



TIBBİ GENETİK VE KLİNİK UYGULAMALARI

EDİTÖR
Munis DÜNDAR

CİLT 1

BÖLÜM 20

GEN TEDAVİSİ

**Salih Şanlıoğlu**

*Profesör, Akdeniz Üniversitesi Gen ve Hücre Tedavi Merkezi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Antalya*

İÇİNDEKİLER

20.1 Gen Tedavisinin Tanımı.....	499
20.2 Gen Tedavisinin Tarihçesi	499
20.3 Gen Aktarım Araçları	503
20.3.1 Viral Olmayan Vektörler	503
20.3.2 Viral Vektörler.....	503
20.4 Gen Tedavisinde Hedef Alınan Hastalıklar	504
20.4.1 Kanser.....	505
20.4.2 Kardiyovasküler Hastalıklar	506
20.4.3 Kalıtsal Olmayan Monogenik Hastalıklar	506
20.4.4 Diğer Hastalıklar	506
20.5 Gen Tedavi Denemelerinde Aktarılan Genler.....	507
20.6 Klinik Gen Tedavi Denemelerinin Güncel Durumu.....	507
20.6.1 Klinik Faz Denemeleri	507
20.6.2 Klinik Gen Tedavi Çalışmaları Yapılan Ülkeler	507
20.7 Ticari Olarak Satışı Onaylanmış Gen Terapi İlaçları.....	508
20.7.1 Glibera.....	509
20.8 Güvenilirlik ve Etik Görüşler	517
20.9 Sonuç.....	518

20.1 GEN TEDAVİSİNİN TANIMI

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu, gen tedavisini “aktarılan genetik materyalin transkripsiyonu ve/veya translasyonu aracılığıyla ve/veya konakçı genomuna entegre olarak etkilerini gösteren; nükleik asitler, viruslar veya genetik mühendisliği ile oluşturulmuş mikroorganizmalar aracılığıyla aktarımı yapılan ürünler” olarak tanımlamaktadır. Bu ürünler in vivo şekilde verilerek hücreleri modifiye etmek için kullanılabilmesi gibi, alıcıya uygulama öncesinde ex vivo olarak da hücrelere aktarılabilmesi belirtilmiştir.

Avrupa ilaç kurumuna göre gen tedavi ilaçları, genel olarak iki karakteristik özellik taşıyan biyolojik tedavi ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Öncelikle ilaç, insanlara uygulandığında herhangi bir genetik sekansın, düzenlenmesi, onarılması, değiştirilmesi, eklenmesi veya silinmesinde görev alacak rekombinant nükleik asitlerden oluşan aktif bileşenler içermelidir. Ayrıca ilgili ilacın tedavi edici, profilaktik veya diagnostik etkisinin de direkt olarak içerdiği rekombinant nükleik asit sekansından veya bu sekansın genetik ekspresyonu ile oluşan üründen kaynaklanması gerekmektedir. Bu tanımla; enfeksiyöz hastalıklara karşı üretilen aşılarda gen tedavi ilaçları kapsamına girmemektedir.

Genel olarak, gen tedavisi; germ hattı hücrelerine gen nakli ve somatik gen nakli olarak iki farklı kategoride değerlendirilebilir. Somatik gen naklinde aktarılan genetik materyal; hedef hücrelere entegre olsa bile genetik modifikasyon bir sonraki nesile aktarılmamaktadır, bununla birlikte germ hattı hücrelerine yapılan aktarım bir sonraki nesile kalıtılır. Bu farklılık dolayısıyla şu anki yasal düzenlemeler somatik hücrelere gen nakline izin verilmektedir. Bu nedenle bu bölümde sadece somatik gen nakli çalışmalarına değineceğiz.

20.2 GEN TEDAVİSİNİN TARİHÇESİ

Bakteriyel pnömoninin patolojisi ve epidemiyolojisi üzerine odaklanmış bir İngiliz bakteriyolojist olan Frederick Griffith'in 1928 yılında, virulan olmayan bir pnömokok türünün virulan bir türe transformasyonunu tanımlamıştır. Bu çalışmada, tip 1 pnömokok bakterilerinin virulan olmayan R formu ile ısı aracılığıyla inaktive edilmiş tip 2 pnömokok bakterilerinin virulan S formlarından bir karışım hazırlanmış ve ardından bu karışım farelere

verilmiştir. Griffith'i şaşırtan deney sonuçlarına göre, bu farelerde pnömoni gelişmiş ve enfeksiyon sonrası ölümler gözlenmiştir. Griffith ayrıca, bu farelerin kanından tip 2 pnömokok bakterilerinin virulan S formu kolonilerini izole etmeyi başarmıştır. Orjinal S formundaki tip 2 pnömokok bakterileri ısı ile inaktif edilmiş olduğundan, araştırmacı, pnömokokların virulan olmayan R formundan (tip 1'den) virulan S formuna (tip 2'ye) dönüştüğü sonucuna varmıştır. Bir yıl sonra, Dawson ve Sia, Griffith'in bulgularını doğrular nitelikte, in vitro koşullarda transformasyon gerçekleştirilebilecek bir metod geliştirmişlerdir. Çok geçmeden, Dawson'ın laboratuvarından ayrılmasının ardından James L. Alloway isimli genç bir bilim adamı, S formundaki pnömokokun yapısını bozarak hücre içeriğini çıkardıktan sonra filtreleyerek bu ekstraktı R formu pnömokok kültürüne eklediğinde, transformasyonun gerçekleştiğini gözlemiştir. Dolayısıyla, elde ettiği bu hücreden bağımsız ekstraktın içeriğindeki bir bileşenin pnömokok bakterilerinin transformasyonundan sorumlu olan bir ajan olduğu sonucuna varmıştır. Alkol ile çöktürülebilen bu presipitat “transformasyon bileşeni” olarak adlandırılmıştır.

Transformasyon bileşeninin keşfi, bilim adamlarını bu maddenin içeriğinde ne olduğunu analiz etmeleri açısından araştırmaya yönlendirmiş ve 1941 yılında Avery ve McCarty transformasyon bileşenini saflaştırma çalışmalarına odaklandıktan sonra, transformasyonun deoksiribonükleik asit (DNA) kaynaklı olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmanın gerçekleştiği 1944 yılında birçok genetik bilimci genlerin proteinlerden oluştuğuna inanırken, bu noktadan sonra bilimsel anlayış değişmiş ve bu sayede yaşamın moleküler temeli olan DNA yoğun araştırmaların ilgi odağı haline gelmiştir.

DNA'nın keşfinden sonra bu yönde yapılan çalışmalar ivme kazanmış ve araştırmacılar canlılar arası gen aktarım mekanizmalarını çözmeye uğraşmışlardır. Örneğin bakteriyel genetik konusunda yaptığı çalışmalar için 1958 yılında Nobel ödülüne layık görülmüş bir genetik bilimci ve mikrobiyolog olan Joshua Lederberg, belirli bakterilerin direkt temas ile genetik materyallerini birbirlerine aktarabildiğini (ör. konjugasyon) keşfetmiştir. Araştırmasında karşılaştığı mekanizmayı; bakteriyel transformasyona ek olarak genetik materyal aktarımını açıklayan farklı bir mekanizma olarak tanımlamaktadır. Lederberg ile Norton Zinder, yaptıkları diğer çalışmada, ince cam filtre ile ayrılmasına rağmen, besin ve ilaca karşı

dirençli *Salmonella* mutantları ile yabancıl tip *Salmonella* formlarının rekombine olabildiklerini gözlemişlerdir. Bu gözlemler sonucunda bakteriyel suşlar arasında kalıtsal özelliklerin aktarımından aktif bir “filtrat”ın sorumlu olduğu bulunmuştur. Saflaştırma işlemleri sonrasında bu filtratın sadece saf DNA’dan oluşmadığı ve DNA’nın bir bakteriden diğerine taşınımından *Salmonella typhimurium* bakteriyofajının sorumlu olduğu kanıtlanmıştır. Zinder ve Lederberg bu mekanizmayı tanımlamak için “transdüksiyon” terimini kullanmışlardır. Bu keşif, farklı bakteri türlerinin aynı antibiyotiğe nasıl çabucak dirençlilik kazandığını açıklayan bir mekanizmadır. Fajların genetik materyali aktarabildiğinin anlaşılmasının ardından, bu yaklaşımın potansiyel faydalarının araştırılması için yapılan ileri çalışmalar ökaryotik virüsler üzerine odaklanmıştır.

Zinder ve Lederberg tarafından bakteriyofajların DNA aktarımına aracılık ettiklerinin kanıtlanması üzerine, Waclaw Szybalski, lambda faji ile ilgili araştırma çalışmaları yapmaya başlamıştır. Bu alanda yapılan çalışmalara öncülük eden deneylerini, Wisconsin Üniversitesi-Madison Tıp Fakültesinde, McArdle Kanseri Araştırmaları laboratuvarında yürütmüştür. Genlerin nasıl aktarıldığı, modifiye edildiği ve düzenlendiği üzerine odaklanan Szybalski, hücrelerin yabancı bir DNA’yı alabilme kapasitesine sahip olduğunu önceden biliyordu. Bununla birlikte, 1962 yılında, yayınladığı “Bir biyokimyasal özelliğin DNA aracılığıyla kalıtılabilir transformasyonu” isimli çalışmaya kadar, henüz hiçbir araştırmacı, biyokimyasal bir özelliğin kalıtıldığı bir transformasyon deneyi gerçekleştirilememiştir. Bu açıdan Szybalski, genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin, fenotipik özelliklerine göre seçilebileceğini öne süren bir teknik tanımlamıştır. Bu prensibe göre, nükleik asitlerin de novo sentezi için hücrelerin dihidrofolat redüktaza (DHFR), özellikle de pürine ihtiyaçları vardır. DHFR inhibe edildiğinde, hücrelerin, Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz (HGPRT) enzimini değerlendirdikleri alternatif bir yolak kullanmaktan başka çareleri kalmamaktadır. HGPRT, hipoksantin ve guanin’in indirgenerek pürin sentezinde kullanılabilecek formlara çevrilmesini sağlayan bir transferazdır. Bu bilginin ışığında, Szybalski, insan kemik iliği hücre hattı olan D98S hücrelerinde HGPRT(+) ve HGPRT(-) türevlerinin olduğunu saptamıştır. Aminopterin, DHFR’yi inhibe ederek de novo pürin sentezini engelleyen bir bileşendir. Hücrelerin aminopterin varlığında canlılığını sürdürebilmesi için, pürinleri alternatif yolağı kullanarak sentezlemesi

gerekmektedir. Dolayısıyla, hücreler aminopterin, hipoksantin ve timidin içeren bir karışımda (ör. HAT medium) kültüre edildiğinde, sadece HGPRT enzimine sahip HGPRT(+) hücreler alternatif yolağı ile DNA sentezi yapabilme yeteneğine sahip olacağından, canlılıklarını sürdürebilir ve proliferasyon olabilirler. Araştırmacı bu deneylerin ardından, HGPRT(+) hücrelerin DNA formunu izole etmiş ve HGPRT(-) alıcı hücreleri transform etmek için kullanmıştır. Sonuç olarak aslında HGPRT(-) olan hücrelerin HAT medium varlığında ölmediğini ve canlılıklarını sürdürebildiğini gözlemlemiştir. Diğer bir deyişle, Szybalski, farklı bir kaynaktan alınan fonksiyonel DNA’nın aktarımı ile genetik bir hasarın düzeltilebileceğini göstermiştir. Ek olarak, transforme edilmiş ana hücrelerle yeni nesil hücrelerin aynı fenotipi göstermesiyle, onarılmış genin kalıtılabildiğini de saptamıştır. Bu çalışmalardan çıkan sonuçlar, memeli hücrelerinde kalıtılabilir gen transferinin belgelenmiş ilk kanıtı olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada kullanılan metod 10 yıl sonra Nobel ödülü alan monoklonal antikor üretimini tanımlayan buluşun kilit noktası olmuştur.

Fajların bir bakteriden diğerine genetik materyali aktarabildiğini gösteren ilk bulgulardan 10 yıl kadar sonra, Howard Temin, benzer bir şekilde spesifik bir genetik mutasyonun bir virus enfeksiyonu sonucu kalıtılabileceğini keşfetmiştir. Deneysel gözlemler sonucunda araştırmacı, Rous Sarcoma Virus (RSV) ile enfekte edilen tavuk hücrelerinde, RSV progenlerinin oluşumundan sorumlu bilgileri içeren viral spesifik gen mutasyonlarının stabil olarak kalıtılabildiğini belirlemiştir. Bu gözlemler, genetik bilgi aktarımının tek yönlü olarak DNA’dan RNA’ya doğru mu olduğu ile ilgili merak uyandıran konuya açıklık getirmesi adına önemli bir bulgu olmuştur. RSV bir RNA virusu olduğundan, Temin’in çalışması aynı zamanda bilgi akışının RNA’dan DNA’ya doğru da olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmaları takiben RNA bağımlı DNA polimerazlar keşfedilmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında, yabancı bir genetik materyalin kromozomal inserasyonu ile kazanılmış yeni karakteristik özelliklerin stabil olarak kalıtılabildiği açığa çıkmıştır.

Böylece, virüslerin sahip olduğu özelliklerin, çeşitli çalışmalarda ilgili hücrelere gen aktarımında oldukça kullanışlı olabileceği açığa çıkmıştır. Başarılı hücre transformasyon çalışmalarından alınan sonuçlar, genetik hastalıkların tedavisinde genetik mühendisliği yaklaşımlarının kullanılabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Hatta 1966 yılında, Edward Tatum somatik

hücre genetiği ve gen tedavisinde virusların olası kullanımı ile ilgili bir makale yayınlamıştır. Bunun için, virusların patoloji yaratan genlerinden kurtarılıp yerine terapötik genlerin yerleştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Birkaç yıl sonra, Roger ve ark.larının yaptığı çalışma, virus aracılı gen transfer yaklaşımının denendiği ilk çalışma olmuştur. Bu çalışmada, vektör olarak o zamanlarda genetik özellikleri en iyi tanımlanan bütün mozaik virusları kullanılmış ve viral RNA'ya bir poliadenilat uzantısı eklenmiştir. Ardından bu viruslarla bütün bitkileri enfekte edilmiştir. Yabani tip bitkilere göre, virus ile enfekte edilen bitkilerde çok daha fazla seviyelerde lizin oligomerlerinin sentezlendiği saptanmıştır. Bu durum poly(A) eklentili RNA genomuna sahip virusun aktarımının başarı ile yapıldığını ayrıca bütün bitkilerinde ifade edildiğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar bu çalışma ile bir nükleotit dizisinin in vitro ortamda, virus RNA'sına eklenebildiğini ve istenilen özelliklerin aktarılması için bir virusun vektör olarak kullanılabilceği sonucuna varmıştır. Alınan heyecan verici sonuçlar, araştırmacıları ileri çalışmalar için motive etmiş ve birkaç yıl sonra ilk insan gen tedavi denemesi gerçekleştirilmiştir.

Rogers ve ekibinin bu öncül çalışmasında Alman bir ailenin, ağır gelişme bozuklukları ile gelişen mental retardasyon gözlenen iki çocuğu konu alınmıştır. Bahsi geçen hastalarda hücresel arjinaz enzim aktivitesindeki yetmezlik, serumda yüksek arjinin seviyelerine neden olmaktadır. Hiperarjinemi olarak isimlendirilen bu hastalık, karaciğerde üre döngüsündeki bir bozuklukla karakterize olan ve beslenme ya da diğer konvansiyonel yöntemler ile takip ya da tedavisinin mümkün olmadığı bir hastalıktır. Araştırmacıların önceki laboratuvar çalışmalarından aldıkları in vitro sonuçlar, Shope Papilloma virusunun serum arjinin seviyesini düşürdüğü yönünde olduğundan, araştırmacılar yanlışlıkla bu virusun arjinaz genini taşıdığı kanısına varmışlardı. Bahsedilen hastalara, yüksek miktarlardaki Shope Papilloma virusunun sistemik enjeksiyonu ile virusun ihtiva ettiği düşük arjinaz geninin aktarılması ve böylece hastalarda bu genin ekspresyonu sonucu üre döngüsünün normale döndürülmesi hedeflenmişti. Araştırmacıların, Shope Papilloma virusun arjinaz aktivitesi için gerekli geni kodladığı ve dolayısıyla genin virus aracılığıyla hastalara aktarılabilceğine inanarak yaptıkları bu çalışmada, denemeler ne yazık ki olumsuz sonuçlanmıştır. Hastalarda ne arjinin seviyelerinde ne de hiperarjineminin klinik seyrinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Gelişen teknoloji ile daha sonraları,

Shope Papilloma virus genomunun sekanslanmasıyla, virus genomunda arjinaz kodlayan genin bulunmadığı ortaya çıkmıştır.

Rogers ve ekibinin insan gen tedavisinde attıkları ilk adım diğer bilim adamlarının bu konuya daha çok ilgi göstermesini sağlamıştır. Örneğin; 1980 yılında, Martin Cline, rekombinant DNA teknolojisinin ilk kez kullanılacağı gen tedavi denemeleri için girişimde bulunmuştur. Daha öncesinde Cline, deneysel çalışmalarında, fare kemik iliği kök hücrelerine ekzojen genlerin (ör. dihidrofolat redüktaz ve herpes simpleks virus timidin kinaz) aktarımını başarmıştır. Ardından bu modifiye hücrelerin, farklı bir farenin kemik iliğine kısmi olarak yerleşebildiğini ve burada prolifer olduğunu göstermiştir. Bu sonuçların ışığında, Cline bu terapötik yaklaşımı insanlar üzerinde denemeyi amaçlamış ve beta talasemi hastalarının tedavisinde kullanmak istemiştir. Beta talasemi hastalığı, hemoglobin proteininin beta-globulin zincirinin üretimindeki hasara (beta globulin geninin genetik hasarı veya kaybına) bağlı olarak gelişen şiddetli bir anemi ile sonuçlanan ve hayati tehlike arz eden bir hastalıktır. Bu hastalık için hali hazırda uygulanan ve yaşam kalitesini artırmaya yönelik tek işlem sık sık kan transfüzyonu uygulamasıdır. Beta talasemi hastalarının tedavi edilmelerine yönelik, terapötik etkinlik sağlayacak bir gen tedavi uygulamasının geliştirilmesi, Cline'da büyük bir heyecan yarattığından, Los Angeles California Üniversitesi (UCLA) İnsan Denekleri Komitesi'ne izin için başvurmuş olmasına rağmen, denemelerine bir an önce başlamak istediğinden acelece herhangi bir onay ya da izin gelmesini beklemeden çalışmalarına başlamıştır. Cline çalışmasında öncelikli olarak, ağır seyreden beta talasemi hastalığına sahip iki bireyin kemik iliği hücrelerini izole etmiş ve rekombinant β -globin ile transfekte etmiştir. Sonra hastaların her biri radyasyona (300 rads) maruz bırakılmıştır. Bu hastalarda ne yazık ki beş yıl sonunda herhangi bir olumlu değişim gözlenmemiştir. Aslında sonuçlar hastalar bakımından başarısız görünse de, gen tedavisinin gelişimi açısından faydalı bir deneme olmuştur. Bu çalışma öncelikle yapılması planlanan bilimsel araştırmalarda denetleyici komiteler tarafından belirlenmiş kurallara uyularak gerekli izinlerinin alınması gerekliliğinin bir göstergesi olarak tarihe geçmiştir. Ayrıca hastalarda herhangi bir olumsuz etki gözlenmediğinden, rekombinant DNA moleküllerinin, gen aktarımlarında kullanılmasına ışık tutan bir çalışma olmuştur. Martin Cline'in gen tedavisi alanında, gerekli izinleri almadan gerçekleştirdiği, olay yaratan denemelerinin ardından, de-

netleyici komiteler kuralları daha da katılaştırmıştır. 1988 yılında ilk kez, Rosenberg ve ekibi tarafından gerçekleştirilecek, insanlara ekzojen gen aktarımının yapılacağı klinik protokol, Rekombinant DNA Danışma Komitesi (RAC) tarafından onaylanmıştır. Bu protokole Rosenberg ilk önce tümöre infiltre kan hücrelerinin in vivo takibinin yapılabilmesi amacıyla, gen işaretleme tekniklerinin kullanılmasını hedefleyen bir proje sunmuştur. Bu yöntemi sunmasının en büyük nedenlerinden birisi, bilim adamının daha önceki çalışmalarında elde ettiği bulgulara dayalı olarak, gen işaretlemesi yapılan kan hücrelerinin interlökin 2 destekli, tümöre infiltrate lenfositlerle birlikte kullanımı sonrası metastatik melanomanın gerileyeceği düşüncesine sahip olmasıydı. İnsan denemelerine başlamadan önce, ilk olarak dolaşım, lenf nodları ve tümör bölgelerindeki TIL hücrelerinin, uzun süreli sağkalımı ve dağılım profilini inceleyerek, TIL hücrelerine genetik modifikasyonun uygulanıp uygulanmayacağını test etmiştir. TIL'lerin infiltrasyonu ile tümöre karşı etkileri arasındaki korelasyonun açığa çıkarılmasının hedeflendiği çalışmada, kanser/metastatik melanoma hastalarındaki TIL hücreleri izole edilip, bu hücrelere retrovirus aracılığıyla, işaretli geni bakteriyel neomisin dirençlilik geni aktarılmış ve hücreler hastalara tekrar verilmiştir. Çalışmanın sonucunda tümörlerin enjeksiyon bölgesinin çevresinde gelişmediği görülmüştür. Ayrıca bu bölgenin cerrahi olarak incelenmesi sonucu enjeksiyondan 3 hafta sonrasına kadar herhangi bir canlı tümör hücrelerine rastlanmadığı belirtilmiştir. Bu çalışma, gen tedavi alanında belirlenen tüm güvenlik kriterlerine uygun bir protokol olarak raporlandırılmıştır. Rosenberg'in yaptığı ilk çalışma ile terapötik deneme arasında geçen süreçte, Michael R. Blaese terapötik bir genin kullanıldığı ilk gen aktarımı denemesini gerçekleştirmiştir. 14 Eylül 1990'da FDA tarafından ilk kez, insanlar üzerinde terapötik amaçla uygulanacak bir gen tedavi denemesi onaylanmıştır. Çalışmada, ağır immün hasara yol açan bir monogenik hastalık olan adenoazin deaminaz yetmezliğine (ADASCID) sahip iki çocuktan beyaz kan hücreleri izole edilmiştir. Adenozin deaminaz (ADA) geninin, izole edilen T lenfosit hücrelerine retrovirus aracılı aktarımı gerçekleştirilmiştir. Hastalarda T hücrelerinin sayısı gelişen immün yanıtı rağmen normal seviyelere ulaşmıştır. Bununla birlikte, hastalardan birine polietilen glikol adenin deaminaz (PEG-ADA) takviyesi yapılarak enzim tedavisine devam ediliyor olması; yapılan gen tedavinin etkinliği üzerine tartışmalara yol açmıştır. Yine de yapılan gen tedavi işlemi bir çok bilim adamı tarafından, hem güvenlik kriterlerine uygun

hem de ADA-SCID hastalarında uygulanabilecek etkin bir tedavi yöntemi olarak kayıtlara geçmiştir. ADA-SCID hastalığının gen aktarım yöntemleriyle tedavi edilme olasılığı, Avrupa'da da bu yönde gelişen bir ilgi uyandırmış ve bir çok bilim adamı tarafından deneme çalışmalarına başlanmıştır. Ayrıca bu vesileyle farklı hastalıklar için de gen transfer çalışmaları dünya genelinde bir artış göstermiştir. İskandinav'da ilk gen transferi 1995 yılında gerçekleştirilmiş ve bu çalışmayla direkt olarak in vivo gen aktarımı yoluyla insan beynine gen transferi yapılabilineceği gösterilmiştir. Her ne kadar bu ilk çalışmalardan, tam da beklenen yanıt alınamamış olsa da, gen tedavisi çalışmaları, trajik bir olayın gerçekleşmesine kadar çok büyük ilgi görmüştür.

1999 yılında, gen tedavisi ile ilgili düşünebilecek en kötü senaryo; 18 yaşındaki bir hastaya Pensilvanya Üniversitesi'nde bir klinik gen tedavi denemesi yapılmasıyla gerçekleşmiştir. Aminoasit ve proteinlerden fazla azotun uzaklaştırılmasında gerekli olan bir karaciğer enzimi olan ornitin transkarbamilaz (OTC) enziminin kısmi hasarı sonucu ortaya çıkan ve nadir görülen bir metabolik hastalık olan OTC yetmezliğinde, hastalığın kısmen kontrol altında tutulması için düşük protein diyetleri ve ilaç tedavileri yapılmaktaydı. Özellikle bebeklerde ortaya çıktığında ölümcül olan bu hastalığın seyrinin en aza indirgenmesi için yapılması planlanan bu gen aktarım çalışmasında adenoviral vektörler kullanılmıştır. Çalışmada tedavi edilmesi beklenen Jesse Gelsinger'a verilen vektörler daha önce ekip tarafından, aynı dozda farelere, maymunlara ve insanlara uygulanarak test edilmiştir. Test sonuçları beklenildiği üzere gözlenmiş, vektör uygulamasından sonra meydana çıkan hafif yan etkiler ve karaciğer inflamasyonu bir kaç gün içerisinde kaybolmuştur. Ardından Gelsinger'a gen aktarımı yapılmış fakat hastanın immün sistemi, yüksek doz adenovirus uygulamasının hemen ardından şiddetli bir inflamasyona neden olmuş, ve hasta çoklu organ hasarı sonucu 4 gün içerisinde hayatını kaybetmiştir. Bu vakanın önemi, tedavi amaçlı kullanılan viral vektörün, ölüm sebebi olarak nitelendirilebileceği ilk vaka olmasından ileri gelmektedir. Stolberg ve ekibi tarafından gerçekleştirilen insan gen tedavi denemesinin ardından, uygulanan yöntemin güvenilirliği konusunda tartışmalar başlamış ve bu kaotik ortam FDA onaylı gen tedavi faz denemelerinin kısa bir süreyle duraksamasına sebebiyet vermiştir.

Nitekim yeni milenyum gen terapi klinik denemeleri



Şekil 20.1 Gen tedavisinde tarihsel açıdan önemli bilimsel dönüm noktaları.

açısından da bir dönüm noktası olmuş ve teknolojik alanda yaşanan ilerlemeler aşağıda açıklandığı gibi bu alanda da meyvesini vermeye başlamıştır. Gen tedavisinde tarihsel açıdan önemli bilimsel dönüm noktalarını Şekil 20.1'de sunuyoruz. Gen tedavi çalışmalarının pek çoğu gen naklinde kullanılacak uygun vektörlerin geliştirilmesi üzerinedir.

20.3 GEN AKTARIM ARAÇLARI

Gen tedavisi, hücrede bulunan kusurlu genlerin ve bu genlerdeki kusurlardan kaynaklanan fonksiyonel hasarların, dışarıdan bir gen aktarımıyla telafi edilmesini hedeflemektedir. Dolayısıyla, terapötik özellikteki transgenin hücre tarafından alınması ve entegrasyon sonrası sağlıklı bir şekilde eksprese edilmesi gen tedavi çalışmalarının en önemli başarı ölçütlerindendir. Konak hücrede eksprese edilmesi istenen terapötik genin, hedef hücreye aktarımında kullanılan taşıyıcı moleküller vektör olarak adlandırılmaktadır. Bu bağlamda farklı vektör tiplerinin kullanıldığı çeşitli aktarım teknikleri uygulanmaktadır. Vektörler virus temelli olabileceği gibi, yalın haldeki DNA ya da katyonik lipid/DNA kompleksleri veya insan yapay kromozomlarının kullanıldığı non-viral teknikler şeklinde tasarlanabilmektedir. Viral vektör-

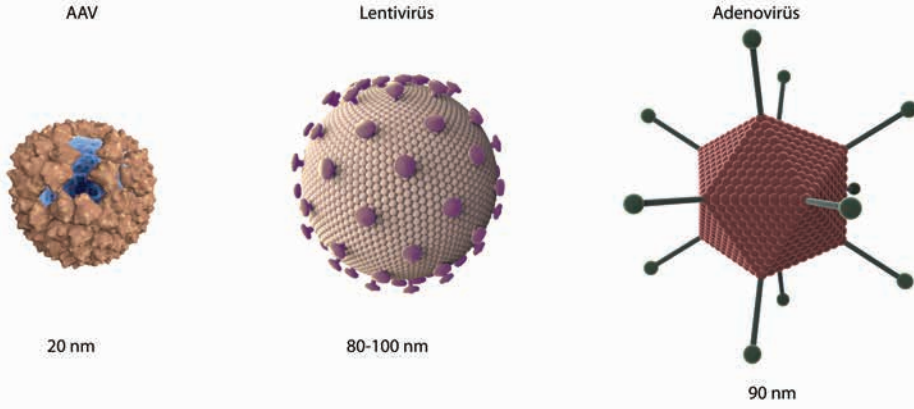
lerle geliştirilen tedavi yaklaşımları yaklaşık olarak klinik uygulamaların üçte ikisini kapsamaktadır.

20.3.1 VİRAL OLMAYAN VEKTÖRLER

Viral olmayan sistemler aracılığıyla sentetik vektörlerin geliştirildiği yaklaşımlar gen tedavi çalışmalarının geliştiği dönemlerde sıkça kullanılan yöntemler olmuştur. En basit viral olmayan gen aktarım sistemi sadece çıplak DNA'nın kullanıldığı ve belirli dokulara bu DNA'nın enjekte edildiği yaklaşımlardır. Aslında bu yöntemler, özellikle kas gibi bazı dokularda, belirlen düzeyde gen ekspresyonu sağlayabiliyor olmasına rağmen, viral vektörlerle yapılan gen aktarımlarına göre daha düşük etkinlik gösterir. En popüler viral olmayan sistemlerden çıplak DNA yöntemi klinik denemelerde sık kullanılırken bu sistemi, katyonik lipid/DNA komplekslerinin kullanımını kapsayan lipofeksiyon yöntemi takip eder.

20.3.2 VİRAL VEKTÖRLER

Virusların hedef hücreleri enfekte edebilme özellikleri, onların gen aktarım çalışmalarında tercih sebebidir. Kullanılacak virusların konak hücrede replikasyonunun engellenmesi çeşitli genetik mo-



Şekil 20.2 Klinik gen tedavi denemelerinde kullanılan viral vektörler.

difikasyonlar ile sağlanır. Terapötik özellikteki geni taşıyan viral vektör, konak hücreyi enfekte ettikten sonra hücre nükleusuna girer ve entegrasyon sonrası aktarılan genin ekspresyonu gerçekleşir. Vektör olarak kullanılan viruslardan bazıları retroviruslar, adenoviruslar, adeno-assosiyasyon virusları ve lentiviruslar olarak sıralanabilir (Şekil 20.2). Son yıllarda, özellikle ağır kombine immün yetmezliği (SCID) denemelerinde karşılaşılan olumsuz etkileri dolayısıyla, retroviral vektörlerin kullanımında bir azalma gözlenmekte ve yapılan çalışmalar retroviral vektörlerin daha güvenilir hale getirilmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. Adenoviruslar klinik denemelerde en yaygın kullanılan vektörlerdir. Retroviral vektörlere göre daha yüksek DNA taşıma kapasitesine sahip bu vektörler, yine de klinik uygulamalarda kullanılan bazı genlerin aktarımı için yetersiz kalmaktadır. Bu vektörlerin avantajı, yüksek transdüksiyon etkinlikleri ile birlikte, aktarılan genin ekspresyon seviyelerini arttırmaları ve hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte etmeleridir. Çiçek virusu, poxvirus, ve herpes simplex virus gibi virus türlerinin kullanımı adenoviruslar kadar yaygın değildir. Bu vektörler, retroviral vektörlerin alternatifi olarak son yıllarda daha sık kullanılmaya başlanmıştır.

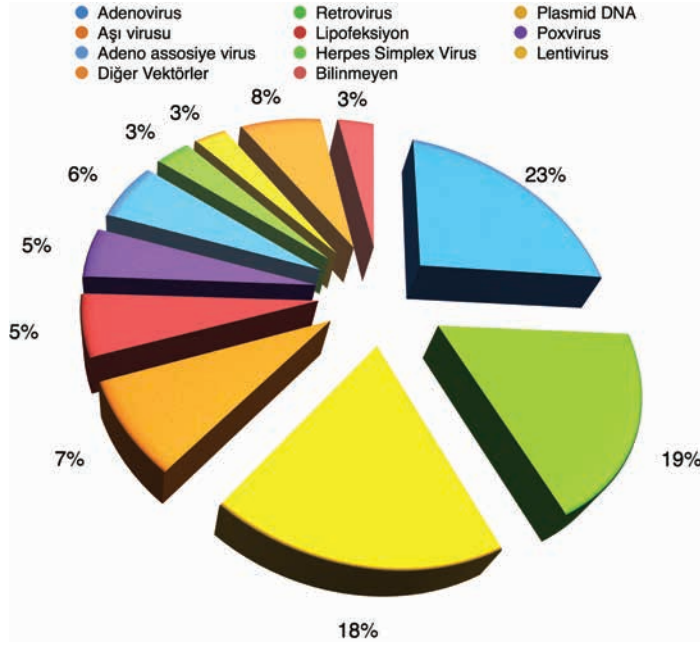
Gelişen viral vektör teknolojisi ile adeno-assosiyasyon virusları (AAV), bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte etme, hızlı, etkin ve stabil gen ekspresyonu sağlama ve adenovirusların aksine herhangi bir immünojeniteye neden olmama özellikleri taşımaktadır. Fakat kısıtlı gen taşıma kapasitesine sahip olmaları ve konak hücre genomuna entegre olamadıklarından etkilerinin hücrede geçici olması dolayısıyla kullanımları sınırlandırılmıştır. Lentiviruslar aslında retroviruslardan köken alırlar. Fakat entegrasyon profilleri, insersiyonel mutagenез riski taşınamaları ile retroviruslardan ayrılır. Lentiviral vektörler konak hücre genomuna entegre

olduklarından, aktarımı yapılan genin diğer vektörlere oranla daha uzun süreli ekspresyonunu sağlarlar. Hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte etmeleri, konak hücrede immünojeniteye neden olmamaları ve AAV'lere oranla daha yüksek gen taşıma kapasiteleri dolayısıyla bu vektörlerin gen tedavi çalışmalarında kullanımları son zamanlarda artış göstermiştir.

Dünya genelinde şimdiye kadar onay almış 1800'den fazla klinik gen tedavi denemeleri olduğu düşünüldüğünde şimdiye kadar yapılan klinik denemelerde adenovirusların, retrovirusların ve plazmidlerin gen aktarım vektörleri olarak en yaygın kullanılan araçlar olduğunu belirtmekte yarar var (Şekil 20.3).

20.4 GEN TEDAVİSİNDE HEDEF ALINAN HASTALIKLAR

Yukarıda bahsedilen çeşitli vektör sistemlerinin hangisinin kullanılacağına karar vermek için gen tedavi ile terapötik yaklaşımın hedeflendiği hastalık türü önem kazanmaktadır. Çeşitli hastalıkların tiplerine ve hedef dokularına göre, transgen aktarımının yapılacağı vektörün tasarımı gerçekleştirilir. Bugüne kadar, gen tedavi yaklaşımı ile tedavi edilen hastalıklar arasında en büyük pay kanser hastalığına aittir. Dünya çapında sürdürülen klinik gen tedavi denemelerinin %60'dan fazlasına konu olan bu hastalığı monogenetik ve kardiyovasküler hastalıklar takip etmektedir (Şekil 20.4). Günümüze kadar dünya çapında yapılmış tüm gen tedavi çalışmalarında en büyük başarının yakalandığı hastalık grubu ise monogenik hastalıkların hedeflendiği denemeler olmuştur.

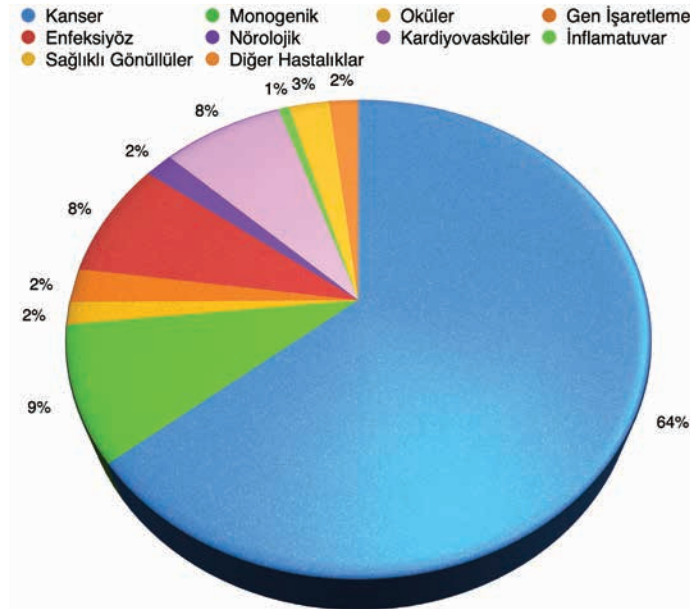


Şekil 20.3 Klinik Gen Tedavi Denemelerinde kullanılan vektör tipleri ve kullanım oranları.

20.4.1 KANSER

Şimdiye dek yapılan klinik gen tedavi denemelerinin büyük çoğunluğunda kanseri tedavi etmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Yıllar boyunca akciğer, jinekolojik, deri, ürolojik, nörolojik ve gastrointestinal tümörler, hematolojik malignansiler ve pediatrik tümörler gibi çok farklı tipte kanser türleri için tedavi stratejilerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Kanser

tedavi etmek için tümör baskılayıcı gen insersiyonu, immunoterapi, onkolitik viroterapi ve gen yönlü enzim ön ilaç tedavileri gibi bir çok farklı strateji uygulanmıştır. Kanserde immunoterapi yöntemi, tümörlü dokudaki tümör antijenlerinin, normalde zayıf olan hümmoral veya hüccresel reaksiyonlarını güçlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda immün-uyarıcı moleküllerin ekspresyonlarının sağlanması için hasarlı dokulara, tümör hüccreleri, tümör



Şekil 20.4 Hedef alınan hastalıklara göre klinik gen tedavi denemelerinin dağılımı.

antijenlerini kodlayan rekombinant viral vektörler, tümör türevli RNA veya tümör antijenleri eksprese eden hücreler aktarılmıştır. Onkolitik viroterapi yönteminde tümör hücrelerinde replike olabilen ve spesifik olarak hedeflendirilebilen virüsler kullanılır. Bu virüsler hücre lizisine neden olur, böylece enfekte olan tümör hücrelerinin ölümünü sağlarlar. Gen yönelimli enzim ön ilaç tedavisinde ise, ön ilaçların, yalnızca tümör ve tümör mikro çevresinde sitotoksik ilaçlara çevirildiği ve böylece kemoterapi etkinliğinin artırıldığı gen ekspresyonları hedeflenmiştir.

20.4.2 KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR

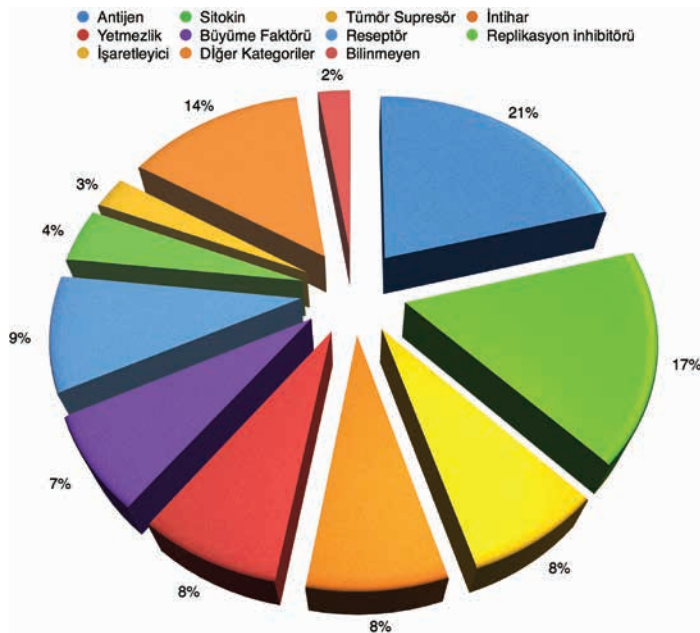
Kardiyovasküler hastalıkların onarılmasına yönelik gen tedavisi, yapılan denemeler arasında %7.8'lük oran ile üçüncü sırada yer almaktadır. Gen tedavisi ile yapılacak uygulamalardan beklenen yararlar; terapötik anjiyogenez için yeni alan sağlaması, miyokardiyal koruma, yenilenme ve tamir etme, bypass greftlerinde başarısızlığı önleme ve risk faktörlerinin yönetimi şeklinde sıralanabilir. Bugüne dek yapılmış kardiyovasküler gen tedavi denemelerinin büyük çoğunluğu, iskemik bölgelerdeki kan akışını artırmaya yönelik geliştirilen terapötik anjiyogenez çalışmalarıdır. İskemi hastalığında iki büyük kategori, koroner arter hastalığı sonrası gelişen miyokard iskemisi ve periferik arter hastalığı sonucu gelişen alt ekstremité iskemisidir. Bu iki uygulama alanında da neredeyse eşit sayıda deneme yapılmıştır.

20.4.3 KALITIMSAL OLMAYAN MONOGENİK HASTALIKLAR

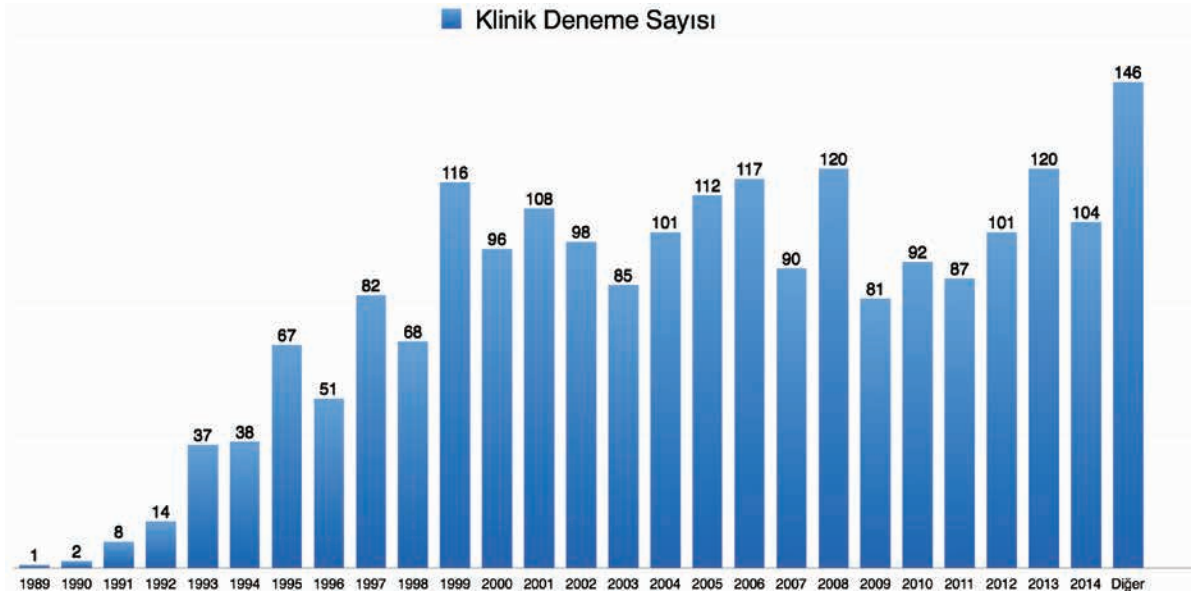
Monogenik hastalıkların gen tedavi ile tedavi edilmesindeki ana amaç; fonksiyonel genin bölünen kök hücrelere aktarımı ve devamlı ekspresyonun sağlanması ile hastalığın düzeltilmesidir. Günümüze kadar 161 adet kalıtsal olmayan monogenik hastalık belirlenmiştir. Bunlardan %22.4 lük kısım ABD ve AB'de en sık rastlanan genetik hastalıktan, kistik fibrozun tedavisini amaçlamıştır. Kistik fibroz hastaları ortalama 40 seneden daha az süre yaşadıklarından bu hastalığa karşı geliştirilen gen tedavi stratejileri birincil hedef haline gelmiştir. En sık çalışma yapılan ikinci grup hastalık ağır kombine immün yetmezliği, monogenik hastalıklar başlığı altında yürütülen gen tedavi denemelerinin %20'sini kapsamaktadır. Bir diğer immün yetmezlik hastalığı olan kronik granülomatoz hastalığı da, klinik olarak anlamlı ve kalıcı terapötik yarar sağlanmasıyla sonuçlanan bir çok çalışmaya konu olmuştur.

20.4.4 DİĞER HASTALIKLAR

Geçmişten günümüze tamamlanan klinik gen tedavi çalışmalarına bakıldığında, enfeksiyöz hastalıklara karşı tamamlanmış 147 adet (%8) deneme bulunmaktadır. Birincil hedef olarak HIV enfeksiyonları ile ilgili çalışmalar yapılırsa da, tetanoz, sitomegalovirus



Şekil 20.5 Klinik Gen Tedavi stratejilerinde aktarımı yapılan gen tipleri.



Şekil 20.6 Günümüze kadar yapılan klinik gen tedavi denemelerinin yıllara göre dağılımı.

ve adenovirus enfeksiyonları için de çalışmalar yürütüldüğü görülmektedir. Nörolojik hastalıklar için de gen tedavisi çalışmaları yapılmış, bu bağlamda 36 adet faz I, I/II ve II denemeleri ile amiotrofik lateral skleröz, multipl skleröz, miyastenia gravis, diyabet sonucu gelişen nörolojik bozukluklar, Alzheimer, Parkinson hastalıkları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Retinitis pigmentosa, glokom, yaş bağımlı maküler dejenerasyonlar ve Leber konjenital amaroza gibi oküler patolojiler için toplamda 28 deneme yapıldığı kaydedilmiştir. Ayrıca romatoid, inflamatuvar, dejeneratif artrit ve ülseratif kolit gibi inflamatuvar hastalıklar da gen tedavisi çalışmalarının konusu olmuştur. Bahsedilen hastalık gruplarına ek olarak kronik renal hastalıklar, fıstık alerjisi, kemik kırıkları gibi diğer hastalık gruplarından da bir kaç deneme çalışması yapılmıştır.

20.5 GEN TEDAVİ DENEMELERİNDE AKTARILAN GENLER

İnsan gen tedavi çalışmalarında kullanılan genler çok çeşitlilik göstermektedir. Tahmin edildiği üzere en sık kullanılan gen tipleri (antijenler, sitokinler, tümör baskılayıcı genler, intihar genleri) kanser tedavisinde kullanılanlardır. Neredeyse tamamının kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılması hedeflenen büyüme faktörleriyle yapılan gen tedavi denemeleri %7.3'lük dilimi oluştururken, yetmezlik genleri % 7.8, reseptör genleri ise %9 'luk bir orana sahiptir (Şekil 20.5).

20.6 KLİNİK GEN TEDAVİ DENEMELERİNİN GÜNCEL DURUMU

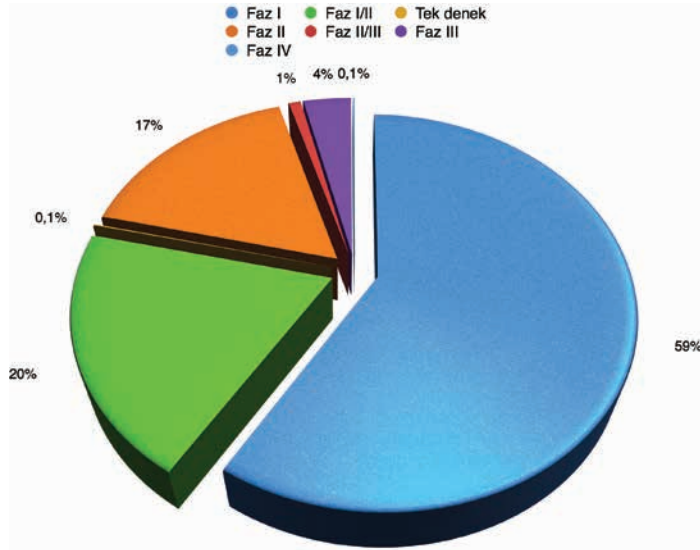
Şekil 20.6'da yıllara göre yapılan klinik gen tedavi çalışmalarının bir grafiği görülmektedir. Grafikten de anlaşılacağı üzere, 1999 yılında yaşanan trajik olaydan sonra klinik gen tedavi denemelerinin sayısında bir düşüş yaşandıysa da sonraki yıllarda da klinik sayısında bir artış yaşanmıştır.

20.6.1 KLİNİK FAZ DENEMELERİ

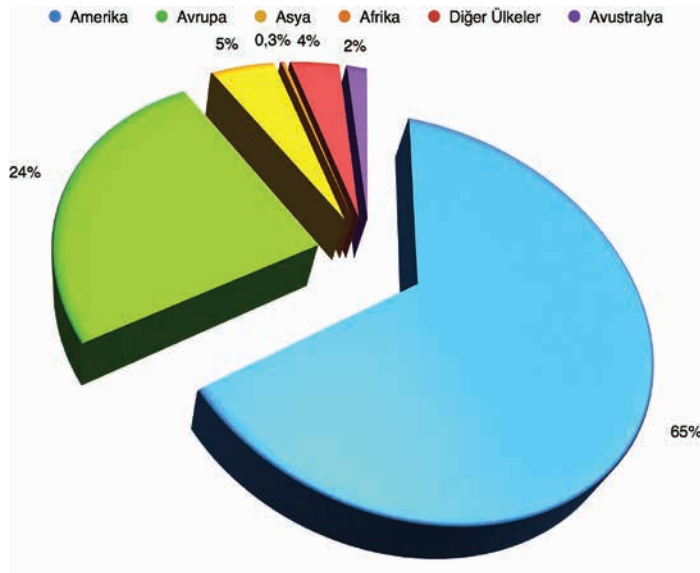
Gen tedavi klinik denemelerinin hemen hemen üçte ikisini Faz I ve Faz I/II denemeleri oluşturmaktadır. Yapılan tüm gen tedavi denemelerinin % 78,6'sını bu iki kategorinin toplamı oluşturmaktadır (Şekil 7). Faz II, Faz II/III ve Faz III denemelerinin önceki yıllara göre artan oranlara sahip olması, yakın gelecekte gen tedavi çalışmalarının klinik uygulamalara yansımaya ihtimalini güçlendirmektedir.

20.6.2 KLİNİK GEN TEDAVİ ÇALIŞMALARINI YAPAN ÜLKELER

Bugüne dek dünya çapında yapılan gen tedavi klinik denemeleri toplamda 5 kıtadan 31 ülkede gerçekleştirilmiştir (Şekil 20.8). Yapılan denemelerin kıtalar arası dağılımı son bir kaç yılda pek değişkenlik göstermemiş; denemelerin, %64.7'si Amerika, %24.5'i Avrupa ve %5.1'i Asya ülkelerinde yapılmıştır. ABD hala dünyada en çok denemenin yapıldığı ülke ola-



Şekil 20.7 Yapılan gen tedavi denemelerinin klinik faz seviyelerine göre dağılımları.

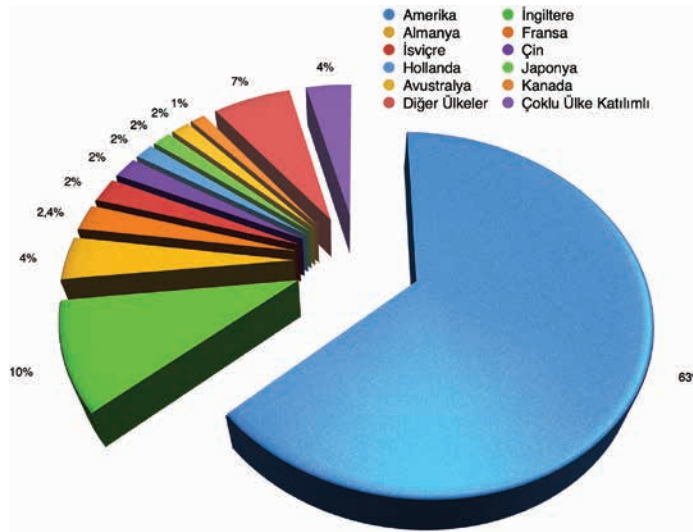


Şekil 20.8 Kıtalar bazında Gen Tedavi denemelerinin dağılımı.

rak birinci sırada yer almaktadır (1359 deneme ile %63.4). Avrupa'da ise; İngiltere toplam 206 deneme ile %9,6'lık payı alırken, Almanya 84 deneme ile %3.9, İsviçre 50 deneme ile %2.3, Fransa 51 deneme ile %2.4, Hollanda 33 deneme ile %1.5'lük bir pay almaktadır. Asyada; en çok veri sağlayan ülke, 43 deneme %2 ile Çin iken bunu 33 deneme %1.5 ile Japonya takip etmektedir. 2014 yılı itibariyle Avustralya'da gen tedavi denemelerinde bir artış gözlenmiş ve toplam sayı 32'e yükselmiştir. 83 deneme ise çoklu ülke çalışması olarak raporlandırılmıştır (Şekil 20.9).

20.7 TİCARİ OLARAK SATIŞI ONAYLANMIŞ GEN TERAPİ İLAÇLARI

2003 yılında gen tedavi kaynaklı bir ürünün klinik uygulamasını onaylayan ilk ülke Çin olmuştur. Si-Biono Gene Tech Co. firması tarafından geliştirilen ve ilk gen tedavi ürünü onaylanmış bir adenoviral vektördür ve baş-boyun yassı hücre karsinom tedavisinde kullanımı onaylanmış non-replikatif (replikasyon özelliği olmayan) bir virüstür. Bu noktada dikkat edilmesi gereken husus, Çin Gıda ve İlaç Kurumu (SFDA)'nın Gendisin'i standart faz 3 klinik



Şekil 20.9 Klinik Gen Tedavi denemelerinin yapıldığı ülkeler ve oranları.

denemelerin datalarını almadan onaylamış olmasıdır (45). Dolayısıyla bu durum başlangıçta Gendisin tedavisinin etkinliği konusunda yoğun tartışmalara neden olmuştur (46). Gendisin'in onaylanmasından iki yıl sonra, Çin SFDA tarafından onaylanmış başka bir gen tedavi ürünü olan, Onkorin ortaya çıkmıştır. Gendisin'in aksine, Onkorin, şartlara bağlı olarak replike olabilen bir adenovirustur. Sunway Biotech Co. Ltd. şirketi tarafından geliştirilmiş olan bu ürün ileri seviye refrakter nazofarinks kanserinin tedavi sinde kemoterapi ile birlikte kullanılmak üzere, 2005 yılında Çin'in onayıyla piyasaya sürülmüştür. 2004 yılında, Ark Therapeutics Group plc isimli bir firma, gen temelli ilaçlar (Serepro) için ticari malzeme üretmek amacıyla Avrupa'da ilk GMP sertifikasına sahip firma olmuştur. Serepro, Herpes simplex virus timidin kinaz (HSV-tk) geni içeren bir adenoviral vektör olup, malignan beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılması amacıyla Ark Therapeutics Group plc tarafından geliştirilmiştir. Serepro'nun klinik etkinliği, 2a ve 2b olmak üzere iki ayrı faz 2 klinik testlerinde değerlendirilmiş ve 2008 yılında faz 3 klinik testleri de tamamlanmış, faz 3 denemesi tamamlanan ilk adenoviral vektör olma özelliği kazanmıştır.

19 Temmuz 2012'de, EMA (Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı) ilk defa bir gen tedavi ürünü (Glybera) Avrupa Birliği'nin onayına sunmuştur. Glybera, Amsterdam Molecular Therapeutics şirketi tarafından geliştirilmiş olup şu an UniQure aracılığıyla piyasaya çıkarılmaktadır. Glybera, şiddetli lipoprotein lipaz yetmezliğinin tedavisinde kas dokularında lipoprotein lipaz eksprese eden, genetik olarak modifiye edilmiş bir adeno-assosiyasyon viral vektördür. Batı dün-

yasında onaylanmış ilk gen tedavi ürünü olan Glybera'nın özelliğinden dolayı bu ilacın geliştirilme süreci hakkında daha detaylı bilgi vermek istiyoruz.

20.7.1 GLİBERA

Alipogene Tiparvovec, ticari ismiyle Glybera, ailesel lipoprotein lipaz yetmezliğine (LPLD) sahip yetişkin hastalara yapılacak gen tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir adeno-assosiyasyon virus vektörüdür. Bu gen tedavi stratejisinde, farklı serotipleri olan adeno-assosiyasyon viruslarının birinci serotipi olan AAV1 vektörü kullanılmıştır. LPLD hastalığı, hastalarda birçok farklı klinik komplikasyonun gelişmesine neden olan nadir görülen bir otozomal resesif hastalıktır. Bu klinik komplikasyonların hayati tehlike yaratan en önemlilerinden biri pankreatit gelişimidir.

Pankreatit, pankreas hasarına bağlı olarak oluşan inflamasyondur. Pankreasta oluşan çeşitli hasarların dolayısıyla vücutta gelişen savunma mekanizmasının devreye girmesiyle oluşan bu inflamasyon tüm vücuda etkileyebilecek bir dizi komplikasyona neden olabilir. Tedavi edilmediği veya şiddetlendiği durumlarda ölümlere de yol açabilmektedir. Genel olarak safra kesesinde taş oluşumu, alkol tüketimi ve erişkinlerde hiperlipidemi gibi birçok farklı sebeplerden dolayı; sindirim sistemine katkıda bulunan pankreatik enzimlerin kontrol dışı salgılanması ve sağlıklı dokuları parçalamaya başlamasıyla karakterize bir hastalıktır. Lipoprotein lipaz yetmezliğine sahip hastalardaki en önemli klinik semptom hiperlipidemidir. Dolayısıyla hastalığın doğası gereği bu hastalarda pankreatit gelişimi oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. İleri

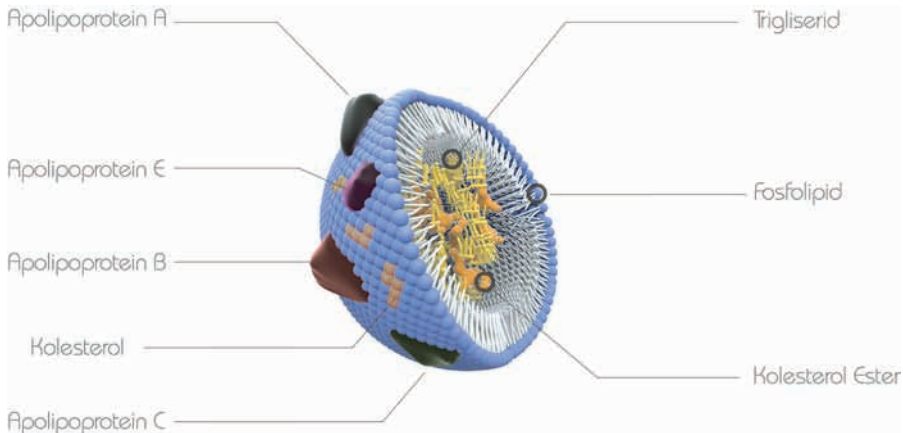
seviyede hipertrigliseridemi, pankreatit oluşumunda primer risk faktörlerinden biri olup, akut pankreatitin nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Pankreatit, pankreatik kanser gelişiminde de yüksek risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte, hastaların %20-30'unda morbidite ve ölümlerle sonuçlanan pankreatit, aynı zamanda sağlıklı yaşam kalitesini düşüren ve sağlık hizmetleri açısından bakıldığında büyük bir ekonomik yük yaratan bir hastalıktır.

Lipoprotein lipaz (LPL), hepatik lipaz, pankreatik lipaz ve endotelial lipazın da dahil olduğu lipaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzimler, dolaşımda trigliserit açısından zengin lipoproteinlerin katabolizmasında önemli rol oynarlar. LPL, öncelikli olarak adipositlerde; iskelet ve kardiyak miyositlerde sentezlenip salınırlar. Biyolojik olarak aktif LPL, 448 aminoasitlik LPL proteinin kovalent olmayan homodimerizasyonu ile oluşur ve katalitik merkezinin aktifleştirilmesi için apolipoproteine gereksinim duyar. Apolipoproteinler, lipitlerle beraber lipoproteinleri oluştururlar ve lipitlerin kanda taşınabilmelerini sağlarlar. Ancak aynı zamanda, lipoprotein lipaz gibi farklı enzimlerin kofaktörü olarak da görev alabilmektedirler. LPL, endoteliumun luminal yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanları ile interaksyona girerek, kilomikronlar e VLDL partikülleri gibi trigliseritçe zengin lipoproteinleri parçalamak amacıyla plazmaya salınır. Kilomikronlar, (%85-92) trigliserit, (%6-12) fosfolipit, (%1-3) kolesterol ve (%1-2) proteinlerden oluşan lipoprotein partikülleridir (Şekil 20.10). Yağların ve kolesterolün, su bazlı bir çözelti olan kan dolaşımında hareket etmesini sağlayan Lipoprotein ailesinin 5 ana üyesinden (kilomikronlar, VLDL, IDL, LDL, HDL) biri olan kilomikronlar, besin kaynaklı lipidle-

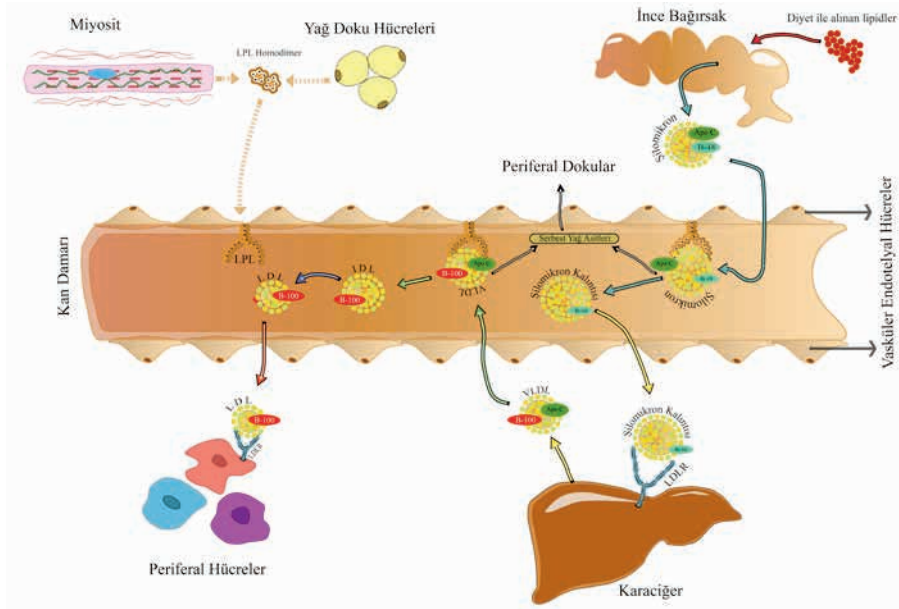
rin bağırsaklardan vücudun diğer bölgelerine taşınmasında görev alırlar (Şekil 20.11).

İskelet kası ve adipoz dokuda sentezlenen LPL, bir homodimer olarak salınır. Bu aktif homodimer daha sonra vasküler endoteliumu geçerek kan damarlarının lümenal yüzeyine sabitlenir. Diyet ile alınan lipitler bağırsaklarda kilomikron içerisine paketlenildikten sonra kilomikronlar lenfatik boşluğa salınır ve ardından kana geçer. Vasküler lümende LPL, dolaşımdaki kilomikronlarla interaksyona girererek, kilomikronlarda taşınan trigliseritlerin serbest yağ asitlerine dönüşümünü sağlar. Kilomikron kalıntıları, kilomikronların yüzeyinde yer alan apolipoprotein E ile etkileşime giren hepatositler tarafından endositoza uğratılır. Bu kalıntılar daha sonra karaciğerde VLDL içine paketlenerek yeniden değerlendirilir ve kan dolaşımına salınarak; çevre dokulara endojen lipid tedariği sağlar. Bu işlem sırasında, ApoB-48, ApoB-100 ile yer değiştirir. LPL daha sonra plazmada VLDL'nin LDL'ye dönüşümünde görev alır. Bu etkileşim sonrasında LPL, VLDL içerisindeki trigliseritleri de hidrolizleyerek serbest yağ asitlerinin oluşumunu ve VLDL'nin IDL'ye dönüşümünü uyarır. IDL daha sonra, periferel hücrelerin LDLR reseptörleri aracılığı ile bağlanabileceği LDL'ye dönüştürülerek periferel dokulardaki hücreler tarafından kullanılır (Şekil 20.11).

LPL'nin olmadığı durumda, kilomikronlardan besin kaynaklı yağlar ayrıştırılamayacağından hipertrigliseridemi ve hiperkilomikronemi ortaya çıkar. Bu yağların birikimi, her ne kadar yağ birikimi ile hastalık oluşumunun direkt bağlantısı henüz gösterilmemiş olsa da, çeşitli dokularda patolojilere yol açabilmektedir.



Şekil 20.10 Kilomikronun şematik yapısı.



Şekil 20.11 Lipoprotein lipaz'ın üretim ve fonksiyonu. LPL, başlıca yağ doku hücreleri(adiposit) ve miyositlerde sentezlenir. Hücrelerden salınmadan önce homodimer bir yapı oluşturan LPL, vasküler endotel hücrelerine yerleşir. Diyet ile alınan lipidler bağırsaklarda kilomikron (şilomikron) içerisine paketlendikten sonra kilomikronlar lenfatik boşluğa salınır. Daha sonra kan dolaşımına giren kilomikronlar, vasküler endotel yüzeyde bağlı olan LPL ile karşılaşır. Kilomikronların yüzeyinde bulunan, ApoCII; LPL'nin kofaktörü olarak görev yapar ve LPL, kilomikron içerisindeki trigliseritleri hidrolize uğratarak serbest yağ asitlerinin oluşumunu sağlar. Bu serbest yağ asitleri periferel dokulara dağılır. Trigliserit içeriğinden arındırılan kilomikron kalıntıları, karaciğerdeki LDLR reseptörleri aracılığıyla karaciğere alınır ve burada VLDL'ye dönüştürülür. Bu sırada, ApoB-48, ApoB-100 ile yer değiştirir. VLDL plasmaya salınır ve yeniden LPL ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonrasında LPL, VLDL içerisindeki trigliseritleri de hidrolizleyerek serbest yağ asitlerinin oluşumunu ve VLDL'nin IDL'ye dönüşümünü sağlar. IDL daha sonra, periferel hücrelerin LDLR reseptörleri aracılığıyla bağlanabileceği LDL'ye dönüştürülerek periferel dokulardaki hücreler tarafından kullanılır.

Lipoprotein Lipaz yetmezliği, LPL kodlayan gende fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların neden olduğu, nadir görülen otozomal resesif bir genetik hastalıktır. Bu mutasyonlar bazı durumlarda LPL'nin fonksiyonunu etkileyen diğer enzim veya proteinleri kodlayan genlerde de olabilir. Bu hastalık ileri seviyede hiperkilomikronemi ve hipertrigliseridemiye yol açar. Bu durum, diyabet gibi birçok hastalığın veya farklı klinik komplikasyonların oluşma riskini artırıcı bir etken olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, hastalığın yaşam kalitesini en çok etkileyen klinik etkisi, tekrarlayan, şiddetli olarak kendini gösteren ve hayati tehlike unsuru olan akut pankreatite neden olmasıdır. LPL yetmezliği erken çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır. Zaman zaman tekrarlayan abdominal ağrı ve akut pankreatit gelişimi ile birlikte seyreden bu hastalıkta, hepatosplenomegali (Karaciğer ve dalak büyümesi), deride yağ birikmesi ve retinal vaskülarizasyon gibi komplikasyonlar da ortaya çıkabilmektedir. Klinik semptomların şiddeti, hiperkilomikroneminin derecesiyle doğru orantılıdır. Hiperkilomikronemi de besinlerle alınan yağ oranıyla ilişkili olarak ortaya çıkar. Dolayısıyla, LPL yetmezliği ile ilgili tedavi stratejileri, yüksek trigliserit seviyelerini normal seviyelere düşürmeye ve

böylece pankreatit riskini azaltmaya yöneliktir. Bu yaklaşımla birlikte besinlerle alınan günlük yağ miktarını 20g'ın altına çekerek hiperkilomikroneminin şiddetini de azaltmaya yönelik tedavi stratejilerini destekleyici yöntemler uygulanmaktadır. Tüm bunlara rağmen, ömür boyu bu sınırlandırılmış diyeti uygulamak birçok hasta için oldukça zor olduğundan LPL yetmezliğine sahip hastaların pankreatit riski ve bununla bağlantılı birçok komplikasyonun oluşma riski ciddiyetini korumaktadır. Genel olarak hastalara uygulanan trigliserit düşürücü ilaçlar da LPL yetmezliğine sahip hastaların trigliserit seviyelerini düşürmemektedir. Ayrıca, LPL proteininin intravasküler yarı ömrünün yaklaşık 15 dakika gibi kısa bir süre olması dolayısıyla, enzim replasman tedavisinin de bu hastalarda uygulanabilirliği pek olası değildir. LPL yetmezliği ile ilgili etkin bir tedavinin olmayışı, yeni bir yaklaşım olarak gen replasman tedavisi stratejilerini gündeme getirmiştir. Bu doğrultuda, fonksiyon kaybı mutasyonlarına sahip LPL yetmezliği hastalarının kas dokularına, LPL geninin fonksiyonel kopyalarının direkt in vivo uygulanmasına dayalı bir yaklaşım ortaya çıkmıştır. Alipogene Tiparvovec (Glybera; AMT-011; AAV1-LP-LS447X); insan LPL geninde fonksiyon kazandıran bir mutasyona (S447X)

sahip gen varyantını taşıyan bir adeno-assosiyasyon sero-tip 1 virusudur. Bu AAV-1 aracılı gen tedavisi, fonksiyon kazandıran transgenin ekspresyonu ile biyolojik olarak aktif LPL'nin sentezine ve sekresyonuna yol açar. Bu LPLS447X varyantı beyaz ırkın yaklaşık olarak %20'sinde görülen bir doğal mutasyondur. Fonksiyon kaybına neden olan birçok diğer gen mutasyonlarının aksine, LPLS447X mutasyonu, fonksiyon kazandırıcı özellikte bir çok etki ile ilişkilidir. Bu gen varyantı ile ilişkili olarak, trigliserit seviyelerinin azalması, HDL düzeylerinin artması ve trigliseritçe zengin lipoproteinlerin dönüşüm hızlarının daha yüksek olması dolayısıyla; LPL ilişkili apolipoprotein B100 seviyelerinde artış gözlenmektedir. Bunlarla birlikte, her ne kadar bu varyantın kardiyoprotektif etkilerinin net mekanizması henüz belirlenememiş olsa da kardiyovasküler hastalık risklerinde de dikkate değer bir azalma söz konusudur. LPL yetmezliğine sahip erişkin hastalarda kullanımı için Avrupa onayı almasıyla Alipogene Tiparvovec, batı dünyasında onaylanmış ilk gen tedavi uygulaması olmuştur.

a. Alipogene Tiparvovec'in Farmakodinamik Özellikleri

Alipogene Tiparvovec, konak hücre olarak böcek (insekt) hücrelerinin kullanıldığı rekombinant bakülovirus teknolojisi ile üretilen bir üründür. İnsan LPL geninin LPLS447X varyantını kodlayan bir transgenik ekspresyon kasetinin AAV1 kapsitlerine enkapsüle edilmesiyle oluşturulmuştur. Ekspresyon kasetinde, LPL gen varyantı LPLS447X in ekspresyonunu kontrol eden sitomegalovirus promotörü, woodchuck hepatit virusu posttranskripsiyonel elementi ve sığır büyüme hormonu poliadenilasyon bölgesi yer almaktadır. Tüm bu elementleri içeren ekspresyon kaseti AAV2'den köken almış ters çevrilmiş terminal tekrarlarla çevrilmiştir.

Bu AAV-LPLS447X kapsidinin AAV1 protein kabuğuna enkapsüle edilmesiyle, LPLS447X'in transdüksiyon yeteneğinin artırılması hedeflenmiştir.

b. Alipogene Tiparvovec'in Etki Mekanizması

LPL yetmezliğine sahip hayvan modellerinde yapılan prelinik çalışmalar sonucunda, alipogene tiparvovec'in bir seri intramuskular enjeksiyonu ile; kas hücrelerinin canlılıklarını sürdürdüğü müddetçe stabil AAV1-LPLS447X 'in ekspresyonunun olduğu ve sonuç olarak biyolojik aktif LPL sentezinin gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu doğrultuda, plazma trigliserit seviyelerinin azaldığı ve lipeminin tamamen sona

erdiği görülmüştür. Bu duruma örnek olabilecek bir çalışmada, LPL ekspresyonu yapamayan LPL-/LPL-farelere, AAV1-LPLS447X 'in aktarılmasıyla yabancı tip LPL gen aktarımı yapılan farelere oranla plazma HDL seviyelerinde iki kattan daha fazla artış ve trigliserit seviyelerinde neredeyse üç kat azalma olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tek bir uygulama ile bir yıldan daha fazla süreyle bu etkilerin devamlılığının sağlandığı gösterilmiştir. LPL yetmezliğine sahip hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, Alipogene Tiparvovec'in intramuskular enjeksiyonları sonucunda, LPLS447X geninin fonksiyonel kopyalarının varlığı ve biyolojik aktif LPL'nin uzun süreli ekspresyonu da gösterilmiştir. AAV vektörlerinin konakçı memeli genomuna entegre olma potansiyeli ve tümör oluşturma riskini arttırabilme potansiyeli dolayısıyla bu vektörlerle ilgili birtakım endişeler söz konusudur. Bu doğrultuda, alipogene tiparvovec tedavisi uygulanmış LPL yetmezliğine sahip 5 hastanın ve AAV1-LPLS447X uygulaması yapılmış farelerin kas dokularından alınan DNA örneklerinde yapılan entegrasyon bölge analizlerinde, AAV1-LPLS447X 'in genler, CpG adaları, palindromik sekanslar veya ribozomal DNA lokuslarından herhangi birine özel olarak entegre olma eğilimine dair herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, AAV1-LPLS447X 'in çoğunlukla mitokondriyal DNA'daki hotspot noktalara entegre olduğu, ancak yabancı tip AAV1'in tercihen entegre olduğu AAVS1 lokusunda spesifik bir birikim olmadığı da belirlenmiştir. Tüm bunlar göz önüne alındığında, AAV vektörlerinin aynı bölgeye entegre olma sıklığının retroviral vektörlere göre çok daha düşük olması dolayısıyla AAV1-LPLS447X ile yapılan gen tedavisinin, konakçı genomuna entegrasyondan kaynaklı bir yan etki oluşturmaması oldukça düşük bir ihtimal olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, rekombinant AAV uygulanan 200'den daha fazla bireyde yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarda herhangi bir tümör gelişimi gözlenmediği de, AAV vektörlerinin tümörojenik potansiyellerinin minimum olduğuna kanıt olacak niteliktedir.

c. Alipogene Tiparvovec ve İmmünojenite

LPL yetmezliğine sahip hastalarda yapılan klinik denemelerde, Alipogene Tiparvovec uygulamasını takiben, immünsüpresan kullanılmasına rağmen virusun protein iskeletine karşı antikor yanıtı geliştiği saptanmıştır. Bununla birlikte, daha önceden maruz kalınan AAV'lere karşı vücut tarafından doğal olarak geliştirilmiş antikorlarla birlikte tedavi sırasında kullanılan anti-AAV antikorlarının varlığı LPL transge-

ninin ekspresyonunda veya LPL proteinin biyolojik aktivitesinde olumsuz bir etki yaratmamıştır. Biyogüvenilirlik açısından da bu antikörlerin herhangi bir sorun teşkil etmediği belirtilmiştir. Tedaviden önce, 27 katılımcının 18'inde yapılan analizlerde AAV'ye karşı geliştirilen antikörlere rastlanmıştır. Bu durum doğal yaşam süresinde herhangi bir zamanda çoğu kişinin AAV enfeksiyonuna maruz kaldıklarının bir göstergesidir. Alipogene Tiparvec tedavisinden sonra, tüm hastalarda anti-AAV antikörleri tespit edilmiş, daha önceden bu antikörlere sahip bireylerde de antikor seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Klinik denemelere katılan hastaların hiçbirinde daha önceden veya Alipogene Tiparvec uygulamasından sonra LPL proteinine karşı geliştirilen bir antikora rastlanmamıştır. Transgene karşı oluşabilecek herhangi bir olası reaksiyon nedeniyle, Alipogene Tiparvec, az da olsa LPL proteinin sentezinin gerçekleştiği hastalarda kullanılacak şekilde sınırlandırılmıştır. AAV vektör aracılı gen transferi ayrıca lokal T hücre aracılı immün yanıt ile de ilişkilidir. Alipogene Tiparvec tedavisi almış hastaların yarısında, AAV'lere karşı T hücre yanıtı geliştiği saptanmıştır. Bununla birlikte hiçbir hastada LPL proteinine karşı bir T hücre yanıtı gelişmemiştir. AAV'ye karşı gelişen bu T hücre yanıtlarının herhangi bir şekilde Alipogene Tiparvec'in etkinliğine, güvenilirliğine veya transgen ekspresyonunun devamlılığına etki etmediği belirtilmiştir. Alipogene Tiparvec tedavisinden sonra, uygulama öncesi ve sonrası inflamasyon göstergesi olabilecek tüm semptomların değerlendirilmesiyle ve bu belirtilerlerin tümünün normal sınırlar içerisinde kalmasıyla, oluşan bu T hücre yanıtlarının herhangi bir klinik yansımasının olmadığı gösterilmiştir.

ç. Alipogene Tiparvec'in Farmakokinetik Özellikleri

İnsanlarda yapılan deneysel klinik çalışmalar kapsamında, LPL yetmezliğine sahip hastalardaki viral dağılımlar incelendiğinde, Alipogene Tiparvec'in biyolojik dağılımının kas dokusuyla sınırlı kaldığı görülmüştür. Alipogene Tiparvec'in LPL yetmezliğine sahip hastalara uygulanmasını takiben, enjeksiyonun yapıldığı bacadaki kas dokusunda yüksek miktarda vektör DNA'sı tespit edilirken, enjeksiyon yapılmayan bacadaki vektör DNA'sı saptanamamıştır. Viral dağılım analizlerine göre, Alipogene Tiparvec uygulamasını takiben, 10. haftaya kadar idrarda, 12. haftaya kadar tükürükte ve 26. haftaya kadar semende, vektör DNA'sı tespit edilmiştir. Teorik olarak immünsüpresanlarla birlikte aynı anda yapılacak bir uy-

gulamanın, vektör DNA'sının serumda tespit edildiği süreyi arttırabileceği öngörülmektedir. Yine de, bugüne kadar Alipogene Tiparvec uygulanmış hiçbir hastada daha uzun vadede serumda vektör DNA'sı tespit edilememiştir.

d. Alipogene Tiparvec'in Klinik Etkinliği

LPL yetmezliğine sahip ve şiddetli hipertrigliseride mi gösteren yetişkin hastalarda, üç deneysel çalışma ile Alipogene Tiparvec'in klinik etkinliği değerlendirilmiştir. Hastalığın nadir görülen özellikte olması dolayısıyla büyük bir popülasyonu hedef alan bir çalışma yapılamayacağından, Hollanda (CT-AMT-010-01) ve Kanada'da (CT-AMT-011-01, CT-AMT-011-02) 27 hastadan alınan sonuçlarla klinik etkinlik değerlendirmeleri yapılmıştır. İlk değerlendirme kriteri 12-14 haftalık bir süreci hedef almaktadır. Tedavinin güvenilirliğinin ve etkinliğinin değerlendirmesi için bu sürecin 15 yıla kadar takip edilmesi planlanmaktadır. LPL yetmezliğine sahip hastalarda pankreatit ve abdominal ağrı görülme sıklığı ve karakterizasyonu; retrospektif ve prospektif açıdan yürütülen iki farklı çalışma (CT-AMT-011-03 ve CT-AMT-011-05) ile değerlendirilmiştir.

e. Alipogene Tiparvec tedavisinin lipidler üzerindeki etkisi ve Klinik Bulgular

- CT-AMT-010-01 deneysel çalışması

Bu deneysel çalışmanın ilk 12 haftasında, LPL yetmezliğine sahip hastalar düşük ve yüksek dozda uygulama yapılacak şekilde iki gruba ayrılmıştır. 4 hastaya düşük doz olarak belirlenen 1×10^{11} gen kopyası/kg; ve diğer 4 hastaya daha yüksek doz olarak belirlenen 3×10^{11} gen kopyası/kg AAV1-LPLS447X uygulanmıştır. Uygulamalar, bacadan intramuskular enjeksiyonlarla gerçekleştirilmiştir ve düşük doz uygulamasında 40 kez ve yüksek doz uygulamasında 60 kez olacak şekilde bir seri enjeksiyon yapılmıştır. Ortalama olarak bu hastaların plazma trigliserit seviyelerinin uygulama öncesinde 14 mmol/L üzerinde olduğu kaydedilmiştir.

Açlık trigliserit seviyelerinin 10 mmol/L değerinin altına düştüğü veya açlık plazma trigliserit seviyelerinin %40'dan daha fazla azalma gösterdiği değerler ilk başarı hedefi olarak belirlenmiştir. Bu değerlendirme baz alındığında, 12. haftada düşük doz uygulaması yapılan hastalardan birinde ve yüksek doz uygulaması yapılan hastaların üçünde bu parametrelere uygun trigliserit

seviyeleri saptandığından, uygulamanın belirlenen ilk başarı hedefine ulaştığı belirtilmiştir. 12. haftanın sonunda, tüm hastaların trigliserit seviyelerinde istatistiksel olarak belirgin ($p<0,007$) oranda düşüş saptanmıştır. Düşük doz AAV1-LPLS447X uygulanan grubun trigliserit seviyelerinde %27; yüksek doz uygulanan grubun trigliserit seviyelerinde %41 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. Ancak, 18-31 aylık takip sonrasında, plazma trigliserit seviyelerinin başlangıç seviyelerinden farklı olmadığı saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda, ilerleyen çalışmalarda AAV1 aracılı tedavide daha yüksek vektör dozlarının uygulanması ile birlikte daha uzun süreli etki için immünsupresan kullanımı gündeme gelmiştir.

- CT-AMT-011-01 deneysel çalışması

Bu çalışma, 2 yıl süreyle takibi yapılan; pankreatit ve şiddetli hipertrigliseridemi hikayesi olan LPL yetmezliğine sahip 14 hastada gerçekleştirilmiştir. 12 haftalık bir süreyi kapsayan bu çalışmada Alipogene Tiparvovec ile doz arttırma denemeleri yapılmıştır. İlk iki hastaya, herhangi bir immünsupresan desteği olmadan 3×10^{11} gen kopyası/kg Alipogene Tiparvovec uygulanmıştır. Sonraki 4 hastaya, 3×10^{11} gen kopyası/kg Alipogene Tiparvovec ile birlikte, oral yolla siklosporin ve mikofenolat mofetil verilmiş ve uygulamanın ertesi gününden itibaren 12 hafta süreyle immünsupresan desteğine devam edilmiştir. Kalan 8 hastaya da bir önceki grupla aynı immünsupresan kombinasyonu ve 1×10^{12} gen kopyası/kg dozda alipogene Tiparvovec uygulanmıştır. Bu çalışmanın başarı hedefi Alipogene Tiparvovec uygulamasının güvenilirliği ve açlık plazma trigliserit düzeylerinde %40 oranında düşüş gözlenen hasta yüzdesi olarak belirlenmiştir.

Uygulama öncesinde hastaların açlık plazma trigliserit seviyeleri ortalaması 13 mmol/L değerinin üstündeydi. Uygulamayı takiben 3-12 hafta arasında yapılan değerlendirmelerde, hastaların %50'sinde açlık trigliserit düzeylerinde başlangıç seviyelerine göre %40 oranında azalma olduğu gözlenmiştir. 4 hastada, trigliserit düzeyleri 10 mmol/L'nin altına düşmüş ve uygulamayı takiben 16-26 haftalar arasında bu değerlerin tekrar başlangıç seviyelerinin üzerine çıkma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Buna rağmen, kilomikronların trigliserit ve kolesterol içeriğinde belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma ile Alipogene Tiparvovec için optimum dozun 1×10^{12} gen kopyası/kg değerinde olması gerektiği öngörülmüştür. 2 yıllık takip sonrasında, hastaların

çoğunun, bireysel olarak klinik semptomlar açısından kendi değerlendirmelerini yaptıklarında daha iyi bir durumda olduklarını keşfettikleri belirlenmiştir. Hastalar, uygulama öncesine göre yemek yiyebilme kapasitelerinin arttığını, tedaviden önce tüketemedikleri besinleri yiyebildiklerini, enerji seviyelerinde artış olduğunu ve daha az abdominal rahatsızlık yaşadıklarını belirtmişlerdir.

- CT-AMT-011-02 deneysel çalışması

CT-AMT-010-01 ve CT-AMT-011-01 deneysel çalışmalarından alınan sonuçlar ışığında, 14 haftalık bir faz II/III çalışması olan CT-AMT-011-02 deneysel çalışması yürütülmeye başlanmıştır. Bu çalışmada, pankreatit öyküsü olan LPL yetmezliğine sahip 5 hastada Alipogene Tiparvovec'in, postprandiyal kilomikron metabolizmasına olan etkisi, esterleşmemiş serbest yağ asitlerinin ve gliserolün plazmada görülme hızları incelenmiştir. Alipogene Tiparvovec, oral immünsupresan desteği ile birlikte 1×10^{12} gen kopyası/kg dozunda uygulanmıştır. Postprandiyal kilomikron metabolizmasının ve serbest asitlerle gliserolün plazmada görülme hızlarının değerlendirilmesi için yapılan testlere, Alipogene Tiparvovec uygulamasından 2 hafta önce başlanmış ve uygulamadan 14-52 hafta sonrasına kadar devam edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm hastaların uygulama öncesi trigliserit seviyelerinin 11 mmol/L'nin üzerinde olduğu ve hiç bir lipit düşürücü ilaç kullanmadıkları kaydedilmiştir. Uygulama alan hastaların ikisi tip 1 diyabet hastasıydı. 14. haftada Alipogene Tiparvovec uygulamasının postprandiyal kilomikron metabolizmasında belirgin bir gelişme yarattığı belirlenmiştir. Uygulamayı takiben serbest yağ asidi ve gliserolün plazmada ortaya çıkma hızlarında herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bununla beraber 14. haftada yapılan analizler postprandiyal total plazma trigliserit seviyelerinde % 60 oranında bir azalma olduğunu göstermiştir. Uygulama öncesinde ortalama 18.77 mmol/L olan bu seviyeler Alipogene Tiparvovec tedavisi ile 7.30 mmol/L değerine düşmüştür. Postprandiyal kilomikron trigliserit seviyelerinde de %85 oranında bir azalma saptanmıştır. Ayrıca kilomikron trigliserit/total plazma trigliserit oranı da 0.64 değerinden 0.15 değerine gerilemiştir. Kilomikron trigliseritlerinin total plazma trigliseritlerine oranı, plazmadaki trigliseritlerin sıvı içerisindeki hareketliliğine (yüzebilirliğine) etki eden bir orandır. Bu oranın yüksek olması durumunda, kilomikronlar geniş ve sıvı içerisinde yüzebilen bir karakteristik özellik gösterirler. Bu özellikteki kilomikronlar, en patojenik formlar olarak değerlendirilmektedir ve pankreatitin ortaya

çıkmasına neden olurlar. Bunun dışında, Alipogene Tiparvovec uygulamasının, postprandiyal glukoz, insülin ve C-peptid seviyelerinde belirgin bir farklılık yaratmadığı saptanmıştır. Uygulama sonrasında transgen ekspresyonunun ve eksprese olan proteinin biyolojik etkilerinin 52. haftaya kadar devam ettiği gözlenmiştir.

f. Alipogene Tiparvovec Uygulamasının Pankreatit Oluşum Riskine Olan Etkisi

CT-AMT-011-01 ve CT-AMT-011-02 deneysel çalışmalarından alınan sonuçlardan toplanan verilerle, CT-AMT-011-03 kodlu retrospektif bir çalışma yapılmıştır. Akut abdominal ağrılı pankreatitin oluşma sıklığı ve şiddetinin değerlendirilmesi için LPL yetmezliğine sahip 5 hastada gözlemsel bir çalışma tasarlanmıştır. Hastaneye akut abdominal ağrılı pankreatit dolayısıyla başvuran hastaların; Alipogene Tiparvovec uygulaması alan kişiler olup olmadığı incelenmiş, ayrıca pankreatit gelişiminin Alipogene Tiparvovec uygulamasından önce mi sonra mı gerçekleştiği değerlendirilmiştir. Cox regresyon analizi kullanılarak yapılan değerlendirmeler sonucunda, Alipogene Tiparvovec uygulamasıyla pankreatit riskinin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Pankreatit hikayesiyle hastaneye başvurmış ve Alipogene Tiparvovec tedavisi yapılmış tüm hastalar değerlendirildiğinde, pankreatit gelişiminin tedavi sonrası süreçte %56-67 oranında azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca bu hastaların, hastanede kalış süreleri azalmış ve hiçbirinde şiddeti gittikçe artan bir pankreatik sendrom gözlenmemiştir. LPL yetmezliğine sahip Alipogene Tiparvovec tedavisi alan 13 hastada 6 yıllık takip sonrası değerlendirmeler göz önüne alınarak yapılan CT-AMT-011-05 çalışmasında, pankreatit riskinin azaldığı belirtilmiştir. Bu hastaların pankreatit sebebiyle hastaneye yatma oranlarında, tedavi öncesine göre % 59 oranında azalma olduğu gözlenmiştir.

g. Alipogene Tiparvovec'in Güvenilirlik Profili

Alipogene Tiparvovec, genellikle klinik deneysel çalışmalarda hastaların toleransının yüksek olduğu bir ilaç olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, doz sınırlandırıcı herhangi bir toksisite etkisi rapor edilmemiştir. En yaygın yan etkiler olarak, ödem, bacaklarda ağrı ve kramp gibi enjeksiyona bağlı oluşan lokal reaksiyonlar tanımlanmıştır ve bu yan etkilerin birkaç gün içerisinde geçtiği gözlenmiştir. Alipogene Tiparvovec tedavisi almış hastaların üçte birinde, enjeksiyonu takip eden günlerde ekstremiteler

ağrısı gözlenmiştir. Genel olarak oldukça yaygın kategoride değerlendirilen, baş ağrısı, ekstremiteler ağrısı, hipertermi ve morarma gibi yan etkilerle birlikte; %10'dan daha az oranda görülen iştah azalması, hipoglisemi, yanma hissi, baş dönmesi, hipertansiyon, pulmoner emboli, abdominal ağrı ve enjeksiyon bölgesinde oluşan reaksiyonlar gibi yan etkiler de tanımlanmıştır. Alipogene Tiparvovec tedavisi uygulanan hastalardan sadece birinde, 7 hafta sonra pulmoner emboli gelişmiştir, ancak bu durumun LPL yetmezliği veya Alipogene Tiparvovec uygulaması ile ilişkilendirilecek bir durum olduğu düşünülmemektedir.

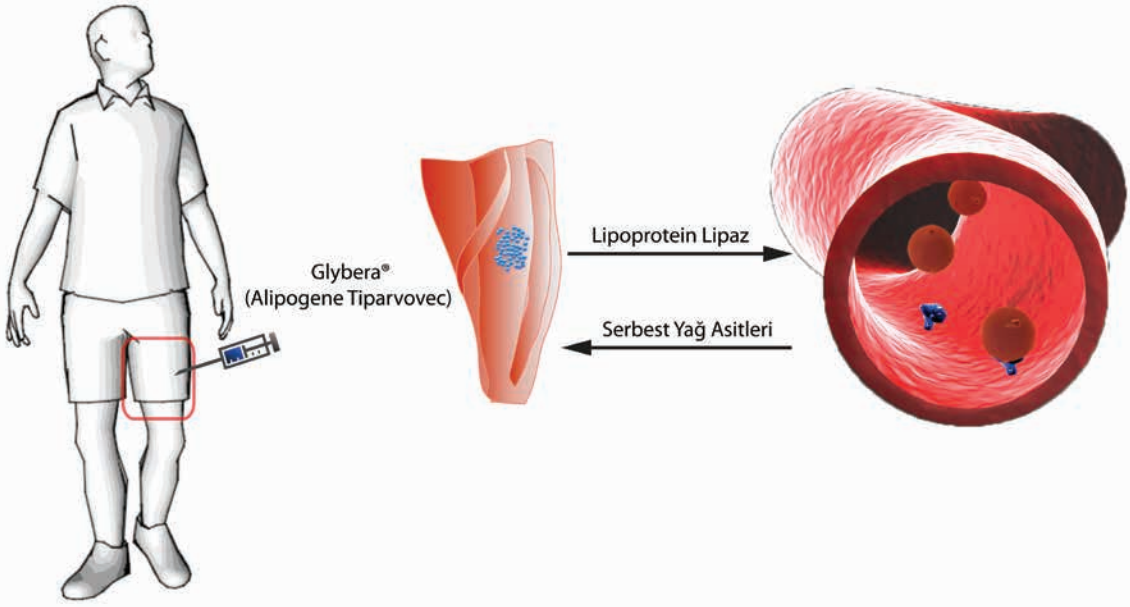
h. Alipogene Tiparvovec Dozajı ve Uygulama Şekli

Alipogene Tiparvovec, ailesel LPL yetmezliği hastası olan ve besinle alınan yağın kısıtlandığı diyet uygulamalarına rağmen şiddetli ve çoklu pankreatit atakları geçiren erişkinlerde kullanım için onaylanmış bir gen tedavisi ürünüdür. Uygulamanın yapılabilmesi için, LPL yetmezliğinin tanısının genetik testlerle doğrulanmış olması ve hastalarda az da olsa tespit edilebilir seviyede LPL proteini sentezlenmesi gerekmektedir. Uygulama; eğitimli personeller tarafından; ardarda yapılacak bir seri intramuskular enjeksiyonlar halinde, toplam doz 1×10^{12} gen kopyası/kg olacak şekilde yapılmalıdır. Kesinlikle intravenöz uygulama yapılmamalıdır (Şekil 20.12).

Alipogene Tiparvovec uygulamasından önce ve uygulamayı takiben 6. ve 12. aylarda, AAV1 ve LPL-S447X'a karşı T hücre yanıtlarının ve nötralize edici antikorların ölçümü ile tedavi takibi yapılmalıdır. Tedaviye başlamadan 3 gün öncesinden itibaren tedavinin 12. haftasına kadar, siklosporin (3 mg/kg/day) ve mikofenolat mofetil (2×1 g/day) kombinasyonundan oluşan immünsüpresan desteği önerilmektedir. Ayrıca, çok sayıda ardarda enjeksiyon yapılma gerekliliği dolayısıyla, Alipogene Tiparvovec uygulamasından 30 dakika öncesinde, intravenöz methylprednisolone (1 mg/kg) enjeksiyonu yapılması gereklidir. Methylprednisolone, genel olarak anti-inflamatuvar olarak kullanılan bir kortikosteroiddir.

1. Ailesel Lipoprotein Lipaz Yetmezliğinde Alipogene Tiparvovec'in Güncel Durumu

Alipogene Tiparvovec, daha önce tedavisi mümkün olmayan LPL yetmezliğini gidermek amacıyla LPG genine fonksiyon kazandıran özel bir gen varyantı kullanarak oluşturulan gen nakil vektörlerinin kas hücrelerine enjekte edilmesiyle geliştirilen bir gen



Şekil 20.12 Glybera uygulaması. 1×10^{12} genom kopyası/kg dozda intramuskular glybera enjeksiyonu ile LPL yetmezliğine sahip hastalarda LPL aracılı serbest yağ asit üretimi ile hipertrigliseridemi ve hiperkilomikronemi oluşumu engellenebilir.

tedavi stratejisidir. Bu tedavi ile LPL yetmezliğine sahip hastaların trigliserit ve kilomikron seviyelerini normalize etmek amaçlanmıştır. Klinik çalışmalarda Alipogene Tiparvovec uygulamasının, 12-14 hafta süreyle LPL yetmezliğine sahip hastaların plazma trigliserit seviyelerini %40-60 oranında düşürdüğü gözlenmiştir. Her ne kadar bu hastaların trigliserit seviyeleri 16-26 hafta sonunda tedaviden önceki seviyelerine yükselme eğiliminde olsa da, tedavi uygulanan hastaların postprandiyel kilomikron metabolizmalarında gelişme olduğu gözlenmiştir. Ayrıca enjeksiyon yapılan kas hücrelerinde artmış LPLS447X gen ekspresyonu ile birlikte 52 haftalık takip süresince biyolojik olarak aktif LPL'ye rastlanmıştır. Tedavi edilmiş hastalarda 6 yıl süre sonunda yapılan gözlemler, bu süreçte hastaların pankreatit ve akut abdominal ağrı hikayelerinde belirgin bir azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca lokal bölgede oluşan, geçici, enjeksiyona bağlı reaksiyonların dışında Alipogene Tiparvovec ile yapılan klinik çalışmalarda ciddi bir reaksiyon oluşmamıştır. Bu açıdan hasta toleransı yüksek bir tedavi olarak değerlendirilen Alipogene Tiparvovec uygulamalarında doza bağlı herhangi bir toksisite vakasıyla da karşılaşılma-
mıştır. Gen transferi için kullanılan rAAV vektörlerinin var olan avantajları ve güvenlik profilleri göz önüne alındığında, rAAV vektörlerinin kalıtsal hastalıkların tedavisinde tercih edilebilecek vektörler olab ilme potansiyelleri yüksektir. Diğer yandan, rAAV

vektörlerinin tümörojenik potansiyelleri ve immün yanıt oluşturma etkileri gibi endişeler dolayısıyla bu vektörlerin etkinliği ve güvenilirliği açısından endişeler de mevcuttur. Her ne kadar, AAV vektörlerinin tümörojenik potansiyelleri ile ilgili endişeler varsa da, Alipogene Tiparvovec ve diğer rAAV vektörleri ile ilgili yapılan prelinik hayvan çalışmalarında bu vektörlerin; özellikle kas gibi yavaş bölünen hücrelere uygulanması durumunda tümörojenik potansiyellerinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. rAAV vektörlerine karşı oluşan immün yanıt ise; uygulama yöntemi, hedef doku, vektör serotipi ve dozu, hedeflenen hastalık ve transgenin ekspresyon seviyesi gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Alipogene Tiparvovec tedavisinde, oluşan immün yanıt LPL transgeninin ekspresyon seviyesini; eksprese olan LPL proteininin biyolojik aktivitesini veya tedavinin güvenilirliğini olumsuz yönde etkilememektedir. Alipogene Tiparvovec tedavisi; Avrupa'da onay aldıktan sonra Batı dünyasında onaylanmış ilk gen tedavi stratejisi olma özelliği kazanmış ve gen tedavi stratejilerinde gelişimi teşvik eden ve bu stratejileri geleceğe taşıyan önemli bir adım olmuştur. Alipogene Tiparvovec şu an itibarıyla Amerika ve Kanada da dahil olmak üzere birçok ülkede LPL yetmezliğine sahip hastalarda kullanılmak üzere onay aşamasındadır. Hastalığın nadir görülen özelliği dolayısıyla, Alipogene Tiparvovec ile yapılan klinik çalışmalar kısıtlı kalmaktadır. Bu nedenle Alipogene Tiparvovec'

in daha fazla ülkede onay almasıyla bu yeni geliştirilmiş gen tedavi stratejisinin uzun dönemli etkilerinin ve güvenilirliğinin daha iyi tanımlanabilmesi mümkün olacaktır.

20.8 GÜVENİLİRLİK VE ETİK GÖRÜŞLER

Gen tedavisi, yakın gelecekte farklı hastalık türleri için standart bir tedavi haline gelebilecek, terapötik potansiyeli çok yüksek bir yaklaşım olmasına rağmen, bahsedildiği üzere yapılan tedavi amaçlı deneyimlerin ve üretilen terapötik ilaçların yeterliliğinin onaylanması aşamasında çeşitli güven ve etik problemleri yaşanmaktadır. Tartışmaya açık bir yaklaşım olması, gen tedavisine karşı belirsizliklerin ve olası sonuçların açığa çıkarılması açısından bir hayli önem taşımaktadır. İnsanlara yapılacak gen aktarımının potansiyel etkileri güvenlik ve germline yaklaşımları üzerinde yoğunlaşmıştır. Şimdilik, yasal düzenlemeler sadece somatik hücrelere gen tedavi yapılmasına izin vermektedir.

Aktarımı yapılan transgenin konak hücredeki ekspresyonunun seviyesi ve stabilitesi gen tedavisinin başarısını etkileyen faktörler arasındadır. Hastada oluşabilecek riskler ve insan genetik mühendisliği konusundaki süre gelen korkular, gen tedavi deneyimlerinin insanlar üzerinde gerçekleştirilmesinin neden bu kadar yavaş sürdüğünün ve zorlu olduğunun önemli göstergelerindendir. Viral vektörlerin kullanımının hastalarda tehdit oluşturabileceği düşüncesi özellikle güvenilirlik açısından şüphe uyandırmaktadır. Bu endişelerden bazıları retrovirus temelli gen aktarımlarına karşı gelişmiştir. 2000 yılında Science dergisinde yayınlanan bir makalede ilk kez, X'e bağımlı ağır immün yetmezlik hastalığına dair geliştirilen gen tedavisi açıklanmıştır. Ne yazık ki bu ilk başarıdan sonra, takip eden denemelerde vektör kaynaklı insersiyonel mutagenез gelişmiş ve hastalarda lösemi (sonradan kemoterapiyle tedavi edilmiş) ortaya çıkmıştır. Ayrıca, kronik granüloamatöz hastalığının gen tedavisinde de, kullanılan gen transfer vektörüne bağlı olarak benzer problemlerle karşılaşmıştır.

Fakat zamanla gelişen vektör teknolojileri sayesinde, daha sonra yapılan denemelerde yine entegre olma özelliğine sahip vektörler kullanılmış olsa da herhangi bir hastada insersiyonel mutagenезe rastlanmamıştır. Yine de, insersiyonel mutagenез riski, entegre olma özelliğine sahip vektörlerin kullanımında majör bir olumsuz etken olarak klinikte gen tedavi araçları-

nın kullanımında endişelere yol açan bir durumdur. Bu vektörlerin karakteristik özelliklerinden doğan ana riskler, vektörlerin regülatör gen bölgelerine veya aktif transkripsiyonel bölgelere entegre olması ve dolayısıyla insersiyonel mutagenез veya onkogeneze yol açma olasılığından kaynaklanmaktadır. Tüm bu problemler göz önüne alındığında, günümüz vektör geliştirme teknolojilerinde, transgenlerin daha önceden belirlenmiş genomik bölgelere hedefli entegrasyonu üzerine çalışmalar önem kazanmaktadır. İnsan hücrelerine hedeflenmiş entegrasyon için en etkili metodlardan birisi, DNA'da çift zincirli kırık oluştuktan sonra homolog rekombinasyonun tetiklenmesi yaklaşımıdır. Genomik DNA'da oluşturulacak bölgeye özgü kırıklar, zinc finger nükleazlar (ZFNs), meganükleazlar veya transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALENs) aracılığıyla gerçekleştirilebilmektedir.

Retroviruslarla ilgili endişelerin artması, bilim adamlarını başka virusların kullanıma yönlendirmiş ve çalışmalarda adenovirusların kullanım sıklığı artmıştır. Adenoviruslar, genel olarak immünojenik olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, kardiyovasküler hastalıkların ve malignant gliomaların adenoviral aracılı insan gen tedavisi çalışmalarından elde edilen veriler incelendiğinde, hedef dokuya lokal olarak yapılan vektör uygulamalarından güvenilirlik açısından oldukça iyi sonuçlar alınmıştır. Adenoviral vektör uygulamasına karşı nötralize edici antikor yanıtı oldukça hızlı olup aynı hızla vücuttan temizlenebilmektedir. Her ne kadar bazı ara çalışmalarda insanlara uygulanan adenovirusların yeteri kadar güvenli olduğu belirtilmişse de, uzun süreli güvenilirlik ile ilgili oldukça az bilgiye sahibiz. Güvenilirlik açısından değerlendirildiğinde; insan gen tedavisine karşı çıkarılan en önemli argümanlardan biri, gen tedavi yapılan bireyde kontrolün dışında oluşabilecek bir genetik değişim ve daha kötüsü bu değişimin nesillere aktarılması olasılığıdır. Oysa, onaylanmış birçok tedavi yaklaşımında, yüksek oranda kullanılan kimyasalların da benzer genetik değişimlere yol açabileceği gerçeği göz ardı edilmektedir. Örneğin, birçok mutajenik ilaç, radyoterapi gibi tedavilerle benzer genetik değişimler olasıdır ve bu değişimlerin germ hattında olması sonucu diğer nesillere aktarımı da söz konusu olabilmektedir. Gen tedavi ürünlerinin bu etki mekanizmaları dolayısıyla; özellikle insan hastalıklarının tedavisiiçin kullanılacak ürünler ile ilgili, bilim camiasında birtakım etik endişeler bulunmaktadır. İlk insan gen tedavi klinik denemesinden önce, 1972 yılında Theodore Friedman; gelecekteki gen tedavi

tekniklerine, gelişimine ve klinik uygulamalarına ışık tutması amacıyla, tüm bilimsel etik kriterlerini kapsayan bir öneri sunmuştur. Öncül buluşların sahipleri Rogers ve Cline ise, gen tedavisinin insanların duygularını harekete geçiren bir olgu olduğunu belirtmiş ve eğer işler ters giderse neler yapılabilir sorusunun cevabını aramışlardır. Cline'in bu açıklamasıyla gen tedavisinin rasyonelliği ve etik durumu hakkında yoğun tartışmalar başlamıştır. Tüm bu tartışmalar ve endişeler insan gen tedavisini beklenenden çok daha kompleks bir tedavi yöntemi haline sokmuştur.

20.9 SONUÇ

Yıllar boyunca süre gelen çalışmalar ve beraberindeki tartışmalara rağmen, klinik veya preklinal deneyimlerde kullanılan gen tedavi protokolleri oldukça umut vaat eden sonuçlar doğurmaktadır. Bunlara verilebilecek en iyi örnekler, erişkinlerde hemofili B ve lipoprotein lipaz yetmezliğinin tedavisi için yapılan iki çalışmadır. Bununla birlikte her iki denemede de, vektör uygulamasına bağlı olarak oluşan immün yanıt nedeniyle, karaciğer ve kasta düzeltilmiş genleri içeren hücrelerin yıkımı gerçekleşmiş ve ne yazık ki geçici bir klinik yarar sağlanmıştır. Bu istenmeyen immün yanıtın kaçınmak için, immün sistem modülasyonu veya geçici süreyle immün baskılama gibi çözümler geliştirilmeye çalışılmıştır. Gen tedavisinin şiddetli endikasyonları olan bir hastalığa uygulanması hastalığın klinik belirtilerinin hafifletilmesi veya tamamen yok edilmesi olasılığına dair verilebilecek en iyi örnek; hemofili B ile ilgili yapılan çalışmadır. Bu çalışmada hastalara farklı dozlarda vektör uygulanmış ve immünsüpresan kullanılmamasına rağmen, 6 hastadan 4'ünde FIX profilaksisi bitmiş ve spontan kanamalar sona ermiştir. Diğer iki hastada profilaktik enjeksiyon sıklıkları azalmıştır. Yüksek doz vektör alan iki hastadan birinde AAV8 spesifik T hücreleriyle birlikte serum aminotransferaz seviyelerinde geçici bir artış gözlenmiştir. Diğer hastada ise karaciğer enzim seviyelerinde bir miktar artış olmuştur. Bu iki hastada da yapılan kısa süreli glukokortikoid tedavisi ile aminotransferaz seviyeleri normale düşmüş ve transgen ekspresyonunda kayıp gözlenmemiştir. Her ne kadar daha uzun süreli ve daha fazla sayıda hastada takibi gerektiren bir süreç olsa da, geçici süreli hepatik disfonksiyon riskine rağmen, bu yaklaşımla bir hastalığın şiddetli formundan daha hafif seyirli bir forma dönüştürülmesinin veya tamamen iyileştirilebilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Takashi ve Yamanaka, dört farklı tanskripsiyon faktörünün ektopik ekspresyonları ile somatik hücrelerin, pluripotent özellik kazanacak şekilde yeniden programlanabilir olduğunu keşfetmişlerdir. Bu çalışmada, gen tedavisinde kilometre taşı olarak nitelendirilecek gelişmelerden birisi olmuştur. Somatik hücrelerin yeniden programlanabilmesi, gen ve hücre tedavilerinde kullanılabilecek güçlü bir potansiyel araç olarak kabul edilmiş ve hastaya özgü tedavi geliştirilmesi için rejeneratif tıp alanında bir dönüm noktası olmuştur. Bu hücreler indüklenmiş kök hücreler (iPS) olarak tanımlanmış olup, morfolojik ve büyüme özellikleri açısından embriyonik kök hücrelere (ES) benzerler. Bu yaklaşım, gen tedavisi yaklaşımlarında klinik olarak uygulanabilir hale gelmesinden önce birtakım önemli sorunların çözülmesi gerektiği yeni bir araştırma alanı olarak değerlendirilmektedir. Araştırılması gereken konular arasında, yeniden programlanma etkinliği, gelişim potansiyeli ve üretilen iPS hücrelerinin kalitesi ve in vivo güvenilirlik profilleri gibi konular gelmektedir. İlk olarak retroviral vektör aracılı aktarımla geliştirilmiş bir teknik olsa da, güvenilirlik konusundaki endişeleri ortadan kaldırmak amacıyla genoma entegre olmayan vektörler kullanarak ve geçici ekspresyon sağlayarak transkripsiyon faktörlerinin istenenden uzun süreli ekspresyonunu engelleyerek insersiyonel mutagenез riskini ortadan kaldırmak gerekmektedir. Globalleşen dünyada, gen tedavisi söz konusu olduğunda insanların inanç ve endişelerine saygı duymak önemli bir gerekliliktir. Gen tedavisinin kabul edilebilir olması için şeffaflık gerekmektedir, bu doğrultuda yapılan çalışmaların sonucunda öğrenilen bilgiler ulaşılabilir olmalıdır. Sonuç olarak, gen tedavi çalışmaları yapılırken, terapötik ve bilimsel konularla birlikte, etik ve çevresel bir çok konuyu da kapsayan sorulara yanıt aramaya çalışmak gen tedavinin geleceği, uygulanabilirliği ve kabul edilebilirliği için izlenmesi gereken yol olmalıdır.

Teşekkür:

Bu yazının hazırlanmasında emeği geçen asistanlarım Mükerrrem Hale Taşyürek, Yunus Emre Ekşi ve Hazal Banu Olgun'a teşekkürlerimi sunarım. Proje desteği: TÜBİTAK 215S820

KAYNAKLAR

Aalbers CJ, Tak PP, Vervoordeldonk MJ, *Advancements in adenovirus-associated viral gene therapy approaches: exploring a new horizon. F1000 Med Rep*, 2011. 3: p. 17.

Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, et al., *Gene*

therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med*, 2009. 360(5): p. 447-58.

Alloway JL, Further Observations on the Use of Pneumococcus Extracts in Effecting Transformation of Type in Vitro. *J Exp Med*, 1933. 57(2): p. 265-78.

Alloway JL, The Transformation in Vitro of R Pneumococci into S Forms of Different Specific Types by the Use of Filtered Pneumococcus Extracts. *J Exp Med*, 1932. 55(1): p. 91-9.

Avery OT, Macleod CM, McCarty M, Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med*, 1944. 79(2): p. 137-58.

Beutler E, The Cline affair. *Mol Ther*, 2001. 4(5): p. 396-7.

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, et al., T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 1995. 270(5235): p. 475-80.

Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, Hinderer C, et al., Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2013. 24(2): p. 55-64.

Burnett JR, Hooper AJ, Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser(447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Mol Ther*, 2009. 11(6): p. 681-91.

Carpentier AC, Frisch F, Labbe SM, Gagnon R, et al., Effect of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. 97(5): p. 1635-44.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, et al., Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 2000. 288(5466): p. 669-72.

Dawson MH, Sia RH, In Vitro Transformation of Pneumococcal Types : I. A Technique for Inducing Transformation of Pneumococcal Types in Vitro. *J Exp Med*, 1931. 54(5): p. 681-99.

Dirice E, Sanlioglu AD, Kahraman S, Ozturk S, et al., Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Gene Ther*, 2009. 20(10): p. 1177-89.

Doerschug K, Sanlioglu S, Flaherty DM, Wilson RL, et al., First-generation adenovirus vectors shorten survival time in a murine model of sepsis. *J Immunol*, 2002. 169(11): p. 6539-45.

Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, Crawford JM, et al., Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther*, 2001. 8(17): p. 1343-6.

Duan D, Sharma P, Dudus L, Zhang Y, et al., Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression. *J Virol*, 1999. 73(1): p. 161-9.

Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med*, 2007. 9(10): p. 833-42.

European Association for Cardiovascular P, Rehabilitation, Reiner Z, Catapano AL, et al., ESC/EAS Guidelines for the management of

dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*, 2011. 32(14): p. 1769-818.

Fehse B, Roeder I, Insertional mutagenesis and clonal dominance: biological and statistical considerations. *Gene Ther*, 2008. 15(2): p. 143-53.

Ferreira V, Petry H, Salmon F, Immune Responses to AAV-Vectors, the Glybera Example from Bench to Bedside. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 82.

Ferreira V, Twisk J, Kwikkers K, Aronica E, et al., Immune responses to intramuscular administration of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) in a phase II clinical trial of lipoprotein lipase deficiency gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2014. 25(3): p. 180-8.

Friedmann T, Medical ethics. Principles for human gene therapy studies. *Science*, 2000. 287(5461): p. 2163-5.

Friedmann T, Stanfield Rogers: insights into virus vectors and failure of an early gene therapy model. *Mol Ther*, 2001. 4(4): p. 285-8.

Friedmann T, Roblin R, Gene therapy for human genetic disease? *Science*, 1972. 175(4025): p. 949-55.

Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, et al., Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2009. 85(8): p. 348-62.

Gaddy DF, Riedel MJ, Pejawar-Gaddy S, Kieffer TJ, et al., In vivo expression of HGF/NK1 and GLP-1 From dsAAV vectors enhances pancreatic ss-cell proliferation and improves pathology in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes*, 2010. 59(12): p. 3108-16.

Gaudet D, de Wal J, Tremblay K, Dery S, et al., Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Atheroscler Suppl*, 2010. 11(1): p. 55-60.

Gaudet D, Methot J, Dery S, Brisson D, et al., Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther*, 2013. 20(4): p. 361-9.

Gaudet D, Methot J, Kastelein J, Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Lipidol*, 2012. 23(4): p. 310-20.

Giri I, Danos O, Yaniv M, Genomic structure of the cottontail rabbit (Shope) papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(6): p. 1580-4.

Griffith F, The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*, 1928. 27(2): p. 113-59.

Guo J, Xin H, Chinese gene therapy. Splicing out the West? *Science*, 2006. 314(5803): p. 1232-5.

Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, et al., Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 2010. 363(4): p. 355-64.

Haddley K, Alipogene tiparvovec for the treatment of lipoprotein lipase deficiency. *Drugs Today (Barc)*, 2013. 49(3): p. 161-70.

Hedman M, Muona K, Hedman A, Kivela A, et al., Eight-year safety follow-up of coronary artery disease patients after local intracoronary VEGF gene transfer. *Gene Ther*, 2009. 16(5): p. 629-34.

- Immonen A, Vapalahti M, Tyynele K, Hurskainen H, et al., Ad-vHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther*, 2004. 10(5): p. 967-72.
- Kaeppel C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, et al., A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med*, 2013. 19(7): p. 889-91.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, et al., Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009. 4(6): p. 472-6.
- Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, et al., Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood*, 2011. 117(12): p. 3311-9.
- Marcaida MJ, Munoz IG, Blanco FJ, Prieto J, et al., Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(5): p. 727-48.
- Mercola KE, Bar-Eli M, Stang HD, Slamon DJ, et al., Insertion of new genetic information into bone marrow cells of mice: comparison of two selectable genes. *Ann N Y Acad Sci*, 1982. 397: p. 272-80.
- Mercola KE, Stang HD, Browne J, Salser W, et al., Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science*, 1980. 208(4447): p. 1033-5.
- Mingozzi F, Meulenberg JJ, Hui DJ, Basner-Tschakarjan E, et al., AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood*, 2009. 114(10): p. 2077-86.
- Muona K, Makinen K, Hedman M, Manninen H, et al., 10-year safety follow-up in patients with local VEGF gene transfer to ischemic lower limb. *Gene Ther*, 2012. 19(4): p. 392-5.
- Mussolino C, Cathomen T, TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr Opin Biotechnol*, 2012. 23(5): p. 644-50.
- Peng Z, Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*, 2005. 16(9): p. 1016-27.
- Puumalainen AM, Vapalahti M, Agrawal RS, Kossila M, et al., Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 1998. 9(12): p. 1769-74.
- Riedel MJ, Gaddy DF, Asadi A, Robbins PD, et al., DsAAV8-mediated expression of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Gene Ther*, 2010. 17(2): p. 171-80.
- Rip J, Nierman MC, Sierts JA, Petersen W, et al., Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: working toward clinical application. *Hum Gene Ther*, 2005. 16(11): p. 1276-86.
- Rip J, Sierts JA, Vaessen SF, Kastelein JJ, et al., Adeno-associated virus LPL(S447X) gene therapy in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*, 2007. 194(1): p. 55-61.
- Rip J, van Dijk KW, Sierts JA, Kastelein JJ, et al., AAV1-LPL(S447X) gene therapy reduces hypertriglyceridemia in apoE2 knock in mice. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1761(10): p. 1163-8.
- Rogers S, Lowenthal A, Terheggen HG, Columbo JP, Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *J Exp Med*, 1973. 137(4): p. 1091-6.
- Rogers S, Pfuderer P, Use of viruses as carriers of added genetic information. *Nature*, 1968. 219(5155): p. 749-51.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, et al., Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 1990. 323(9): p. 570-8.
- Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese M, Hwu P, et al., The development of gene therapy for the treatment of cancer. *Ann Surg*, 1993. 218(4): p. 455-63; discussion 463-4.
- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, et al., Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*, 1988. 319(25): p. 1676-80.
- Ross CJ, Liu G, Kuivenhoven JA, Twisk J, et al., Complete rescue of lipoprotein lipase-deficient mice by somatic gene transfer of the naturally occurring LPLS447X beneficial mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(10): p. 2143-50.
- Ross CJ, Twisk J, Bakker AC, Miao F, et al., Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation. *Hum Gene Ther*, 2006. 17(5): p. 487-99.
- Ross CJ, Twisk J, Meulenberg JM, Liu G, et al., Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL(S447X) beneficial mutation. *Hum Gene Ther*, 2004. 15(9): p. 906-19.
- Salmon F, Grosios K, Petry H, Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera(R)). *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2014. 7(1): p. 53-65.
- Sambrook J, Westphal H, Srinivasan PR, Dulbecco R, The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968. 60(4): p. 1288-95.
- Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, et al., Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 2000. 11(16): p. 2197-205.
- Sanlioglu A, Karacay B, Benson P, Engelhardt J, et al., Novel approaches to augment adeno-associated virus type-2 endocytosis and transduction. *Virus Res*, 2004. 104(1): p. 51-9.
- Sanlioglu AD, Griffith TS, Omer A, Dirice E, et al., Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: a gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes. *J Cell Biochem*, 2008. 104(3): p. 710-20.
- Sanlioglu S, Benson P, Engelhardt JF, Loss of ATM function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to UV irradiation. *Virology*, 2000. 268(1): p. 68-78.
- Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, et al., Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*, 2000. 74(19): p. 9184-96.

- Sanlioglu S, Duan D, Engelhardt JF, Two independent molecular pathways for recombinant adeno-associated virus genome conversion occur after UV-C and E4orf6 augmentation of transduction. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(4): p. 591-602.
- Sanlioglu S, Monick MM, Luleci G, Hunninghake GW, et al., Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2001. 1(2): p. 137-47.
- Scott LJ, Alipogene tiparvovec: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. *Drugs*, 2015. 75(2): p. 175-82.
- Sheridan C, Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol*, 2011. 29(2): p. 121-8.
- Stolberg SG, The biotech death of Jesse Gelsinger. *N Y Times Mag*, 1999: p. 136-140, 149-150.
- Stroes ES, Nierman MC, Meulenberg JJ, Franssen R, et al., Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(12): p. 2303-4.
- Szybalska EH, Szybalski W, Genetics of human cress line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1962. 48: p. 2026-34.
- Takahashi K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
- Tasyurek M, Altunbas H, Canatan H, Griffith T, et al., GLP-1-mediated gene therapy approaches for diabetes treatment. *Expert Rev Mol Med*, 2014. 16: p. e7.
- Tatum EL, Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med*, 1966. 10(1): p. 19-32.
- Tatum EL, Lederberg J, Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1947. 53(6): p. 673-84.
- Temin HM, Mixed infection with two types of Rous sarcoma virus. *Virology*, 1961. 13: p. 158-63.
- Terheggen HG, Lowenthal A, Lavinha F, Colombo JP, et al., Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *Z Kinderheilkd*, 1975. 119(1): p. 1-3.
- Terzioglu E, Bisgin A, Sanlioglu A, Ulker M, et al., Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synovocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. 46(5): p. 783-9.
- Tong GX, Geng QQ, Chai J, Cheng J, et al., Association between pancreatitis and subsequent risk of pancreatic cancer: a systematic review of epidemiological studies. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. 15(12): p. 5029-34.
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, et al., Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010. 11(9): p. 636-46.
- Vachani A, Moon E, Wakeam E, Albelda SM, Gene therapy for mesothelioma and lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. 42(4): p. 385-93.
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, et al., Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(5): p. 618-30.
- Wierzbicki AS, Hardman TC, Viljoen A, New lipid-lowering drugs: an update. *Int J Clin Pract*, 2012. 66(3): p. 270-80.
- Wilson JM, Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther*, 2005. 16(9): p. 1014-5.
- Wirth T, Parker N, Yla-Herttuala S, History of gene therapy. *Gene*, 2013. 525(2): p. 162-9.
- Wirth T, Samaranayake H, Pikkariainen J, Maatta AM, et al., Clinical trials for glioblastoma multiforme using adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther*, 2009. 11(5): p. 485-92.
- Xin H, Chinese gene therapy. Gendicine's efficacy: hard to translate. *Science*, 2006. 314(5803): p. 1233.
- Yla-Herttuala S, Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther*, 2012. 20(10): p. 1831-2.
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, et al., Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009. 324(5928): p. 797-801.
- Zhou W, Freed CR, Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2009. 27(11): p. 2667-74.
- Zinder ND, Lederberg J, Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol*, 1952. 64(5): p. 679-99.

