

ÖZET**TEK BİR DÖNGÜDE KOMBİNE KOŞULLANDIRMA VE KEMO SEÇİMİNE YÖNELİK
YÖNTEM**

- 5 Radyasyonsuz hematopoetik kök hücre (HSC) nakline yönelik bir yöntem, bir ön-koşullandırma adımı olarak 6TG gibi bir pürin bazı analogunun 2 ila 10 mg/kg vücut ağırlığındaki bir veya iki dozunun memeli bir özneye uygulanması içerir. Yöntem ayrıca hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HPRT)-eksikliği olan donör HSC'lerin ön-koşullandırma adımıyla 48 ila 72 saatte özneye melezlenmesini ve 1 ila 5 mg/kg'lık
- 10 pürin bazı analogunun melezleme adımıyla takiben iki ila sekiz hafta boyunca her iki ila dört günde bir özneye uygulanmasını içerir. Yöntem, ön-koşullandırma yokluğunda radyasyon aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu yüzden, özne nakil işlemine yönelik hazırlık yapılırken miyeloablatif radyasyon ile tedavi edilmez ve bu yüzden özne miyeloablatif radyasyon ile indüklenen toksisiteye sahip değildir.

İSTEMLER

1. Radyasyonsuz hematopoetik kök hücre (HSC) nakline yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik bir pürin bazı analogu olup, özelliği pürin bazı analogunun 6-
5 tiyoguanin (6TG) olması ve yöntemin aşağıdaki adımları içermesidir:
 - (a) bir ön-koşullandırma adımı olarak pürin bazı analogunun 2 ila 10 mg/kg vücut ağırlığındaki bir veya iki dozunun memeli bir özneye uygulanması;
 - 10 (b) hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HPRT)-eksikliği olan donör HSC'lerin ön-koşullandırma adımı 48 ila 72 saatte özneye melezlenmesi ve
 - (c) 1 ila 5 mg/kg'lık pürin bazı analogunun melezleme adımını takiben iki ila sekiz hafta boyunca her iki ila dört günde bir özneye uygulanması;
 - 15 burada yöntem ön-koşullandırma yokluğunda radyasyon aracılığıyla gerçekleştirilir.
2. İstem 1'in kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği adım (a) ve
20 adımın (c) kombinasyonu ile özneye uygulanan toplam 6TG dozajının 105 mg/kg'ı geçmemesidir.
3. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği
25 adım (a) ve adımın (c) kombinasyonu ile özneye uygulanan toplam 6TG dozajının 75 mg/kg'ı geçmemesidir.
4. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği
adımın (c) uygulanmasının 3 günde bir gerçekleştirilmesi ve melezleme adımını takiben dört haftadan daha uzun bir süre gerçekleştirilmemesidir.
- 30 5. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği öznenin %75'in üzerinde genetik olarak modifiye edilmiş hematopoetik hücreler göstermesidir.

6. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği öznenin %95'in üzerinde genetik olarak modifiye edilmiş hematopoetik hücreler göstermesidir.
- 5 7. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği nakledilecek HPRT-eksikliği olan HSC'lerin, çinko parmak nükleazları (ZFN'ler), transkripsiyonel aktivatör-benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler), küçük parçalı homolog rekombinasyon (SFHR) kalıp zincirleri, inhibitör RNA'lar (siRNA'lar) veya mikroRNA'lar (miRNA'lar), antisens RNA'lar, trans-zincirleme RNA'ları, 10 ribozimler, hücre içi antikorlar veya dominant negatif veya rekabetçi inhibitör proteinleri kodlayan dizilerin eklenmesi aracılığıyla HPRT-eksikliği olan olarak elde edilmesidir.
- 15 8. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği nakledilecek HPRT-eksikliği olan HSC'lerin genetik olarak modifiye edilmiş olmasıdır.
- 20 9. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği nakledilecek HSC'lerin otolog veya sinojenik olmasıdır.
- 10 10. İstemler 1-8'den herhangi birinin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği nakledilen HSC'lerin allojenik olmasıdır.
- 25 11. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği öznenin miyeloablatif radyasyon ile tedavi edilmemesidir.
- 30 12. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği öznenin kalıtsal veya genetik bir bozukluk, lenfohematopoetik hücreleri etkileyen edinilmiş bir hastalık veya lenfohematopoetik bir maligniteye sahip olmasıdır.
- 35 13. Önceki herhangi bir istemin kullanımına yönelik pürin bazı analogu olup, özelliği öznenin insan olmasıdır.

TARİFNAME
TEK BİR DÖNGÜDE KOMBİNE KOŞULLANDIRMA VE KEMO SEÇİMİNE YÖNELİK
YÖNTEM

5 FEDERAL OLARAK DESTEKLENEN ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ AÇIKLAMA

Bu buluş, Hibe No. Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından verilen AI067769'un desteğiyle Devlet desteği ile yapılmıştır. Hükümet bu buluşa yönelik belirli haklara sahiptir.

10 ALTYAPI

Hematopoetik kök hücre nakli (HSCT), birçok kalıtsal bozukluk ve lenföhematopoetik malignitelere (1) yönelik tedavinin bir dayanak noktasıdır. İlaveten, hematopoetik kök hücreleri (HSC) genellikle ex vivo gen terapisine yönelik önemli bir hedefi temsil eder.

15 HSC'ye gen aktarımı, normal BM ile sitotoksik ilaçların monogenik kusurlarının düzeltilmesine hem de ilaç duyarlılığının değiştirilmesine yönelik potansiyel bir strateji sağlar. Bu uygulamalar, önemli bir terapötik potansiyele sahiptir, ancak HSC'ye düşük gen aktarımı ile kısıtlanır. Ex vivo manipülasyon, fibronektin-destekli gen aktarımı ve HSC önceki gen aktarımının kuvvetlendirilmesi sırasında bağlanmayı minimuma

20 indirilmesine yönelik geliştirilmiş sitokinler gibi yakın zamandaki çalışmalar, insan hücrelerine gen aktarımının etkinliğini ve insan gen terapisi deneylerini (2) geliştirmiştir. Ancak, HSC'ye gen aktarımının etkinliği ve çok sayıda transdüse edilen hücrelerin melezlenmesi kanser ve monogenetik hastalıkların başarılı bir şekilde tedavi edilmesine yönelik bu teknoloji uygulamasını kapsamlı hale getirmek üzere büyük bir

25 zorluk olarak kalmaya devam eder.

Gen-modifiyeli HSC'nin melezlenmesini geliştirmek ve HSCT'den sonra lenföhematopoetik yeniden yapılandırma işlemi için gerekli süreyi azaltmak üzere, dihidrofolat redüktaz (DHFR) (3) veya çoklu ilaç-direnci geni 1 (MDR1)

30 (4, US1996/017660) gibi ilaç direnç genlerini kullanan in vivo seçim stratejileri, test edilmiştir ancak kabul edilemez toksisite (5) veya yetersiz seçim etkinliği (6) nedeniyle genel olarak başarısız olmuştur. Mevcut olarak, O6-metilguanin-DNA-metiltransferaza (MGMT) ait mutant formlar, O6-benzilguanin (2,7, US1997/004917) ile kombinasyon halinde BCNU veya temozolomide karşı bunların kemo koruma sağlama kabiliyetine

35 yönelik test edilmiştir, ancak bu ajanlar önemli bir toksisite riskine neden olur ve yakın

zamandaki gözlemler mutant MGMT'nin yüksek seviyelerde (8) ifade edildiğinde seçici bir dezavantaja neden olabileceğini belirtir. US2003032003AA'da, HPRT-eksikliği yaşayan hücrelerin 6TG ile in vivo olarak seçilmesine yönelik bir seçim stratejisi açıklanmıştır. Ancak, bu patent başvurusunda, ışınlama işlemi in vivo seçiminden önce
 5 önceden koşullandırmaya yönelik yine kullanılır veya in vivo seçimi 6TG uygulaması arasında iyileşme dönemi ile döngüler halinde gerçekleştirilir.

İlaveten, önerilen 6TG dozu yüksektir ve uzun bir süre boyunca uygulanır (55 gün boyunca 200 mg/kg toplam doz). İlaveten, BM içindeki HPRT ifadesini devre dışı
 10 bırakmak ve akabinde in vivo olarak 6TG ile donör hücreleri seçmek üzere bir yaklaşım "müdahaleci RNA aracılı pürin analog direnci" ('iPAR') olarak Porter ve DiGregori tarafından rapor edilmiştir. Bu rapor, shRNA hedefleyici Hprt'yi ifade eden lentiviral vektör ile HSC'de HPRT inaktivasyonunun fizibilitesini ve bu değiştirilen hematopoetik hücrelere yönelik farelerde in vivo olarak 6TG ile kuvvetlendirme işlemini göstermiştir.
 15 Ancak, bu raporda, önceden-kosullandırma işlemi yine toplam vücut ışınlaması ile gerçekleştirilmiştir ve in vivo kemo seçimi aktarım-sonrası en az 4 hafta kadar başlatılmamıştır. Ek olarak, 6TG kısa bir atış olarak veya sadece orta derecede iliği baskılayıcı olarak seçilen dozajlarda uygulanmıştır ve yeterli HSC transdüksiyon seviyelerinin çalışmalarda kullanılan ikinci-nesil lentiviral vektörler tarafından elde edilip
 20 edilmediği açık değildir. Sonuç olarak, rapor edilen melezleme seviyeleri değişken ve nispeten orta derecede olmuştur.

Kemik iliği hücreleri yeniden yapılandırılırken toksisiteden kaçınan daha etkili HSCT yöntemlerine yönelik bir ihtiyaç devam eder.

25

Referanslar:

- 30 (1) Bhattacharya D, Ehrlich LI, Weissman IL. Eur J Immunol. 2008;38:2060-2067.
- (2) Milsom MD, Williams DA. DNA Repair (Amst). 2007;6:1210-1221.
- (3) Williams DA, Hsieh K, DeSilva A, Mulligan RC. J Exp Med. 1987;166:210-218.
- (4) Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, et al. Science. 1992;257:99-103.

(5) Zaboikin M, Srinivasakumar N, Schuening F. Cancer Gene Ther. 2006;13:335-345.

(6) Southgate T, Fairbairn LJ. Expert Rev Mol Med. 2004;6:1-24.

(7) Neff T, Beard BC, Kiem HP. Blood. 2006;107:1751-1760.

5 (8) Schambach A, Baum C. DNA Repair (Amst). 2007;6:1187-1196.

(9) Porter CC, DeGregori J. Blood. 2008;112:4466-4474.

İlkel hematopoetik hücrelerin in vivo seçimi (Patent
10 yayını WO/1998/019540) US1996/017660
terapötik alkilleyici ajanların toksisitesinden korumak üzere gen terapisine yönelik
mutant alkiltransferazlarının kullanımı (Patent
yayını WO/1997/035477) US1997/004917
İn vivo seçim (Patent yayını WO/1997/043900) US2003032003AA

15

KISA AÇIKLAMA

Buluş, radyasyonsuz bir hemapoetik kök hücre (HSC) nakli yönteminde kullanıma
yönelik bir pürin bazı analogu sağlar, burada pürin bazı analogu 6-tiyoguanindir (6TG)
20 ve burada yöntem aşağıdaki adımları içerir:

- (a) bir ön-koşullandırma adımı olarak pürin bazı analogunun 2 ila 10 mg/kg
vücut ağırlığındaki bir veya iki dozunun memeli bir özneye uygulanması;
- (b) hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HPRT)-eksikliği olan donör
25 HSC'lerin ön-koşullandırma adımı 48 ila 72 saatte özneye melezlenmesi ve
- (c) 1 ila 5 mg/kg'lık pürin bazı analogunun melezleme adımı takiben iki ila
sekiz hafta boyunca her iki ila dört günde bir özneye uygulanması;

burada yöntem ön-koşullandırmanın yokluğunda radyasyon aracılığıyla gerçekleştirilir.
30

Bu yüzden özne nakil işlemine yönelik hazırlık yapılırken miyeloablatif radyasyon ile
tedavi edilmez ve bu yüzden özne miyeloablatif radyasyon ile indüklenen toksisiteye
sahip değildir.

35 Bir pürin bazı analogunun temsil edici özellikleri, aşağıdaki unsurları içerir: 6-tiyoguanin

(6TG), 6-merkaptopürin (6-MP) ve azatiyopürin (AZA). Bazı düzenlemelerde, özneye uygulanan toplam 6TG dozajı 105 mg/kg'ı aşmaz; tipik olarak özneye uygulanan toplam 6TG dozajı 75 mg/kg'ı aşmaz. Bir düzenlemede, pürin bazı analogunun uygulanması her 3 günde bir gerçekleştirilir ve melezleme adımını takiben dört
5 haftadan daha uzun süre sürmez.

Yöntem ile uyumlu olarak tedavi edilen öznelere, %75'in üzerinde genetik olarak modifiye edilen hematopoetik hücreler gösterecektir. Bazı düzenlemelerde, öznelere %95'in üzerinde genetik olarak modifiye edilen hematopoetik hücreler gösterecektir.
10 Nakledilecek olan HPRT-eksikliği olan HSC'ler, teknikte uzman kişilerce bilinen klasik yöntemler kullanılarak HPRT-eksikliği ile elde edilebilir. Temsil edici yöntemler, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, çinko parmak nükleazları (ZFN'ler), transkripsiyonel aktivatör-benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler), küçük parçalı homolog rekombinasyon (SFHR) kalıp zincirleri, inhibitör RNA'lar (siRNA'lar) veya mikroRNA'lar (miRNA'lar), antisens
15 RNA'lar, trans-zincirleme RNA'ları, ribozimler, hücre içi antikorlar veya dominant negatif veya rekabetçi inhibitör proteinleri kodlayan dizilerin eklenmesini içerir. Nakledilen HSC'ler otolog, sinjeneik veya allojenik olabilir.

Bazı düzenlemelerde, nakledilecek olan HPRT-eksikliği olan HSC'ler genetik olarak
20 modifiye edilmiştir. Özne kalıtsal veya genetik bir bozukluk, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu veya edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) gibi lenfematopoetik hücreleri etkileyen edinilmiş bir hastalık veya lenfematopoetik bir maligniteye sahip olabilir. Donör HSC'lerin genetik modifikasyonu, hücrelerin HPRT-eksikliğe sahip olarak elde edilmesinin ötesine uzanabilir ve aynı zamanda bir durumu
25 tedavi etme veya düzeltme işlevi görür.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1A-1B. 6TG koşullandırma rejiminin optimizasyonu. (ŞEKİL 1A) Bir doz-
30 bulma çalışması olarak, HPRT-wt fareleri, araç kontrolü ile ve Gün 1'de (grup başına n=3) veya sırasıyla Gün 1 ve Gün 3'te (n=3) 10 mg/kg olan iki doz ile belirtildiği üzere 2.5 ila 10 mg/kg aralığında olan 6TG dozlarının değiştirilmesi yoluyla i.p. olarak enjekte edilmiştir. Birinci 6TG dozundan sonra Gün 4'te, paraformaldehit ile sabitlenen kemik kesitleri H&E ile boyanmıştır ve BM
35 histolojisi incelenmiştir. Temsili fotomikrograflar (40 x büyütme) her bir 6TG

koşullandırma rejimine yönelik gösterilir. (ŞEKİL 1B) Temsili fotomikrograflar, kontrol cihazı ve Gün 1 ve Gün 3'te 10 mg/kg 6TG olan iki dozdan oluşan optimize koşullandırma rejimi ile tedavi edilen HPRT-wt farelerinden düşük (10x) ve yüksek (100x) büyütmede genel ve detaylı BM histolojisini gösterir. Histolojik analizler yukarıdaki gibi Gün 4'te gerçekleştirilmiştir.

Şekil 2A-2B. HPRT-eksikliği olan farelerde 6TG'nin koşullandırıcı dozları ile enjeksiyondan sonra ilerleyici miyelotoksisite eksikliği ve 6TG koşullandırması ile tek başına düşük melezleme oranı. (ŞEKİL 2A) HPRT-wt VE HPRT-eksikliği olan fareler, Günler 1 ve 3'te 10 mg/kg 6TG ile i.p. olarak enjekte edilmiştir. Birinci 6TG dozundan sonra Gün 7'de, paraformaldehit ile sabitlenen kemik kesitleri H&E ile boyanmıştır ve BM histolojisi incelenmiştir. Temsili fotomikrograflar (40 x büyütme) gösterilir. (ŞEKİL 2B) Tedavi planı: HPRT-wt dişi alıcı fareler (n=4), Gün-2'de 6TG'nin (10 mg/kg, i.p.) birinci koşullandırma dozunu almıştır, akabinde HPRT-eksikliği olan erkek BM ile nakledilmiştir, akabinde Gün 0'da 6TG'nin (10 mg/kg, i.p.) ikinci bir koşullandırma dozunu almıştır. BM, birinci 6TG dozundan sonra Gün 7'de analiz edilmiştir. H&E ile boyanan paraformaldehit ile sabitlenen kemik kesitleri (40 x büyütme) gösterilir.

Şekil 3. HPRT-wt karşısında HPRT-eksikliği olan farelerde kronik düşük-doz 6TG miyelotoksisitesinin doz yanıtı ve zaman seyri. HPRT-doğal suşlu fareler ve HPRT-eksikliği olan fareler, yukarıda her bir panelde gösterildiği üzere farklı 6TG dozları ve araç kontrolü (grup başına n=3) ile her 3 günde bir tedavi edilmiştir. HPRT-doğal suşlu fareler için, histoloji tedavinin başlamasından sonra 60 güne kadar aşağıdaki süre noktalarında incelenmiştir:

Araç kontrolü (Gün 60), 6TG 0.25 mg/kg (Gün 60), 6TG 0.5 mg/kg (Gün 60), 6TG 1.0 mg/kg (Gün 38), 6TG 2.5 mg/kg (Gün 28), 6TG 5.0 mg/kg (Gün 22). HPRT-eksikliği olan farelerde, histoloji tüm hayvanlara yönelik Gün 60'ta incelenmiştir. H&E ile boyanan paraformaldehit ile sabitlenen kemik kesitlerinin temsili fotomikrografları (40x orijinal büyütme) gösterilir.

Şekil 4A-4B. Kombine 6TG koşullandırma ve *in vivo* kemo seçimi stratejisinin optimizasyonu. Tedavi planı: HPRT-wt dişi alıcı fareler Gün -2'de 6TG'nin (10 mg/kg, i.p.) birinci koşullandırma dozunu almıştır, akabinde Gün 0'da 6TG'nin (10 mg/kg, i.p.) ikinci bir koşullandırma dozu ile birlikte HPRT-eksikliği olan

erkek BM ile nakledilmiştir. *In vivo* kemo seçimi akabinde belirtildiği üzere 2 hafta boyunca (ŞEKİL 4A) veya 4 hafta boyunca (ŞEKİL 4B) her 3 günde bir 2.5 mg/kg veya 5.0 mg/kg 6TG olan tekrar eden i.p. enjeksiyonları ile gerçekleştirilmiştir. H&E ile boyanan paraformaldehit ile sabitlenen kemik kesitlerinden kemik iliğinin temsili fotomikroagrafları (40x orijinal büyütme) gösterilir.

Şekil 5. HPRT-wt alıcılarının kombine 6TG koşullandırması ve kemo seçimi kullanılarak HPRT-eksikliği olan donör-deriveli BM ile nakil işleminden sonra uzun-vadeli hematopoetik yeniden yapılandırma. Bar grafikleri, belirtildiği üzere 4 haftada (yani, kemo seçimi periyodunun bitiminden hemen sonra) ve nakil işleminden sonra 4 ayda, 7 ayda ve 12 ayda XY kromozom FISH analizi ile belirlendiği üzere kemik iliğinde (BM) ve periferik kan lökositlerinde (PBL) donör-deriveli hücrelerin yüzdesini gösterir.

DETAYLI AÇIKLAMA

Buluş, 6-tiyoguaninin (6TG) 6TG miyelotoksistide tiyoguanin nükleotidine hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HPRT)-aracılı dönüşümünün önemli rolünden yararlanan yeni bir *in vivo* kemo seçimi stratejisi sağlar. HPRT-eksikliğin hematopoetik hücre gelişimi ve fonksiyonunu tek başına bozmaması nedeniyle, nakil işlemine yönelik kullanılacak olan hematopoetik hücrelerden uzaklaştırılabilir. *In vivo* kemo seçimi stratejisi, HPRT-doğal suşlu alıcıların hem iliği yok edici koşullandırması hem de donör hücrelerin tek döngülü bir *in vivo* kemo seçimi prosesine yönelik 6TG kullanılarak HPRT-eksikliği olan donör HSC'ler ile gerçekleştirilen HSCT'yi içerir. Buluş, HPRT aktivitesindeki melezlenen HSC eksikliği 6TG'nin sitotoksik etkilerine oldukça dirençliken 6TG'nin ekstra-hematopoetik dokuların üzerinde herhangi bir olumsuz etki olmadan seçici miyeloablatifi indüklediği bir dozajlama programının geliştirilmesi ve keşfedilmesine bağlıdır. Bu kombine 6TG koşullandırma ve kemo seçimi stratejisi ile, düşük genel toksisite ile HPRT-eksikliği olan donör HSC'nin etkili ve yüksek melezlemesi elde edilebilir. *In vivo* kemo seçimindeki 6TG, HPRT-eksikliği olan donör (veya melezlenen) BM'nin kendini yenileyen, pluripotent HSC popülasyonunun büyütülmesi yoluyla immünojenik olarak normal kemik iliğinin (BM) uzun-vadeli yeniden yapılandırılmasına izin verir.

Oldukça etkili ve genellikle toksik-olmayan koşullandırma ve tek döngülü in vivo kemo seçimine yönelik burada açıklanan yöntem, HSCT melezleme etkinliği ve nakil işlemi sonucunu geliştirmek ve ex vivo gen terapisinden sonra genetik olarak modifiye edilen hücrelere seçici bir avantaj sağlamak üzere bir strateji olarak genellikle uygulanabilir. İn vivo kemo seçimi stratejisi, HPRT-eksikliği olan donör HSC'nin hem ön-koşullandırma hem de tek döngülü kemo seçimine yönelik sadece 6TG veya diğer bir pürin bazı analogu kullanır ve alıcı >%95 oranında BM'nin değiştirilmesi ile oldukça etkili melezleme ve uzun-vadeli yeniden yapılandırma sağlayabilir. Bu strateji, genel olarak gen terapisinin kapsamını genişletmek üzere fazla sayıda ex vivo olarak manipüle edilen HSC'nin melezleme işleminin geliştirilmesine yönelik uygulanabilir.

Tanımlar

Bu uygulamada kullanılan tüm bilimsel ve teknik terimler, aksi belirtilmediği sürece teknikte yaygın olarak kullanılan anlamlara sahiptir. Bu başvuruda kullanıldığı üzere, aşağıdaki kelimeler veya ifadeler belirtilen anlamlara sahiptir.

Burada kullanıldığı üzere, "radyasyonsuz hematopoetik kök hücre (HSC) nakli" alıcının radyasyon aracılığıyla miyeloablatif koşullandırmaya tabi tutulmadığı anlamına gelir. Bunun yerine, koşullandırma donör HSC'ler ile melezlemeden önce (ve bu gün dahil olmak üzere) 48 saat boyunca tipik olarak uygulanan 6TG uygulaması yoluyla elde edilir.

Burada kullanıldığı üzere, "HPRT-eksikliği olan" hem doğal olarak HPRT-eksikliği olan hücreleri hem de gen modifikasyonu yoluyla HPRT-eksikliği olan olarak elde edilen hücreleri içerir.

Burada kullanıldığı üzere, "donör HSC'ler" veya "donör hücreler" HSC'lerin nakil alıcısı veya diğer bir öznenen derive edilip edilmediğine bakılmaksızın melezlenecek hücrelere refere eder. Bu yüzden, bir öznenen hasat edilen hücreler modifiye edilebilir ve "donör hücreler" haline gelerek aynı özneye tekrar melezlenebilir. Bunlar burada "donör hücreler," "melezlenen hücreler" veya "nakledilen hücreler" olarak refere edilebilir.

Burada kullanıldığı üzere, "bir" veya "bu" açık bir şekilde aksi belirtilmediği sürece en az bir anlamına gelir.

Hematopoetik Nakil İşlemine Yönelik Kombine Koşullandırma ve Kemo Seçimi

5

Buluş, bir radyasyonsuz hematopoetik kök hücre (HSC) nakil işlemi yönteminde kullanıma yönelik bir pürin bazı analogu sağlar, burada pürin bazı analogu 6-tiyoguanindir (6TG) ve burada yöntem aşağıdaki adımları içerir:

- 10 (a) bir ön-koşullandırma adımı olarak pürin bazı analogunun 2 ila 10 mg/kg vücut ağırlığındaki bir veya iki dozunun memeli bir özneye uygulanması;
- (b) hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HPRT)-eksikliği olan donör HSC'lerin ön-koşullandırma adımı 48 ila 72 saatte özneye melezlenmesi ve
- (c) 1 ila 5 mg/kg'lık pürin bazı analogunun melezleme adımı takiben iki ila
- 15 sekiz hafta boyunca her iki ila dört günde bir özneye uygulanması;

burada yöntem ön-koşullandırma yokluğunda radyasyon aracılığıyla gerçekleştirilir.

- 20 Bu yüzden, özne nakil işlemine yönelik hazırlık yapılırken miyeloablatif radyasyon ile tedavi edilmez ve bu yüzden özne miyeloablatif radyasyon ile indüklenen toksisiteye sahip değildir. Yöntem, herhangi bir türde radyasyon tedavisi almamış olan özneler, miyeloablatif radyasyon tedavisi almamış olan özneler ve burada açıklanan yönteme yönelik ön-koşullandırma olabilecek bir zaman aralığında ve/veya bir dozda olmayacak şekilde geçmişte miyeloablatif radyasyon tedavisi almış olan özneler dahil olmak üzere
- 25 çeşitli özneler ile kullanıma yönelik düşünülür. Örneğin, özne tipik olarak burada açıklanan kombine koşullandırma ve kemo seçimi yöntemindeki 2 hafta içinde veya hatta 8 hafta içinde miyeloablatif radyasyon almamıştır.

- 30 Bir pürin bazı analogunun temsili örnekleri, aşağıdaki unsurları içerir: 6-tiyoguanin (6TG), 6-merkaptopürin (6-MP) ve azatiyopürin (AZA). Bazı düzenlemelerde, özneye uygulanan toplam 6TG dozajı 105 mg/kg'ı aşmaz; tipik olarak özneye uygulanan toplam 6TG dozajı 75 mg/kg'ı aşmaz. Bir düzenlemede, pürin bazı analogunun uygulanması melezleme adımı takiben her 3 günde bir ve dört haftadan fazla olmayacak şekilde gerçekleştirilir.

35

Aynı zamanda burada açıklanan, alternatif bir 6TG'nin internetten bilinen (örneğin, rxlist.com) pürin bazı analogu olarak kullanıldığı bir yöntemdir ve buluşun yönteminde kullanıma yönelik uygun bir dozu tanımlarken teknikte uzman klinisyeni yönlendirmek üzere diğer kaynaklar mevcuttur. Örneğin, pediatrik hastalarda ve yetişkinlerde 6TG

5 tek-ajanlı kemoterapiye yönelik normal oral doz günde 2 mg/kg vücut ağırlığıdır; 4 hafta sonra tedaviye herhangi bir yanıtın gözlenmemesi halinde, doz 3 mg/kg'a yükseltilebilir. Geri dönüşümlü miyelosüpresyon gözlenerek tek bir oral dozda 35 mg/kg'a kadar verilmiştir.

- 10 Akut lenfatik lösemi bakımından, pediatrik hastalar ve yetişkinlere yönelik normal başlangıç dozu, günde 2.5 mg/kg 6-MP vücut ağırlığıdır (sıradan yetişkinlerde 100 ila 200 mg ve sıradan 5 yaşındaki bir çocukta 50 mg). Akut lösemisi olan pediatrik hastalar birçok durumda zorlanmadan bu dozu tolere etmiştir; bazı hastalarda birkaç hafta boyunca veya daha fazla günlük olarak devam ettirilebilir. Bu dozajda 4 haftadan
- 15 sonra, herhangi bir klinik gelişmenin ve lökosit veya trombosit baskılamasına yönelik kesin bir kanıtın görülmemesi halinde, dozaj günde 5 mg/kg'a kadar yükseltilebilir. 2.5 mg/kg/gün olan bir dozaj, akut lenfatik lösemisi ve yüksek toplam lökosit sayısı olan bazı yetişkinlerde 1 ila 2 hafta içinde lökosit sayısında hızlı bir düşüş ile sonuçlanabilir. Tam bir hematolojik remisyon elde edildiğinde, idame tedavisi önemli olarak düşünülür.
- 20 İdame dozları hastadan hastaya değişiklik gösterecektir. 6-MP'nin normal günlük idame dozu, tek bir doz olarak 1.5 ila 2.5 mg/kg/gündür.

- 6-TG ve 6-MP'ye yönelik dozaj, bir şekilde karşılaştırılabilir, öte yandan AZA'ya yönelik dozajın ilk önce 6-MP'ye yönelik biyoaktif hale getirilmesinin gerekli olması nedeniyle
- 25 karşılaştırılması zordur ve genellikle lösemisinin tedavi edilmesine yönelik kullanılmaz. Katı organ nakli alan hastalara yönelik, reddetmeyi önlemek ve toksisiteyi minimuma indirmek üzere gerekli AZA dozu, dikkatli bir yönetim gerektirerek ayrı hastalara göre değişecektir. Başlangıç dozu, genellikle nakil işleminin başlangıcında günün günde 3 ila 5 mg/kg'dır. AZA genellikle nakil gününde veya nadiren nakilden 1 ila 3 gün önce tek
- 30 bir günlük doz olarak verilir. Dozun günde 1 ila 3 mg/kg olan idame seviyelerine azaltılması, genellikle mümkündür. AZA dozu, reddetme tehdidi nedeniyle toksik seviyelere yükseltilmemelidir.

- HPRT-eksikliği olan donör HSC'ler, doğal olarak HPRT-eksikliği yaşayabilir veya
- 35 genetik modifikasyon yoluyla HPRT-eksikliği olacak şekilde elde edilebilir. Bu

bağlamda, "donör HSC'ler" HSC'lerin nakil işleminin alıcısından veya diğer bir öznenen derive edilip edilmediğine bakılmaksızın melezlenecek hücelere refere eder. Nakledilen HSC'ler otolog, sinjeneik veya allojenik olabilir.

- 5 Genetik modifikasyon, teknikte uzman kişilerce bilinen bir dizi yoldan herhangi biri kullanılarak elde edilebilir. Genetik modifikasyonun uygun yollarına örnekler, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, çinko parmak nükleazları (ZFN'ler), transkripsiyonel aktivatör-benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler), küçük parçalı homolog rekombinasyon (SFHR) kalıp zincirleri, inhibitör RNA'lar (siRNA'lar) veya mikroRNA'lar (miRNA'lar), antisens
- 10 RNA'lar, trans-zincirleme RNA'ları, ribozimler, hücre içi antikolar veya dominant negatif veya rekabetçi inhibitör proteinleri kodlayan dizilerin eklenmesini içerir. Modifikasyon, donör HSC'ler veya progenitörler ile direkt olarak kullanılabilir. Bu teknolojiler, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, hematopoetik progenitör hücreler veya direkt olarak hematopoetik kök hücreleri ve aynı zamanda hematopoetik progenitör veya
- 15 hematopoetik kök hücreler olarak farklılaştırılan veya trans-farklılaştırılan yetişkin veya embriyonik kök hücreler veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin diğer türlerini içeren bir dizi hücre tipinin genetik modifikasyonuna yönelik kullanılabilir.

- Bazı düzenlemelerde, nakledilecek HPRT-eksikliği olan HSC'ler belirli bir terapötik
- 20 amaca uymak üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Örneğin, donör HSC'ler kalıtsal bir genetik kusuru düzeltmek, normal kemik iliğinin sitotoksik ilaçlara ilaç duyarlılığını değiştirmek, lenfohematopoetik hücreleri etkileyen bulaşıcı mikroorganizmalara karşı direnç sağlamak, endojen bağışıklık sistemini değiştirmek veya yeniden-ayarlamak veya endojen kemik iliğinin değiştirilmesi ve nakledilen bir doku karşısında
- 25 lösemi/lenfoma etkisinin indüksiyonu ile lenfohematopoetik maligniteler ile mücadele etmek üzere modifiye edilebilir.

- Daha spesifik olarak, kalıtsal genetik kusurlar, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, orak hücreli anemi, talasemi, kalıtsal sferositoz, G6PD eksikliği ve benzeri gibi
- 30 hemoglobinopatileri içeren hemapotoez bozukluklarını, şiddetli kombine immün yetmezlik (SCID) gibi immünolojik veya antimikrobiyal fonksiyon bozukluklarını, kronik granülomatöz hastalığını (CGD), Wiskott-Aldrich sendromu (WAS) gibi koagülasyon kusurlarına yol açan trombopoiez bozukluklarını ve aynı zamanda epidermoliz büllozanın (EB) çeşitli formları ve mukopolisakkaridoz gibi doku hasarı bölgelerine

giden hematopoetik hücrelerin genetik mühendisliği ile iyileştirilebilen diğer genetik yapısal veya metabolik bozuklukları içerebilir.

5 Kemik iliğinin kemotoksik ilaçlara yönelik ilaç duyarlılığının avantajlı olmasının mümkün olduğu modifikasyondaki hastalıklar, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, maksimum tolere edilen dozajı miyelotoksisite ile sınırlandırılan kemoterapi ajanları ile tedavi edilen malign hastalıkları içerir. Bunlar akciğer kanseri, kolorektal kanser, meme kanseri, prostat kanseri, pankreas kanseri, mide kanseri, karaciğer kanseri, baş ve boyun kanseri, böbrek hücreli karsinom, mesane kanseri, serviks kanseri, yumurtalık kanseri, 10 deri kanseri, sarkomlar ve gliomayı içerir.

Kemik iliği veya hematopoetik kök hücre nakli işleminin enjoden bağışıklık sistemini değiştirmek veya yeniden ayarlamak üzere kullanıldığı hastalıklar, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, inflamatuvar bağırsak hastalığı, skleroderma ve lupus eritematozusu 15 içerir.

Bulaşıcı mikroorganizmalara karşı direnç sağlamanın avantajlı olabileceği hastalıklar, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, HIV enfeksiyonu ve AIDS, HTLV enfeksiyonu ve parvovirüs B19 enfeksiyonunu içerir.

20 Kemik iliği veya hematopoetik kök hücre nakli işlemi ile tedavi edilen malign veya önceden-malign lenfohematopoez hastalıkları, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, akut miyelojenöz lösemi, akut lenfositik lösemi, lenfoma ve miyelodisplastik sendromları içerir.

25 Bu teknolojinin terapötik uygulamasının diğer bir örneği, radyasyon hasarı ve kemotoksinlerin neden olduğu endojen lenfohematopoezde oluşan hasar sonrası kemik iliği veya hematopoetik kök hücre nakli işleminin sonucunu geliştirmek olabilir.

30 Bu teknolojinin terapötik-olmayan ancak ticari olarak kullanışlı bir uygulaması, bunların endojen lenfohematopoezinin bir insan donöründe hücreler ile neredeyse tamamen yerleştirildiği insanlaşmış hayvan modelleri üretmek üzere kullanılması olabilir. Üretildikten sonra, bu tür hayvanlar örneğin insan hastalıklarına uygulamaya yönelik 35 düşünülen yeni ilaçların miyelotoksisitesini test etmek üzere kullanılabilir. Bu,

lenfohematopoezinin çeşitli ilaçlara olan duyarlılığının hayvan türlerine bağlı olarak farklı olmasının mümkün olması nedeniyle avantajlıdır, bu yüzden bu tür testlerin en çok insanlaştırılmış bir hayvan modelinde test edilmesi istenir.

- 5 Tipik olarak, özne bir memelidir. Memeli özne fare, köpek, kedi, sığır, at, koyun, primat veya insan olabilir. Bir düzenlemede özne insandır.

Uygulama ve Dozaj

- 10 Bileşimler, sıklıkla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar ile birlikte herhangi bir uygun şekilde uygulanır. Mevcut buluşun bağlamında tedavinin bir özneye uygulanmasına yönelik uygun yöntemler mevcuttur ve birden fazla yolun belirli bir bileşimi uygulamak üzere kullanılamamasına rağmen, belirli bir yol diğer yoldan sıklıkla daha hızlı ve etkili bir reaksiyon sağlayabilir. Mevcut buluşun bağlamında bir hastaya
- 15 uygulanan doz, bir süre sonra hastada yararlı bir terapötik yanıt etkilemek veya hastalığın ilerlemesini engellemek üzere yeterli olmalıdır. Bu yüzden, bileşim etkili bir yanıt elde etmek ve/veya hastalık kaynaklı semptomları ve/veya komplikasyonları hafifletmek, azaltmak, tedavi etmek veya en azından kısmen durdurmak üzere yeterli bir miktarda bir özneye uygulanır. Bunu sağlamak üzere yeterli bir miktar, "terapötik
- 20 olarak etkili bir doz" olarak tanımlanır.

- Burada açıklanan terapötik bileşimlerin uygulama yolları ve sıklığı, ayrıca dozaj, kişiden kişiye ve aynı zamanda seçilen ilaca göre değişecektir ve standart teknikler kullanılarak hazır bir şekilde oluşturulabilir. Genel olarak, farmasötik bileşimler örneğin, enjeksiyon
- 25 yoluyla (örneğin, intrakutanöz, intratümöral, intramüsküler, intravenöz veya subkutanöz), intranazal olarak (örneğin, soluma yoluyla) veya oral olarak uygulanabilir. Alternatif protokoller ayrı hastalara yönelik uygun olabilir.

- Teknikte uzman kişilerce anlaşıldığı üzere, dozlar mg/kg vücut ağırlığından mg/vücut
- 30 yüzey alanına dönüştürülebilir, sonuncusu insanlar dahil olmak üzere daha büyük memeli özneler ile kullanıma yönelik uygundur. Allometrik ölçeklendirmeye yönelik hesaplayıcılar teknikte bilinir ve kolaylıkla internetten temin edilebilir. Genel olarak, allometrik ölçeklendirme 0.75-0.80'in bir üssünü kullanır. Daha fazla bilgi için, West & Brown, J Exp Bio 208, 1575-1592, 2005'e bakınız. Ek olarak, Amerika Birleşik
- 35 Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi, 5600 Fishers Lane Rockville, MD 20857 adresinde

bulunan İlaç Bilgileri Eğitim ve İletişim Dairesi Başkanlığı'ndaki İlaç Değerlendirme ve Gıda ile İlaç Uygulaması Araştırması'na yönelik HFD-240 Merkezi'nden temin edilebilen "Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers" makalesini yayınlar.

5

Örneğin, 5 mg/kg 6TG 20 g olan bir fareye yönelik 15.08 mg/m² olan bir doza karşılık gelir. Bu, 65 kg olan bir insana yönelik 0.4 mg/kg'a eşittir. 6TG uygulamasından sonra absorpsiyon %30 olarak tahmin edilir, bu yüzden farelerdeki bu i.p. dozu insanlarda yaklaşık 1.3 mg/kg olan oral uygulamadan sonra absorbe edilmiş bir doza karşılık gelir.

10 Pediatrik hastalarda ve yetişkinlerde 6TG tek-ajanlı kemoterapiye yönelik klasik oral doz, günde 2 mg/kg vücut ağırlığıdır; 4 hafta sonra tedaviye herhangi bir yanıtın gözlenmemesi halinde, doz 3 mg/kg'a yükseltilebilir.

Buluş, özneye yönelik aşırı ışınlama veya aşırı 6TG dozajını takiben toksisiteden kaçınılması bakımından beklenmeyen bir avantaj sağlar. Şaşırtıcı bir şekilde, etkili koşullandırma ve kemik iliğinin yeniden yapılandırılması, tedavi süresi boyunca ve iki ila sekiz hafta arası bir süre boyunca 105 mg/kg'dan daha az toplam 6TG dozajı kullanılarak sağlanabilir. Etkili melezleme, iki hafta kadar kısa bir süre boyunca 65 mg/kg'dan daha az toplam 6TG dozajı ile gözlenmiştir. Ek olarak, yöntem bir ayrı 20 öznedeki toksisitenin izlenmesi ve her bir özneye yönelik minimal toksisite ile etkili melezlemeyi optimize etmek üzere dozun ayarlanması seçeneğine olanak sağlar. Bazı düzenlemelerde, özne melezleme-sonrası tedaviler boyunca 1 veya 2.5 mg/kg vücut ağırlığı 6TG olarak uygulanır.

25 Yöntem ile uyumlu olarak tedavi edilen öznelere, %75'in üzerinde genetik olarak modifiye edilen hematopoetik hücreleri gösterecektir. Bazı düzenlemelerde, özne %95'in üzerinde nakil işlemi ve kemo seçiminden sonra genetik olarak modifiye edilen hematopoetik hücreleri gösterir. Başarılı melezleme, çeşitli aralıklar ile periferik kan veya kemik iliğinin numune olarak alınması ile bir öznedeki doğrulanabilir. Periferik kan 30 mononükleer hücreleri, bunlar ile sınırlı olmamak üzere polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), kantitatif gerçek zamanlı PCR (Q-PCR), araştırmacı nükleaz analizi (ayrıca 'Cel-I assay' olarak da refere edilir), Southern blot analizi, Western blot/immunoblot analizi, immünohistokimya veya immünositokimya, hücre içi boyama ile akış sitometrisi analizi, HPRT enzimatik aktivite analizi, HPLC, kütle spektrometresi ve benzerini içeren 35 genel olarak dahil olmak üzere teknikte uzman bir kişinin aşına olduğu çeşitli standart

teknikler kullanılarak fonksiyonel aktivitede HPRT gen bozulması, nakavtı veya azalmasının izlenmesi yoluyla incelenebilir.

ÖRNEK

5

Aşağıdaki örnek, mevcut buluşu açıklamak ve bunun yapımı ve kullanımına yönelik teknikte uzman bir kişiye yardımcı olmak üzere temsil edilir. Örnekler, herhangi bir şekilde buluşun kapsamını kısıtlama amacını taşımaz.

10 **Örnek 1: 6-tiyokuanin ile tek başına kombine ön koşullandırma ve *in vivo* kemo seçimi HPRT-eksikliği olan kemik iliği ile normal hematopoezin oldukça etkin olarak yeniden yapılandırılmasını sağlar**

6-tiyoguanin (6TG) gibi pürin analogları, hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HPRT) ile nükleotidlere dönüştürüldükten sonra miyelotoksisiteye neden olur. Bu örnek, HPRT-eksikliği olan HSC'nin hem koşullandırılması hem de *in vivo* kemo seçimine yönelik tek bir ajan olarak 6TG kullanan yeni ve oldukça etkili bir stratejinin gelişimini gösterir. 6TG miyelotoksisitesinin doz-yanıtı ve zaman seyri, ilk önce HPRT-doğal suşlu fareler ve HPRT-eksikliği olan transgenik fareler ile karşılaştırılmıştır. Dozaj ve plan parametreleri, sinojenik HPRT-doğal suşlu alıcılara nakledilen HPRT-eksikliği olan transgenik donör kemik iliğinin (BM) *in vivo* kemo seçiminden hemen sonra miyelo-süpresif koşullandırmaya yönelik 6TG'yi kullanmak üzere optimize edilmiştir.

Uygun dozajlarda 6TG, HPRT-doğal suşlu farelerde ekstra-hematopoetik dokuların üzerinde herhangi bir olumsuz etki olmadan seçici miyelotoksisiteyi indüklemiştir, öte yandan HPRT aktivitesinde eksik olan HSC, bunun sitotoksik etkilerine oldukça dirençli olmuştur. Kombine 6TG koşullandırma ve nakil sonrası kemo seçimi düşük toplam toksisite ile HPRT-eksikliği olan donör BM'ye yönelik tutarlı olarak -%95 melezleme elde etmiştir. İmmünofenotipik olarak normal BM'nin uzun-vadeli bir şekilde yeniden yapılandırılması, hem primer hem de sekonder alıcılarda elde edilmiştir. Bu sonuçlar, tek-ajanlı 6TG'nin hem ışınlama işlemi gerektirmeden miyelo-süpresif koşullandırmada hem de HPRT-eksikliği olan donör hücrelerin *in vivo* kemo seçiminde kullanılabilmesi bakımından kavramı kanıtlar. Sonuçlar, nakil işleminden hem önce (koşullandırma olarak) hem de sonra (kemo seçimi olarak) 6TG'nin miyelosüpresif etkilerinin

uygulanması yoluyla, HPRT-eksikliği olan hematopoetik kök hücrelerin oldukça etkili olarak melezlenmesi sağlanabilir.

Hematopoetik kök hücreleri kullanılarak *ex vivo* gen terapisinin klinik etkinliği, seçici bir avantajın nakledilen hücrelere [1, 2] uygulanmasına bağlı olmaya devam eder. Melezlemeyi geliştirmek ve lenfohematopoetik yeniden yapılandırmaya yönelik gerekli süreyi azaltmak üzere, dihidrofolat redüktaz (DHFR) [3] veya çoklu ilaç-dirençli gen 1 (MDR1) [4, 5] gibi ilaç dirençli genleri kullanan *in vivo* seçim stratejileri test edilmiştir, ancak kabul edilemez toksisite [6] veya yetersiz seçim etkinliği [7] nedeniyle genel olarak başarısız olmuştur. Mevcut olarak, O⁶-metilguanin-DNA-metiltransferazın (MGMT) mutant formları, O⁶-benzilguanin [8, 9] ile kombinasyon halinde BCNU veya temozolomide karşı kemo koruma sağlama kabiliyetleri açısından test edilir, ancak bu ajanlar aynı zamanda önemli ölçüde bir toksisite riski taşır ve yakın zamandaki gözlemler mutant MGMT'nin yüksek seviyelerde [10] ifade edildiğinde seçici bir dezavantaj sağlayabileceğini belirtir.

Özellikle, bu yaklaşımlar genel olarak eksojen bir ilaç direnci genini miyeloablatif ışınlama ile ön koşullanan alıcılara fazlaca-ifade eden hematopoetik progenitörlerin nakline dayanır; ancak, kemo-direnç sitotoksik ilaçların aktivasyonuna yönelik normal olarak gerekli olan azalan endojen enzim seviyeleri ile sağlanabilir. Bu bağlamda, pürin nükleotid kurtarma yolu enzimi hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza (HPRT) ait yüksek seviyelerin pürin analogu 6-tiyoguanine (6TG) [11] yönelik artan duyarlılığa neden olduğu önceden gözlemlenmiştir. 6TG'nin metabolik dönüşümünün birinci adımı, tiyoguanozin monofosfatı (TGMP) üretmek üzere riboz 5-fosfatın eklenmesine aracılık eden HPRT [12] ile katalize edilir. Bu yüzden, 6TG sitotoksisite bunun akabinde sonuçsuz uyumsuzluk onarımı ve sonraki apoptoz dahil olmak üzere DNA'ya dahil edilen tiyo-dGTP'lere HPRT-aracılı dönüşümünde temel olarak tahmin edilir.

Azalan aktivite yoluyla miyelo koruma sağlamak üzere, endojen ilaç-aktive edici enzim normal olarak hematopoetik progenitörlerde oldukça fazla ifade edilmelidir, ancak normal hematopoeze yönelik gerekli değildir. Aslında, hematopoetik progenitörler normal olarak bunları 6TG'ye oldukça duyarlı hale getiren yüksek HPRT [13-16] seviyelerini ifade eder. Gerçekten, 6-merkaptopürin (6MP), azatiyopürin (Aza) ve 6TG gibi pürin analogları neredeyse yarım yüzyıl boyunca [17] özellikle pediatrik hastalarda lösemi tedavisine ve aynı zamanda organ nakli hastalarında immünosüpresyona ve

daha yakın zamanda otoimmün hastalıklara yönelik klinik olarak kullanılmıştır. Daha yüksek dozlarda, miyelotoksisite klinik olarak kullanıldığında ve kısa bir süre boyunca uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında 6TG'nin en sık ve sabit olumsuz etkisidir, 6TG normal HPRT-doğal suşlu hayvanlarda [11] diğer dokulara yönelik çok az toksisite ile kuvvetli bir şekilde mielosüpresiftir.

Aksine, HPRT-eksikliği olan hayvanlardan kemik iliği (BM) 6TG'ye oldukça dirençlidir [11]. Ancak kayda değer bir şekilde, hematopoezisin *Hprt*-nakavt hayvanlarında fenotipik ve fonksiyonel olarak normal olduğu biz [11] ve diğerleri [18] tarafından bulunmuştur ve megaloblastik anemi durumlarının insanlarda [19] kalıtsal HPRT eksikliği (Lesch-Nyhan sendromu) ile ilişkilendirilmesine rağmen, bunun adeninin [20] oral uygulamasına iyi yanıt verdiği rapor edilmiştir. İlaveten, HPRT eksikliğin insanlarda veya hayvanlarda [21] bağışıklık sisteminin herhangi bir şekilde bütün olarak zarar görmesi ile ilişkili olduğu düşünülmez.

Bu gözlemler, 6TG-direnci olan ancak bunun dışında normal olan HPRT-eksikliği olan progenitor hücrelerin 6TG tedavisi gören HPRT-doğal suşlu alıcılara nakledildiğinde seçici bir avantaja sahip olması gerektiğini ve bu stratejinin *ex vivo* gen terapisinin sonucunu geliştirmek üzere kullanılabileceğini belirtir. Aslında, Porter ve DeGregori [22] HSC'nin *Hprt*-hedefli shRNA'yı ifade eden lentiviral bir vektör ile aktarılmasının ve bu tasarlanmış hematopoetik hücrelerin farelerdeki 6TG kemo seçimi ile *in vivo* olarak iyileştirilmesinin fizibilitesini önceden göstermiştir. Ancak, bu önceki raporda, 6TG sadece orta derecede mielosüpresif olacak şekilde veya nakil işleminden sonra 4 hafta veya daha fazla olarak başlatılan kısa bir seçim süresinde seçilen dozajlarda uygulanmıştır ve toplam vücut ışınlaması ile ön koşullandırma işlemine rağmen, melezleme sonuçları %5 - 50 aralığında olarak nispeten ılımlı ve oldukça değişken olmuştur [22].

Bu noktada, HPRT-eksikliği olan kemik iliği naklinden sonra melezleme ve hematopoetik yeniden yapılandırma üzerine 6TG uygulamasının doz, süre ve uzunluğunun değiştirilmesinin etkileri sistematik olarak incelenmiştir. Bir değişken olarak vektör aktarım etkinliğini dışarıda bırakmak üzere, 'ideal' donör hücreleri olarak *Hprt*-nakavt hayvanlarından BM kullanılmıştır, böylelikle hem (i) HPRT-doğal suşlu alıcıların mielosüpresif koşullandırılmasına yönelik nakil-öncesinde hem de (ii) HPRT-eksikliği olan donör hücre popülasyonlarının kemo seçici uygulamasına yönelik nakil-

sonrasında 6TG dozajını modifiye etme ve parametreleri planlama etkilerine odaklanmaya yardımcı olur. Akabinde, burada 6TG'yi hem ön koşullandırma hem de *in vivo* kemo seçimine yönelik tek bir ajan olarak sıralı bir şekilde uygulayan yeni bir rejimin geliştirilmesi açıklanır ve bu kombinasyon rejiminin hızlı ve tutarlı bir şekilde
5 oldukça etkili melezleme ve uzun-vadeli yeniden yapılandırma sağladığını gösterir.

Materyaller ve yöntemler

Fareler

10

Hprt-eksikliği olan B6.129P2-*Hprt1^{b-3}*/J (CD45.2) fareleri, *Hprt*-doğal suşuna sahip (wt) C57BL/6J ve B6.SJL-*Ptprc^aPepc^b*/BoyJ (CD45.1) fareleri, orijinal olarak Jackson Laboratory'den elde edilmiştir (Bar Harbor, ME). B6.129P2-*Hprt1^{b-m3}*/J fareleri, promotör ve *Hprt*-geninin birinci 2 eksonları boyunca uzanan 55 kb'lık bir kayıp taşır
15 [23]. Fareler yetiştirilmiştir ve kurumsal kurallara göre standart koşullar altında kurumsal özel patojen içermeyen hayvan tesisinde korunmuştur.

6TG tedavisi

20 C57BL/6J ve B6.129P2-*Hprt1^{b-m3}*/J fareleri, şekil açıklama yazılarında açıklandığı üzere farklı zaman noktalarında 6TG'ye (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) ait 200 µl'lik değişen dozlarda intraperitoneal olarak (i.p.) enjekte edilmiştir. Kontrol hayvanları 200 µl'lik steril H₂O ile i.p. olarak enjekte edilmiştir.

25 Kemik iliği nakli ve 6TG in vivo kemo seçimi

Dişi alıcı C57BL/6J (HPRT-wt) veya B6.SJL-*Ptprc^aPepc^b*/BoyJ (HPRT-wt, CD45.1) fareleri, HSCT'den 48 saat önce i.p. enjeksiyonu yoluyla 10 mg/kg 6TG ile tedavi edilmiştir. HSCT'ye yönelik, B6.129P2-*Hprt1^{b-m3}*/J erkek farelerinden (CD45.2) izole
30 edilen $0.8-1 \times 10^7$ çekirdekli BM hücreleri, HPRT-wt alıcılarına intravenöz olarak enjekte edilmiştir. 6TG (10 mg/kg) 2 saat sonra ve 3 günde bir bundan sonra 4 hafta boyunca 5 mg/kg'da i.p. enjeksiyonu ile tekrardan uygulanmıştır. Sekonder alıcı farelere seri nakil, aynı hücre dozu ve 6 ay önce 6TG *in vivo* kemo seçimi ile nakil işlemi gerçekleştiren primer alıcı farelerden BM'nin kullanılması haricinde yukarıdaki gibi 6TG ön
35 koşullandırma/kemo seçimi rejimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Fare koromozomu X- ve Y'ye özgü florans in situ hibridizasyon

FISH, üreticinin protokolüne göre fareye özgü Tüm Kromozom-Y boya probu/RAB9 (XqF1) DNA probları karışımı (Kreatech, Amsterdam, Hollanda) kullanılarak BM ve PBL hücrelerinin üzerinde gerçekleştirilmiştir. Erkek donör HPRT-wt hücrelerinin dışı alıcı C57BL/6J farelerindeki yüzdesini belirlemek üzere, her bir cam deney plakası için 200 çekirdek, uygun çift ve üç-renkli filtreler ile donatılan bir floresan mikroskop (Zeiss) kullanılarak sayılmıştır. Aşağıdaki kriterler FISH'nin analiz edilmesine yönelik uygulanmıştır: (1) çekirdeğin kalitesi DAPI boyaması aracılığıyla değerlendirilmiştir, (2) Y-kromozomuna yönelik yeşil floresan sinyal puanlanmıştır, (3) X-kromozomuna yönelik kırmızı floresan sinyal puanlanmıştır, (4) Y-kromozomu çekirdeğine yönelik yeşil floresan sinyalin yokluğu, sadece bir X-kromozomu tespit edildiğinde dahi dışı olarak rapor edilmiştir (Ek Şekil S1; ek şekiller için Deneysel Hematoloji 2012, 40:3-13'e bakınız).

Hematopoetik dokuların immünofenotipik analizi

Fare BD Fc Bloğu (BD Biosciences, San Jose, Kaliforniya) ile engellemeden sonra, BM, PBL, timüs veya dalak hücreleri CD45, CD45.2, CD4, CD8, Mac1/Gr1, B220, Sca-1, c-kit ve soy antikor kokteyline karşı FITC-, PE-, PerCP- veya APC-konjuge sıçan anti-fare antikorları ile boyanmıştır. Antikorlar Biolegend (San Diego, Kaliforniya) veya BD Biosciences şirketinden alınmıştır. Akış sitometrik verileri, bir BD LSRII running BD FACSDiva (BD Biosciences) ile elde edilmiştir ve FlowJo yazılımı (TreeStar, Ashland, Oregon) kullanılarak analiz edilmiştir (Ek Şekil S2).

Histopatolojik analiz

Bu çalışmada kullanılan tüm farelerin nekropsisi ve tüm torasik ve abdominal organlar ve kemik iliğini histolojik incelemesi, UCLA Laboratuvar Hayvanı Tıbbi Diagnostik Hizmet Laboratuvarı Bölümü tarafından gerçekleştirilmiştir. Dokular rutin işlenmiştir veya gerekli olması halinde dekalsifiye edilmiştir ve parafin kesitleri kesilmiştir ve hematoxilen ve eozin (H & E) ile boyanmıştır.

İstatistiksel analiz

Veriler, QuickCalcs istatistiksel yazılım programı (Graphpad Software Inc.) kullanılarak analiz edilmiştir. Eşleştirilmemiş t-testleri, p değerlerini hesaplamak üzere kullanılmıştır ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak önemli olarak dikkate alınmıştır.

5

Sonuçlar

HPRT-wt farelerde 6TG'nin akut miyelotoksitesisi

10 Hematopoetik progenitörlerde HPRT ifadesinin yüksek seviyeleri, 6TG'nin seçici bir miyelotoksik etkisine aracılık etmek ve bir koşullandırma rejimi olarak kullanılmasını sağlamak üzere tahmin edilir. Buna göre, HPRT-wt farelerinde çeşitli dozajlarda 6TG'ye ait bolus enjeksiyonlarından sonra BM üzerinde kısa-vadeli etkiler incelenmiştir. 2.5 mg/kg, 5.0 mg/kg veya 10 mg/kg'lık 6TG'ye ait tek bir dozun intraperitoneal 15 enjeksiyonu, Gün 1'de veya 10 mg/kg'lık iki doz enjeksiyonu Günler 1 ve 3'te gerçekleştirilmiştir ve BM histolojisi Gün 4'te incelenmiştir. Artan miyelotoksitesite, toplam 6TG dozajı arttıkça gözlenmiştir (Şekil 1A). Vasküler yapılar aşamalı olarak belirgin hale gelmiştir ve hem eritroid hem de miyeloid soylarının hücreleri tüketilmiştir. Sadece vasküler endotelyum, mezenkimal hücreleri, birkaç olgun granülosit ve makrofaj ve az 20 rastlanan hematopoetik progenitör hücreler test edilen en yüksek 6TG dozunda görülmüştür (Şekil 1B).

Yukarıdaki rejimlerin herhangi biri ile kolaylıkla görülen herhangi bir klinik belirti Gün 4'te gözlenmemiştir, ancak gözlem periyodu uzatıldığında, kilo kaybı ve ekstremitelerin 25 solukluğu Gün 7'de görülmüştür. BM'nin histolojik olarak incelenmesi, ilave 6TG dozları uygulanmasa bile Gün 4 ile Gün 7 arasında artan bir şiddet göstermiştir (Şekil 1A, 2A). Klinik ve histolojik bulgular ile uyumlu olarak, iki doz 10 mg/kg'lık 6TG ile tedavi edilen ve Gün 7'de analiz edilen HPRT-wt farelerine ait BM, araç kontrolü ile tedavi edilen HPRT-wt farelerinin içerdiği sayıya ($1.1 \times 10^7 \pm 0.2 \times 10^7$, $n=3$) ($p < 0.01$) göre bir uyluk ve 30 kaval kemiğinden kurtarılan BM çekirdekli hücre sayısında ($4.7 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^6$, $n=3$) önemli ölçüde nicel bir azalma göstermiştir.

Geriye kalan BM hematopoetik hücrelerin akış sitometrisi ile immünofenotipik analizi (Tablo 1), uzun-vadeli çok soylu yeniden yapılandırma aktivitesi [24] ile HSC'yi içeren 35 ilgili KLS ($lin^-/c-kit^+/sca-1^+$) progenitörleri oranının, Gün 4'e kadar 3-kat ($p < 0.01$) ve Gün

7'ye kadar 10-kat ($p<0.001$) olacak şekilde önemli ölçüde azaldığını ortaya çıkarmıştır (Tablo 1-iii, -iv). Olgun CD8+ ve CD4+ T hücrelerinin ilgili yüzdesi, BM histolojisinde de görülebileceği üzere muhtemelen çok fazla genişlemiş kan damarları ve periferik kan/kanama akışı nedeniyle Gün 7'deki kontrollere kıyasla 7-kata ($p<0.001$) ulaşarak 6TG uygulamasından bir süre sonra aşamalı olarak artmıştır. B220+ hücrelerinin ilgili yüzdesi, Gün 4'te herhangi bir kayda değer değişiklik göstermemiştir, ancak 6TG uygulamasından sonra Gün 7'deki kontrollere kıyasla iki katına çıkmıştır.

Tablo 1. 6TG koşullandırma rejiminden sonra BM hematopoetik hücrelerin immünofenotipik analizi.

BM hücreleri, aşağıdaki sıçan anti-fare antikorları ile boyanmıştır: CD45-FITC, CD4-PE, CD8-APC, B220-PerCP, Mac1/Gr1-PE, Sca-1-PE ve c-kit-FITC ve akış sitometrisi ile incelenmiştir.

Tedavi ve analiz planları küçük roma rakamları ile belirtilir ve Şekil 1'deki gibidir. (i): Gün 1'de araç kontrolü, Gün 4'te analiz. (ii) Gün 1'de 10 mg/kg'lık 6TG'nin tek dozu, Gün 4'te analiz. (iii): Günler 1 ve 3'te 10 mg/kg'lık 6TG'nin iki dozu, Gün 4'te analiz. (iv) & (v): Günler 1 ve 3'te 10 mg/kg'lık 6TG'nin iki dozu, Gün 7'de analiz. **En son iki kolon, sırasıyla HPRT-wt (iv) ve HPRT-eksikli olan (v) farelerde aynı 6TG dozajı ve planının (10 mg/kg 6TG x 2 doz) üç sonucunu gösterir.** Belirtilen hematopoetik hücre alt popülasyonuna ait yüzdelar, toplam CD45+ hücrelerine ait ortalama % $\pm$ SD olarak ifade edilir (her bir grup için n=3).

Hücre popülasyonu	HPRT-doğal suşu				HPRT-eksikliği
	i	ii	iii	iv	v
CD45 ⁺	91.5 $\pm$ 2.4	95.7 $\pm$ 0.8	95.7 $\pm$ 0.1	82.8 $\pm$ 5.1	90.0 $\pm$ 2.0
CD4 ⁺	3.5 $\pm$ 0.4	11.9 $\pm$ 2.5	9.6 $\pm$ 0.6	20.5 $\pm$ 3.1	2.9 $\pm$ 1.7
CD8 ⁺	3.6 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 1.7	5.2 $\pm$ 0.4	25.0 $\pm$ 2.7	2.7 $\pm$ 0.4
B220 ⁺	28.4 $\pm$ 3.3	23.1 $\pm$ 2.2	26.2 $\pm$ 1.8	56.3 $\pm$ 1.5	10.7 $\pm$ 3.5
Mac1 ⁺ /Gr1 ⁺	75.8 $\pm$ 1.1	85.4 $\pm$ 1.8	81.0 $\pm$ 1.3	61.8 $\pm$ 3.0	79.3 $\pm$ 2.9
KLS (HSC)	4.2 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.6

Önemli ölçüde, karaciğer enzimleri HPRT-wt farelerinde bu koşullandırma rejimini takiben yükselmemiştir, 6TG sitotoksitesinin bu dozajda hematopoetik progenitörlere yönelik seçiciliğini belirtir ve miyelosüpresif bir koşullandırma rejimi olarak bunun potansiyel kullanımını önerir.

HPRT-eksikliği olan farelerde 6TG koşullandırma dozajında miyelotoksite eksikliği

10

Yukarıdaki bulgulara zıt olarak, HPRT-eksikliği olan fareler maksimum dozajlama ile muamele edildiğinde (Günler 1 ve 3'te iki doz 10 mg/kg'lık 6TG), kemik iliği histolojisi Gün 7'de hiçbir şekilde etkilenden kalmıştır (Şekil 2A) ve araç kontrol grubundaki ile karşılaştırılabilir olmuştur (Şekil 1A). Önemli bir şekilde, 6TG ile tedavi edilen HPRT-eksikliği olan farelere ait bir uyluk ve kaval kemiğinden elde edilen çekirdekli BM hücrelerinin toplam sayısı ($1.5 \times 10^7 \pm 0.3 \times 10^7$, n=3), aynı zamanda araç kontrollü-tedavi edilen HPRT-wt farelerinin içerdiği sayı ($1.1 \times 10^7 \pm 0.2 \times 10^7$, n=3) ile karşılaştırılabilir olmuştur ve aynı 6TG rejimi ile tedavi edilen HPRT-wt farelerin içerdiği sayıdan ($4.7 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^6$, n=3) ($p < 0.005$) büyük ölçüde daha yüksek olmuştur.

20

İlaveten, 6TG ile tedavi edilen HPRT-eksikliği olan farelere ait BM'de hematopoetik hücre alt popülasyonlarının oranı (Tablo 1-v), araç kontrollü-tedavi edilen HPRT-wt farelerinin (Tablo 1-i) ve tedavi edilmemiş HPRT-wt farelerinin (Tablo 2, %BM kolonu) ve aynı zamanda tedavi edilmemiş HPRT-eksikliği olan farelerin (Tablo 3, %BM kolonu) oranı ile karşılaştırılabilir olmuştur.

25

Tablo 2. Tedavi görmemiş HPRT-wt farelerinde hematopoetik hücrelerin immünofenotipik analizi.

BM, PBL, dalak (S) ve timüs (T) aşağıdaki sıçan anti-fare antikorlar ile boyanmıştır: CD45-FITC (BM, PBL, T, S), CD4-PE (BM, PBL, T, S), CD8-APC (BM, PBL, T, S), Mac1/Gr1-PE (BM, PBL, S), B220-PerCP (BM, PBL, S), Sca-1-PE (BM) ve c-kit-FITC (BM) ve akış sitometrisi ile incelenmiştir. Belirtilen hematopoetik hücre alt popülasyonlarının yüzdeleri toplam CD45+ hücrelerine ait ortalama % $\pm$ SD olarak ifade edilir (her bir grup için n=3).

Hücre popülasyonu	BM (%)	PBL (%)	Timüs (%)	Dalak (%)
CD45 ⁺	92.6±3.2	98.6±0.5	98.7±0.6	97.1±1.0
CD4 ⁺	3.9±1.6	12.2±2.6	6.5±2.1	19.7±1.7
CD8 ⁺	1.6±0.8	11.4±1.7	3.6±1.2	16.5±0.3
CD4 ⁺ /CD8 ⁺			85.6±4.3	
B220 ⁺	20.4±8.2	47.8±13.2		54.4±4.9
Mac1 ⁺ /Gr1 ⁺	87.3±8.1	36.1±5.0		18.7±3.9
KLS (HSC)	3.6±2.4			

Tablo 3. Tedavi görmemiş HPRT-eksikliği olan farelerde hematopoetik hücrelerin immünojenotipik analizi.

BM, PBL, dalak (S) ve timüs (T) aşağıdaki sıçan anti-fare antikorları ile boyanmıştır: CD45-FITC (BM, PBL, T, S), CD4-PE (BM, PBL, T, S), CD8-APC (BM, PBL, T, S), Mac1/Gr1-PE (BM, PBL, S), B220-PerCP (BM, PBL, S), Sca-1-PE (BM) ve c-kit-FITC (BM) ve akış sitometrisi ile incelenmiştir. Belirtilen hematopoetik hücre alt popülasyonlarının yüzdeleri toplam CD45⁺ hücrelerine ait ortalama % ± SD olarak ifade edilir (her bir grup için n=3).

Hücre popülasyonu	BM (%)	PBL (%)	Timüs (%)	Dalak (%)
CD45 ⁺	92.3±1.3	96.1±2.7	98.7±0.4	94.9±1.8
CD4 ⁺	4.9±1.4	15.9±0.8	6.5±1.0	18.4±2.7
CD8 ⁺	2.4±0.2	11.7±0.7	2.9±0.1	11.8±1.9
CD4 ⁺ /CD8 ⁺			86.9±0.9	
B220 ⁺	28.2±2.7	55.7±2.9		51.3±5.5
Mac1 ⁺ /Gr1 ⁺	79.7±2.2	30.1±4.0		9.9±1.8
KLS (HSC)	3.3±0.5			

5

Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar iki doz kadar 10 mg/kg 6TG'nin 7 günde oluşan aşamalı olarak artan miyelotoksisite ile HSCT'den önce 3 gün kadar iyi bir şekilde tolere edilebilen etkili bir koşullandırma rejimi olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.

HPRT-wt alıcılarında 6TG koşullandırmasından sonra HPRT-eksikliği olan BM'nin nakli

5 Yukarıda oluşturulan plana bağlı olarak, 6TG (10 mg/kg i.p.) yukarıda açıklandığı üzere her bir plan için bir dozun 48 saat önce (bu noktada Gün 1 yerine Gün -2 olarak belirtilir) uygulanması ve bir dozun nakil işlemi gününde (Gün 3 yerine Gün 0 olarak belirtilir) uygulanması yoluyla HPRT-wt alıcılarında (CD45.1) bir koşullandırma rejimi olarak kullanılmıştır. Koşullandırmadan sonra, HPRT-wt alıcıları akabinde HPRT-
10 eksikliği olan konjenik donörlerden (CD45.2) BM ile nakledilmiştir.

Gün 4'te, kemik iliği daha az erken progenitör hücreleri ve artan vaskülarite ile azalan hücresellik göstermiştir (Şekil 2B) ve HPRT-eksikliği olan BM ile nakledilen bu 6TG-koşullu HPRT-wt farelerinden kurtarılan çekirdekli BM hücrelerinin toplam sayısı
15 $(3.8 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6, n=4)$, araç kontrollü-tedavi edilen HPRT-wt grubunun sayısına $(1.1 \times 10^7 \pm 0.2 \times 10^7, n=3)$ kıyasla yine de önemli ölçüde azaltılmıştır ($p<0.001$). BM'nin akış sitometrik analizi, gün 4'te toplam hücre popülasyonunun sadece $\%17.8 \pm \%$
20 4.4 'ünün donör HPRT-eksikliği olan CD45.2+ hematopoetik hücrelerden derive edildiğini göstermiştir.

Kronik düşük-dozlu 6TG tedavisinden sonra miyelotoksisiteye yönelik eşik

6TG ön koşullandırmasının yüksek melezleme seviyelerini elde etmek üzere tek başına yeterli olmayabileceğini yukarıdaki sonuçların belirttiği üzere, daha düşük 6TG dozları
25 ile kronik tedavi göz önüne alındığında gerçekleştirilmiştir. HPRT-wt ve HPRT-eksikliği olan farelere (grup başına $n=3$), araç ile tek başına 60 gün kadar her 3 günde bir 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.5 mg/kg veya 5.0 mg/kg'lık 6TG i.p. olarak enjekte edilmiştir. HPRT-wt farelerinde, araç kontrol grubu aynı zamanda 0.25 mg/kg ve 0.5 mg/kg'lık 6TG grupları 60 günlük bir süre boyunca $\%100$ hayatta kalma göstermiştir ve
30 0.25 mg/kg ve 0.5 mg/kg'lık 6TG gruplarında BM'nin histolojik incelemesi, Gün 60'ta normal hücresellik göstermiştir (Şekil 3).

Aksine, HPRT-wt 1.0 mg/kg'lık 6TG grubunda, gün 38'de (13 mg/kg toplam dozaj), Gün 42'de (14 mg/kg toplam dozaj) ve Gün 51'de (17 mg/kg toplam dozaj) ölümler meydana
35 gelmiştir (Tablo S1). Daha yüksek dozajlarda, 2.5 mg/kg veya 5 mg/kg'lık tekrar eden

6TG enjeksiyonları alan HPRT-wt fareleri, sürekli olarak ilerleyen klinik sıkıntı belirtileri (hareketsizlik, kambur duruş, kendi kendini temizleme eksikliği, anokreksi), anemi (ekstremitelerin solukluğu) ve %>10 kilo kaybı göstermiştir, kurumsal kurallara göre sırasıyla Gün 28'de (2.5 mg/kg 6TG grubu; 22.5 mg/kg toplam dozaj) ve Gün 22'de (5.0 mg/kg 6TG grubu; 35 mg/kg toplam dozaj) ölmeleri gerekli olmuştur. BM'nin 1.0 mg/kg'lık 6TG grubundan histolojik olarak incelenmesi, birçok apoptotik biçim göstermiştir ve hasara yönelik bir başlangıç aktivasyon yanıtı yansıtarak daha düşük dozaj gruplarına göre daha fazla blast hücre gözlenmiştir (Şekil 3; Gün 38). daha yüksek dozaj grupları aynı zamanda her bir grupta 6TG'nin kümülatif dozajı ile orantılı olan lezyonların şiddeti ile önemli ölçüde azalmış hücresellik ve vasküler yapıların genişlemesini göstermiştir. 2.5 mg/kg'lık 6TG'nin tekrar eden dozları ile tedavi edilen fareler, azalan hücresellik ve yaygın apoptoz göstermiştir (Gün 28). 5 mg/kg'lık en yüksek kronik dozajda, hayatta kalan hücrelerin birçoğunun miyeloid soydan gelmesi ile BM önemli derecede tükenmiştir (Gün 22).

HPRT-wt farelerinin aksine, HPRT-eksikliği olan farelerin tümü, enjekte edilen 6TG dozajından (yukarıdaki ile aynı dozlama planlarına göre uygulanan 105 mg/kg'a kadar maksimum toplam doz) (Tablo S1) bağımsız olarak deney boyunca hayatta kalmıştır (60 gün). HPRT-eksikliği olan farelerin herhangi birinde, Gün 60'ta deneyin bitiş zaman noktasında 6TG dozajına bakılmaksızın kayda değer bir BM patolojisi gözlenmemiştir (Şekil 3). Kalp, akciğer, karaciğer, pankreas, böbrek ve dalak dahil olmak üzere incelenen dokuların herhangi birinde kayda değer tedavi ile alakalı bir anormallik gözlenmemiştir. Bu yüzden, HPRT-eksikliği olan fareler, HPRT-wt farelerinde ölümcül miyelotoksisiteye neden olan 1.0 mg/kg, 2.5 mg/kg ve 5.0 mg/kg'lık dozlarda kronik 6TG tedavisinin herhangi bir toksik etkisini göstermemiştir.

Kombine 6TG koşullandırması ve in vivo kemo seçimi HPRT-eksikliği olan BM'nin sürekli ve oldukça etkin bir şekilde melezlenmesini sağlar

Yukarıdaki doz-bulucu çalışmaya bağlı olarak, akabinde HPRT-wt alıcılarında HPRT-eksikliği olan BM'nin naklinden hemen sonra başlayan düşük 6TG dozlarının sürekli olarak uygulanması ile kombine edilen 6TG önceden koşullandırma işleminin melezlenen donör hücrelere yönelik daha fazla kemo seçici büyümeyi elde edip edemeyeceği sorulmuştur. Buna göre, dişi HPRT-wt fareleri önceden oluşturulan her bir koşullandırma planına yönelik bir dozun 48 saat önce (Gün -2) uygulanması ve bir

dozun nakil işlemi gününde (Gün 0) uygulanması yoluyla 6TG (10 mg/kg i.p.) ile önceden koşullandırılmıştır. HPRT-wt dişi alıcıları akabinde HPRT-eksikliği olan erkek BM ile nakledilmiştir ve yukarıdaki kronik miyelotoksisite sonuçlarına bağlı olarak, alıcılar ayrıca 2 hafta boyunca (30 mg/kg toplam dozaj) ve 4 hafta boyunca (42.5 mg/kg) her 3 günde bir 2.5 mg/kg'lık 6TG'nin tekrar eden dozları veya 2 hafta boyunca (40 mg/kg toplam dozaj) veya 4 hafta boyunca (65 mg/kg toplam dozaj) her 3 günde bir 5.0 mg/kg'lık 6TG'nin tekrar eden dozları ile tedavi edilmiştir. Analiz, sırasıyla 2 hafta veya 4 haftada *in vivo* kemo seçimi periyodundan hemen sonra gerçekleştirilmiştir (Şekil 4).

10

Beklendiği üzere, kombine 6TG koşullandırması, HSCT, ve 6TG *in vivo* kemo seçimi prosedürleri iyi tolere edilmiştir ve herhangi bir sıkıntı belirtisi gözlenmemiştir. 6TG ile tedavi edilen grupların tümünde, nakil işlemi geçiren hayvanların %100'ü hayatta kalmıştır (2 hafta tedavi: n=3 ve 4 hafta tedavi: n=8). Vücut ağırlıkları, 6TG ile tedavi edilen hayvanlarda nakil işleminden sonra birinci haftada başlangıçta düşmüştür, ancak stabilize edilmiştir ve tüm hayvanlar bundan sonra normal kilolarına dönmüştür. Histopatolojik analiz, nakil işlemi geçiren hayvanlardaki genel hücresellik ve hematopoezin 6TG kemo seçimi dozajı ve süresine bakılmaksızın tedavi edilmemiş HPRT-wt kontrolünden ayırt edilebilir olduğunu göstermiştir (Şekil 4).

20

Kromozom XY-FISH [25, 26], 2 hafta 6TG kemo seçimi alan gruplarda, bu zaman noktasında BM'nin 89.3 ± 1.7 (2.5 mg/kg grubu) ve 95.5 ± 1.2 (5 mg/kg grubu) seviyelerinde donör-deriveli ilik ile çoktan fazla miktarda tekrardan yapılandırılmış olduğunu göstermiştir. 2 haftada donör-deriveli periferik kan lökositlerinin (PBL) yüzdeleri, sırasıyla 13.0 ± 4.6 (2.5 mg/kg grubu) ve 12.7 ± 2.9 (5.0 mg/kg grubu) olmuştur (Tablo 4). *In vivo* kemo seçimi HSCT'den sonra 4 haftaya kadar devam ettiğinde, donör-deriveli BM hücrelerinin yüzdesi tekrardan hem 2.5 mg/kg grubunda (95.3 ± 0.9) hem de 5.0 mg/kg grubunda (96.7 ± 1.2) son derece yüksek bulunmuştur. Kayda değer bir şekilde, donör-deriveli PBL'nin yüzdesi, 4 haftada 2.5 mg/kg grubuna (29.9 ± 1.9) kıyasla 5.0 mg/kg grubunda (39.7 ± 3) önemli ölçüde daha yüksek ($p < 0.005$) ve aynı zamanda her iki dozdan biri ile 2 hafta kemo seçimi alan gruplara göre önemli ölçüde daha yüksek ($p < 0.0002$) olmuştur (Tablo 4). Bu yüzden, 4 hafta boyunca her 3 günde bir 5 mg/kg'lık 6TG ile devam eden *in vivo* kemo seçimi ile kombine edilerek Gün -2 ve Gün 0'da 10 mg/kg'lık 6TG ile ön koşullandırma, HPRT-eksikliği olan donör hücreler ile BM melezlemesinin maksimum seviyelerini ve aynı

35

zamanda donör-deriveli PBL'nin en yüksek seviyelerini vermiştir; bu rejim diğer çalışmalarda kullanılmıştır.

Tablo 4. Kombine 6TG koşullandırması ve in vivo kemo seçiminden sonra hayatta kalma ve melezleme.

İn vivo kemo seçimine yönelik tedavi planları aşağıdaki gibidir: 2 hafta boyunca 2.5 mg/kg'lık 6TG, 2 hafta boyunca 5.0 mg/kg'lık 6TG, 4 hafta boyunca 2.5 mg/kg'lık 6TG veya 4 hafta boyunca 5.0 mg/kg'lık 6TG ile in vivo kemo seçimi. Tüm tedavi grupları, %100 olan bir hayatta kalma oranı göstermiştir. HPRT-wt dişi alıcı BM ve PBL'de HPRT-eksikliği olan erkek hematopoetik hücrelerin melezlenmesi, kromozom XY-FISH ile belirlenmiştir (ortalama% $\pm$ SD).

Tedavi	Hayatta kalma (%)	Melezleme	
		BM (%)	PBL (%)
6TG 2.5 mg/kg x 2 hafta	100 (n=3)	89.3 $\pm$ 1.7	13.0 $\pm$ 4.6
6TG 5.0 mg/kg x 2 hafta	100 (n=3)	95.5 $\pm$ 1.2	12.7 $\pm$ 2.9
6TG 2.5 mg/kg x 4 hafta	100 (n=3)	95.3 $\pm$ 0.9	29.9 $\pm$ 1.9
6TG 5.0 mg/kg x 4 hafta	100 (n=8)	96.7 $\pm$ 1.2	39.7 $\pm$ 3.0

HPRT-eksikliği olan BM'nin uzun-vadeli yeniden yapılandırılmasında kombine 6TG koşullandırması ve in vivo kemo seçimi sonuçları

Yukarıda oluşturulan kombine 6TG koşullandırması ve *in vivo* kemo seçim rejimi kullanılarak HPRT-eksikliği olan donör BM ile melezlemesinin devamlılığı, nakil işleminden sonra 4 ay, 7 ay veya 12 ay (yani, sırasıyla 4-haftalık *in vivo* kemo seçimi periyodu bitiminden sonra 3 ay, 6 ay ve 11 ay) incelenmiştir. Nakil işlemi geçiren tüm hayvanlar (4 ay: n=8; 7 ay: n=6; 12 ay: n=5) incelenen tüm zaman noktalarında sağ ve

iyi kalmıştır, hiçbir şekilde morbidite veya rahatsızlık belirtileri göstermemiştir. Bu hayvanların kabaca patolojik ve histolojik olarak incelenmesi, kayda değer bir şekilde herhangi bir anormallik göstermemiştir.

- 5 Donör-deriveli progenitör hücreleri ile lenfohematopoetiğe yönelik çok-soylu yeniden yapılandırma, kombine 6TG ön koşullandırması ve *in vivo* kemo seçimi ile HSCT'den 4 ay sonra, yani 4-haftalık kemo seçimi periyodu bittikten 3 ay sonra değerlendirilmiştir. BM, PBL, timüs ve dalağa yönelik immünofenotip, donörler olarak HPRT-eksikliği olan CD45.2 fareleri ve alıcılar olarak HPRT-wt CD45.1 fareleri kullanılarak konjeneik bir
- 10 CD45.1/CD45.2 nakil düzenlemesinde gerçekleştirilmiştir (n=5). Hematopoetik dokuların tümü, CD45.2+ donör hücrelerinin toplam kemik iliğinin %75'ini aşan seviyelerde yüksek miktarda melezlenmesini göstermiştir (Tablo 5). Donör-deriveli CD45.2+ popülasyonuna ait immünofenotip, T hücreleri (CD4/CD8), B220+ hücreleri ve makrofajlar/ granülositlere (Mac-1/Gr1) ait ilgili yüzdelerin, tedavi görmemiş kontrollerin
- 15 yüzdeleri ile karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir (Tablolar 2 ve 3).

Tablo 5. Konjeneik bir CD45.1/CD45.2 nakil modelinde 6TG koşullandırması ve *in vivo* kemo seçimi rejimi kullanılarak nakil işleminden 4 ay sonra hematopoetik dokuların immünofenotipik analizi. 6TG koşullandırması ve *in vivo* kemo seçimi

- 20 metinde açıklandığı üzere gerçekleştirilmiştir. Alıcı BM ve PBL aşağıdaki sıçan anti-fare antikoları ile boyanmıştır: CD45.2-FITC (BM, PBL, T, S), CD4-PE (BM, PBL, T, S), CD8-APC (BM, PBL, T, S), Mac1/Gr1-PE (BM, PBL), B220-PerCP (BM, PBL, S) ve akış sitometrisi ile incelenmiştir. Belirtilen hematopoetik hücre alt popülasyonlarının yüzdeleri, toplam CD45.2+ hücrelerine ait ortalama % $\pm$ SD olarak ifade edilir (her bir
- 25 grup için n=5).

Hücre popülasyonu	BM (%)	PBL (%)	Timüs (%)	Dalak (%)
CD45.2 ⁺	76.1 $\pm$ 9.3	73.8 $\pm$ 5.2	89.7 $\pm$ 8.3	65.9 $\pm$ 5.2
CD4 ⁺	3.2 $\pm$ 1.3	17.0 $\pm$ 3.0	10.4 $\pm$ 2.8	22.6 $\pm$ 3.6
CD8 ⁺	3.0 $\pm$ 1.3	12.7 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 0.8	14.9 $\pm$ 2.1
CD4 ⁺ /CD8 ⁺			79.3 $\pm$ 4.2	
B220 ⁺	29.3 $\pm$ 6.3	45.4 $\pm$ 3.8		58.2 $\pm$ 8.6
Mac1 ⁺ /Gr1 ⁺	80.68 $\pm$ 6.1	28.2 $\pm$ 3.3		14.1 $\pm$ 1.6

Melezleme seviyeleri aynı zamanda nakil-sonrası 4-ay, 7-ay ve 12-ay şeklindeki zaman noktalarında kromozom XY-FISH ile değerlendirilmiştir. Yüksek seviyelerde donör-deriveli BM ile sabit uzun-vadeli yeniden yapılandırma, nakil işleminden sonra sırasıyla %97.7 $\pm$ %0.5 (4 ay), %94.7 $\pm$ %1.9 (7 ay) ve %93.0 $\pm$ %0.8 (12 ay) şeklindeki melezleme seviyeleri ile tüm zaman noktalarında gözlenmiştir (Şekil 5). İlaveten, donör-deriveli PBL'nin yüzdesi, 4-haftalık 6TG seçim periyodundan hemen sonraki seviye (%39.7 $\pm$ %3.0) ile kıyaslandığında büyük ölçüde artmıştır (4 ayda %67.4 $\pm$ %10.6, p=0.01; 7 ayda %73.3 $\pm$ %7.9, p<0.01; 12 ayda %73.0 $\pm$ %10.7, p<0.01).

CD4+ ve CD8+ hücreleri, B220+ hücreleri ve Mac-1+/Gr1+ hücreleri ve ayrıca KLS (lin⁻/sca-1⁺/c-kit⁺) HSC'ye ait ilgili yüzdelere 4 ayda, 7 ayda ve 12 ayda immünofenotip işlemi ile BM'de belirlenmiştir (Tablo 6) ve tedavi görmemiş dişi HPRT-wt (Tablo 2) ve tedavi görmemiş erkek HPRT-eksikliği olan (Tablo 3) kontrol fareleri ile karşılaştırılmıştır. Üç zaman noktasının tümünde, KLS hücrelerinin 4 ay ve 7 ayda ve HSCT'den sonra 12 ayda normal aralıkta yükselmesine rağmen her bir hücre popülasyonunun ilgili yüzdesi kontrollerin yüzdesi karşılaştırılabilir olmuştur. Bu yüzden, HPRT-eksikliği olan donör-deriveli ilik, nakil-sonrası en az 12 ay boyunca normal hematopoetizasyonla ilgili uzun-vadeli yeniden yapılandırma sağlayabilmiştir.

Tablo 6. 6TG koşullandırması ve in vivo kemo seçimi rejimi kullanılarak HPRT-eksikliği olan BM ile nakil-sonrası 4 ay, 7 ay ve 12 ayda BM'nin immünofenotipik analizi. 6TG koşullandırması ve in vivo kemo seçimi ile HSCT'den sonra belirtilen zaman noktaları, alıcı BM hücreleri aşağıdaki sıçan anti-fare antikoru ile boyanmıştır: CD45-FITC, CD4-PE, CD8-APC, Mac1/Gr1-PE, B220-PerCP, Sca-1-PE ve c-kit-FITC ve akış sitometrisi ile incelenmiştir. Belirtilen hematopoetik hücre alt popülasyonlarının yüzdeleri toplam CD45+ hücrelerine ait ortalama % $\pm$ SD olarak ifade edilir.

Hücre popülasyonu	4 ay BM (%)	7 ay BM (%)	12 ay BM (%)
CD45 ⁺	91.6 $\pm$ 1.9	94.3 $\pm$ 2.1	82.5 $\pm$ 4.9
CD4 ⁺	2.5 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 2.7
CD8 ⁺	1.9 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.6

Hücre popülasyonu	4 ay BM (%)	7 ay BM (%)	12 ay BM (%)
B220 ⁺	51.8±2.4	32.9±3.8	11.5±2.8
Mac1 ⁺ /Gr1 ⁺	77.0±13.0	80.8±2.3	72.3±5.4
KLS (HSC)	7.8±1.0	7.0±1.1	1.8±0.6

HPRT-eksikliği olan donör BM'nin kombine 6TG koşullandırması ve kemo seçimi ile birbirini izleyen nakil işleminden sonra sekonder alıcıların hematopoetik yeniden yapılandırılması

5

6TG koşullandırmasını kemo seçimi ile kombine eden optimize rejimin, uzun-vadeli yeniden yerleşen HSC'lere yönelik seçim yapıp yapmadığını daha ayrıntılı olarak değerlendirmek üzere, akabinde BM nakil-sonrası 7 ayda primer alıcılardan aynı rejimi kullanan sekonder alıcılara [27] nakledilmiştir. Sekonder nakil alıcıları akabinde 4-
10 haftalık 6TG *in vivo* kemo seçiminin bitiminden sonra 3 ay korunmuştur (Ek Şekil S3). 6TG koşullandırması ve kemo seçiminden sonra, primer alıcıları melezlemiş olan HPRT-eksikliği olan erkek donör hücreler, sekonder dişi alıcıları yüksek seviyelerde seri olarak yeniden yerleştirebilmiştir (XY-FISH ile belirlendiği üzere %95.5 ± %1.1). İmmünojenotipik analiz, sekonder alıcılara ait BM ve PBL'de incelenen tüm hücre
15 popülasyonlarının yüzdelerinin (Tablo 7), tedavi görmemiş kontrollerin yüzdeleri (Tablolar 2 ve 3) ile tekrardan karşılaştırılabilir olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Tablo 7. HPRT-eksikliği olan BM'nin 6TG koşullandırması ve *in vivo* kemo seçimi ile birbirini izleyen nakil işleminden sonra sekonder alıcılarda hematopoetik

20

hücrelerin immünojenotipik analizi. 6TG koşullandırması ve *in vivo* kemo seçimi rejimi ile birbirini izleyen nakil işlemi, Şekil S3'te açıklandığı üzere gerçekleştirilmiştir. Sekonder alıcı BM ve PBL, aşağıdaki sıçan anti-fare antikorları ile boyanmıştır: CD45-FITC (BM, PBL), CD4-PE (BM, PBL), CD8-APC (BM, PBL), Mac1/Gr1-PE (BM, PBL) ve B220-PerCP (BM, PBL) ve akış sitometrisi ile incelenmiştir. Belirtilen hematopoetik
25 hücre alt popülasyonlarının yüzdeleri, toplam CD45⁺ hücrelerine ait ortalama % ± SD olarak ifade edilir (her bir grup için n=6).

Hücre popülasyonu	BM (%)	PBL (%)
CD45 ⁺	84.6±4.7	95.8±1.4

Hücre popülasyonu	BM (%)	PBL (%)
CD4 ⁺	4.1±1.0	7.0±3.3
CD8 ⁺	2.4±0.8	7.0±3.2
B220 ⁺	19.1±2.9	33.3±12.3
Mac1 ⁺ /Gr1 ⁺	78.3±4.7	31.6±11.7

- 6TG'yi HPRT-eksikliği olan donör HSC'lerin ön-nakil koşullanmasına ve ayrıca devam eden nakil sonrası *in vivo* kemo seçimine yönelik tek bir ajan olarak kullanan optimize bir rejim geliştirilmiştir. Bu kombine 6TG koşullandırması ve kemo seçimi stratejisi, 5 ilerleyici ve eş zamanlı bir replasman süreci boyunca düşük genel toksisite ile etkili HSC melezlemesi sağlamıştır, burada alıcı konaklar mevcut olsa bile çok az sıkıntı ve %100 hayatta kalma oranı göstermiştir, öte yandan bunlara ait BM sürekli olarak XY-FISH ile -%95 ve CD45.2 immünofenotip işlemi ile >%75 melezleme sağlayan HPRT-eksikliği olan donör hücreler ile hızlı bir şekilde ve neredeyse tamamen değiştirilmiştir.
- 10 Donör-deriveli PBL'nin yüzdesi, bunu takip eden 4-haftalık 6TG seçim periyodunun yüzdesi ile kıyaslandığında bir süre sonra önemli ölçüde artmıştır (nakil-sonrası 4 ve 7 ay). PBL içindeki kalıntı alıcı hücreler, muhtemelen PBL içindeki bölücü-olmayan olgun hücrelere yönelik daha düşük bir dönüşümü yansıtır. BM'nin sabit uzun-vadeli yeniden yapılandırılması, hem primer hem de sekonder alıcılarda elde edilmiştir. BM, PBL, 15 dalak ve timüsün immünofenotip analizi, uzun-vadeli yeniden yapılandırmadan sonra hematopoetik farklılaşmanın 6TG *in vivo* kemo seçiminden etkilenmediğini göstermiştir.

- Bu sonuçlar aynı zamanda, uygun konsantrasyonlarda, 6TG'nin ekstra-hematopoetik dokularda herhangi bir olumsuz etki olmadan seçici miyelotoksisiteyi indüklediğine dair 20 önceki gözlemi doğrular. HPRT tüm somatik hücrelerde [30] düşük seviyelerde ifade edilir ve HPRT kalıtsal kaybı, yüksek seviyelerde HPRT ifadesi ve aktivitesinin merkezi sinir sisteminde, özellikle nöral gelişme [32] sırasında bulunmasından dolayı şiddetli zihin geriliği ve davranışsal anormallikler olarak görülen Lesch-Nyhan sendromuna [31] neden olur. Ancak, tamamen farklılaştırılan nöronların çoğalmamasından dolayı, bu 25 daha yüksek seviyeler olgun yetişkinlerde daha yüksek 6TG nörotoksitesine dönüşmez.

Porter ve DeGregori [22] tarafından yapılan önceki çalışmada, 4.5 Gy olan toplam vücut ışınlaması mieloablasyon elde etmek üzere kullanılmıştır ve 6TG daha sonraki

zamanlarda sadece kemo seçimine yönelik kullanılmıştır. Aksine, bizim rejimimizde, tek bir ajan olarak 6TG hem koşullandırma (konak BM'nin sitoazalımı) hem de kemo seçici ilaç olma (donör BM'nin büyütülmesi) görevini yerine getirir. 6TG toksisitesinin apoptoz [33] ile sonuçlanmak üzere iki dizi DNA replikasyonu gerektirdiği ve bu yüzden gecikmiş bir etkiyi gösterdiği bilinir. Sonuçlar aynı zamanda 6TG'nin doz ve zamana bağlı miyelotoksik bir etkisini belirtmiştir. Bu yüzden, nakil işleminden önce 10 mg/kg'lık 6TG ile koşullandırma, 6TG miyelotoksitedeki gecikmeyi telafi ederek ve nakil işlemi sırasında HSC'ye yönelik yeterli bir niş sağlayarak 6TG *in vivo* kemo seçiminin sonucunu geliştirebilir. Ek olarak, Porter *et al.* %5 - 50 aralığında olan değişken melezleme seviyeleri ile sonuçlanarak nakil işlemi sonrası 1 aydan daha uzun bir süre sonra başlayarak kısa bir süre boyunca 0.25 - 2 mg/kg aralığında olan daha düşük dozlarda 6TG kullanmıştır. Mevcut çalışmada, *Hprt*-eksikliği olan BM nakledilen farelerin nakil-sonrası hemen başlayan kemo seçici ilacın uygulanması ve büyük ölçüde daha uzun seçim periyodları boyunca devam etmesi yoluyla 6TG dozlarını 5- ile 40-kat daha fazla tolere edebildiği doğrulanmıştır.

6TG *in vivo* kemo seçimi stratejisinin kullanımını klinik olarak uygun bir yaklaşıma dönüştürmek üzere, normal HSC'yi HPRT-eksikliği olan ve bu yüzden 6TG-dirençli olan olarak elde etmek amacı ile genetik olarak değiştirmek üzere yöntemler geliştirmek gereklidir. İlaveten, mevcut çalışmanın otolog nakil düzenlemesinde durumu modelleyen bu stratejinin sinojenik farelerde kemik iliği nakline yönelik kullanılması ile sınırlı olduğu vurgulanmalıdır. Bu stratejinin, azaltılmış-yoğunluk koşullandırma rejimlerinin klasik miyeloablatif rejimlerin toksisitesinin üstesinden gelmek üzere rutin olarak kullanılması nedeniyle allojenik düzenleme ile eşit olarak kullanışlı olup olmayacağı görülerek belirlenmelidir. Belirtilmesi gerekebileen potansiyel sorunlar, hematopoetik malignitelere yönelik allojenik nakil işleminden sonra lösemik hücrelerden kaynaklanan spontan 6TG direnci olasılığını ve allojenik donör hücreler seçici bir şekilde *in vivo* olarak büyütüldüğünde graft-versus-host hastalığının olası bir şekilde şiddetlenmesini içerir.

30

Referanslar

[1] Biffi A, Cesani M. Curr Gene Ther. 2008;8:135-146.

[2] Persons DA, Nienhuis AW. Curr Opin Mol Ther. 2002;4:491-498.

- [3] Williams DA, Hsieh K, DeSilva A, Mulligan RC. *J Exp Med*. 1987;166:210-218.
- [4] Mickisch GH, Aksentijevich I, Schoenlein PV, et al. *Blood*. 1992;79:1087-1093.
- 5 [5] Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, et al. *Science*. 1992;257:99-103.
- [6] Zaboikin M, Srinivasakumar N, Schuening F. *Cancer Gene Ther*. 2006;13:335-345.
- [7] Southgate T, Fairbairn LJ. *Expert Rev Mol Med*. 2004;6:1-24.
- [8] Milsom MD, Williams DA. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6:1210-1221.
- 10 [9] Neff T, Beard BC, Kiem HP. *Blood*. 2006;107:1751-1760.
- [10] Schambach A, Baum C. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6:1187-1196.
- [11] Aubrecht J, Goad ME, Schiestl RH. *J PharmacolExpTher*. 1997;282:1102-1108.
- [12] Stout JT, Caskey CT. *Annu Rev Genet*. 1985;19:127-148.
- 15 [13] Fontenelle LJ, Henderson JF. *BiochimBiophysActa*. 1969;177:175-176.
- [14] Holmsen H, Rozenberg MC. *BiochimBiophysActa*. 1968;157:266-279.
- [15] Lajtha LG, Vane JR. *Nature*. 1958;182:191-192.
- [16] Lowy BA, Ramot B, London IM. *J Biol Chem*. 1960;235:2920-2923.
- [17] Elion GB. *Science*. 1989;244:41-47.
- 20 [18] Ansell JD, Samuel K, Whittingham DG, et al. *Development*. 1991;112:489-498.
- [19] Torres RJ, Puig JG. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:48.
- [20] van der Zee SP, Schretlen ED, Monnens LA. *Lancet*. 1968;1:1427.
- [21] Seegmiller JE, et al. *AdvExp Med Biol*. 1977;76A:412-433.
- 25 [22] Porter CC, DeGregori J. *Blood*. 2008;112:4466-4474.
- [23] Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. *Nature*. 1987;326:292-295.
- [24] Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. *Am J Pathol*. 2006;169:338-346.
- [25] Rondon G, Giral S, Pereira M, et al. *Leuk Lymphoma*. 1997;25:463-467.
- 30 [26] Brazelton TR, Blau HM. *Stem Cells*. 2005;23:1251-1265.
- [27] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. *Cell*. 2001;105:369-377.
- [28] Olsen NJ, Kovacs WJ. *Immunol Res*. 2001;23:281-288.
- [29] Olsen NJ, Gu X, Kovacs WJ. *J Clin Invest*. 2001;108:1697-1704.

[30] Kelley WN, Wyngaarden, J.B. In: J.B. Stanbury JBW, et al., ed. The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed. New York: McGraw Hill; 1983. p. 1115-1143.

[31] Lesch M, Nyhan WL. Am J Med. 1964;36:561-570.

5 [32] Lo YF, Palmour RM. Biochem Genet. 1979;17:737-746.

[33] Mojas N, Lopes M, Jiricny J. Genes Dev. 2007;21:3342-3355.

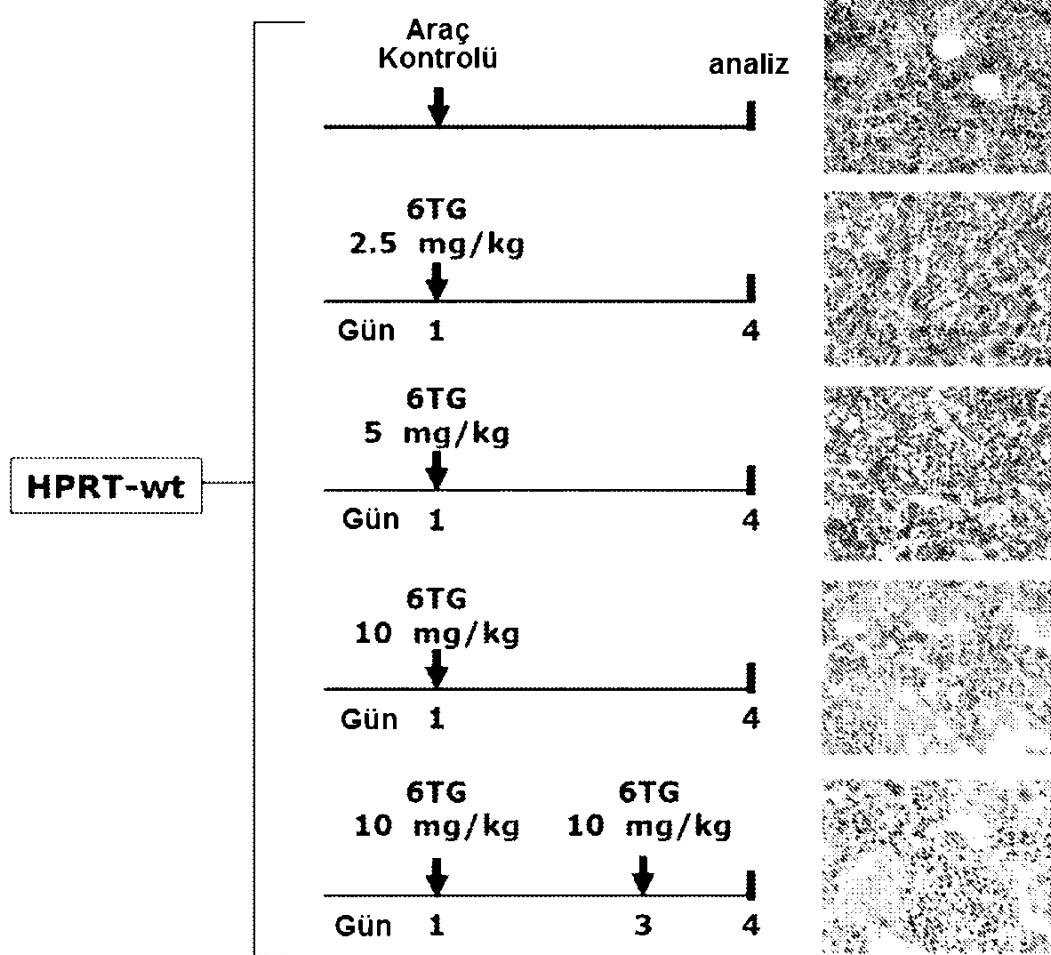
[34] An DS, Qin FX, Auyeung VC, et al. MolTher. 2006;14:494-504.

[35] Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Nature. 2006;441:537-541.

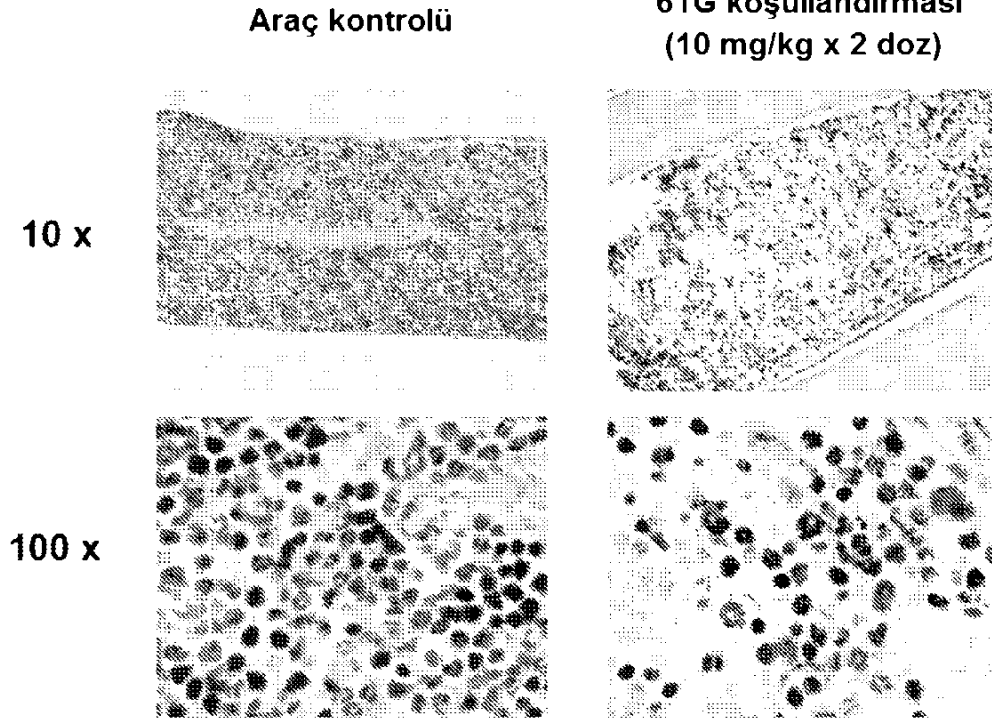
10 **Örnek 2: HPRT-eksikliği olan hücrelerin oluşturulması**

Bu örnek, hem farklı HPRT-hedefli shRNA aday dizilerini ifade eden üçüncü-jenerasyon lentiviral vektörleri hem de HPRT'yi hedef alan çinko parmak nükleazlarının (ZFN) nükleo transferini kullanan otolog düzenleme ile *ex vivo* gen terapisi için dönüşümsel uygulamaya yöneliktir. Sonucu yaklaşım, ZFN yapısının hedef genin kalıcı olarak nakavt edilmesini sağlamak ve böylece genetik mühendisliği prosedürünün bir sonucu olarak eklemeli mutagenез potansiyelini hafifletmek üzere sadece geçici ifadesinin gerekli olması nedeniyle avantajlıdır. Bu bağlamda, bu strateji seçici bir avantajının kemo direnç elde etmek üzere yeni bir transgenin eklenmesi yerine bir enzim eksikliği yoluyla nakledilen hücrelere aktarılması bakımından eşsizdir. HPRT-hedefli shRNA, HPRT'nin tespit edilemeyen seviyelere azaltarak düzenlenmesine yönelik başarılı olmuştur. Ek olarak HPRT, ZFN kullanılarak başarılı bir şekilde nakavt edilmiştir.

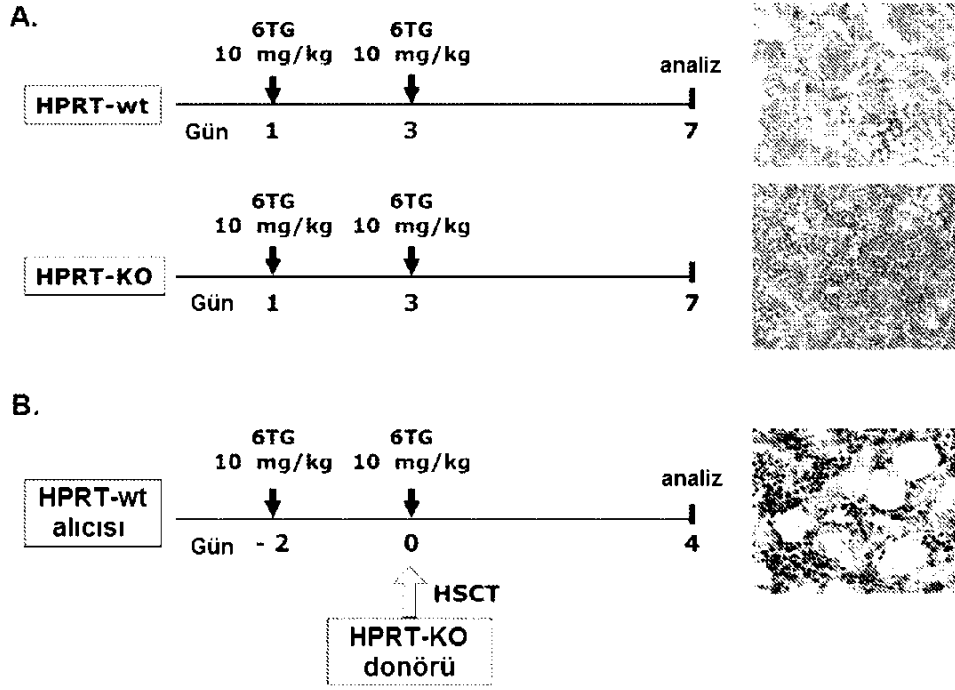
25 Buluş, eklenen istemler haricinde sınırlandırılmaz.



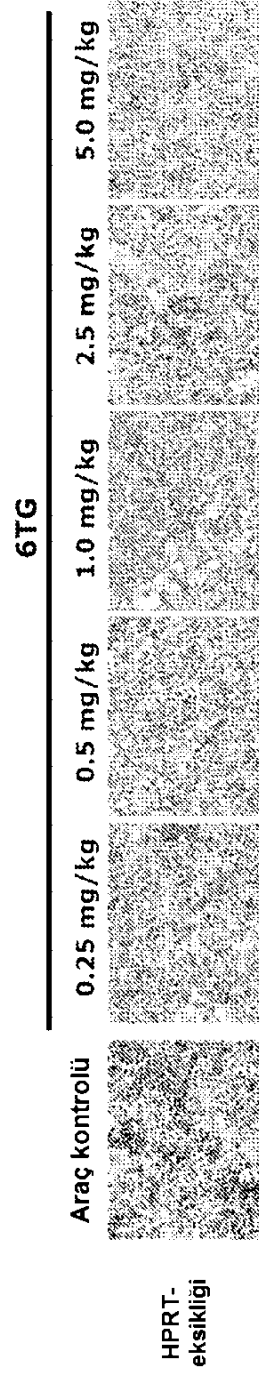
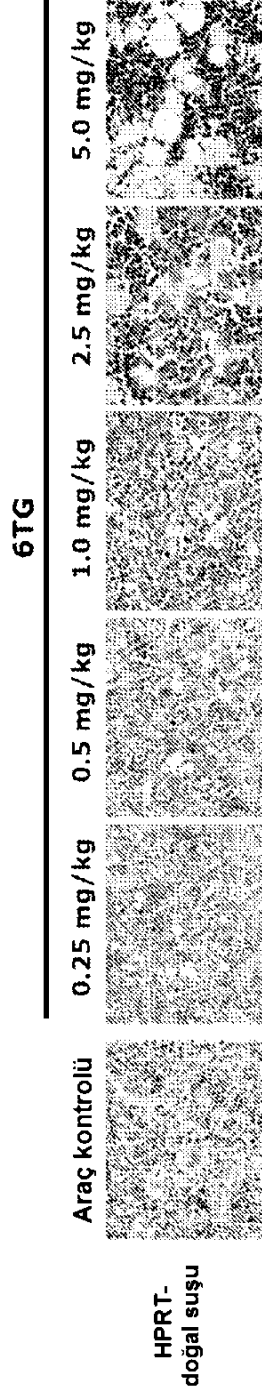
Şekil 1A

HPRT-wt

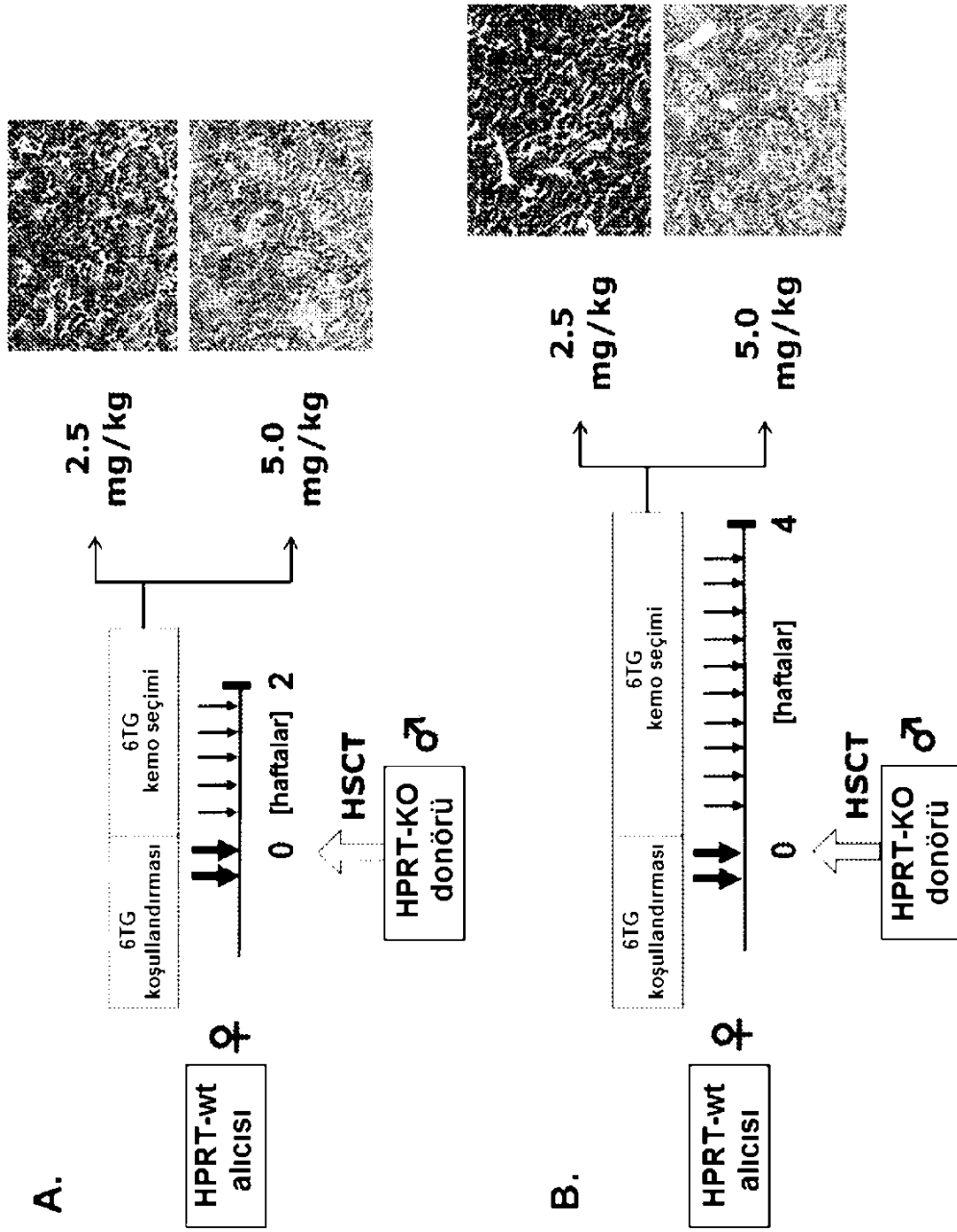
Şekil 1B



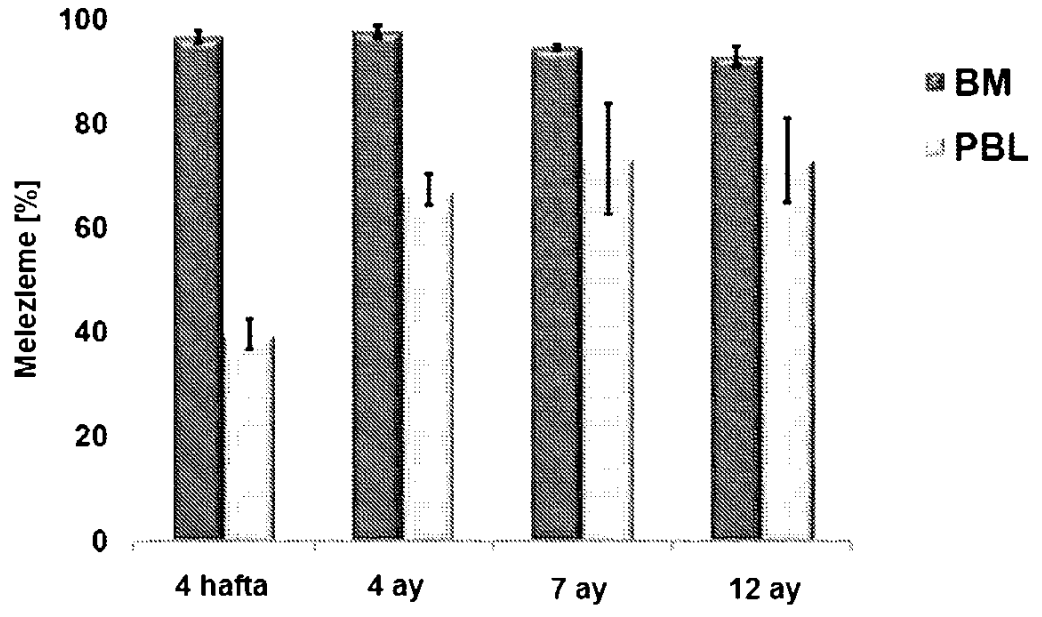
Şekiller 2A-2B



Şekil 3



Şekiller 4A-4B



Şekil 5