



Malign melanom fare modelinde;
anti PD-1 monoklonal antikoru ve
C Novyi-NT intramural uygulamasının etkinliğinin
değerlendirilmesi

Doç. Dr. Gülsüm GENÇOĞLAN

Celal Bayar Üniversitesi Dermatoloji A.D., Manisa

Anti-PD-1 Nedir ?

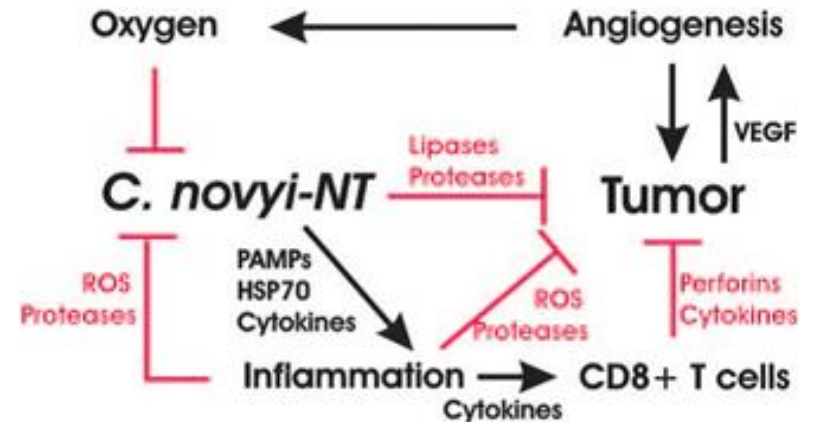
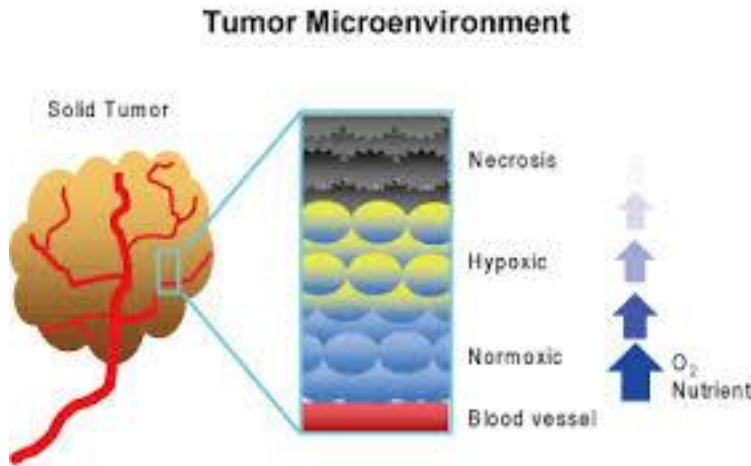
- İnsan monoklonal antikoru
- Metastatik hastalıkta ipilimumab tedavisi sonrası FDA onaylı
- Tedaviye yanıt oranı %25- %33 arasında
- BRAF inhibitörleri kadar hızlı etkinlik gösteriyor
- Stabilizasyon, uzun süreli etkili
- Tümör hacmi küçük hastalarda daha etkin

Kısıtlılıklar

- BRAF mutasyonu negatif...
- Tümör hacmi büyük olgularda etkinlik (?)
- BRAF inhibitörü direnci gelişen hastalarda etki(?)

C-Novyi Nedir?

- Clostridium ailesinin en küçük basili, 3 μm
- Anaerob Gram (+) basil
- Kanser için tanımlanan bu hipoksi/nekrotik ortam tümörler için yüksek spesifik bir özellik olup vücudun hiçbir bölgesinde böyle bir mikro çevre bulunmamakta
- Bu alana etki edebilen bir kemoterapotik ajan yok



Literatürdeki Öncül Bulgular

Kanser tedavisinde C. Novyi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar

Referans	Kanser tipi	Kullanılan tedavi yöntemi	Sonuç	Uygulama
Staedtke vd., (2015)	Glioblastoma (hayvan modeli)	C Novyi-nt Liposomal doxorubisin	Etkili	Intravenöz
Zheng vd., (2014)	Pankreas karsinomu (hayvan modeli)	C Novyi-nt	Etkili	Intatümorale
Roberts vd. (2014)	Köpek yumuşak doku sarkomu + 1 retroperitoneal leyomiyosarkom olgu;	C Novyi-nt	3'ünde TR, 3'ünde KR, 5'inde SH Tam remisyon	Intatümorale
Maletzki vd., (2010)	Pankreas karsinomu (hayvan modeli)	C Novyi-nt	Etkili	Intravenöz
Agrawal vd. (2004)	Renal kortikal adenokarsinom (hayvan modeli)	C Novyi-nt	Etkili	Intravenöz
Dang vd., (2004)	Kolon karsinomu Kolanjio karsinom	C Novyi-nt Mikrotübül stabilizerleri Mikrotübül destabilizerleri	Etkili	Intavenöz

- Burada daha önce yapılmış olan ve çalışmayı destekleyen literatürler sunulmalıdır
- **Yapılacak proje bir çalışmanın tekrarından çok yeni bilgilere ulaşma amacını gütmelidir**

Amaç

- Melanom tedavisinde immunoterapi ile *C.novyi*-nt kombinasyonu
- Anti PD1 tedavi etkinliğini saptanması
- Bakteriyolitik etkiyle tümör yükünün azaltılması
- Daha fazla tümoral antijenin açığa çıkmasını ve bu yolla T hücrelere antijen sunumunu artırıp
- Tümör içine ek antijenik faktör göndererek daha fazla T lenfositin tümoral alana göçünü uyarıp immun sistemin anti tümoral aktivitesini arttırmak

Yöntem

Çalışmada;

- 7-8 haftalık 50 adet C57bl fare
- B16 melanom modeli kullanılacak
- HMb45 ve S100 ile kontrol biopsi yapılacaktır
- **Çalışma grupları**
 - Melanom+ serum fizyolojik
 - Melanom+ anti Mouse PD-1
 - Melanom+ CNovyi-NT+ Serum Fizyolojik
 - Melanom+ anti Mouse PD-1+ C Novyi-NT

Yöntem

- Grup 2 ve Grup 4 te Anti mouse PD1 antikoru, her bir enjeksiyon 250 µg olacak şekilde 1, 7, 11, 15. günlerde intraperitoneal
- Grup 3 ve Grup4 deki farelere intratümoral C novyi-NT sporları PBS içinde süspansiyon
- Diğer gruplarda aynı miktarda serum fizyolojik yine intraperitoneal olarak
- Fareler 2 haftada bir kontrol edilerek tümörü belirgin nekroz gösteren ya da 2000 mm³ den fazla büyüme gösterenler sakrifiye edilecektir

Yöntem

Tümör Kitesinin Ölçümü;

- Tümör oluşumu histopatolojik olarak konfirme edildikten sonra mikrokaliper yardımıyla yapılan ölçümlerle tümör hacminin ($V=ab^2/2$; a= tümörün en uzun bölümü, b=tümörün en kısa bölümü) 10 mm³ olması beklenecek ve daha sonra hayvanların dahil oldukları gruplara göre tedavi şeması uygulanacaktır

Yöntem

Patolojik Değerlendirme;

- Hematoksilen-eozin, Hmb45 ve S100 boyama
- Tümör kalınlığı
- Peri tümöral inflamatuvar hücre popülasyonunun karakteri (lenfosit, monosit, polimorfonükleer lökosit sayımı) ve yoğunluğu

İmmünohistokimyasal Değerlendirme;

- Anti-LAG-3, anti-Tim-3, anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-CD28, anti-IL-2, anti-TNF- α , anti-IFN- δ
- Örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek, immunoreaktiviteler değerlendirilecek ve HSCORE analizi ile yapılacaktır
- Immunohistokimyasal boyamalar eş zamanlı olarak izotip kontrolleri ile aynı şartlarda boyanarak metodun validasyonu sağlanacak

Yöntem

Kantitatif Real-time PCR;

- Dokuda ve kanda;
- IL-2, TNF α , ve IFN γ düzeylerinin ölçümü

Flow Sitometrik Analiz;

- İnflamatuar hücre populasyonun karakteri ve yoğunluğu

İstatistiki Testler;

- SPSS software 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) programları
- Deneysel sonuçlar, çoklu karşılaştırmalar için ANOVA varyans analizi ve Tukey's post-hoc karşılaştırma testi;
- Tek yönlü karşılaştırmalar için Student's t testi

B Planı

- Burada çalışma sırasında karşılaşılabilecek sorunlar ve muhtemel çözümlerine yer verilmelidir

En Önemli Risk(ler)	B Planı
Proje ekibinin kanser hücrelerin kültürlenmesi B16 tümör modeli oluşturulması konularında gerek Tübitak tarafından desteklenen projeleri ile yayınlamış ve yayınları bulunduğundan İP 1-2'de malign melanom hücrelerin kültürlenmesinde ve tümör modeli oluşturulmasında bir başarısızlık yaşanacağı tahmin edilmemektedir.	Hücre hatları yeniden temin edilerek çoğaltılacaktır.
Proje ekibi çalışma dizaynı öncesinde C Novyi-NT nin John Hopkins üniversitesinden transferini sağlamış canlandırma testi tamamlamıştır. Bakterilerin kültürü ve sporulasyonu başarıyla uygulanmıştır. John Hopkins den gönderilen örnek ve çoğaltılan bakteriden elde edilen pasajlar tekrar dondurulmuştur. Konu ile ilgili yeterli deneyime sahip olduğundan belirtilen işlerin gerçekleştirilmesinde olumsuz bir durum ile karşılaşılacağı sanılmaktadır.	Öncelikle pasajlanmış dondurulmuş örnekler açılacaktır. Burda da sorun olursa John Hopkins üniversitesinden yeniden bakteri temini yoluna gidilecektir.
İmmunohistokimyasal boyaların başarısız olması, sitokin ölçümleri ve flowsitometride işaretlemelerde sorun yaşanabilir.	İP 6,7 ve 8'de projeye ait tekrarlanabilir ve ölçülebilir parametreler yer almaktadır. Deney sırasında alınan örnekler her aşamada saklanmak suretiyle yeni kesitler ve doku örnekleri hazırlanarak gerekirse antikor ve boyalar yenilenecek işlemler tekrarlanacaktır.

Beklenen Yararlar

- İmmunoterapi etkinliğinin artması
- Tümör hacminin azaltılması
- Hastalısız sağ kalımın oranının artması
- İmmunoterapi tedavi süresinin kısaltılması
- Yan etkilerin azaltılması