

OZET

Bir mikroakışkan cihaz kullanılarak ilaç etkilerinin belirlenmesi için bir yöntem

5 Buluş, bir mikroakışkan cihaz kullanılarak bir etkenin (6), örneğin bir ilacın, farklı hücrelere (7, 8) etkilerinin aynı anda belirlenmesine imkan vermektedir. Buluş, bir etkenin (6) farklı miktarlarının etkilerinin aynı anda belirlenmesine de imkan vermektedir.

İSTEMLER

- 1) Bir veya daha fazla etkenin (6), bir veya daha fazla farklı hücrelere (7, 8) etkisini aynı anda belirleyen bir yöntem olup özelliği;
- 5
- i. Ana kanalı (4) değişken genişliğe sahip bir mikroakışkan cihaz kullanması,
- ii. Ana kanala (4) bir veya daha fazla etkenin (6) yüklenmesi,
- iii. Ana kanalın (4) bir tarafındaki test kanalına (3) matriks içinde olan veya olmayan bir veya daha fazla çeşit hücrelerin (7), ana kanalın (4) diğer tarafındaki test kanalına (3) matriks içinde olan veya olmayan farklı bir veya daha fazla çeşit hücrelerin (8)
- 10
- yüklenmesi,
- iv. Sıvı haznelere (5) kültür ortamı veya fizyolojik tampon çözeltilerinin yüklenmesi,
- v. Cihazın uygun hücre kültürü koşullarında tutulması olup özelliği;
- bir veya daha fazla etkenin (6) test kanallarındaki (3) farklı hücrelerin (7, 8) bir özelliklerine etkilerinin aynı anda belirlenmesidir.
- 15
- 2) İstem 1'deki etken (6) olup özelliği, matriks içinde olan veya olmayan hücreler veya parçacıklar, hücreler veya parçacıklar içeren veya içermeyen matriksler, selüloz, matrijel, kolajen, laminin, agaroz, poliakrilamid, toz malzeme, delikli malzeme, polimerler, biyouyumlu matriksler, tozlar, delikli malzemeler, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, bir veya daha fazla biyolojik veya kimyasal bir molekül veya bunların bir birleşimini
- 20
- içermesidir.
- 3) İstem 1'deki yöntem olup özelliği, yüklemelerin,
- i. ana kanal (4) ardından test kanalları (3) ardından sıvı haznelere (5) veya
- ii. test kanalları (3) ardından sıvı haznelere (5) ardından ana kanal (4) veya
- iii. test kanalları (3) ardından ana kanal (4) ardından sıvı haznelere (5) sırasıyla ve/veya
- 25
- bu adımlar bir birleşimde tekrarlanarak yapılmasıdır.
- 4) İstem 1'deki yöntem olup özelliği, istenildiğinde farklı yüklemeler arasında cihazın uygun hücre kültürü koşullarında tutulmasıdır.
- 5) İstem 1'deki yöntem olup özelliği, etkenin (6) cihazdaki dağılımının simülasyonlar ile belirlenmesidir.
- 30
- 6) İstem 1'deki yöntem olup özelliği, etkenin (6) cihazda dağılımının floresan mikroskop, eşodaklı floresan mikroskop, ışık mikroskobu veya bunların bir birleşimi ile görüntülenerek belirlenmesidir.
- 7) İstem 1'deki farklı hücrelerin (7, 8) bir özellikleri olup, özelliği genlerin RNA ve/veya protein seviyesindeki ifadeleri, canlılık, çoğalma, hareketlilik, yönelme, işgal, hücre şekli
- 35
- geometrik özellikleri, hücre içindeki molekül ve/veya makromoleküllerin miktarları ve/veya dağılımları, hücre zarındaki molekül ve/veya makromoleküllerin miktarları ve/veya

dağılımları, hücre dışındaki molekül ve/veya makromoleküllerin miktarları ve/veya dağılımları, veya bunların bir birleşimini içermesidir.

- 5
- 8) İstem 7'deki molekül ve/veya makromoleküller olup özelliği, floresan veya diğer boyalı olan veya olmayan ilaç, DNA, RNA, protein, yağ, şeker, molekül, polimer veya bunların bir birleşimini içermesidir.
- 9) İstem 1'deki yöntem olup özelliği, ana kanalın (4) değişken genişlikte olması sebebiyle, etkenin (6) ana kanal (4) boyunca farklı miktarlarda bulunması ve böylece etkenin (6) farklı miktarlarının etkilerinin aynı anda belirlenmesidir.

10

TARİFNAME

Bir mikroakışkan cihaz kullanılarak ilaç etkilerinin belirlenmesi için bir yöntem

Buluşun ilgili olduğu teknik saha

5

Buluş, bir mikroakışkan cihaz kullanılarak ilaç veya diğer etkenlerin farklı hücrelere etkilerinin belirlenmesini sağlayan bir yöntem ile ilgilidir.

Tekniğin bilinen durumu

10

İlaç ve diğer etkenlerin farklı hücrelere etkilerinin aynı anda incelenmesi, ilaç keşfi için önemlidir. Etkenin hedeflenen hücreler dışındaki hücrelere etki etmesi istenmez. Ayrıca etkenin etkili olduğu en düşük dozda kullanılması istenir.

15

Etken, matriks içinde olan veya olmayan hücreler veya parçacıklar, hücreler veya parçacıklar içeren veya içermeyen matriksler, selüloz, matrijel, kolajen, laminin, agaroz, poliakrilamid, toz malzeme, delikli malzeme, polimerler, biyouyumlu matriksler, tozlar, delikli malzemeler, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, bir veya daha fazla biyolojik veya kimyasal bir molekül veya bunların bir birleşimini içerebilir.

20

Hücreler, otokrin, juxtakrin, parakrin, endokrin sinyalleme, kemotaktik, haptotaktik, durotaktik tepkiler verebilirler.

Kanser, kök hücreler, immünoloji, gelişim, endokrinoloji, sinirbilim vb. üzerine tüm araştırmalar, hücrelerin yukarıda belirtilenler gibi faktörlerle etkileşimlerini araştırabilecek daha iyi cihazlar ve yöntemler gerektirmektedir.

25

Sağlık ve hastalık durumlarında hücrelerin veya parçacıkların, aynı ya da farklı tipte diğer hücreler veya parçacıklar, çözünür faktörler ya da bir matrikse bağlanan çözünür faktörler gibi çeşitli faktörlerle etkileşimleri, önemlidir. Örneğin, epidermal büyüme faktörü (EGF) alıcısını ifade eden meme kanseri hücreleri EGF kaynağına doğru hareket ederler.

30

Mikroakışkan teknolojisi, kesin uzamsal ve zamansal kontrol, yüksek-çıkıtlı analiz, düşük üretim masrafları ve taşınabilirlik sağlamaktadır. Kullanılan malzeme ve atık hacimleri pikolitre kadar düşük olabilir. Bilinmeyen veya toksik malzemelerden küçük hacimlerin kullanılması güvenli deneysel çalışmayı sağlamaktadır. Ayrıca, mikroakışkan teknolojisi, fizyolojik mikroçevreleri

taklit edebilmenin yollarını sağlayabilir. Bu özellik, hücreleri hem sağlık hem hastalık durumlarında daha gerçekçi çalışabilmemize ve ilaç, ajan testi yaklaşımlarını iyileştirmemize yardımcı olabilir. Hayvan testlerinin azaltılmasına da yardımcı olabilir.

5 Günümüzde kullanılan cihazlar genelde çözünür faktörlerin dereceli değişen konsantrasyonlarını sağlamaya odaklıdır (Kamm, R. D. et al. Device for High Throughput Investigations of Cellular Interactions. PCT/US2011/0540212 2011). Fakat canlıda dereceli değişen konsantrasyonlar, tepki verecek faktörler ile etkenlerin kaynaklarının farklı uzaklıklarda olması ile yaratılır. Diğer bir cihaz farklı uzaklıkları aynı anda test etmek üzere tasarlanmıştır (Pesen Okvur, Devrim. Microfluidic Device for Investigation of Distance Dependent Interactions in Cell Biology, US 2016/0243551).

10 Bu cihaz DDI chip olarak adlandırılır.

Bu patent başvurusunun yöntemi, DDI chip kullanılarak, incelenen etkenin farklı hücelere etkisinin ve bu etkinin doza bağlılığının belirlenmesini sağlar.

Buluşun çözümünü amaçladığı teknik problemler

15

Buluşun amacı, ilaç ve benzeri etkenlerin farklı hücelere etkilerinin aynı anda tespit edilmesidir. Buluş ayrıca bir etkenin farklı miktarlarının etkilerinin aynı anda belirlenmesini amaçlamaktadır.

20 Şekillerin açıklamaları

Şekil 1: Buluş yönteminin kullandığı cihazın çizimi, üstten ve kesit çizimleri

Şekil 2: Buluş yöntemini uygulamak üzere yüklenmiş cihazın üstten çizimi

Çizimler gerekmedikçe ölçekli değildir.

25

Şekillerdeki referansların açıklanması

Şekillerdeki parçalar numaralandırılmış olup, açıklamaları aşağıda verilmektedir:

1. Işığı geçiren yüzey
2. Yapı

30

3. Test kanalı
4. Ana kanal
5. Sıvı haznesi
6. Etken
- 5 7. Hücreler
8. Farklı hücreler

Buluşun açıklaması

- 10 Buluş, bir mikroakışkan cihaz kullanılarak ilaç ve benzeri etkenlerin aynı anda birden fazla farklı hücreye etkilerinin belirlenmesini sağlayan bir yöntem ile ilgilidir.

- Mikroakışkan cihazda orta kanala etkisi belirlenecek etken (6) yüklenir. Orta kanala komşu kanallara incelenecek hücreler (7, 8) yüklenir. Hücrelerin canlılıkları, hareketlilikleri, çoğalmaları, yapışmaları veya işgalleri gibi özellikleri incelenir. Etken (6) solüsyon veya matriks içinde
- 15 yüklenebilir. Hücreler (7,8) solüsyon veya matriks içinde yüklenebilir: Hücreler (7,8) iki boyutlu veya üç boyutlu yüklenebilir. Etken (6), matriks içinde olan veya olmayan hücreler veya parçacıklar, hücreler veya parçacıklar içeren veya içermeyen matriksler, selüloz, matrijel, kolajen, laminin, agaroz, poliakrilamid, toz malzeme, delikli malzeme, polimerler, biyouyumlu matriksler, tozlar, delikli malzemeler, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, bir veya daha fazla biyolojik
- 20 veya kimyasal bir molekül veya bunların bir birleşimini içerebilir.

Mikroakışkan kanalda ana kanalın (4) genişliği değiştiği için etken (6) miktarı ana kanal (4) boyunca farklıdır. Böylece farklı miktarlardaki etkenin (6) farklı hücrelere (7,8) etkileri aynı anda belirlenebilir.

- 25 Kontrollü ilaç salınımı bu yöntem ile çalışılabilir. İlaçların yan etkileri bu yöntemle belirlenebilir. İlaçların etkili oldukları IC50 gibi eşik değerleri bu yöntemle belirlenebilir.

Bir somut örnekte, test edilecek etken (6), örneğin bir ilaç, ana kanala (4) eklenir. Ardından test edilecek hücreler (7) ana kanalın (4) bir tarafındaki bir test kanalına (3) eklenir, test edilecek farklı hücreler (8) ana kanalın (4) diğer tarafındaki bir test kanalına (3) eklenir. Hücre ölümü zaman içinde incelenir.

- 30 Diğer bir somut örnekte, test edilecek etken (6), örneğin bir ilaç, ana kanala (4) eklenir. Ardından test edilecek hücreler (7) ana kanalın (4) bir tarafındaki bir test kanalına (3) eklenir, test edilecek ikinci ve üçüncü hücre çeşitleri birlikte karıştırılarak ana kanalın (4) diğer tarafındaki bir test kanalına (3) eklenir. Hücre ölümü zaman içinde incelenir.

Diğer bir somut örnekte, test edilecek hücreler (7) ana kanalın (4) bir tarafındaki bir test kanalına (3) eklenir, test edilecek farklı hücreler (8) ana kanalın (4) diğer tarafındaki bir test kanalına (3) eklenir. Ardından test edilecek etken (6) ana kanala (4) eklenir. Hücre ölümü zaman içinde incelenir.

- 5 Diğer bir somut örnekte test kanallarından (3) birine EGF alıcısını yüksek seviyede ifade eden hücreler, diğer test kanalına (3) bu alıcıyı ifade etmeyen hücreler yüklenir. Ana kanala (4) ve sıvı haznelere (5) EGF içermeyen veya düşük miktarda içeren kültür ortamı eklenir. Hücreler 4 saat veya daha uzun süre kültürlendikten sonra, ana kanala (4) EGF içeren kültür ortamı yüklenir. Hücrelerin ana kanala (4) doğru yönelimli hareketleri ışık mikroskobu ile incelenir. EGF alıcısını
- 10 yüksek seviyede ifade eden hücrelerin, diğer hücrelerden daha çok ana kanala (4) doğru yönelme göstermesi beklenir.

Diğer bir somut örnekte, ana kanala (4) sert bir malzeme yüklenir. Test kanallarının (3) her birine farklı hücreler (7, 8) yüklenir. Hücrelerin şekilleri ve ana kanala (4) yönelmeleri zaman için incelenir.

- 15 Yöntemde, mikroakışkan cihaza yüklemeler,
- i. ana kanal (4) ardından test kanalları (3) ardından sıvı hazneleri (5) veya
 - ii. test kanalları (3) ardından sıvı hazneleri (5) ardından ana kanal (4) veya
 - iii. test kanalları (3) ardından ana kanal (4) ardından sıvı hazneleri (5) sırasıyla ve/veya bu adımlar tekrarlanarak yapılabilir.

20

İstenildiğinde, farklı yüklemeler arasında cihaz uygun hücre kültürü koşullarında tutulabilir.

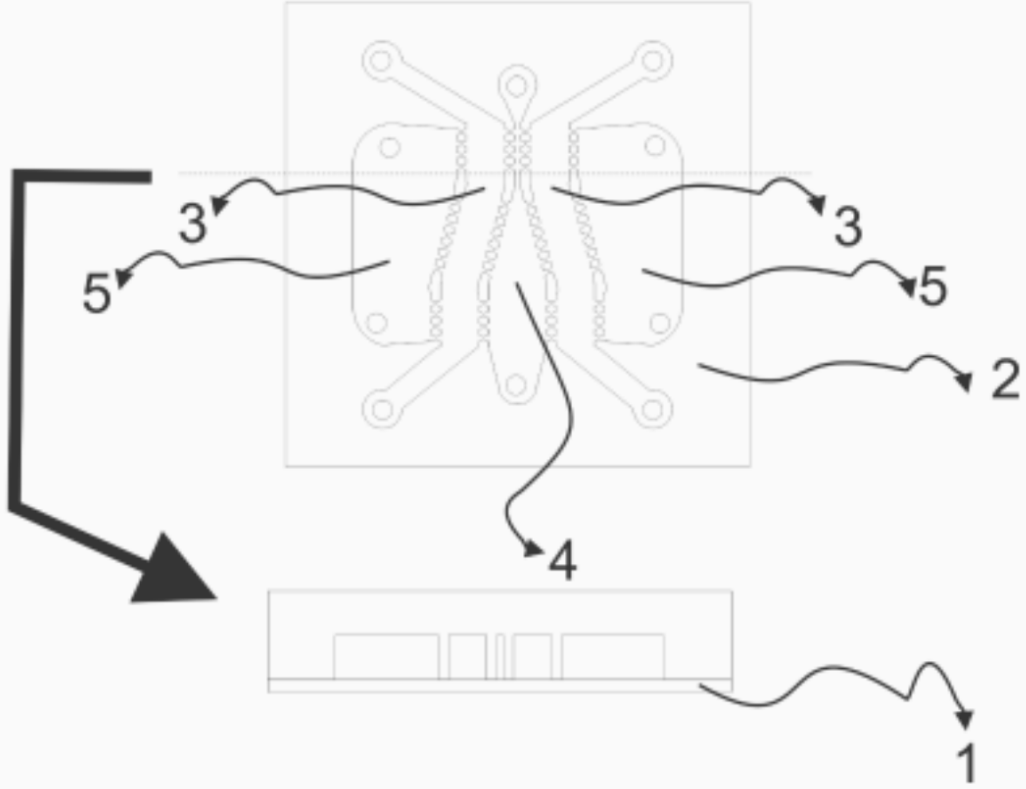
Test edilecek etkenin (6) cihazda dağılımı simülasyonlar (benzetimler) ile hesaplanabilir. Ayrıca etkenin (6) cihazda dağılımı floresan mikroskop, eşodaklı floresan mikroskop, ışık mikroskobu veya

25 bunların bir birleşimi ile görüntülenerek belirlenebilir.

- Hücrelerde incelenecek özellikler, genlerin RNA ve/veya protein seviyesindeki ifadeleri, canlılık, çoğalma, hareketlilik, yönelme, işgal, hücre şekli geometrik özellikleri, hücre içindeki molekül ve/veya makromoleküllerin miktarları ve/veya dağılımları, hücre zarındaki molekül ve/veya
- 30 makromoleküllerin miktarları ve/veya dağılımları, hücre dışındaki molekül ve/veya makromoleküllerin miktarları ve/veya dağılımları veya bunların bir birleşimi olabilir.

Molekül ve/veya makromoleküller, floresan veya diğer boyalı olan veya olmayan ilaç, DNA, RNA, protein, yağ, şeker, molekül, polimer veya bunların bir birleşimi olabilir.

Şekil 1



Şekil 2

