, psödoksantoma elastikum, anjiyoid çizgileri, histoplazmoz, punktat iç koroidopati ve yaş yaşa bağlı makula dejenerasyonunu içerdiği
10 istem 11'de tanımlandığı gibi kullanımı için istem 1'e göre rekombinant protein.

15

20

25

30

35

TARİFNAME

TRANSFERRİN-TUMSTATİN FÜZYON PROTEİNİ VE BU PROTEİNİN ÜRETİLMESİNE VE KULLANILMASINA YÖNELİK YÖNTEMLER

5

İLGİLİ BAŞVURULARA ÇAPRAZ REFERANS

Mevcut başvuru, 17 Ağustos 2011 tarihinde dosyalanan 61/524,508 sayılı U.S. Geçici Patent Başvurusunun rüçhan hakkını talep etmektedir.

10

TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, tumstatin veya diğer antianjiyojenik proteinle bağli transferrin içeren rekombinant proteinlerle ve bunların üretilmesine ve kullanılmasına yönelik yöntemlerle ilgilidir. Mevcut buluş, aynı zamanda bu tür rekombinant proteinleri eksprese etme kabiliyetine sahip ekspresyon sistemiyle ve bunların üretilmesine ve kullanılmasına yönelik yöntemlerle ilgilidir.

ÖNCEKİ TEKNİK

20

Koroid neovaskülarizasyonu (CNV) (koroid tabakasında yeni damarlanma), psödoksantoma elastikum, anjiyoid çizgileri, histoplazmoz, punktat iç koroidopati ve yaş yaşa bağli makula dejenerasyonu (AMD) gibi hastalıklarda ciddi görme kaybına yol açabilen koroid vaskülatürün (damar yayılması) kontrolsüz bir şekilde büyümesini ifade etmektedir. Yaş AMD, drusen (tamamlayıcı bileşenler, lipidler ve apolipoproteinler) birikiminin hipoksiye yol açan bağli iskemik bölgelere sebep olması durumunda meydana gelmektedir. Hipoksinin, koroid endotelial hücrelerin matris metalloproteinaz (MMP) salgılamasını aktif hale getiren vasküle endotelial büyüme faktörünün (VEGF) salgılamasında bir artışa yol açtığına inanılmaktadır. Metalloproteinazlar, hücre dışı matrisi parçalamakta ve böylelikle endotelial hücrelerin proliferasyonuna ve retinaya doğru taşınmalarına olanak sağlamaktadır. MMP etkisi, nihayetinde yeni kan damarlarının veya CNV'nin gelişmesine yol açmakta ve bu da retinanın ayrılması veya kanamasına ve kan ve lipid (yağ) sızıntısından dolayı alt retinal lezyonların oluşumuna sebep olabilmektedir. Ortaya çıktıktan sonra CNV, sanayileşmiş ülkelerdeki yaşlı nüfusta ana görme kaybı sebebi olmaktadır.

35

CNV'nin tedavisi, halihazırda hasta popülasyonunun bir kısmıyla sınırlı olmakta ve vasküler hiper-geçirgenlik ve yeni kan damar oluşumunda VEGF'nin zararlı rolünün kısıtlanması odaklanmaktadır. Ancak, VEGF, aynı zamanda yara iyileşmesi, foto reseptör sağ kalımı ve koroid kapiler yatağı korunması gibi fizyolojik aktivitelerde yapıldığı bir kilit rol oynamaktadır.

5 Halihazırda, Ranibizumab (Lucentis™), Aflibercept (Eylea™) ve pegaptanib (Macugen™), günümüze kadar CNV'nin tedavi edilmesi için onaylanmış olan iki terapötik maddedir. Bu maddeler, VEGF'yi inhibe etmektedir. Ranibizumab'ın CNV'nin tedavi edilmesi konusunda genellikle pegaptanibten daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ranibizumab, VEGF-A'nın bütün izoformları ile bağlanmakta ve vasküler geçirgenlik ve büyüme dahil VEGF aktivitesini inhibe etmektedir.

10 Bahsedilen iki terapötik maddenin dışında, ranibizumab'ın ana tam uzunluklu antikoru olan bevacizumab (Avastin™) da CNV'ye ilişkin ruhsat dışı bir tedavi şeklinde keşfedilmektedir.

CNV'nin tedavi edilmesinde bu terapilerin başarısına rağmen, aktif hale getirilmiş endotelial hücrelerde apoptoz eksikliği ve yara iyileşmesi gibi VEGF ile ilgili fizyolojik aktivitelerin potansiyel olarak bozulması dahil bu terapilerin yapıldığında var olan dezavantajlar bulunmaktadır. Buna ek olarak, ranibizumab kullanımı insanlarda intravitreal uygulamadan sonra tromboembolik olayların arttırıldığı gibi dahil sistemik risklere yol açmaktadır. Aynı zamanda intravitreal bevacizumab, iskemik atak, kan basıncı (tansiyon) artışı, serebrovasküler kazalar ve ölümle

15 ilişkilendirilmiştir. İlaveten, CNV'den muzdarip hastalarla yapılan bir klinik çalışmada, ranibizumaba olan yanıt oranı CNV'ye sahip hastalarda yalnızca ~%40 olmuş ve harf sayısındaki kazanç, yalnızca 7.2 olmuştur.

Dolayısıyla, azaltılmış yan etkilere ve/veya daha iyi terapötik etkililiğe sahip CNV'nin tedavi edilmesine yönelik yeni ve/veya daha etkili terapötik yaklaşım ile ilişkin bir ihtiyaç bulunmaktadır.

25

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluşun bazı yönleri, tumstatin veya diğer benzer antianjiyogenik proteinle bağlantılı transferrin içeren bir rekombinant protein sağlamaktadır. Bazı yapılandırılmalarda, transferrin ve tumstatin, doğrudan birbirine bağlanmaktadır. Yine diğer yapılandırılmalarda, transferrin ve tumstatin, bir bağlayıcı vasıtasıyla birbirine eşdeğer bir şekilde bağlanmaktadır. Uygun bağlayıcılar, teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinmektedir.

30

Mevcut buluşun diğer yönleri, mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine bağlı transferrin

35

içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asidi içeren bir plazmid sağlamaktadır. Tipik olarak, rekombinant proteini kodlayan nükleik asit sekansı, ekspresyon kontrol sekansı ile faal olarak bağlanmaktadır.

- 5 Mevcut buluşun yine diğer yönleri, mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine bağlı transferrin içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asit sekansı içeren bir rekombinant nükleik asit molekülü sağlamaktadır. Bazı yapılandırılmalarda, nükleik asit sekansı faal olarak ekspresyon kontrol sekansı ile bağlanmaktadır.
- 10 Mevcut buluşun yine diğer yönleri, mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine bağlı transferrin içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asidi içeren rekombinant nükleik asit molekülüyle transfekte olan ve molekülü eksprese eden rekombinant konakç hücre sağlamaktadır.
- 15 Mevcut buluşun diğer yönleri, mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine bağlı transferrin içeren bir rekombinant proteinin üretilmesine yönelik bir yöntem sağlamakta; söz konusu yöntem, aşağıdaki adımları içermektedir:

- 20 rekombinant konakç hücrenin mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine bağlı transferrin içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asidi içeren rekombinant nükleik asit molekülüyle transfekte edilmesi;
- transfekte edilmiş konakç hücrenin, tumstatine bağlı transferrin içeren rekombinant protein üretmek için yeterli olan koşullar altında kültürlenmesi; ve rekombinant proteinin büyük ölçüde saflaştırılmış rekombinant protein şeklinde geri kazanılması.

- 25 Bazı yapılandırılmalarda, rekombinant protein, mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine doğrudan bağlanan transferrin içermektedir.
- 30 Mevcut buluşun yine diğer yönleri, koroid neovaskülerizasyonla (CNV) ilişkilendirilmiş bir klinik durumun tedavisine kullanılmak üzere mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine bağlı transferrini içeren bir rekombinant protein sağlamaktadır.

- 35 Bazı yapılandırılmalarda, CNV ile ilişkilendirilmiş klinik durum, psödoksantoma elastikum, anjiyoid çizgileri, histoplazmoz, punktat iç koroidopati ve yaş yaşa bağlı makula dejenerasyonunu (AMD) içermektedir.

Mevcut buluşun bileşimleri, aynı zamanda bununla sağlanmamak üzere, kanser; kanserle ilişkilendirilmiş neovaskülarizasyon; kornea anjiyogenez; proliferatif diyabetik retinopati; neovasküler glakom; gözün diğer neovasküler ve vasküler proliferatif bozuklukları ve aynı zamanda vücudun başka yerinde oluşan diğer neovasküler ve vasküler proliferatif bozukluklar gibi diğer hastalıkların tedavi edilmesi için de kullanılabilmektedir.

Mevcut buluşun bileşimleri, bununla sağlanmamak üzere, intravitreal, intravenöz, suprakoroid, topikal, perioküler, subkutanöz, intramüsküler, subretinal, retrobulberi, intraskleral ve benzeri gibi teknikte uzman kişiler tarafından bilinen yöntemlerin herhangi biri kullanılarak uygulanabilmektedir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1, transferrin-tumstatin, bevacizumab ve tumstatinin anti-proliferatif aktivitesini gösteren bir grafikdir.

Şekil 2, farklı transferrin-tumstatin, bevacizumab ve tumstatin konsantrasyonlarına sahip koroid endotelial hücrelerde gözlemlenen endotelial tüp oluşumunun engellenmesini gösteren bir grafikdir.

Şekil 3, BN sıçanlarında CNV lezyon boyutunun *in vivo* değerlendirmesini gösteren bir çubuk grafiğidir.

Şekil 4, transferrin-tumstatin ile desteklenen gen ekspresyon yapıları şematik bir temsildir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Mevcut buluşun bazı yönleri, tumstatine bağlı (diğer bir ifadeyle eklenmiş) transferrin içeren bir rekombinant protein sağlamaktadır. Transferrin, doğrudan veya dolaylı olarak (örn., bir bağlayıcı vasıtasıyla) tumstatine bağlanabilmektedir. Mevcut buluşun yine diğer yönleri, mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine bağlı transferrin içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asit sekansı içeren bir rekombinant nükleik asit molekülü sağlamaktadır. Mevcut buluşun yine diğer yönleri, mevcut buluşta tanımlandığı gibi tumstatine bağlı transferrin içeren bir rekombinant proteini kodlayan bir nükleik asidi içeren rekombinant nükleik asit molekülüyle transfekte olan ve molekülü eksprese eden rekombinant konak hücre sağlamaktadır. Mevcut buluşun yine diğer yönleri, tumstatine bağlı transferrin içeren bir rekombinant proteinin üretilmesine ve kullanımasına yönelik

yöntemler sağlamaktadır

Tumstatinin CNV'nin tedavi edilmesinde terapötik olarak etkili olduğu gösterilmiştir. Herhangi bir kurama bağlanılamaması, tumstatinin mevcut CNV terapilerinde eksik olan bir özellikle olan apoptoza sebep olmak suretiyle anjiyogenezin geriletilmesi (indirgeme) kabiliyetine sahip olduğuna inanılmaktadır

Tumstatin, ilk olarak bazal membranda mevcut olan Kollajen IV'nin C terminali kollajen olmayan etki alanından (NC1) elde edilen bir endojen anjiyogenez inhibitörüdür. Tumstatinin $\alpha V\beta 3$ integrinlerine bağlanarak, endotelial hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek ve aynı zamanda endotelial hücre apoptozunu indükleyerek kan damar oluşumunun inhibe edilmesinde bir rol oynadığına inanılmaktadır. Herhangi bir patolojik durumun yokluğunda, anjiyogenik (VEGF gibi) ve anti-anjiyogenik moleküller (tumstatin gibi) arasında bir denge korunmaktadır. Hipoksi ve iskemi esnasında, anjiyogenik ve anti-anjiyogenik moleküller arasındaki dengenin kırıldığına ve böylelikle neovaskülarizasyona sebep olduğuna inanılmaktadır. Tumstatin gibi anjiyogenez inhibitörleri, neovaskülarizasyonla mücadele etme konusunda vücudun yapısında var olan mekanizmaları bir parçası olmaktadır

Tumstatin, ranibizumab ve bevacizumab üzerinde birçok avantaja sahip olmakta ve bu antikorlardan terapötik olarak daha iyi olduğuna inanılmaktadır. Günümüze kadar, tumstatin reseptörü olan $\alpha V\beta 3$ integrin, yalnızca aktif hale getirilmiş endotelial hücrelerde bulunmakta ve normal damarlarda bulunmamaktadır. Buna bağlanarak, tumstatinin yara iyileşmesi gibi fizyolojik işlemleri etkilemeksizin aktif hale getirilmiş endotelial hücrelerin hedef alınmasına yönelik bir yolak sağlamaktadır. Tumstatin, endotelial hücrelerde apoptozu teşvik etmekte ve tumstatinin sebep olduğu apoptozun kan damarların çoğalmasında gerilemeye yol açabildiğine ve dolayısıyla normal görmenin geri kazanılmasında avantajlı olduğuna inanılmaktadır. Buna bağlanarak, tumstatin, etkili bir şekilde neovaskülarizasyonu tedavi edebilmekte ve herhangi bir belirgin anti-VEGF tedavisiyle ilgili yan etkiler olmaksızın görme kaybını önleyebilmektedir.

Şaşırtıcı ve beklenmedik bir şekilde, mevcut buluş sahipleri, CNV'de tumstatinin terapötik etkililiğinin tumstatinin diğer proteine bağlanmasıyla çarpıcı bir şekilde arttırılabildiğini keşfetmiştir. Belirli bir yapılandırılarda, tumstatin, retinal pigment epitelyumdan (RPE hücreleri) füzyon proteinin polarize bir şekilde salgılanmasında elde etmek için transferrine bağlanmıştır. RPE mono katmanına maruz kaldığında, füzyon proteini, tumstatine kıyasla

tercihen bazolateral tarafa doğru salgılanmıştır. Transferrin-tumstatin geniyle olan transfeksiyon işleminden sonra, oluşan transferrin-tumstatin proteini, tumstatin gen ürününe kıyasla polarize epitelyal hücre mono katmanlarında daha çok bazolateral yöne doğru salgılanmıştır. Rekombinant transferrin-tumstatin proteininin bazolateral salgılanması, tumstatini aktif hale getirilmiş ve neovasküler koroid endotelyal hücrelerin daha yakından getirmekte ve böylelikle tumstatinin terapötik aktivitesini arttırmaktadır. Herhangi bir kurama bağlı olmaksızın, transferritumstatinin gelişmiş bazolateral salgılanması, demir içeriği ve transferrin reseptör aktivitesinin muhtemelen bu hastaların gözlerinde artmasından dolayı AMD'den muzdarip hastaların gözlerinde belirgin olmaktadır. Demirin ortadan kaldırılmasına yönelik en erişilebilir yolun koroid vaskülatür vasıtasıyla olduğuna inanılmaktadır. Bu yol, aynı zamanda transferrinin (ve dolayısıyla rekombinant transferrin-tumstatin proteininin) koroide doğru arttırılmasıyla salgılanmasına da yol açmaktadır.

Yukarıdakilere bağlanarak, mevcut buluş sahipleri, koroid endotelyal hücrelerin göçünün, proliferasyonunun ve aynı zamanda tüp oluşumunun önlenmesindeki etkililikleri bakımından yeni bir transferrin-tumstatin füzyon proteini (diğer bir ifadeyle transferrin-tumstatin proteini) ve aynı zamanda tumstatini incelemiştir. Bu aktiviteler, bevacizumab ile kıyaslanmıştır. İlâveten, mevcut buluş sahipleri, mevcut buluşun rekombinant proteininin iyi bilinen polarize hücre modelinde (örneğin Madin-Darby köpek böbreği, diğer bir ifadeyle MDCK hücreleri) polarize bir şekilde salgılanma becerisini belirlemiştir.

Burada kullanıldığı gibi, "transferrin" terimi, terapötik olarak etkili transferrin fragmanları içermektedir. Bazı yapılandırılmalarda, "transferrin" terimi, integrinlere bağlanabilen en az bir transferrin peptid fragmanına sahip bir peptidi ifade etmektedir. Alternatif olarak, "transferrin" terimi, tipik olarak tam transferrin peptid sekansının en az 5 amino asidine sahip bir peptidi ifade etmektedir. Yine alternatif olarak, "transferrin" terimi, fragman seçici bir şekilde integrinlere bağlanma kabiliyetine sahip olduğu sürece, tam transferrin peptid sekansının en az %25, tipik olarak en az %50, sıkıca en az %75 ve daha sıkıca en az %90'ına sahip bir peptidi ifade etmektedir. Buna bağlanarak, herhangi bir terapötik olarak etkili transferrin fragmanı rekombinant proteinin neovasküler bölgelere doğru hedeflenmiş alması ve salgılanması (örneğin koroide doğru salgılanma) için kullanılabilmektedir. Bazı yapılandırılmalarda, terapötik olarak etkili transferrin fragmanı tipik olarak selektif bir şekilde integrinlere bağlanabilen bir transferrin peptid fragmanı içermektedir.

Biyolojik aktiviteye sahip bazı transferrin fragmanları teknikte uzman kişiler tarafından

bilinmektedir. Mevcut buluşun kapsamı bu tür rekombinant protein istenen biyolojik aktiviteye sahip olduğu sürece tam uzunluklu transferrini içerdiği takdir edilmelidir. Belirli bir transferrin ve/veya tumstatin fragmanları istenen biyolojik aktiviteye sahip olmasından veya olmamasından burada açılanlar gibi *in vitro* ve *in vivo* deneyler kullanılarak teknikte uzman kişiler tarafından halihazırda belirlenebilmektedir. Buna bağlanarak, mevcut buluşun kapsamı neovasküler bozuklukların tedavi edilmesine yönelik herhangi bir terapötik füzyon proteinini (diğer bir ifadeyle rekombinant tumstatin-transferrin proteinleri) içermekte, burada tumstatin ve/veya transferrin, bağlanabilir bir şekilde bir tam protein veya bunun bir fragmanı olabilmektedir. Rekombinant proteinlerin tipik olarak ana proteinlere kıyasla terapötik olarak daha verimli olduğuna inanılmaktadır. Mevcut buluşun bileşimleri, ilgili hücrelerde rekombinant proteinleri eksprese etme kabiliyetine sahip nükleik asit yapıları veya rekombinant proteinleri içermektedir.

Seri I Peptidleri. Transferrin fragmanları

Burada bazolateral salgılama verme kabiliyetine sahip bazı temsili transferrin fragmanları ve bunların tanımlanması ve üretilmesine yönelik yöntemler ele alınmaktadır.

Transferrin protein sekansı ve aynı zamanda çeşitli salgılayan protein sekansları analiz edilmiş ve bazolateral salgılama/taşıma kabiliyetine sahip yeni füzyon proteinlerin oluşturulması için uygun transferrin fragmanları tanımlanmıştır. İnterlökin 6 (Holtkamp vd., Clin Exp Immunol., 1998, 112(1), 34-43), interlökin 8 (*id.*), ve vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF-A) (Sonoda vd., AGING, 2010, 2(1), 28-42) gibi çeşitli bazolateral olarak salgılanmış proteinlerin peptid sekanslarının analizi, bu tür proteinlerin N-terminali amino asitlerinde şaşırtıcı bir benzerliğin tanımlanması yol açmıştır. İnterlökin 6, interlökin 8 ve vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF-A) dahil proteinlerin bazolateral tarafta salgılandığı ve bol miktarda lösin amino aside sahip olduğuna inanılmaktadır. İlaveten, aynı zamanda dilösinler (örn., "LL"), bu proteinlerin N-terminalinin yakınında mevcut olmaktadır. Bu anlayışlara dayanarak, mevcut buluş sahipleri, transferrin-tumstatinin bazolateral salgılanmasından sorumlu olabilen transferrinde aşağıdaki temsili peptidleri tanımlamıştır: MRLAVGALL (SEK KİM NO:1); MRLAVGALLVC (SEK KİM NO:2); LLVCAVLGLCL (SEK KİM NO:3); GALLVCAVLGLCL (SEK KİM NO:4); LLVCAVLGLCLAV (SEK KİM NO:5); GALLVCAVLGLCLAV (SEK KİM NO:6); ve MRLAVGALLVCLLCAVLGLCLAV (SEK KİM NO:7). Buna bağlanarak, bazı yapılandırılmalarda, bu peptidleri içeren herhangi bir peptid veya rekombinant peptid, transferrin-tumstatinin bazolateral olarak salgılanmasını gerçekleştirilmesi için uygundur. Bu peptidler (örn., burada

açılan transferrin fragmanları tumstatinle veya diğer herhangi bir uygun terapötik proteinle kaynaştırıldığında, terapötik proteinin bazolateral olarak salgılanması yolu açmaktadır (örneğin koroide doğru retinal pigment epitelyum boyunca).

5 Seri II Peptidler. İntegrinlere bağlanma kabiliyetine sahip transferrin peptidleri:

Şaşırtıcı ve beklenmedik bir şekilde, mevcut buluş sahipleri, aynı zamanda transferrin proteininin transferrin reseptörüyle olan beklenen etkileşimine ilaveten, $\alpha V\beta 3$ integrin reseptörüyle etkileşime girebildiğini keşfetmiştir. Mevcut buluşun rekombinant transferrin-tumstatin proteininin tumstatin reseptörü olan $\alpha V\beta 3$ integrin reseptörüyle ve aynı zamanda transferrin mevcudiyetinden dolayı transferrin reseptörüyle etkileşime girdiğine inanılmaktadır. Transferrin-tumstatinin $\alpha V\beta 3$ integrin reseptörüne *in silico* (bilgisayar ortamında) yerleştirilmesi işlemi kullanılarak, mevcut buluş sahipleri, transferrin proteininin içinde integrin reseptörüyle etkileşime giren amino asitleri tanımlamıştır. Aşağıdaki amino asitler, *in silico* yerleştirmeye dayanarak integrinle etkileşime girdiğine inanılan bazı temsili peptidlerdir:

Q(127), N(129), L(131), N(148), I(151), G(152), C(156), L(158), K(163), E(166), K(167), A(168); ve
C(246), T(250), R(251), D(259), E(337), I(342), L(345), T(349), E(357), K(359), L(366),
E(370), W(377), C(396), I(400), N(402), E(404), A(405), D(406), L(423), V(424), P(425), E(429).

Bu etkileşime giren amino asitlere dayanarak, aşağıdaki transferrin peptidleri, integrin reseptörleriyle etkileşime girme kabiliyetine sahip olanlar şeklinde tasarlanmıştır. GFQNLNIGCLKEKAVA (SEK KİM NO:8); LLCTRDEILTEKLEWCINEADLVPENY (SEK KİM NO:9); Transferrin₁₂₇₋₁₆₈; Transferrin₁₂₅₋₁₇₀; Transferrin₂₄₆₋₂₅₉; Transferrin₂₄₄₋₂₆₁; Transferrin₃₃₇₋₄₂₉; ve Transferrin₃₃₅₋₄₃₁. Burada kullanıldığı gibi, Transferrin_{x-y} terimi, amino asit "x"te başlayan ve amino asit "y"de sonlanan transferrin amino asit sekansları ifade etmektedir.

30 Seri III Peptidleri. Transferrin reseptöre bağlanma kabiliyetine sahip transferrin fragmanları

Aşağıda, transferrin reseptörüne bağlanma kabiliyetine sahip olduğu keşfedilen bazı temsili transferrin fragmanları açıklanmaktadır.

35 Aşağıda transferrindeki amino asitlerin transferrin reseptörüyle etkileşime girdiğine

inanılmaktadır. Transferrin₁₆₁₋₁₆₉; H(368), R(371), L(372), D(375), E(376), S(378), V(379); PRKPLEKAV (SEK KİM NO:10); Transferrin₁₅₉₋₁₇₁; Transferrin₃₆₈₋₃₇₉; ve Transferrin₃₆₆₋₃₈₁. Buna bağlı olarak, bu transferrin fragmanları aynı zamanda mevcut buluş yöntemlerinde kullanılabilmektedir.

5

Seri IV Peptidleri. Anti-anjiyojenik ve/veya anti-tümör aktivitesine sahip tumstatin fragmanları

“Tumstatin” terimi, terapötik olarak etkili tumstatin fragmanları içermektedir. Özellikle, “tumstatin” terimi, herhangi bir ek tumstatin peptide sahip olmayan transferrinin kullanılması göre transferrin teslimatını arttırabilen tumstatin peptid kısımları veya fragmanları içermektedir. Buna bağlı olarak, bazı yapılandırılmalarda, “tumstatin” terimi, bu tür bir peptide sahip olmayan transferrine göre transferrinin terapötik etkililiğini arttırabilen en az bir tumstatin peptid fragmanına sahip bir peptidi ifade etmektedir. Alternatif olarak, “tumstatin” terimi, tam transferrin peptid sekansının en az %25, tipik olarak en az %50, sıklıkla en az %75 ve daha sıklıkla en az %90’ına sahip bir peptidi ifade etmektedir. Biyolojik aktiviteye (örneğin anti-anjiyojenik aktiviteye) sahip bazı tumstatin fragmanları tekniğe uzman kişiler tarafından bilinmektedir. Mevcut buluşun kapsamının (ve aynı zamanda “tumstatin” teriminin) tam uzunluklu tumstatin proteinlerini ve aynı zamanda bunların fragmanları içerdiği takdir edilmelidir.

20

Tumstatin, $\alpha V\beta 3$ integrin reseptörüne bağlanan ve tümör büyümesini bastıran bir anjiyojeniz inhibitörüdür. Önceki delesyon mutajenez çalışmaları (bkz. örneğin, Eikesdal vd., PNAS, 2008, 105(39), 15040-15045; ve Thevenard vd., Int. J. Cancer, 2010, 126, 1055-1066), antianjiyojenik aktivitesine sahip aşağıdaki tumstatin amino asit fragmanları tanımlanmıştır: Tumstatin₇₄₋₉₈; Tumstatin₁₈₅₋₂₀₃; ve YSNSG (SEK KİM NO:11).

25

Mevcut buluş sahipleri, aynı zamanda *in silico* protein modellemesi vasıtasıyla yukarıdaki peptid sekansına bağlı olarak yeni peptidler tasarlanmıştır. Belirli bir yapılandırılma, D (aspartik asit), aşağıda gösterildiği gibi iki noktada H (histidin) ile değiştirilmiştir:

30

TMPFLFCNVN**H**VCNFASRN**H**YSYWL (SEK KİM NO:12)

H’nin D ile değiştirilmesinin pozitif H yükü ile diğer protein yükleri arasında saf olumlu elektrostatik etkileşime yol açmaktadır. Diğer bazı yapılandırılmalarda, hidrofobik kalıntılar alanin (A) ve lösin (L), bir hidrofilik amino asit olan arginin (R) ile değiştirilmiştir. Bu modifiye

35

edilmiş peptidlerin bazıları aşağıdakileri içermektedir: TMPFLFCNVNDVCNFRSRNDYSYWL (SEK KIM NO:13); TMPFLFCNVNDVCNFASRNDYSYWR (SEK KIM NO:14); CNYYSNSYSFWLRSLNPER (SEK KIM NO:15); ve CNYYSNSYSFWLASRNP (SEK KIM NO:16).

- 5 Arginin, polaritesinden sorumlu olan bir guanidinyum grubunu ihtiva etmektedir. Hidrofobik kalınlar hidrofobik arginin ile değiştirilmesinin, solventle oluşan ek hidrojen bağları vasıtasıyla proteinin kararlılığının geliştirilmesine yardımcı olduğuna inanılmaktadır, ilaveten, guanidinyum grubunun pH 7.4'te pozitif olarak yüklü olduğu argininin, yüzeye bir yük getireceğine ve protein yüzeyinde ek etkileşimler için bir yol sağlayacağına inanılmaktadır.
- 10 Yukarıdaki doğal sekansları veya modifiye edilmiş fragmanları herhangi biri, mevcut buluşun füzyon veya rekombinant proteinlerinin oluşturulmasında kullanılabilmektedir. Buna bağlı olarak, "transferrin" ve "tumstatin" terimlerinin, bir veya daha fazla amino asit kalınlarını homolog amino asitler dahil yabancı olmayan tipteki amino asitlerle değiştirildiği modifikasyonları içerdiği takdir edilmelidir. Teknikte uzman kişiler, mevcut buluşu okuduktan
- 15 sonra halihazırda uygun amino asit ikamesini belirleyebilmektedir.

- Yukarıda ele alındığı gibi, transferrin ve tumstatinin tam uzunluklu rekombinant proteinlerine ek olarak, mevcut buluşun kapsamı tam uzunluklu transferrin ve/veya tumstatin proteinlerinin biri veya her ikisinin yukarıda açıklanan herhangi bir karşı gelen kısmi
- 20 peptidle değiştirildiği rekombinant proteinleri içermektedir.

- Buna bağlı olarak, mevcut buluşun kapsamı peptid/proteinin yukarıdaki Seri I veya III Peptidlerde açıklanan peptidlerden veya transferrinin kendisinden yukarıdaki Seri II veya IV Peptidlerdeki peptidlerle veya tumstatinin kendisinin (örn., herhangi bir terapötik protein veya
- 25 tumstatin gibi peptid veya Seri II veya IV Peptidi gibi peptid ile kaynaştırılmış Seri I Peptid; ve Seri I Peptid ile kaynaştırılmış Seri II Peptid ve benzeri) herhangi bir kombinasyonunun olduğu rekombinant proteinleri içermektedir. Buna ek olarak, Seri I Peptidleri, hedeflenmiş alım/taşıma/salgılama için herhangi bir yeni terapötik makro molekülle birleştirilebilmektedir.

- 30 Örneklerde, yapı bir şekilde pratiğe indirgenen prosedürler, geniş zaman kipinde tarif edilmekte ve laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiş olan prosedürler ise geçmiş zaman kipinde tarif edilmektedir.

ÖRNEKLER

Malzemeler ve Yöntemler

ÖRNEK 1

5 Malzemeler: Transwell® filtreleri (0.4µm gözenek boyutu), Corning Inc. şirketinden (New York) satın alınmıştır. Bovin serum albumin Sigma Aldrich (MO) şirketinden satın alınmıştır. BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced, BD Biosciences (CA) şirketinden satın alınmıştır. DNA merdiveni, Lipofectamine® 2000 reaktifi ve DAPI boyası, Invitrogen Corporation (CA) şirketinden satın alınmıştır. Kistazima enzimleri, New England Biolabs (MA) şirketinden satın alınmıştır. QuikChange® Bölgeye Yönlendirilmiş Mutajenez Kiti, Agilent Technologies (CA) şirketinden satın alınmıştır. Transferrin geni, koroid endotelyal hücreleri (RF/6A), ve RF/6A besiyerleri, Amerikan Type Culture Collection (VA)'dan satın alınmıştır. QIAGEN® plazmid Giga kiti, QIAGEN Inc. (CA) şirketinden satın alınmıştır. TALON® metal afinite reçinesi (Katalog # 635502), Clontech Laboratories, Inc. (CA) şirketinden satın alınmıştır. Protein içeriğini hesaplamak için kullanılan BCA® Protein Deney Kiti, Pierce Biotechnology, Inc. (IL) (Katalog # 23225) şirketinden satın alınmıştır. Bio-Rad laboratories, Inc. (CA) şirketinden elde edilen hazır jel olan 10% Ready Gel Tris-HCl® ve Fisher Scientific (PA) şirketinden elde edilen EZ Run® önceden boyanmış protein merdiveni, SDS PAGE jel elektroforez sırasında kullanılmıştır. BCA® protein deney kiti, Thermo Fisher Scientific (IL) şirketinden satın alınmıştır.

20

Plazmidlerin Oluşturulması: Aşağıdaki cDNA'lar, yani (a) Tumstatin; (b) Tumstatin-EGFP; (c) Transferrin-tumstatin (transferrin-tumstatin destekli gen ekspresyon yapısı) şematik olarak gösteren Şekil 4'e bakınız. Transferrine sahip benzer bir yapı, uzun vadeli tumstatin ekspresyonu için kullanılmıştır; ve (d) Transferrin-tumstatin-EGFP'yi içeren dört farklı yapı, inceleme için hazırlanmıştır. Primerlerin tamamı, bu deneyde kullanılmak üzere Integrated DNA Technologies Inc. (CA) şirketinden satın alınmıştır. Tumstatin cDNA, ileri primer (5'-CGATGGATCCGCAAC-CTGGACAACGAGAGGCTT-3') (SEK KİM NO:17) ve ters primer (5'-CGATCTCGAGAGTGTCTTTTCTTCAT-GCACACC-3') (SEK KİM NO:18) kullanılarak PCR ile güçlendirilmiş ve BamH1 ve Xho1 fragman şeklinde PSecTag2B vektörüne bağlanmıştır. EGFP, Hind III ve BamH1 fragman şeklinde, şablon olarak pEGFP vektörü (Clontech Laboratories, CA) kullanılarak ve ileri primer (5'-ATCGATAAGCTTTGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3') (SEK KİM NO:19) ve ters primer (5'-ATCGATGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3') (SEK KİM NO:20) kullanılarak PSecTag2B vektörünün içine klonlanmıştır.

35 IgK salgılayıcı sekans, ilk olarak IgK sekansından ortadan kaldırılmak için yapıldı. Nhe1 ve Sfi1 ile

sindirilmesi amacıyla transferrin ile değiş tokuş edilmiştir. Transferrin, kilitlama bölgeleri olan Nhe1 ve Sfi1 bölgelerini ihtiva eden ileri primer (5'-AGTCGCTAGCATGAG-GCTCGCCGTGGAGCCCC-3') (SEK KİM NO:21) ve ters primerler (5'- AGTCGCGGCCGGCTGG GCCAGGTC-TACGGAAAGTGCAGGCT-3') (SEK KİM NO:22) kullanılarak güçlendirilmiş ve doğrusallaştırılmış vektörün içine klonlanmıştır. Transferrin, Tumstatin ve pEGFP içeren PsecTag2B'nin içine dahil edilmiştir. PSecTag2B'nin Igk gen kismı bu işlem sırasında çıkarılmıştır. Aynıleri ve ters primerler, transferrin-tumstatin plazmidi yapmak amacıyla yalnızca Tumstatin içeren PsecTag2B'nin içine Transferrini dahil etmek için kullanılmıştır.

10 Plazmidlerin tamamı E.Coli bakterilerinin dH5α türü kullanılarak bytlmş ve QIAGEN® plasmid Giga kit kullanılarak güçlendirilmiştir. %1 agaroz jeli, TAE tamponunda hazırlanmış ve cDNA yapılarak incelemek için kullanılmıştır. Resimler, GelDoc XR® görüntüleme sistemi (Bio-Rad laboratories, Inc.CA) kullanılarak çekilmiştir.

15 Proteinin retilmesi ve saflaştırılması: Yukarıda bahsedildiği gibi plazmidleri oluşturmak için kullanılan PSecTag2B vektörü, besiyerinde salgılanan proteinin saflaştırılmasında yardımcı olabilen altıhistidin etiketine sahiptir. Plazmid, oluşturulan füzyon proteinlerini eksprese etmek amacıyla ARPE'de (insan retinal pigment epitelyum) transfekte edilmiştir. ARPE hücreleri, %80 hücre doluluk oranı elde edilene dek bytlmştir. ARPE hücrelerinin geçici transfeksiyonu, 20 Lipofectamine® 2000 reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TALON® metal afinite reçinesi, histidin ile etiketlenmiş proteini saflaştırmak için kullanılmıştır. BCA® Protein Deney Kiti, ayrılınan protein ierini hesaplamak için kullanılmıştır. Bir protein tahmin standart eğrisi, Bovin serum Albumin (Sigma Aldrich, MO) kullanılarak yapılmıştır.

25 ARPE hücrelerinin eş odaklı mikroskopisi: Tumstatin-EGFP plazmidi, hücrelerde EGFP geninin işlevini görmek amacıyla ARPE hücrelerinde incelenmiştir. ARPE hücreleri, %80 hücre doluluk oranı elde edilene dek bytlmştir. ARPE hücrelerinin geçici transfeksiyonu, Lipofectamine® 2000 reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür) boyasık hücre çekirdeği için yapılmıştır. Tumstatin-EGFP plazmidiyle transfeksiyon 30 yapılmayan ve yalnızca DAPI boyamasına sahip ARPE hücreleri, kontrol olarak kullanılmıştır.

Transferrin-tumstatin-EGFP ve tumstatin-EGFP'nin içselleştirilmesini incelemek için, protein koroid endotelial hücreleri, transferrin-tumstatin EGFP ve tumstatin-EGFP proteinine 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. 24 saat sonra, hücreler soğuk PBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve bunu 35 takiben soğuk asidik tampon (pH 5.0) ile yıkanmış ve %4 paraformaldehid kullanılarak

sabitlenmiş ve DAPI ile boyanmıştır. Hücreler, Nikon C1 si® eş odaklı mikroskop altında gözlemlenmiştir.

Transferrin-tumstatin-EGFP füzyon proteininin polarize salgılanması MDCK hücre hattı iyi

5 anlaşılabilir bir polarize sistem olmasından dolayı füzyon proteini polarize salgılama incelemesi için seçilmiştir. MDCK hücreleri, membran proteinlerini apikal veya bazolateral yüzeye teslim eden yollara sahiptir.

MDCK hücreleri, Transwell filtrelerine yerleştirilmiş ve Trans epitelyal elektriksel mukavemet (TEER), EVOM® mukavemet ölçer (World Percision Instruments, CA) kullanılarak 10 ölçülmüştür. TEER değerinin 300 Ω 'nin üzerinde olması durumunda, hücreler yukarıda tarif edildiği gibi tumstatin-EGFP veya transferrin-tumstatin-EGFP plazmidiyle transfekte edilmiştir. 24 saatlik transfeksiyon işleminden sonra, MDCK hücreleri sabitlenmiş ve DAPI çekirdek boyası kullanılarak boyanmıştır. Besiyeri, ayrı ayrı hem bazolateral hem de apikal taraftan 15 toplanmış ve füzyon proteinleri, BCA® protein deney kiti kullanılarak ölçülmüştür.

Hücre proliferasyonu deneyi: Koroid endotelyal hücreler (RF/6A), tumstatin proteini ve transferin-tumstatin proteininin VEGF 165'in etkisi altında hücrelerin proliferasyonu 20 üzerindeki etkisini incelemek için kullanılmıştır. Bir MTT deneyi, hücre proliferasyonunu değerlendirmek için kullanılmıştır.

Koroid endotelyal hücreler (RF/6A, geçit#9), takriben 20,000 hücre/kuyucuk besleme yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakaya yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca kuyucuğa yapışması sağlanmıştır. 24 saat sonra, hücreler 50 ng/ml'lik bir konsantrasyonda VEGF 165 25 solüsyonlarıyla (R&D systems, MN) inkübe edilmiştir. RF/6A hücrelerinin proliferasyonu, 50 ng/mL VEGF 165 kullanılarak indüklenmiştir. 96 kuyucuktan 3 kuyucuk, kontrol olarak korunmuş ve yalnızca RF/6A hücrelerini ve 50 ng/mL VEGF 165 içermiştir. Geri kalan kuyucuklar, çeşitli konsantrasyonlarda bevacizumab, tumstatin veya transferrin-tumstatin içermiştir.

30

Bu konsantrasyonlar, bevacizumab için kullanılmıştır. 1.5 – 500 nM. Besiyeri, dışarı emilmiş ve 200 μ l taze serum içermeyen besiyeri, 24 saatin sonunda her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. MTT reaktifi (Sigma Aldrich, MO), örn., 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrasodyum bromür, (pH 7.4'lük PBS'de çözünmüş 20 μ l'lik 5 mg/ml MTT) her bir kuyucuğa ilave edilmiş 35 ve 3 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Besiyeri dışarı emilmiş ve oluşan formazan

kristalleri, 200 µl DMSO içinde çözünmüştür. DMSO'nun ilave edilmesinden sonra, çözünen kristaller ve renk absorpsiyonu bir mikro plaka okuyucusu kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Sonraki deneyde, tumstatin veya transferrin-tumstatin, aşağıdaki konsantrasyonlarda bevacizumab yerine kullanılmıştır 7.8 ila 1000 nM. Yukarıda tarif edilenlerle aynı yöntemler takip edilmiştir. Transferrin-tumstatin proteini, 1.5 ila 500 nM'lik konsantrasyonlarda kullanılmıştır (her bir konsantrasyon için n=3).

Tüp oluşturma deneyi: Matrigel®, gece boyunca 4°C'de eritilmiştir. 48 kuyucuklu plaka, her bir kuyucuğun tabanına 75 µl'lik erimiş matrigel® ürününün dağılımı için kullanılmıştır. Tüp oluşturma deneyi için hazırlanmış Plaka, matrigel® ürününü polimerize etmek amacıyla 30 dakika boyunca 37°C'de tutulmuştur. Koroid endotelyal hücreler, matrigel® içeren 48 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Her bir kuyucuk, 6×10^3 hücre içermektedir. Üç kuyucuk, hiç tumstatin içermemiş ve kontrol olarak tutulmuştur. Ek 45 kuyucuk, proliferasyon deneyi için yukarıda tarif edilen konsantrasyonlarda tumstatin proteinini ihtiva etmiştir. Plaka, 18 saat boyunca 37°C'de tutulmuştur. Tüp oluşumu, ışık mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir. Transferrin-tumstatin ve bevacizumab protein deneylerini gerçekleştirmek için aynı yöntemler kullanılmıştır 0.15 ile 500 nM aralığındaki konsantrasyonlar (her bir konsantrasyon için n=3) kullanılmıştır.

Hücre göçü deneyi: *In vitro* hücre göçü deneyleri, Matrigel istila odası (8-µm gözenek boyutu, Becton Dickinson, MA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0.5 ml serum içermeyen besiyerindeki 5×10^5 hücrelik bir süspansiyon, Matrigel odasına ilave edilmiştir. Kuyucuklar, 1 ml'lik 10 ng/ml VEGF solüsyonuyla doldurulmuş. Odalar, %95 hava/%5 CO₂ inkübatörde 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Membranın alt yüzeyindeki hücreler, Haematoksilin ve Eosin boyasıyla boyanmıştır. İstila eden hücreler, 40x büyütülmüş Nikon mikroskopunda fotoğraflanmış ve her bir konsantrasyon için üç membrandan oluşan beş alanda sayılmıştır. Transferrin-tumstatin ve bevacizumab protein deneylerini gerçekleştirmek için aynı yöntemler kullanılmıştır 0.15 ile 500 nM aralığındaki konsantrasyonlar (her bir konsantrasyon için n=3) kullanılmıştır.

Moleküler yerleştirme: "Accelry's discovery visualizer v2.5.1.9167" (Accelry's, Inc.CA), tumstatin ve transferrin-tumstatinin αVβ3 integrin reseptörüne *in silico* yerleştirilmesi için incelenmiştir. Kollajenöz olmayan kollajen IV etki alanı (PDB #1LI1) kristal yapısı, tumstatine ilişkin bir homolog model geliştirmek için bir referans olarak kullanılmıştır. İyon içermeyen insan serum transferrinin kristal yapısı (PDB # 2HAV), transferrine ilişkin bir

homolog model geliştirmek için bir referans olarak kullanılmıştır. Proteinler hazırlanmış ve enerji asgarileştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Transferrin-tumstatin füzyon proteinleri, tumstatinin transferrin C terminaline bir peptid bağıyla kaynaştırılmasın vasıtasıyla oluşturulmuştur. $\alpha V\beta 3$ integrin yerleştirme incelemeleriyle birlikte tumstatine ilişkin bir tumstatin homoloji modeli, bir ligand olarak kullanılmış ve $\alpha V\beta 3$ integrinin (PDB # 1JV2) hücre dışı etki alanının kristal yapısına yerleştirilmiştir. $\alpha V\beta 3$ integrin yerleştirme incelemeleriyle birlikte transferrin-tumstatine ilişkin olarak, füzyon proteini, $\alpha V\beta 3$ integrin reseptörüne (PDB # 1JV2) yerleştirilmiştir.

Apoptoz deneyi: Apoptoz işlemi, DeadEnd kalorimetrik TUNEL (TdT aracılı dUTP çentik uğlu etiketleme) sistemi (Promega Corporation, WI) kullanılarak incelenmiştir. Koroid endotelial hücreler (1×10^5 hücre / kuyucuk), 12 kuyucuklu plakadaki lamele yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca yapışmasın sağlanmıştır. 24 saat sonra, hücreler, farklı konsantrasyonlarda bevacizumab (1, 10 ve 100 nM), tumstatin (100, 250 ve 500 nM) ve transferrin-tumstatin (1, 10 ve 100 nM) proteine maruz bırakılmıştır. Protein maruziyetinden 24 saat sonra, hücreler yikanmış %4 paraformaldehid ile sabitlenmiş ve fosfat tamponunda (pH 7.4) %0.2 Triton® X-100 solüsyonu kullanılarak geirgenliğ sağlanmıştır. Hücreler, DeadEnd™ kolorimetrik TUNEL deneyi sistemiyle birlikte sağlanan standart protokol uyarınca boyanmıştır. Hücreler, 40x büyütölmüş bir ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Kahverengi Lağım Farelerinde CNV İndüksiyonu ve koroid düz yuvalar: Erişkin erkek kahverengi lağım fareleri (150-180g), Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, IN, ABD) şirketinden satın alınmıştır. Sıçanlara 40 ila 80 mg/ml ketamin ve 10-12 mg/kg ksilazin karışımının intraperitoneal yolla enjekte edilmesi vasıtasıyla anestezi uygulanmıştır. Lazer yanıkla indüksiyonu, aşağdaki gibi gerçekleştirilmiştir. Göz bebekleri, %1 tropikamid solüsyonunun topikal yolla uygulanmasın vasıtasıyla genişletilmiştir. Göz dibi, göze bir lamel yerleştirildikten ve %2.5 hipromelloz solüsyonunun damlatılmasından sonra görselleştirilmiştir. Optik sinirle ortak merkezli olan sekiz lazer noktası (100 μ m, 150 mW, 100 ms), 532 nm diyot lazer (Oculight Glx; Iridex Inc., Mountain View, CA, ABD) ve yarı amba (Zeiss yarı amba 30SL; Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, CA, ABD) kullanılarak her bir farenin sağ gözüne yerleştirilmiştir. Sol göz, her bir hayvan için bir kontrol olarak kullanılmıştır. Bruch membran kopmasın "baloncuk oluşumu" son noktasın vasıtasıyla doğrulanmıştır. Lazer uygulandıktan sonra intraoküler (göz içi) kanama sergileyen fareler, incelemiden çıkarılmıştır. Lazer yanıkla indüksiyonundan sonra 14 gün boyunca CNV lezyonlarının gelişmesine izin verilmiştir. 14 günün sonunda, sıçanlara aşağdaki tedavilerin biri intravitreal yolla

uygulanmıştı (a) PBS pH 7.4, (b) bevacizumab, (c) tumstatin protein ve (d) transferrin-tumstatin protein. Farelere 14 günlük tedavinin sonunda tenazi uygulanmışı ve gözler karılmıştı

- 5 Koroid düz yuvaya ilişkin olarak, farelere 80 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin karışımının intraperitoneal enjeksiyonu kullanılarak anestezi uygulanmıştı. Farelere, 10 ml'lik %4 paraformaldehid ile yapılan infüzyonu takiben 10 ml PBS (pH 7.4) aşılanmıştı. Son olarak 4 ml'lik 50 mg/ml flöresin izotiyosiyanat (FITC)-dekstran solüsyonu (2×10^6 Da) aşılanmıştı. Daha sonra gözler yerinden karılmışı ve düz yuvalar hazırlanmıştı. Düz yuvalar, 488 ve 568 nm uyarım dalga boyları kullanılarak Nikon EZ-CI eş odaklı mikroskop ile görüntülenmiştir. CNV alanları ImageJ yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.
- 10

Sonuçlar

- 15 Plazmidlerin oluşturulması Sırasıyla 5813, 6521, 8550 ve 7842 baz çifti olan tumstatin, tumstatin-EGFP, transferrin-tumstatin-EGFP ve transferrin-tumstatin plazmidinin %1 agaroz jel resmi çekilmiştir (gösterilmemekte). 1Kb'lik DNA merdiveni, boyut işaretleyicisi olarak alıştırılmıştı. Tumstatin (28 kDa) ve transferrin-tumstatin-EGFP'nin (135 kDa) SDS jel elektroforez resmi de çekilmiştir (gösterilmemekte). Aynı zamanda PSecTag2B'ye yerleştirildikten sonra tumstatine ilişkin baz çifti sekanslama sonucuna yönelik bir elektroferogram da alınmıştı. Sekanslama işlemi, kapiler elektroforez (Applied Biosystems, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tumstatin-EGFP ekspresyonu, ARPE hücrelerince incelenmiş ve görüntüler çekilmiştir (gösterilmemekte). Tumstatin-EGFP proteinini eksprese eden ARPE hücrelerinin eş odaklı mikroskopi resimleri (100X) de çekilmiştir (gösterilmemekte). DAPI boyaması hücre çekirdeğini boyamak için gerçekleştirilmiştir. Hiçbir tumstatin-EGFP transfeksiyonuna sahip ARPE hücreleri, herhangi bir arka plan floresansını indirmek amacıyla kontrol olarak kullanılmıştı.
- 20
- 25

- Transferrin-tumstatin-EGFP proteininin içselleştirilmesi belirlenmiştir. Yoğun EGFP sinyali, transferrin-tumstatin-EGFP proteinine olan maruziyetten sonra RF/6A hücrelerinde gözlemlenmiştir. Hücre yüzeyindeki herhangi bir proteinin asidik tampon yıkaması ile karılması beklenmiştir. Bu, hücre membranını oluşturan lipid fosfolipidlerinin pKa'sından dolay olmuştur. Fosfat grupları en düşük pKa değeri, ~2 olmakta ve bu da fosfat grupları yüklenmemiş H_3PO_4 durumunda olduğunu veya pH 2 değerinde tek negatif yüke ($H_2PO_4^-$) sahip olduğunu işaret etmektedir. ~2'den daha yüksek olan pH değerinde, iki negatif
- 30
- 35

yüke (HPO_4^{-2}) sahip olma olasılığı artmaktadır. Dolayısıyla EGFP sinyalinin yalnızca içselleştirilmiş proteinden dolayı olması gerekmiştir. RF/6A hücrelerinin tumstatin-EGFP proteinine olan maruziyeti, gözlemlenebilir hiçbir içselleştirmeye yol açmamıştır.

5 Transferrin-tumstatin-EGFP füzyon proteininin polarize salgılaması

MDCK hücreleri, transferrin-tumstatin-EGFP proteininin bazolateral salgılamasını incelemek için kullanılmıştır. Bu deneyde çekilen resimler, transferrin-tumstatin-EGFP proteininin hücrelerin bazolateral tarafında salgılandığını göstermiştir. Bazolateral tarafı eş odaklı mikroskop altında incelenmesi durumunda hücre sınırları görünür olmamıştır. Bu, ışığın mikroskopa geri yansımaları olarak sağlamayan ve aynı zamanda hücrelere giden ışık yolunu engelleyebilen transwell filtrelerinin gözenekli yapısının sonucu olabilmektedir. Bu, filtrenin bazolateral tarafından gelen hücrelerin görünebilir eksikliğine ilişkin olabilir bir sebep olabilmektedir. Hücrelerin bazolateral tarafından görünmemesine rağmen, DAPI boyaması ve salgılanan proteinden gelen EGFP sinyali, bazolateral tarafta açıkça gözlemlenebilmektedir. Hücreler, filtrenin apikal tarafında eş odaklı mikroskop altında incelenmesi durumunda açıkça gözlemlenebilmektedir. Protein salgılaması hücrelerin bazolateral yüzeyinde gözlemlenmiştir. Bu tür bir oluşum, en az iki yolla açıklanabilmektedir. Protein, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanabilmekte veya protein filtreye (bazolateral olarak salgılanan protein) gömülebilmektedir. Bazolateral ve apikal besiyerinde salgılanan proteinin miktarının ölçümü, transferrin-tumstatin-EGFP proteininin salgılayıcı yolağı doğrulamıştır.

Apikal ve bazolateral besiyerinden toplanan transferrin-tumstatin-EGFP proteini saflaştırılmıştır. Apikal ve bazolateral besiyerindeki protein içeriği belirlenmiştir. Apikal besiyeri %23.17 ve bazolateral taraf %76.83 oranında transferrin-tumstatin-EGFP proteini ihtiva etmiştir. Her iki besiyerinde salgılanan toplam proteinin %100 olduğu kabul edilmiştir. Tumstatin-EGFP proteini (kontrol), polarize MDCK hücresi incelemesinin tamamlanmasından sonra toplanan apikal ve bazolateral besiyerinden saflaştırılmıştır. Apikal besiyeri %68.84 ve bazolateral taraf ise %31.16 oranında tumstatin-EGFP proteini ihtiva etmiştir. Bu veriler, transferrin-tumstatin füzyon proteinine sahip olunmasından füzyon proteininin bazolateral salgılamasını çarpıcı bir şekilde arttırdığını göstermektedir. Transferrin yokluğunda, tumstatin, füzyon proteininde transferrin mevcudiyetinde apikal olarak salgılanan %23.17 oranına kıyasla daha fazla apikal tarafta (%68.84) salgılanmıştır.

35 Hücre proliferasyonu deneyi: VEGF 165 vasıtasıyla indüklenen hücre proliferasyonu, tumstatin

ve transferrin-tumstatin proteininin mevcudiyeti vasıtasıyla inhibe edilmiştir. Şekil 1, tumstatin, transferrin-tumstatin ve bevacizumab proteinlerinin etkisi altındaki hücre proliferasyonunu göstermektedir. MTT deneyi, VEGF (50 ng/ml) ile stimüle edilen koroid endotelial hücre proliferasyonu üzerinde tumstatin (●), transferrin-tumstatin (Δ) ve bevacizumab (•) anti-proliferatif aktivitesini değerlendirmek için kullanılmıştır. MTT reaktifiyle yapılan tedaviden sonraki absorbans, UV-Vis spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Veriler, $n = 3$ 'e ilişkin olarak $\pm$ S.D. şeklinde ifade edilmiştir. Grafiğin gösterdiği gibi, transferrin-tumstatin proteini, tek başına tumstatine kıyasla hücre proliferasyonunun indirgenmesinde oldukça etkili olmuştur. Transferrin-tumstatin proteininin IC_{50} değerinin 5.97 nM olduğu keşfedilmiştir. Bu değer, tek başına tumstatin proteinine ilişkin 185.7 nM olmuştur. Aynı zamanda Bevacizumab, hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yönelik test edilmiş ve etkililiğinin IC_{50} 7.78 nM olduğu keşfedilmiştir.

Transferrin-tumstatin proteini, Bevacizumaba kıyasla hücre proliferasyonunun inhibe edilmesinde daha verimli olmuştur. Transferrin-tumstatin, aynı zamanda bevacizumaba kıyasla proteinin IC_{50} 'si üzerinde daha büyük sayıda hücreyi inhibe edebilmiştir. 15.6 nM'lik bir konsantrasyonda, transferrin-tumstatin inhibisyonu neredeyse %84 olurken bevacizumab inhibisyonu ~%63 olmuştur.

Tüp oluşturma deneyi: Tüp oluşumunun temsili resimleri (gösterilmemekte), farklı tumstatin, transferrin-tumstatin ve bevacizumab konsantrasyonlarında çekilmiştir. Tüp oluşumunun tumstatin ve transferrin-tumstatin protein konsantrasyonundaki artışla azaldığı görülmüştür. Hem tumstatin hem de transferrin-tumstatin proteini, tüp oluşumunu inhibe edebilirken bevacizumab etkisi altında dikkat edilebilir hiçbir tüp oluşumu inhibisyonu gözlemlenmemiştir. Transferrin-tumstatin füzyon proteini kullanılarak gerçekleştirilen tüp oluşum deneyinde tüplerin oluşumunun hemen hemen tamamen önlenmesi, 125 nM'lik konsantrasyonda gözlemlenmiştir. Şekil 2, test edilen üç proteinin tamamında çift kırılganlık yerleştirme grafiğini göstermektedir. Tüp oluşumu, 18 saat sonra değerlendirilmiştir. Veriler, $n = 3$ 'e ilişkin olarak ortalama $\pm$ S.D. olarak ifade edilmektedir.

İstila deneyi: İstila deneyi, *in vivo* olarak bazal membran taklit etmekte ve hücreler, VEGF gibi kimyasal olarak çekici maddeye doğru göç etme eğiliminde olmaktadır. Resimler, tumstatin ve transferrin-tumstatin proteininin etkisi altında istilacı hücrelerin sayısındaki azalmayı göstermiştir. Matrigel istila odası membranla istila eden hücrelerin sayısındaki çarpıcı azalma, tumstatin proteininin konsantrasyonu besiyerinde artarken gözlemlenmiştir. Aynı zamanda

tumstatin ve transferrin-tumstatin etkisi altında membran istila eden hücrelerin resimleri (gösterilmemekte) de çekilmiştir. VEGF (10 ng/ml), kimyasal olarak çekici madde olarak kullanılmış ve tumstatin veya transferrin-tumstatin proteini yokluğunda membran önemli ölçüde istila edildiği gösterilmiştir. Ancak, Membran istilasını indüklenmesindeki VEGF etkisi, VEGF'nin mevcut olması rağmen iki proteinin herhangi birinin mevcudiyetinde indirgenmiştir. Bu, tumstatin ve transferrin-tumstatin proteininin hücre göçünün indirgenmesindeki etkililiğini ve VEGF gibi uyarıcıların mevcudiyetinde bile olan istilayı işaret etmektedir.

İstila, yalnızca tumstatin proteinine kıyasla transferrin-tumstatin proteini vasıtasıyla önemli ölçüde azaltılmıştır. Transferrin-tumstatin proteininin etkisi, 15 ile 125 nM'lik ($P < 0.05$) konsantrasyonlarda tumstatinden çok farklı olmuştur. Ancak, 250 ile 500 nM'lik daha yüksek konsantrasyonlarda fark çok belirgin ölçüde olmamıştır. Bu, istila etme eğiliminin doymuş hale geldiğini (hücreler daha fazla istilalanmamakta ve VEGF'ye doğru çekilmekte) ve ek istila, daha yüksek konsantrasyonlarda etkilenmemiştir. Bu etki, hücre proliferasyonunda gözlemlenenen farklı olmuş ve tüp oluşumu, iki protein kullanılarak incelenmiştir. Bevacizumab, transferrin-tumstatine ilişkin 12.14 nM'ye kıyasla daha düşük olan 8.0 nM'lik IC_{50} değeri sergilemiş ve hücre istilasında VEGF'nin önemli rolünü işaret etmiştir.

Moleküler yerleştirme: Moleküler modeller, $\alpha\beta3$ integrin reseptörüne yerleştirilen tumstatin ve transferrin-tumstatine ilişkin *in silico* olarak yapılmıştır. İki farklı yerleştirilen proteinlere ilişkin enerji değerleri, transferrin-tumstatinin yerleştirilmesinin (-130.43 kcal/mol'lük etkileşim enerjisi), tek başına tumstatinin yerleştirilmesinden (-113.28 kcal/mol'lük etkileşim enerjisi) enerjik olarak daha uygun olduğunu işaret etmiştir.

Apoptoz deneyi: Tumstatin, transferrin-tumstatin ve bevacizumab etkisi altındaki apoptozu sergileyen hücrelerin temsili resimleri (gösterilmemekte) çekilmiştir. Tumstatin ve transferrin-tumstatin proteini, test edilen üç konsantrasyonun tamamında (sırasıyla 100, 250 ve 500 nM ve 1, 10 ve 100 nM) koroid endotelyal hücrelerde apoptozu indüklemiştir. Bevacizumab (1, 10 ve 100 nM konsantrasyonlar) vasıtasıyla hiçbir belirgin apoptoz indüklenmemiş ve kontrol PBS ile gözlemlenene benzer olmuştur.

Kahverengi Lağım Farelerinde CNV İndüksiyonu ve koroid düz yuvalar:

Transferrin-tumstatinin bevacizumab ve tumstatine (Şekil 3) kıyasla lazer ile indüklenmiş CNV

lezyon alanında daha etkili olduğu keşfedilmiştir. CNV lezyon boyutu, koroid düz yuvalardaki 14 günlük tedavinin sonunda ölçülmüştür. CNV lezyon boyutunun bir kantitatif kıyaslaması Şekil 3'te gösterilmektedir (* tumstatin tedavisine kıyasla $p < 0.05$ 'i işaret etmektedir. † bevacizumaba kıyasla $p < 0.05$ 'i işaret etmektedir. Veriler, her bir gruptaki $n = 42-48$ lezyona ilişkin olarak ortalama $\pm$ S.D. şeklinde ifade edilmektedir). Transferrin-tumstatin ile tedavi edilmiş fareler, bevacizumab ve tumstatin ile tedavi edilmiş farelere kıyasla önemli ölçüde daha düşük lezyon boyutuna sahip olmuştur.

Tartışma

Mevcut buluşun bazı yönleri, tumstatine bağlanan transferrini içeren bir rekombinant protein sağlamaktadır. Mevcut buluşun rekombinant proteinleri (özellikle transferrin-tumstatin rekombinant (örneğin füzyon) proteini), $\alpha V\beta 3$ integrine artmış bağlanmaya sahip olma ve tek başına tumstatine kıyasla sırasıyla 21, 25 ve 31 kat daha yüksek aktiviteyle tüp oluşumunu, endotelial hücre proliferasyonunu ve göçü inhibe etmiştir. İlaveten, transferrin-tumstatinin bevacizumaba kıyasla koroid endotelial hücre proliferasyonunun ve tüp oluşumunun inhibe edilmesinde daha etkili olduğu gösterilmiştir. Dahası, transferrin-tumstatin rekombinant proteini, tek başına transferrine kıyasla CNV'nin *in vivo* olarak inhibe edilmesine yönelik üstün bir verimlilik sergilemiştir. Mevcut buluşun diğer yönleri, mevcut buluşta tanımlanmış gibi tumstatine bağlı transferrin içeren bir rekombinant proteini (diğer bir ifadeyle transferrin-tumstatin füzyon proteini) üretme kabiliyetine sahip bir plazmid ekspresyon sistemi sağlamaktadır. Bazı yapılandırılmalarda, mevcut buluşun plazmid ekspresyon sistemi, proteinin tercihen birbirine karşı hücre mono tabakalarındaki bazolateral tarafına doğru salgılanması olarak sağlamaktadır.

Deneyler, transferrin-tumstatin rekombinant proteininin sırasıyla tumstatin (IC_{50} 185.7 nM) ve bevacizumaba (IC_{50} 7.78 nM) kıyasla 31 kat ve 1,3 kat daha büyük potansiyele sahip endotelial hücre proliferasyonunu (IC_{50} 5.97 nM) inhibe etmiştir. Herhangi bir kurama bağlı kalmaksızın, transferrin-tumstatinin tumstatine kıyasla 31 kat daha büyük etkililiği ve bevacizumaba kıyasla 1.3 kat daha iyi aktivitesinin iki olası mekanizmanın sonucu olduğuna inanılmaktadır. İlk olarak, transferrinin tumstatinin $\alpha V\beta 3$ integrin reseptörüne bağlanma etkililiğini geliştirdiğine inanılmaktadır. *In silico* modelleme kullanılarak, mevcut buluş sahipleri, transferrinin $\alpha V\beta 3$ integrinle olan bağlanma etkileşimlerine sahip olduğunu belirlemiştir. Aynı zamanda *in silico* modellemesi, füzyon proteininin tek başına tumstatine kıyasla daha iyi etkileşim enerjisi sergilediğini (-130.43 kcal/mol'e karşı -113.28 kcal/mol) göstermiştir. Rekombinant

protein transferrin-tumstatinin gelişmiş aktivitesinin ikinci olasılık mekanizması füzyon proteininin içselleştirilmesi olduğuna inanılmaktadır. Transferrin-tumstatinin koroid endotelial hücreler vasıtasıyla içselleştirildiği gözlemlenmiştir. Bu içselleştirme, tumstatin için belirgin olmamıştır.

- 5 Transferrin-tumstatinin aynı zamanda yalnızca içselleştirmeden sonra aktif hale getirilen bir yolak vasıtasıyla hareket etmesi mümkündür. Endostatin ve anjiyostatin gibi diğer endojenöz antianjiyojenik proteinlerinin fibronektin ve vitronektin gibi RGD ihtiva eden proteinlerle birlikte kompleksler oluşturduğu gösterilmiştir. Kompleks oluşumu, bu anjiyojenik proteinlerin aktivitesi için esansiyel olmakta ve bu proteinlerin fibronektin veya vitronektinden yoksun olan farelerde aktif olmadıkları keşfedilmiştir. Fibronektin, önemli miktarda ($\sim 3.0 \mu\text{g}/10^5$ hücre/gün) endotelial hücrelerde salgılanmakta ve içselleştirildikten sonra, hücrenin sitoplazmasında fibronektin gibi RGD ihtiva eden proteinlerin birikmesi, apoptozu indüklemiştir. Dolayısıyla, transferrin-tumstatin füzyonunun fibronektin gibi RGD içeren proteinlerin sitoplazmik içeriğini arttırması ve böylelikle hücrelerin apoptozuna sebep olması mümkündür. Bu olasılık, tumstatin için belirgin olmamakta, çünkü tumstatin, deneylerde herhangi bir içselleştirme belirtisi sergilememiştir. Tumstatin için, $\alpha\text{V}\beta 3$ integrine bağlanması başlıca eylem mekanizması olduğuna inanılmaktadır.
- 10
- 15

- Yeniden, herhangi bir kurama bağlı kalmaksızın, transferrin-tumstatin rekombinant proteininin tek başına tumstatinle benzer şekilde protein sentezini inhibe etmek ve apoptozu indüklemek suretiyle hücre proliferasyonunu inhibe ettiğine inanılmaktadır. Mevcut buluş sahipleri, tek başına tumstatine kıyasla rekombinant transferrin-tumstatin proteinine ilişkin daha büyük anti-apoptotik aktivite gözlemlenmiştir. Bevacizumab, koroid endotelial hücrelerde herhangi bir gözlemlenebilir aktivite uygulamamıştır. Apoptotik aktivite eksikliği, daha önceden korneal endotelial hücreler, retinal ganglion hücreleri ve retina-RPE-koroid kültürlerde bevacizumaba yönelik rapor edilmiştir.
- 20
- 25

- Deneyler, transferrin-tumstatin rekombinant proteininin tek başına tumstatine kıyasla koroid endotelial hücrelerde tüp oluşumunu 25 kat daha fazla inhibe ettiğini göstermiştir. Transferrin-tumstatin rekombinant proteininin içselleştirilmesinin diğer aktif hale getirilmiş endotelial hücrelere daha güçlü bir şekilde bağlanabilen ve tüp oluşumunu önleyebilen fibronektin ve transferrin-tumstatin kompleksine yol açtığına inanılmaktadır. Bevacizumab, koroid endotelial hücrelerde tüp oluşumunun fark edilebilir herhangi bir şekilde inhibe edildiğini sergilememiştir. Genellikle, tüp oluşumunun bazal membranda mevcut olan kollajen IV, VIII, XV, XVIII ve laminin 8 ve 10'un etkisi altında meydana geldiğine inanılmaktadır. Bu bileşenler, endotelial hücrelerin kararlılığını yapışmasını ve göçünü teşvik etme eğiliminde
- 30
- 35

olmaktadır. Aynı zamanda VEGF gibi büyüme faktörleri, bazal membran matrisinde mevcut olmaktadır. Ancak, VEGF, tüp oluşumunun hücre dışı matrisindeki VEGF'yi nötr hale getirmek suretiyle hareket ettiği bilinen bevacizumab'ın mevcudiyetinde bile yüksek verimlilikte meydana gelmesinden dolayı tüp oluşumunda önemli bir rol oynar gibi görünmemektedir.

5

Anjiyojenez sırasında, bazal membranın bozulmasından sonra, endotelial hücrelerin, geçici bazal membran benzeri matrise göçtüğüne inanılmaktadır. VEGF'nin endotelial hücrelerin göçünde önemli bir rol oynadığı bilinmekte ve mevcut buluş sahipleri, Boyden odası hücre göçü deneyi kullanılarak bu işlemi incelemiştir. Bu deneyin amaçlarından biri, ilaveten kan damarlar oluşturan endotelial hücreler vasıtasıyla bazal membranın istilasının üzerinde VEGF'nin etkisinin değerlendirilmesi. 10 ng/ml VEGF'nin etkisi altındaki hücre göçü, tek başına tumstatinin kullanılmasıyla kıyasla rekombinant protein transferrin-tumstatinin kullanılması durumunda çarpıcı bir şekilde daha düşük olmuştur. Tumstatinin odaksal adezyon kinaz (FAK) fosforlanması inhibe ettiği gösterilmiştir. FAK aktivasyonunun olmaması hücre göçünün inhibisyonuna yol açmaktadır. Rekombinant protein transferrin-tumstatinin daha büyük bir ölçüde olması rağmen benzer etkiler uyguladığına inanılmaktadır.

Transferrinin tumstatine kaynaştırılması diğer ana avantaj, füzyon proteininin ayrıcalıklı bazolateral salgılamasıdır. Rekombinant protein transferrin-tumstatinin yaklaşık %75'i, tek başına tumstatinin yalnızca ~%35'ine kıyasla hücrenin bazolateral tarafına doğru salgılanmıştır. Bu, rekombinant protein transferrin-tumstatine intravitreal ilaç teslimatı takiben çoğalan koroid endotelial hücrelerini hedef alma kabiliyetini sağlamaktadır. Terapötik maddelerin intravitreal teslimatından sonra, RPE hücreleri, bu hücrelerin sıkı birleşme yeri yapısından dolayı terapötik maddelerin daha fazla hareket etmemesi için bir bariyer olarak hareket etmektedir. Transferrin-tumstatin, bazolateral olarak salgılamak yapan yapı sayesinde tumstatin veya bevacizumab üzerinde avantajlı olmaktadır. İntravitreal yolla uygulanan transferrin-tumstatin, tumstatini koroid endotelial hücrelere doğru ve hastalıklı bölgesinin yakınına yerleştirmektedir.

In vivo incelemeler, transferrin-tumstatinin koroid neovaskülarizasyonun inhibe edilmesindeki üstün verimliliğini işaret etmiştir. Transferrin-tumstatinle tedavi edilen BN fare gözlerindeki lezyon boyutu, bevacizumab veya tumstatin ile tedavi edilen farelere kıyasla çarpıcı bir şekilde daha düşük olmuştur.

Bu sonuçlar, diğer hususların yanı sıra (a) transferrin-tumstatinin bevacizumabdan daha iyi

hücre proliferasyonu inhibitörü olması (b) transferrin-tumstatinin bevacizumabda mevcut olmayan bir şekilde koroid endotel hücrelerde hücre apoptozunu indüklemesi, (c) transferrin-tumstatinin tüp oluşumunu inhibe ederken bevacizumabın tüp oluşumunun inhibe edilmesinde etkisiz olması sayesinde transferrin-tumstatinin bevacizumabdan daha iyi bir terapötik madde olduğunu işaret etmektedir. Tek başına tumstatine kıyasla, transferrin-tumstatin, neovaskülarizasyonu değerlendirmek için kullanılan in vitro deneylerin tamamında ≥ 20 kat potansiyel uygulamaktadır. Daha çarpıcı olarak ise, transferrin-tumstatinin bevacizumab ve tumstatine kıyasla lazerle indüklenmiş CNV'nin indirgenmesinde *in vivo* olarak daha etkili olmasıdır.

ÖRNEK 2

Tf-T proteininin üretimi ve saflaştırılması Plazmidleri oluşturmak için kullanılan PSecTag2B vektörü, besiyerinde salgılanan proteinin saflaştırılmasına yardımcı olan alt histidin etiketine sahiptir. ARPE hücreleri (geçit # 24), %80 hücre doluluk oranına gelene kadar 12 kuyucuklu plakada büyütülmüştür. Güçlendirilmiş Tf-T (transferrin-tumstatin) plasmid (PSecTag2B vektöründe klonlanmış), DMEM/F12 besiyerinde seyreltilmiş ve lipofektamin reaktifiyle karıştırılmıştır. Plazmid ve lipofektamin kompleksi, hücreleri ve besiyerlerini ihtiva eden her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. Hücreler, 24 saat boyunca %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda, besiyeri toplanmış ve saflaştırılmıştır. TALON® metal afinite reçinesi, füzyon proteinini saflaştırmak için kullanılmıştır. Hücrelerden toplanan besiyeri, reçine ile karıştırılmış ve hafif karıştırılarak oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Reçineye bağlanmış protein, pH 7.0 değerinde 50 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür ve 150 mM imidazol sulu solüsyonu kullanılarak ayrılmıştır. Daha sonra, imidazol, imidazol olmaksızın daha küçük bir tampona karşı diyaliz uygulanması (2000 MWCO diyaliz torbası kullanılarak) vasıtasıyla protein solüsyonundan çıkarılmıştır. BCA® Protein Deney Kiti, protein içeriğini tahmin etmek için kullanılmıştır. Üç ayrı parti, tarif edildiği gibi saflaştırılmış ve SDS jel elektroforez (PAGE), floresans spektroskopisi ve dairesel dikroizm kullanılarak çoğalabilirlik bakımından değerlendirilmiştir.

Jel elektroforezi için, 5 µg protein, 4x yükleme boyasıyla karıştırılmış ve 5 dakika boyunca kaynatılmıştır. Numuneler, %4-20 gradyan SDS-PAGE jeline (Bio-Rad, Hercules, CA) yerleştirilmiştir. Uzak UV spektral bölgedeki (190-250 nm) dairesel dikroizm (CD), Tf-T ve tumstatin ikincil yapısını incelemek için kullanılmıştır. CD spektrumları AVIV modeli 62 DS spektropolarimetrede (AVIV Biomedical, Inc., NJ) elde edilmiştir. Protein solüsyonu, 1 mm

yolak uzunluklu kuvars hücreesine aktarılmış ve termostatik hücre tutucusuna yerleştirilmiştir. Veriler, 2 nm bant genişliği kullanılarak 0.25 nm'lik aralıklarda toplanmıştır. 100 nM'lik tumstatin ve Tf-T solüsyonu, 5 mM fosfat tamponunda (pH 7.4) hazırlanmıştır. Floresans spektroskopisi işlemi, proteinin 280 nm'de uyarılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Emisyon spektrumu, 300-400 nm dalga boylarından toplanmıştır. Deney, Spectramax M5 mikro plaka okuyucusunda (Molecular Devices, LLC) gerçekleştirilmiştir.

Tumstatin ve Tf-T proteininin karakterizasyonu: Tf-T'nin karakterizasyonu, SDS jel elektroforezi (PAGE), boyut dışlama kromatografisi (SEC), dairesel dikroizim ve dinamik ışık saçılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jel elektroforezi için, 5 µg protein, 4x yükleme boyasıyla karıştırılmış ve 5 dakika boyunca kaynatılmıştır. Numuneler, %4 ila %20 gradyan SDS-PAGE jeline (Bio-Rad, Hercules, CA) yerleştirilmiştir. SEC, Agilent SEC-3 kolonu (I.D. 7.8 mm ve uzunluk 300 mm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjekte edilen numunelere ilişkin akış hızı 2 ml/dakika olmuştur. Enjekte edilen numune hacmi, 25 µl olmuştur. SEC için kullanılan mobil faz, fosfat tampon salin (PBS) pH 7.4 olmuştur.

Uzak UV spektral bölgedeki CD, Tf-T ve tumstatin ikincil yapılarını incelemek için kullanılmıştır. CD spektrumları AVIV modeli 62 DS spektropolarimetrede (AVIV Biomedical, Inc., NJ) elde edilmiştir. Protein solüsyonu, 1 mm yolak uzunluklu kuvars hücreesine aktarılmış ve termostatik hücre tutucusuna yerleştirilmiştir. Veriler, 2 nm bant genişliği kullanılarak 0.25 nm'lik aralıklarda toplanmıştır. Malvern Nanosizer, 1 mg/ml tumstatin ve Tf-T solüsyonunun partikül boyutunu değerlendirmek için kullanılmıştır.

Tumstatin ve Tf-T füzyon proteininin salgılanması: Protein salgılama incelemesi için, RPE hücre monokatkman Tf-T'nin salgılama desenini değerlendirmek için seçilmiştir. İlk olarak hücreler, elektriksel mukavemet, sıkı birleşme yeri oluşumu ve nükleer boyama deseni bakımından karakterize edilmiştir. RPE hücreleri, Transwell filtrelerine yerleştirilmiş ve transepitelyal elektriksel mukavemet (TEER), EVOM® mukavemet ölçer (World Precision Instruments, CA) kullanılarak ölçülmüştür. TEER'in >200 Ω.cm² olması durumunda sıkı birleşme yeri oluşumu da ZO-1 boyamasıyla doğrulanmıştır. TEER >200 Ω.cm² değerine sahip hücrelere sahip filtreler, %10 formalinin (0.5 ml apikal tarafta ve 1.5 ml bazolateral tarafta) ilave edilmesiyle oda sıcaklığında 30 dakika boyunca sabitlenmiştir. Hücreler, ilaveten oda sıcaklığında 1 saat boyunca %5 keçi serumu (0.5 ml apikal tarafta) içeren %0.1 triton X 100 ilave edilerek daha geçirgen hale getirilmiştir. 1: 100 dilüsyonlar halinde seyreltilmiş Birincil ZO1 antikoru (0.5 apikal tarafta), hücrelere ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca

inkübe edilmiştir. 1: 100 dilüsyonlar halinde seyreltilmiş ikincil FITC ile etiketlenmiş antikor (0.5 apikal tarafta), hücrelere ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler, çekirdekleri boyamak amacıyla 5 dakika boyunca 3 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile inkübe edilmiştir. Filtreler, keskin bir bıçakla kesilmiş ve lamele aktarılmış ve SuperMount yerleştirme besiyeri (BioGenex, CA) ilave edilerek sabitlenmiş ve eş odaklı mikroskop altında görüntülenmiştir.

Salgılama desenini değerlendirmek için, hücreler, apikal tarafta 200 µg tumstatin veya Tf-T proteini ile inkübe edilmiştir. 24 saatlik transfeksiyondan sonra, besiyeri, ayrı ayrı hem bazolateral hem de apikal taraftan toplanmış ve TALON metal afinite reçinesi kullanılarak saflaştırılmıştır. Tumstatin ve Tf-T proteinleri, BCA® protein deney kiti kullanılarak ölçülmüştür.

Tf-T proteininin kararlılığı: Tf-T proteini, (a) pH 4.0 ve 8.0 tamponlarında, (b) pH 7.0'da tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) ve fosfat sitrat tamponunda, ve (c) pH 7.0'de 10 mM ile 250 mM aralığındaki iyonik güçlü sodyum klorürde kararlılığına ilişkin olarak değerlendirilmiştir. Protein solüsyonlar, 48 saat boyunca yukarıda bahsedilen koşullara maruz bırakılmış ve dairesel dikroizim ve floresans spektroskopisi kullanılarak kararlılığı değerlendirilmiştir. SDS PAGE, pH kararlılığını değerlendirmek için dairesel dikroizim ve floresans spektroskopisine ek olarak kullanılmıştır.

CNV ile indüklenmiş Kahverengi Lağım Farelerinde erken zaman noktalı etkinlik çalışmaları:

Erişkin erkek kahverengi lağım fareleri (150-180g), Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, IN, USA) şirketinden satın alınmıştır. Sıçanlara 40-80 mg/ml ketamin ve 10-12 mg/kg ksilazin karışımının intraperitoneal yolla enjekte edilmesi vasıtasıyla anestezi uygulanmıştır. Lazer yanıklarla indüksiyonu, Örnek 1'de tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Lazer yanıklarla indüksiyonundan sonra 7 gün boyunca CNV lezyonlarının gelişmesine izin verilmiştir. 7 günün sonunda sıçanlara intravitreal yolla aşağıdaki tedavilerin biri uygulanmıştır: (a) PBS pH 7.4, (b) bevacizumab veya (c) Tf-T proteini. Tedaviden önceki ve sonraki CNV lezyonlarının gelişimi, flöresin anjiyografi kullanılarak izlenmiştir. Floresin anjiyografiye ilişkin olarak farelere anestezi uygulanmış, göz bebekleri %1 tropikamid solüsyonunun topikal yolla uygulanması vasıtasıyla genişletilmiş ve 200 µl %1 sodyum flöresin, kuyruk damarları vasıtasıyla farelere uygulanmıştır. Lezyonlardan olan sızıntı hemen Genesis Df göz dibi kamerası (Kowa Optimed Inc, CA) kullanılarak izlenmiştir. CNV alanları ImageJ yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.

Sonuçlar

Tf-T proteininin üretimi ve saflaştırılması: Tek bant 100 Kda Tf-T proteini, hazırlanan ve test edilen üç Tf-T partisinde elde edilmiştir. Tarif edilen yöntem vasıtasıyla üretilen Tf-T, benzer floresansa ve dairesel dikroizm spektrumlarına sahip olmuştur.

Tumstatin ve Tf-T proteininin karakterizasyonu: SDS PAGE'de 100 kDa ve 28 kDa'daki tek bant ve SEC'teki tek zirve alanı Tf-T ve tumstatin saflığını göstermiştir. Tf-T'ye ilişkin partikül boyutu, 8.0 nm ve polidispersite endeksi (PDI) ise 0.414 olmuştur. Tumstatin partikül boyutu 3.9 nm ve PDI ise 0.359 olmuştur. Tf-T dairesel dikroizm spektrumları CD taraması Tf-T'nin çoğunlukla β yapraklara sahip olduğunu ve (~%60) α -sarmallara mevcudiyetiyle (~%32) birlikte döndüğünü işaret etmiştir. Aynı zamanda Tumstatinin yapısında β yapraklara bakıldığında zengin olmakta ve dönmektedir (~%50). Ancak, tumstatin, daha az α -sarmallara sahip olmakta (~%16) ve daha rastgele sarmal yapıya sahip olmaktadır (~%40). Dolayısıyla, dairesel dikroizm spektrumları her iki protein için farklı olmaktadır.

Tf-T füzyon proteininin salgılanması: RPE hücreleri, 4 hafta boyunca Transwell filtresinde büyütüldüğünde sıkı birleşme yerleri oluşturmuştur. Sıkı birleşme yeri oluşumu, aynı zamanda ZO-1 proteininin boyanması vasıtasıyla da doğrulanmıştır. RPE hücreleri, ZO-1 için açık boyama deseni sergilemiş ve monokatman içindeki RPE hücrelerinin tekdüze çokgensel şeklinin hatlarını belirlemiştir. Proteinlerin apikal maruziyetini takiben, RPE hücreleri, bazolateral tarafa 126.8 μ g/ml Tf-T proteini salgılamıştır. Bunun aksine, bazolateral tarafa doğru yalnızca 12.3 μ g/ml tumstatin salgılanmıştır.

Tf-T proteininin kararlılığı: Tf-T'nin pH 7.0'da en kararlı olduğu keşfedilmiştir. SDS PAGE, kontrol Tf-T'ye kıyasla pH 4-6'da bant yoğunluğunun azaldığını göstermiş ve bu da proteinin bozulması işaret etmiştir. İlave, floresans ve dairesel dikroizm, pH 7.0 dışında pH değerlerinin tamamında sinyalde bir azalmayı işaret etmiştir. Proteinin pH 7.0'da en kararlı olduğunun keşfedilmesi sayesinde, ilave kararlılık incelemeleri (iyonik güç ve tampon), pH 7.0'da gerçekleştirilmiştir.

Fosfat sitrat ve TRIS tamponunda 10 mM ila 250 mM NaCl'ye maruz kalmış Tf-T'nin floresansı ve dairesel dikroizm spektrumları elde edilmiştir. Tf-T, fosfat sitrat tamponunun mevcudiyetinde hiçbir iyonik güç değişim etkisi sergilememiştir. Tf-T sinyali, NaCl 250 mM ve TRIS tamponunun mevcudiyetinde indirgenmiştir. Dolayısıyla, fosfat sitrat tamponu, protein için daha uygundur.

CNV ile indüklenmiş Kahverengi Lağım Farelerinde erken zaman noktası etkinliği çalışmaları

Tedavinin daha erken bir zaman noktasında (CNV indüksiyonundan 7 gün sonra) başlatılması durumunda, Tf-T ile tedavi edilen fareler, bevacizumab ile tedavi edilmiş farelere kıyasla daha küçük lezyon boyutuna sahip olmuştur. Bu, Tf-T'nin koroid neovaskülarizasyona ilişkin bir önleyici tedavi olarak etkili olduğunu işaret etmektedir.

SEKANS LİSTESİ

10

<110> Kompella, Uday B Scheinman, Robert I Tyagi, Puneet olan bir kurum olan Kolorado Üniversitesi Mütevelli Heyeti

15

<120> TRANSFERRİN-TÜMSTATİN FÜZYON PROTEİNİ VE BU PROTEİNİN ÜRETİLMESİNE VE KULLANILMASINA YÖNELİK YÖNTEMLER

20

<130> CU-006910PC

25

<150> US 61/524,508

<151> 2011-08-17

30

<160> 22

35

<170> PatentIn versiyon 3.5

40

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

45

<213> Yapay Sekans

50

<220>

<223> Transferrin fragmenti

<400> 1

 5
 Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu
 1 5
 10

 <210> 2
 15
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Yapay Sekans

 <220>
 25 <223> Transferrin Fragmenti

 30 <400> 2

 Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys
 35 1 5 10

 40
 <210> 3
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 50
 <220>
 <223> Transferrin Fragmenti
 55
 <400> 3
 60

Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu
 1 5 10
 5
 <210> 4
 10 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Yapay Sekans
 <220>
 20 <223> Transferrin Fragmenti
 <400> 4
 25
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu
 30 1 5 10
 35
 <210> 5
 <211> 13
 40 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 45
 <220>
 <223> Transferrin Fragmenti
 50
 <400> 5
 55
 Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu Ala Val
 1 5 10
 60

5 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Yapay Sekans

 15 <220>
 <223> Transferrin Fragmenti

 20 <400> 6

 25 Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu Ala Val
 1 5 10 15

 30
 <210> 7
 <211> 24
 35 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 40
 <220>
 <223> Transferrin Fragmenti
 45
 <400> 7
 50
 Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Leu Leu Val Cys Ala
 1 5 10 15
 55

 60

Val Leu Gly Leu Cys Leu Ala Val

20

5

<210> 8

10

<211> 16

<212> PRT

15

<213> Yapay Sekans

<220>

20

<223> Transferrin Fragmenti

25

<400> 8

Gly Phe Gln Asn Leu Asn Ile Gly Cys Leu Lys Glu Lys Ala Val Ala

30

1

5

10

15

35

<210> 9

<211> 27

40

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

45

<220>

<223> Transferrin Bölümü

50

<400> 9

55

Leu Leu Cys Thr Arg Asp Glu Ile Leu Thr Glu Lys Leu Glu Trp Cys

1

5

10

15

60

Tyr Ser Asn Ser Gly
 1 5
 5
 <210> 12
 10 <211> 25
 <212> PRT
 15 <213> Yapay Sekans
 <220>
 20 <223> Yapay Peptit
 <400> 12
 25
 Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn His Val Cys Asn Phe Ala
 30 1 5 10 15
 35
 Ser Arg Asn His Tyr Ser Tyr Trp Leu
 40 20 25
 <210> 13
 <211> 25
 <212> PRT
 50 <213> Yapay Sekans
 <220>
 <223> Yapay Peptit
 60 <400> 13

5 Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Arg
 1 5 10 15

 10 Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu
 20 25
 15

 20 <210> 14
 <211> 25
 <212> PRT
 25 <213> Yapay Sekans

 30 <220>
 <223> Yapay Peptit

 35 <400> 14

 40 Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala
 1 5 10 15

 45 Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Arg
 50 20 25

 55 <210> 15
 <211> 19
 60 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

5 <220>

<223> Yapay Peptit

10 <400> 15

15 Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Arg Ser Leu Asn
1 5 10 15

20 Pro Glu Arg

25

30 <210> 16
<211> 19

35 <212> PRT
<213> Yapay Sekans

40 <220>

<223> Yapay Peptit

45 <400> 16

50 Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Arg Asn
1 5 10 15

55 Pro Glu Arg

60

5
 <210> 17
 <211> 33

10
 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans

15
 <220>
 <223> Yapay Oligonükleotit

20
 <400> 17
 cgatggatcc gcaacctgga caacgagagg ctt 33

25

30
 <210> 18
 <211> 33
 <212> DNA

35
 <213> Yapay Sekans

40
 <220>
 <223> Yapay Oligonükleotit

45
 <400> 18
 cgatctcgag agtgtctttt cttcatgcac acc 33

50

55
 <210> 19
 <211> 32
 <212> DNA

60
 <213> Yapay Sekans

<220>
 5 <223> Yapay Oligonükleotit
 <400> 19
 10 atcgataagc tttgtgagca agggcgagga gc 32
 15 <210> 20
 <211> 32
 20 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans
 25 <220>
 <223> Yapay Oligonükleotit
 30 <400> 20
 35 atcgatggat cccttgtaga gctcgccat gc 32
 40 <210> 21
 <211> 32
 <212> DNA
 45 <213> Yapay Sekans
 50 <220>
 <223> Yapay Oligonükleotit
 55 <400> 21
 agtcgctagc atgaggctcg ccgtgggagc cc 32
 60

<210> 22
5 <211> 41
<212> DNA
10 <213> Yapay Sekans

<220>
15 <223> Yapay Oligonükleotit

<400> 22
20 agtcgcggcc ggctgggcca ggtctacgga aagtgcaggc t 41

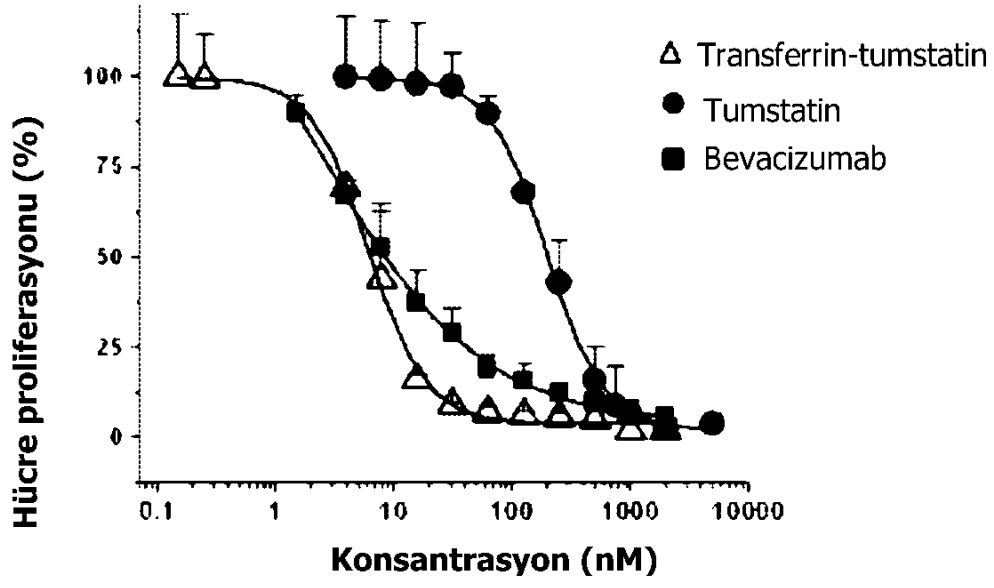
25

30

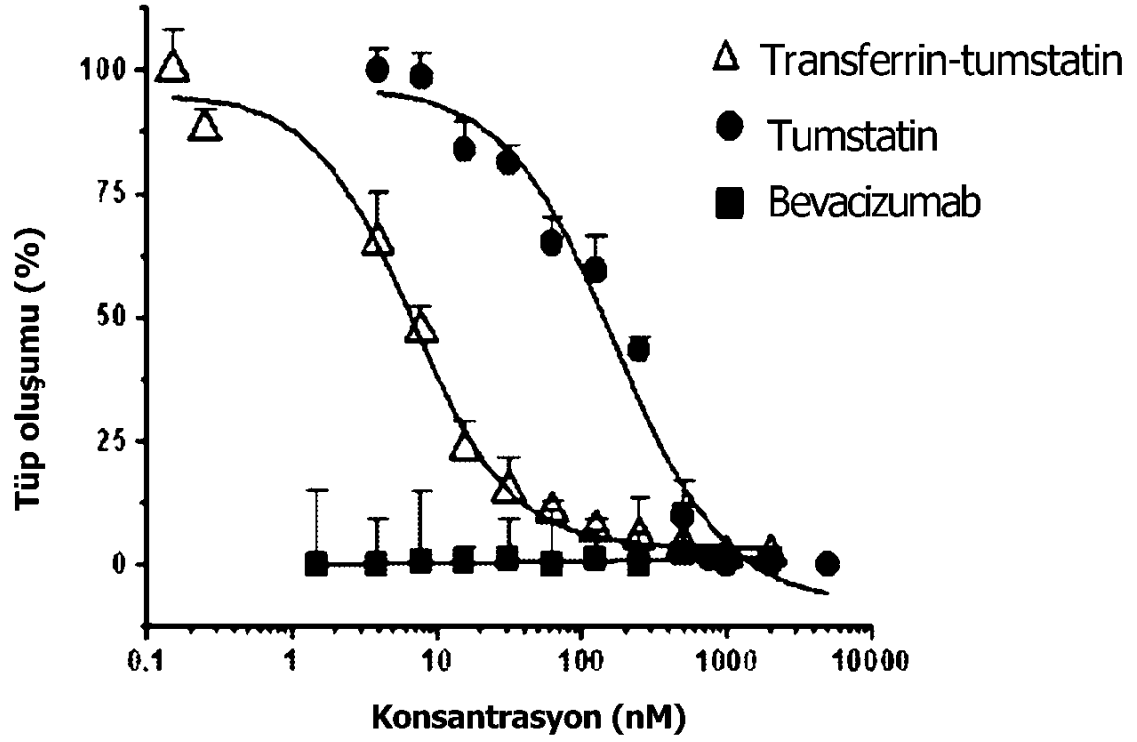
35

40

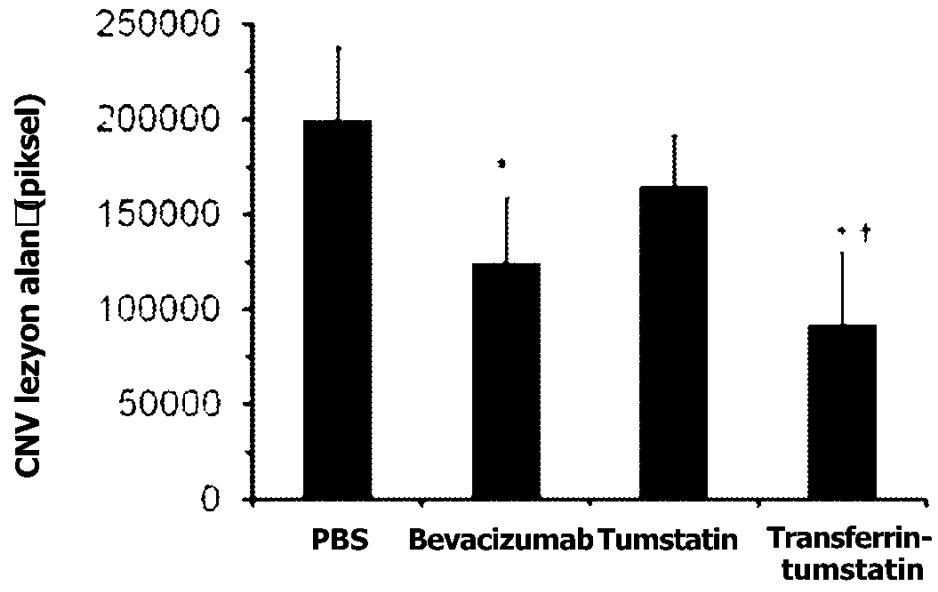
45



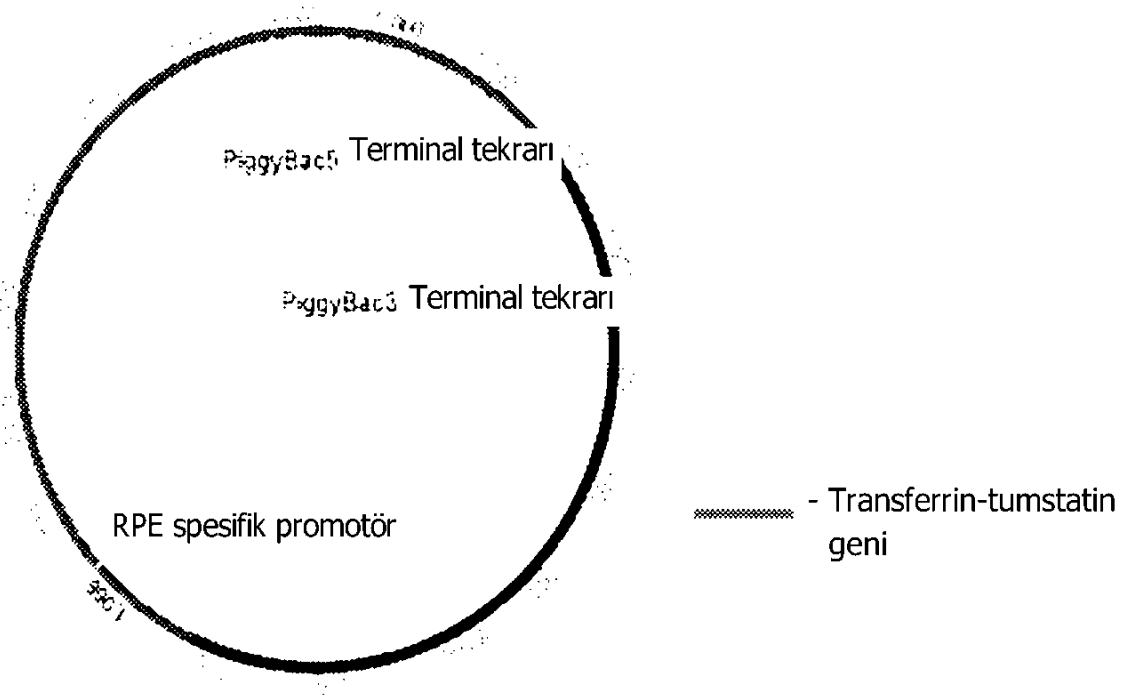
ŞEKİL 1



ŞEKİL 2



ŞEKİL 3



ŞEKİL 4