



Gen Tedavisinin Dünü, Bugünü ve Yarını

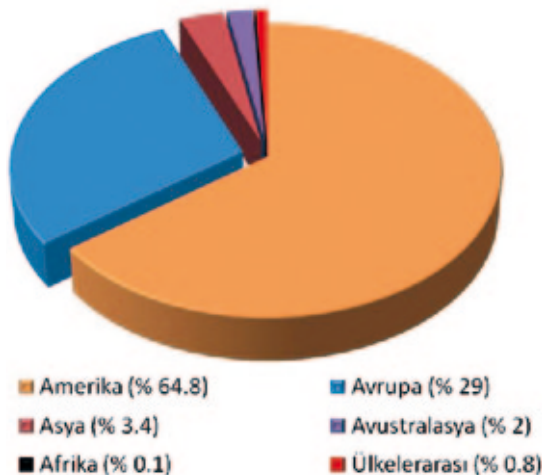
Tıbbi genetiğin uygulama alanı olan gen tedavisi, genetik geçiş gösteren kalıtsal (kistik fibroz, SCID vb) veya sonradan edinilebilen (kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, aşırı şişmanlık vb) insan hastalıklarını tedavi etmek maksadıyla, genlerin, küçük DNA ve RNA moleküllerinin insan hücrelerine, organ ve dokularına transfer işlemini içeren bir tedavi yöntemidir. Çoğu zaman genetik insan hastalıklarının tedavisi, örneğin bağışıklık yetmezliği hastalığında olduğu gibi, genlerle birlikte hücrelerin naklini gerektirir. Bu nedenle gen ve hücre tedavi yöntemleri birbirleriyle örtüşen veya birbirlerini tamamlayan iki tedavi yöntemi olarak kabul edilir. Bu alanda yapılan çalışmalar, uluslararası düzeyde Avrupa Gen ve Hücre Tedavisi Derneği ve Amerikan Gen ve Hücre Tedavisi Derneği adlı iki organizasyon tarafından koordine edilmektedir. İnsan Genom Projesi'nin taslağının 22 Haziran 2000'de açıklanmasıyla birlikte bir insanda yaklaşık 20.000 ile 25.000 civarında gen olduğu açığa çıktı. Bu genlerin pek çoğunun işlevini henüz bilmesek de, genetik mekanizmaları kısmen de olsa açığa çıkarılmış insan hastalıklarını gen transferi yoluyla tedavi etmeye çalışan klinik çalışmaların tüm hızıyla devam ettiğini belirtmemizde yarar var. Bu konuda çalışan uzmanlar olarak bu yazıda klinik gen tedavisi uygulamalarının geçmişi, bugününü ve yarınını ele alıyoruz.

İnsanda gen tedavisiyle ilgili ilk klinik deneme 1990'da, camiamızda gen tedavisinin babası olarak bilinen ve pediatrist genetikçi olan W. French Anderson tarafından yapıldı. Bu denemede, adenoazin deaminaz yetmezliğine (ADA) bağlı bağışıklık yetmezliği hastalığına (SCID) yakalanmış çocuklara doğru ADA proteini kodlayan gen, retrovirüs aracılığıyla önce T hücrelerine ve ardından vücutlarına enjekte edildi. Bu çalışma, bağışıklık yetmezliği olan hastalarda gen tedavisi uygulamasının güvenilir olduğunu kanıtlayan ilk çalışmadır. O günden bu güne kadar resmi olarak onaylandığı bildirilen 1537 klinik gen tedavisi denemesi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4'te gösterildiği gibi 1990'dan 1999'a kadar klinik gen tedavisi denemelerinin sayısında hızlı bir artış olduğu göze çarpıyor. Malesef, 1999 ve 2002 yıllarında gerçekleştirilen iki klinik gen tedavisi denemesinde hastalarda beklenmeyen yan etkilerin görülmesi üzerine klinik gen tedavisi denemelerinde sayıca artış durdu ve gen tedavisi klinik deneme sayısı açısından durağan bir döneme girdi. 1999'da Philadelphia'da yaşanan ve gen tedavisi camiasında yarattığı çarpıcı etki nedeniyle tarihe geçen deneyimi burada hatırlamamızda yarar var. Dünyaca ünlü Pennsylvania Üniversitesi İnsan Gen Tedavi Enstitüsü'nde 1990'ların ikinci yarısında James M. Wilson başkanlığında, karaciğeri tutan ve kandaki amonyumun temizlenmesini engelleyen tehlikeli bir genetik hastalık olan ornitin transkarbomilaz (OTC) yetmezliğine karşı, içerisinde OTC geni barındıran gen nakil araçları (vektörleri) kullanılarak (adenovirüs) yapılan gen tedavisinde klinik denemeler başarıyla yürüyordu. En yüksek dozda adenovirüs verilen hasta grubunda yer alan sadece bir hastada (Jesse Gelsin-



Michael Blaese (solda), French Anderson (ortada) ve Kenneth Culver (sağda) 1990 Eylül'ünde yaptıkları bir basın toplantısında, insanlarda uygulanan ilk gen tedavisi denemesini tüm dünyaya duyururken.

ger), uygulanan tedavi yönteminin daha önce saptanamamış bir yan etkisi gözlemlendi. Aslında adenovirüs karaciğere en iyi ve en etkin gen transferi yapabilen vektör olmasına karşın bu hastada oluşturduğu yan etki, viral vektörlerin hastalara kan yoluyla yüksek dozda verilirken nadir de olsa öldürücü sonuçlar doğurabilen reaksiyonlar oluşturabileceğini gösterdi. Bu vaka gen tedavisi denemelerinde kaybedilen ilk hasta olarak tarihe geçti. Dr. Alain Fischer ve arkadaşlarının X kromozom bağımlı bağışıklık yetmezlik sendromu (X-SCID) olarak bilinen genetik bir hastalığa karşı uygulamış oldukları klinik gen tedavisi denemelerinde, on tane çocuk hastanın dördünde iyileştirici gen taşıyan RNA genomlu virüsün (retrovirüsün) hasta DNA'sında uygun gen bölgelerine girmesiyle kan kanseri (lösemi) gelişti. X-SCID tedavi edilmediği takdirde (uygun kemik iliği nakli yapılmaması durumunda) bağışıklık yetersizliği nedeniyle hastalarda oldukça öldürücü seyreden (genç yaşta ölüme yol açan) genetik bir hastalıktır. 2000'li yılların başlarında gen tedavisi denemelerinde beklenmeyen yan etkilerin gözlemlenmesi ve arzulanan tedavi etkinliğinin kısıtlı olmasından dolayı gen tedavisi çalışmaları üzerinde baskılar yoğunlaşmaya başladı. Basında çıkan olumsuz haberler ve denetim komisyonlarının baskısı yıllık onaylanan klinik gen tedavisi denemelerinin sayıca azalmasına yol açtı. 2003'te sadece 85 tane yeni klinik gen tedavisi çalışmasının onaylanması (1998'den bu yana en düşük rakam) gen tedavisi camiasında o zamanlarda yaşanan üzücü olayların kaçınılmaz bir sonucu olarak değerlendirildi. Ancak son yıllarda kat edilen yol ve klinik denemelerden elde edilen başarılar sayesinde 2003 sonrasında yıllık onaylanan klinik gen tedavisi denemelerinin sayısında tekrar bir artış gerçekleşti.

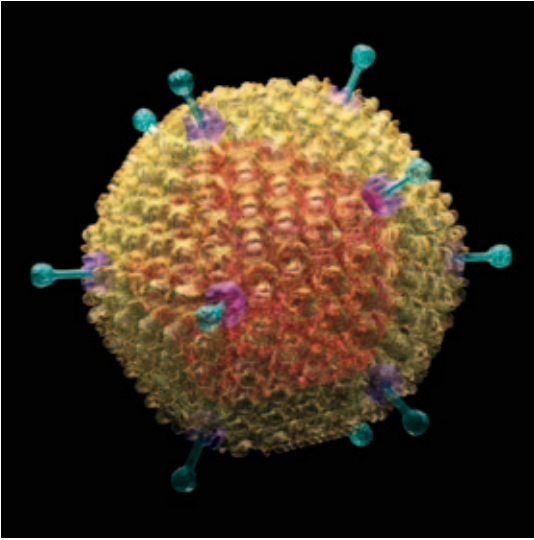


Gen Tedavisinde Klinik Denemelerin Gerçekleştirildiği Ülkeler

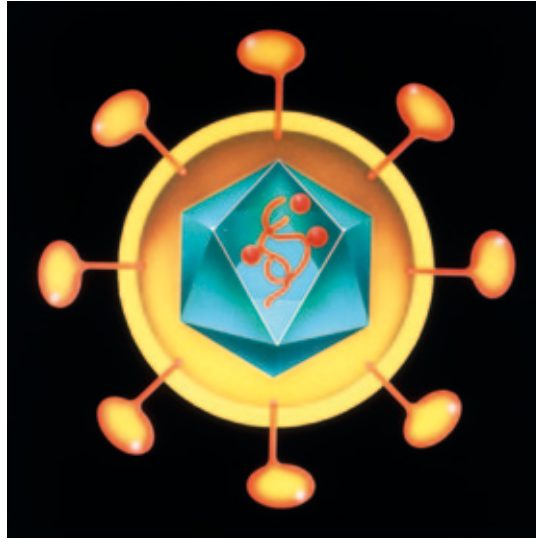
Gen tedavisinde klinik denemeler halen yedi kıtanın beşinde devam etmekte. 1537 onaylanmış klinik gen tedavisi denemesinin kıtalara göre dağılımına baktığımızda, bu denemelerin %95'inin Amerika ve Avrupa'da yapıldığını görüyoruz. Bunları sırasıyla Asya, Avustralasya ve Afrika kıtası izliyor. Ayrıca 13 tane klinik gen tedavisi denemesi de uluslararası katılımlı-çok merkezli çalışmalar olarak sürüyor. Klinik gen tedavisi denemelerinin ülkelere göre dağılımı incelendiğinde ise 29 ülkede klinik gen tedavisi denemesinin yapıldığını görüyoruz. Bu ülkeler arasında Amerika Birleşik Devletleri başı çekmekle birlikte, Kanada 20 adet klinik gen tedavisi denemesiyle dokuzuncu sırayı alıyor. Aynı kıta üzerinde bulunan Meksika ise bir klinik denemeyle klinik gen tedavisi denemesi gerçekleştirilen ülkeler arasına son sıralarda olsa da girmeyi başardı. Avrupada, Birleşik Krallık ikinci sırada gelirken, üçüncü sırada Almanya, dördüncü sırada İsviçre ve beşinci sırada Fransa bulunuyor. Son yıllarda Polonya, Çek Cumhuriyeti gibi Doğu Avrupa Ülkeleri de klinik gen tedavisi denemelerine katıldı. Ancak, klinik gen tedavisi veritabanına kaydedilen sayıların gerçek rakamların çok altında olabileceğini unutmamamız gerek. Örneğin, Rusya'da yalnızca bir tane resmi olarak onaylanmış çalışma olduğu bildirilmesine karşın gerçekte çok daha fazla sayıda klinik gen tedavisi denemesinin yapıldığını biliyoruz. Kanadada 50'den fazla çalışma olmasına karşın bunlardan sadece 20 tanesi klinik gen tedavisi denemeleriyle ilgili veritabanına kaydedilmiş bulunuyor.

Gen Tedavisinde Hedeflenen Hastalıklar

Gen tedavisi başlangıçta kalıtsal tek gen hastalıklarının iyileştirilmesinin amaçlandığı bir yöntem olarak geliştirildi. Ancak en yaygın ve öldürücü hastalıkların başında gelen kanser hastalığının da birden fazla genin işe karıştığı bir hastalık (multigenetik) olduğu anlaşıldığından, günümüzde klinik gen tedavisi çalışmalarının çoğunluğunun kanser hastalığını tedavi etmeye yönelik olduğu görülüyor. Kalıtsal tek gen hastalıklarını tedavi etmeye yönelik yaklaşımlar 2004'e kadar ikinci sıradayken, 2004'ten sonra ikinci sırayı kalp ve damar hastalıklarına karşı geliştirilen yöntemler aldı. Sonuçta şu an için kalıtsal tek gen hastalıklarını tedavi etmeye yönelik yak-



Adenovirüsün bilgisayarda çizilmiş görüntüsü



Bir retrovirüsün şematik görüntüsü

laşımın şimdiye kadar yapılan klinik gen tedavisi çalışmalarında en başarılı sonuçları verse de, toplam klinik çalışmaların sadece % 8,1'ini oluşturarak üçüncü sırada yer alıyor. Kanser gen tedavisinde kan kanserinin (hematolojik malignansiler) yanında akciğer, prostat, meme ve cilt kanserleri gibi çok değişik kanser tipleri hedefleniyor. Bu bağlamda kanser hücrelerinin içine virüs aracılı tümör baskılayıcı gen transfer etmek, tümörü gen transferiyle ölmek üzere programlamak, bağışıklık sistemimizi tümör aşılılarıyla tetiklemek gibi stratejilerin oldukça rağbet gören gen tedavisi yaklaşımları olduğunu belirtmeliyiz. Kardiyovasküler gen tedavisinin temel hedefi damarlaşmayı (anjioenez), kalp kasının rejenerasyonu ve tamarini sağlamak, damar nakli sonrası (anjyoplasti) tıkanmayı önlemektir. Bu nedenle kansız dokulara kan akımını sağlamak kardiyovasküler gen tedavisinin temel hedefidir. Bu amaçla fibroblast büyüme hormonu (FGF) ve vasküler endotelial büyüme hormonu (VEGF) kodlayan genler klinik denemelerde başarıyla kullanılıyor. Kalıtsal tek gen hastalıklarının tedavisinde temel amaç, genin normal kopyasını hücrelere vererek bozuk kopyasıyla değiştirilmesini sağlamaktır. Kalıtsal tek gen hastalığına karşı geliştirilen gen tedavisi yöntemlerinin (toplam 124 tane) üçte biri akciğer, pankreas, barsak ve ter bezlerini etkileyen bir hastalık olarak bilinen kistik fibrozu tedavi etmeye yöneliktir. Kistik fibroz, ABD ve Avrupa'da en yaygın görülen genetik bozukluk olup bu hastaların ortalama yaşam süresi 40 yılın altındadır. Şiddetli kombine bağışıklık yetmezlik sendromu (SCID) gibi tek gen hastalıklarına karşı da klinik gen tedavisi yöntemleri başarıyla geliştirilmektedir. Bulaşıcı (enfeksiyöz) hastalıklara karşı (HIV, tetanoz, CMV vb) geliştirilen

gen tedavisi yöntemleri, tedavi edilmeye çalışılan hastalıklar kategorisinde % 7,9 ile dördüncü sırada gelir. Multiple sklerozis, Myastina Gravis, Parkinson, Alzheimer gibi sinirsel hastalıklar da gen tedavisi yöntemleriyle iyileştirilmeye çalışılıyor. Retinitis pigmentosa, Glokom, yaşa bağlı maküler dejenerasyon gibi göz hastalıklarının yanı sıra, iltihaplı eklem yangısı gibi romatizmal hastalıkların da klinik gen tedavisi çalışmalarının kapsamında olduğunu belirtmekte yarar var.

Klinik Gen Tedavisi Denemelerinde Kullanılan Vektörler

Klinik Gen tedavisi denemelerinde kullanılan vektörlerin (gen nakil araçları) % 75'i viral vektördür. Bunlar arasında adenovirüs birinci sırada, retrovirüs ikinci sırada gelir. Bunları sırasıyla vaksinya, paks virüsü, adeno asosiy virüs ve herpes simpleks virüsü takip eder. Retrovirüs aslında klinik gen tedavisi denemelerinde ilk test edilen vektördür ve sadece bölünen hücreleri enfekte etmeleri ile uzun süreli gen transferi sağlamaları nedeniyle son yıllara kadar (2004) klinik denemelerde en çok tercih edilen vektördü. Fransız bir ekip tarafından X-SCID hastalığına karşı geliştirilen gen tedavisi denemelerinde kullanılan retrovirüs (hastada kanseri tetikleme gibi) çok ciddi yan etkiler doğurduğu için günümüzde bu vektörün kullanımı artık tercih edilmiyor. Retrovirüsü kullanarak çalışmalarına devam etmek isteyen araştırmacılar da klasik retrovirüs yerine hastada kendi kendini etkisiz kılabilen gelişmiş retroviral vektörü (SIN) kullanmayı tercih ediyorlar. Kalıtsal hastalıklar için olmasa da kanser gen tedavisi için en uygun vektör aslında



Prof. Dr. Salih Şanlıoğlu Yüksek lisans (1990-1992) ve doktora eğitimini (1992-1996) Ohio State Üniversitesi'nde moleküler genetik alanında yapmıştır. Gen tedavisi ihtisas eğitimini Dr. James M. Wilson'ın başkanlığını yaptığı Pennsylvania Üniversitesi İnsan Gen Tedavi Enstitüsü'nde başlayıp (1996) Iowa Üniversitesi Gen Tedavi Merkezi'nde tamamlamıştır (2002). Sonrasında Türkiye'ye dönerek Antalya'da, Akdeniz Üniversitesi'nde Türkiye'nin ilk gen tedavi ünitesinin kuruluşunu gerçekleştirmiştir. Kendisi halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik anabilim dalında çalışmaktadır.



adenovirüstür. Geçici gen sentezi sağlaması, girdiği hücreleri bağışıklık sistemimize tanıtmayı, bölünmeyen hücreleri enfekte etmesi, yüksek dozda kolayca üretilebilmesi gibi özellikler adenovirüsü kanser gen tedavisinde en çok tercih edilen vektör haline getirdi. Ancak adenovirüs sistemik olarak bağışıklık (immun) reaksiyonuna yol açabileceğinden bu virüsün yüksek dozda, kan yoluyla sistemik olarak hastalara verilmesi doğru değildir. Bunun yanında viral vektörlerin klinik gen tedavisi denemelerinde sorun yaratabileceğine inanan araştırmacılar, iyileştirici proteini kodlayan çıplak DNA'yı ya direkt olarak ya da lipid kompleksi içerisinde (lipofeksiyon) hastalara vermeyi tercih edebilirler.

İnsanlara Aktarılan Genler

Klinik gen tedavisi denemelerinde 200'den fazla birbirinden farklı gen, yukarıda bahsedilen yöntemlerle (viral yöntemler ve viral olmayan yöntemler) insanlara aktarılır. En yaygın ve öldürücü hastalık kanser olduğuna göre klinik gen tedavisi denemelerinde insanlara aktarılan genlerin çoğunlukla kanser hastalığını tedavi etmeye yönelik genler olduğunu söyleyebiliriz. Bu bağlamda bağışıklık sistemini tetikleyici tümör antijeni kodlayan genler, sitokin genleri, tümör baskılayıcı genler, kanser hücrelerini intihar etmeye iten genler klinik gen tedavisi dene-

melerinde tercih edilen genlerin başında gelir. Üreme faktörü kodlayan genlerin hemen hemen tamamı kalp ve damar hastalıklarını tedavi etmeye yöneliktir. Kalıtsal tek gen hastalıklarına karşı kullanılan genler de (yetmezlik genleri) tüm denemelerde kullanılan genlerdendir.

Klinik Gen Tedavisi Denemelerinin Son Durumu

Gen tedavisi ilaçlarının klinik denemelerini genel olarak dört safhaya (faza) ayırabiliriz. Faz denemelerinin başlangıcından (Faz I) sonuna kadar (Faz III) tamamlanması, genelde yıllarca süren sabırlı bir çalışmayı gerektirir. Yeni bir ilacın insanlarda rutin kullanımı bu ilacın ancak Faz I, II ve III safhalarını geçtikten sonra ulusal denetleme komitesi tarafından onaylanmasıyla mümkündür. Faz IV aşında yapılmaya zorunluluğu olmayan, sadece satışı onaylanan ilacın uzun süreli güvenlik taramasını içeren klinik bir çalışmadır. Bunların yanında, gerekliliği tartışma konusu olan, ilacın insanlara uygulanıp uygulanmamasına karar verilen Faz 0 çalışmasının olabileceğini de bilmek gerekir. Faz I denemesi genelde küçük bir grup üzerinde gerçekleştirilen (10-20), ilacın güvenirliliği ve tolere edilebilirliği hakkında bilgi veren bir ilaç doz çalışmasıdır. İlacın iyileştirici etkinliği ve daha geniş hasta popülasyonu üzerindeki etkileri (20-300) ancak Faz II çalışmasında ölçülebilir. Faz III çalışması ise çok merkezli plasebo kontrollü olarak yapılan daha geniş insan kitlesinde ilacın iyileştirici etkinliğini belirlemeye yönelik (300-3000) bir çalışmadır. Faz III safhasında olan bir ilaç için hasta yararına olmak kaydıyla deneme bitmeden ulusal denetleyici kurumlara (Amerika'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi - FDA, Avrupa'da Avrupa İlaç Ajansı - EMA) onay için başvuru yapılabilir. Klinik gen tedavisi denemelerine kabul edilen hastaların genelde geleneksel tedavi yöntemleriyle tedavi edilememiş ileri evredeki hastalar olduğunu unutmamak gerekir. Klinik gen tedavisi denemelerinin son durumuna gelince, klinik gen tedavisi denemelerinin çoğunluğu halen Faz I ve Faz I/II safhasındadır. Bu rakam da gerçekleştirilen tüm klinik gen tedavisi denemelerinin % 70'ine karşılık gelir. Klinik gen tedavisi denemelerinin % 16,5'i Faz II, % 0,8'i Faz II/III safhasındadır. Faz III safhasında olan klinik gen tedavisi denemelerinin oranı ise yalnızca % 3,4'tür. Bu nedenle geleneksel yöntemlerle tedavi edilememiş çaresiz hastaların durumu düşünülerek klinik gen tedavisi denemelerine bir şekilde hız verip onları sonuçlandırmak gerekmektedir.

Sonuç

1990'lı yılların sonlarında klinik gen tedavisi deneme sonuçlarının beklentileri karşılayamaması, gen tedavisi alanındaki çalışmaların ve araştırmacıların gereğinden fazla eleştirilmesine yol açtı. Oysa klinik gen tedavisi denemelerine kabul edilen hastaların, genel olarak daha önce tedavi görmüş, ancak konvansiyonel tedavi yöntemlerinin (kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi) başarısız sonuçlandığı ve rahatsızlığı ileri evredeki hastalar olduğunu unutmamamız gerekir. 1999'da Philadelphia'da yaşanan OTC vakası ve Dr. Alain Fisher'in yürütücülüğünü yaptığı X-SCID denemelerinde dört hastada istenmeyen yan etkilerin gözlemlenmesi diğer klinik denemelerden elde edilen başarıları gölgelememeli. Gerçekten Jesse Gelsinger'in ölümüne yol açan yöntem (hepatik arter içerisine adenovirüs aracılı OTC geni transferi), daha önce 17 hastada başarıyla uygulandı. Bir Fransız ekibi tarafından yürütülen X-SCID denemelerinde dört hastada gözlemlenen kan kanseri vakasından üç tanesi ek kemoterapiyle tedavi edildi ve bu hastalar kendilerine uygulanmış olan gen tedavisi sayesinde hayatta kalmayı başardılar. İşin ilginç tarafı, Adrian J. Thrasher ve arkadaşları tarafından yürütülen X-SCID klinik denemelerinde retrovirüslere bağlı benzer bir etki gözlemlenmemekle birlikte şimdiye kadar 20'den fazla çocuk bu yöntemle başarılı bir şekilde tedavi edildi. Avustralya'da yapılan bir diğer X-SCID klinik çalışmasında da herhangi bir yan etki saptanmadı. Elde edilen olumsuz deneyimler aslında daha dikkatli viral vektör kullanılmasını ve daha güvenli yeni gen transfer yöntemlerinin geliştirilmesini sağladı. Dr. Roncarolo ve ekibinin şiddet-



Dr. Kohn, SCID olarak bilinen genetik hastalığa karşı gen tedavisi uyguladığı bebekte steril odada.

li kombine bağışıklık yetmezlik sendromlu (ADA-SCID) 10 hastada gerçekleştirmiş olduğu retrovirüs aracılı ADA gen transferinin uzun süreli takibi sonucunda (2-8 yıl; ortalama 4 yıl) bu yöntemin X-SCID denemelerinde olduğu gibi herhangi bir yan etkisinin olmadığı, tersine hastalarda oldukça güvenilir ve yararlı bir tedavi yöntemi olduğu kanıtlandı. Doğuştan körlükte bile gen tedavisinin güvenli ve etkin bir tedavi yöntemi olabileceği hem Pennsylvania Üniversitesi Çocuk Hastanesi araştırmacıları tarafından hem de İngiltere'de Londra Üniversitesi araştırmacılarınınca ispatlandı. Çinliler tarafından kanser gen tedavisinde etkin olduğu ileri sürülen dünyanın ilk ticari gen tedavisi ilacı Gendisın, sonuçta Çin'de piyasaya sürülmüş bulunuyor. Son gelişmeler ışığında gen tedavisinin artık başlangıçta kendisinden beklenileni vermeye başladığını rahatlıkla söyleyebiliriz. Bunun yanında, gen tedavisinin pek çok genetik hastalıkta halen tek çözüm yolu olduğunu, uygulamanın rutin hale dönüştürülebilmesi için daha çok çalışma yapmamız gerektiğini hiçbir zaman unutmamalıyız.

Teşekkür: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Gen Tedavi Ünitesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ahter D. Şanlıoğlu'na, Dr. Burçak Yoldaş, Dr. Atıl Bişgin, Çiğdem Aydın, Sevim Kahraman, Fatma Zehra Hapil ve Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim elemanlarından Dr. Ercüment Dirice'ye bu bilgilerin elde edilmesi ve hazırlanması esnasında göstermiş oldukları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Edelstein, M.L., Abedi, M. R. ve J. Wixon, "Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update," *The Journal of gene medicine* 9: 10 (2007): 833-842.
Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E. ve diğerleri, "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1," *The Journal of clinical investigation* 118: 9 (2008): 3132-3142.
Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L. ve diğerleri, "Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency," *The New England journal of medicine* 360: 5 (2009): 447-458.

- Bainbridge, J. W., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K. ve diğerleri, "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis," *The New England journal of medicine* 358: 21 (2008): 2231-2239.
Peng, Z., "Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers," *Human gene therapy* 16: 9 (2005): 1016-1027.



Gendisın'ın ürettiği NBS celligen plus bioreaktörü