

# Gen Tedavisinde Kullanılan Gen Transfer Sistemleri

GENE DELIVERY SYSTEMS FOR GENE THERAPY

Meral ÖZGÜÇ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

Gen tedavisi hücrelere tedavi amaçlı nükleik asitlerin aktarımı olarak tanımlanmaktadır. Bu tedavi yönteminin başarıya ulaşması için hücrelere yüksek verimlilikte aktarım yapabilmek, aktarılan genlerin hücre içinde kontrollü ve uzun süreli ekspresyonlarını sağlamak gerekmektedir. Bugün için gen tedavisi deneysel bir model olarak kabul edilmekle birlikte 500'den fazla klinik protokol uygulanmıştır. Gen aktarımı için viral ve non-viral vektör sistemleri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Gen tedavisi, viral vektörler, non-viral vektörler

## SUMMARY

Gene therapy can be defined as delivery of nucleic acids into cells with the aim of correction of disease. For successful therapy, conditions for the efficient transfer of foreign genes, their regulation and stable expression within the cells must be met. Even though gene therapy is still in experimental stages there are over 500 clinical protocols. Much research is being done on viral and non-viral vectors used as delivery systems and their efficiency is being upgraded with many laboratory protocols.

**Key words:** Gene therapy, viral vectors, non-viral vectors

Meral ÖZGÜÇ

Hacettepe Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji  
Anabilim Dalı  
06100, Sıhıhye, ANKARA  
e-mail: mozguc@gen.hun.edu.tr

Gen tedavisi en temel olarak "nükleik asitlerin somatik hücrelere tedavi amaçlı aktarımı" olarak tanımlanır. Bu tedavi yöntemi, genetik hataları düzeltmeyi veya tedavi edici etkisi olan gen ürünlerinin uygun hücrelerde ekspresyonunu sağlamayı amaçlar.

Gen tedavisi yöntemlerinin ilk klinik denemeleri için izin 1990 yılında Adenozin Deaminaz (ADA) eksikliği için ABD'de verilmiştir (1). Bu tarihten itibaren kanser ve kalıtsal hastalıklar için 300'ün üzerinde faz I ve faz II klinik deneme protokolü onaylanmış ve uygulamaya geçilmiştir (2,3). Bu klinik denemelerin başlamasına rağmen gen tedavisi halen deneysel bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Başarılı bir tedavi için aşağıda sıralanan basamakların yerine getirilmesi gerekmektedir:

a) Hastalığın patofizyolosinden sorumlu olan genin

izolasyonu ve karakterizasyonu,

- Bu genin uygun aktarım sistemleri (delivery systems) ile hücrelere verilmesi,
- Klinik öncesi çalışmalar ile gen aktarım modelinin verimi ve güvenilirliğinin tespit edilmesi
- Klinik fazlarda kullanılacak olan vektör, hücre vb. gibi araçların uygun koşullarda ve geniş ölçekli olarak üretilmesi.

## GEN AKTARIM VEKTÖRLERİ

Gen tedavisinin en kritik basamağı genleri uygun hücrelere aktaracak ve burada kontrollü bir şekilde ekspresyonlarını sağlayacak vektörlerin geliştirilmesidir.

Bugün için kullanılan vektör sistemleri:

- Viral
- Non-viral olarak tanımlanabilir.

## VİRAL VEKTÖRLER

Retrovirus, Adenovirus, Adeno-Assosiyasyon Virüsü (AAV), Lentivirus, Herpes Simplex Virus (HSV) en sık olarak kullanılan vektör sistemleridir. Viral vektör sistemlerinin başarılı olması için transdüksiyon verimliliklerinin yüksek olması, üretim ve pürifikasyon yöntemlerinin mükemmelleştirilmesi, hastalarda toksik etki yapmaması, immünojenik cevabı uyarılmaması gibi şartların yerine getirilmesi gerekmektedir.

### Retroviral ve Lentiviral Vektörler:

Retroviruslar zarflı tek iplikli RNA viruslarıdır. Viral RNA revers transkriptaz ile çift iplikli DNA ya dönüştürülür ve bu proviral form çekirdeğe taşınarak entegraz enzimi aracılığı ile hücre kromozomuna entegre olur (4). Retrovirusların aktif olarak bölünen hücelere gereksinim duyması bazı durumlarda bir dezavantaj olurken örneğin kanser tedavisinde bölünen hücrelerin transdüksiyonu selektif bir avantaj sağlamaktadır (5).

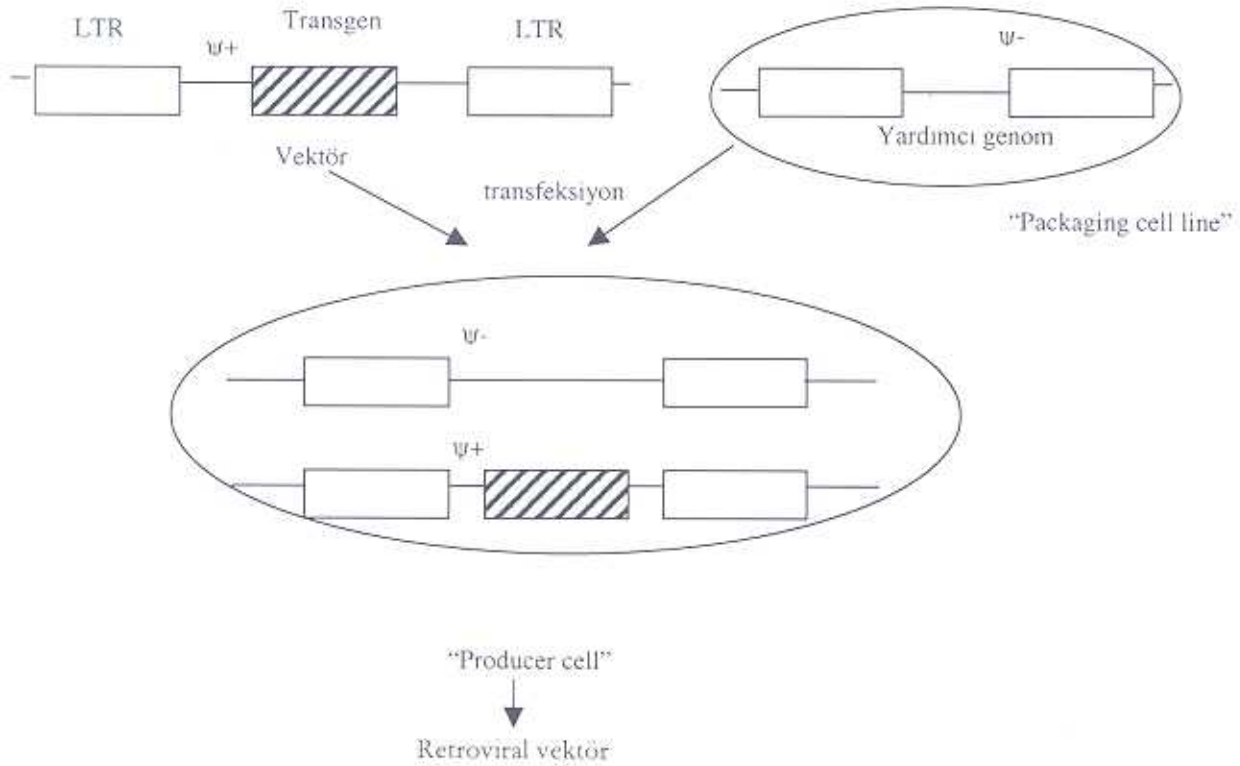
Bugün kullanılan retroviral vektörler Moloney fare

lösemi virüsü (MLV)'nden köken almıştır. 10 kb uzunluğundaki viral genom;

- LTR (long terminal repeats)
- Psi( $\Psi$ ) - viral genomun paketlenmesi için gerekli bölge
- gag, pol, env yapısal, enzimatik ve zarf proteinini kodlayan bölgelerden oluşur.

Viral vektör genomları sadece LTR ve Psi bölgelerini taşır ve enfeksiyon kapasitesinden yoksundur.

Transgen (tedavi amaçlı gen) taşıyan retroviral vektörler, Psi dizisi delete edilmiş retroviral genom taşıyan fare fibroblast hatlarına (packaging cell line) transfekte edilerek, bu hücre hatlarının viral partikül üretir hale (producer cell line) gelmesi sağlanır. Hedef hücre viral partikül üreten hücre veya hücreden arı süpernatant ile kültüre edilerek genin hedef hücreye transdüksiyonu sağlanmaktadır.



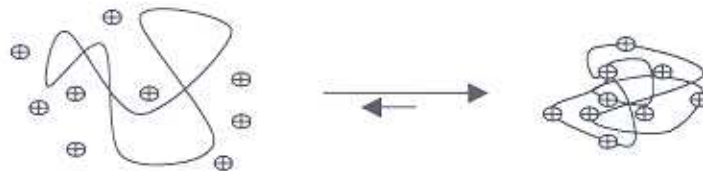
Şekil 1. Retroviral vektör üretilmesi (6)

Klinik denemelerin %50'sine yakın bir oranda retroviruslar kullanılmakla birlikte bu vektör sistemlerinin bazı dezavantajları gözönünde tutulmalıdır. Viral genomun kromozoma entegrasyonu mutageneze yol açabilir, virus genomu homolog rekombinasyon ile replikasyon kompetan forma dönebilir, endojen retroviruslarla rekombine olma potansiyeli vardır. Buna rağmen düşük toksik etkileri, çok çeşitli hücre tipleri için tropik olmaları, yaklaşık 10kb kadar taşıma kapasiteleri birer avantaj olarak görülmektedir (7).

Lentiviral vektörler, HIV-1 veya FIV'den köken alırlar (8,9). En büyük avantajları bölünmeyen hücreleri de enfekte edebilmeleridir. Kromozoma entegre oldukları için kalıcı ekspresyon sağlarlar. Retrovirusların tüm dezavantajları lentiviruslar için de geçerlidir, ayrıca HIV-1'e serokonversiyon problemi klinik deneylerde ciddi bir sorundur.

#### Adenoviral Vektörler:

Adenoviruslar çift iplikli DNA viruslarıdır. Hedef hücre genomuna entegre olma özelliği taşımazlar, ekstrakromozomal olarak çoğaldıkları için uzun süreli ekspresyon sağlayamazlar. Bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmeleri ve 7-8 kb DNA taşıma kapasitelerinin olması bu vektörlerin avantajlarıdır. Ancak hem toksik hem de enflamatuvar cevaba yol açmaktadırlar. Uzun süreli ekspresyon sağlayamadıkları için tekrarlanarak uygulanmaları gerekmektedir, bu da immün cevabı uyarak etkinliği kısıtlamaktadır (10). Viral genomda E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> (erken genler, E<sub>1</sub> enfeksiyondan sorumlu) gen delesyonları ile oluşturulmuş adenoviral vektörler artık yerini "gutless", "high-capacity (HcAd)" gibi tanımlanan yeni vektör sistemlerine bırakmaktadır (konsensus A tekrarları arasında AII-AV'te 91 bp delesyon oluşturulmuştur) (11,12). HcAd vektörlerinin en önemli özelliği ~30 kb DNA taşıma kapasitelerinin olmasıdır.



Şekil 2. Polikasyonlarla DNA'nın kondansasyonu

#### Adeno-Assosiyate Vektörler:

AAV tek iplikli, 5 kb'lık genomu olan DNA virusu olup, çoğalmak için bir adenovirus veya herpes virusu gibi yardımcı (helper) bir virusla ko-enfeksiyona gereksinim duyar (13). AAV herhangi bir insan patolojisi ile ilişkili bulunmamıştır. Bölünmeyen ve çok çeşitli hücre tiplerini enfekte edebilmeleri bir avantajdır.

Latent fazda viral genom insan kromozom 19'a entegre olur ve ancak bir yardımcı virus varlığında enfeksiyon başlayabilir. Bu açıdan adenoviruslarla karşılaştırıldığında kalıcı ekspresyon sağlaması bir avantajdır.

Bugün için kullanılmakta olan rAAV-2 vektörleri ITR/transgen/ITR (inverted terminal repeat) DNA'sı olacak şekilde hiçbir viral gen taşımaksızın tasarlanırlar (14). Bu nedenle adenoviral genleri (rep, cap) taşıyan plazmidlerin transfeksiyona dahil edilmeleri ile ve E<sub>1</sub>a, E<sub>1</sub>b gen aktivitesi taşıyan insan 293 hücre hatları (helper cells) kullanılarak vektör üretimi sağlanır (15).

#### NON-VİRAL VEKTÖRLER

Fiziksel ve kimyasal yöntemlerle DNA'nın hücrelere aktarım yolları belli başlı olarak katyonik lipozomlar, plazmid-DNA, DNA-protein kompleksleri ve çıplak DNA'nın mekanik yöntemle hücreye aktarımını kapsar (16).

Non-viral vektörlerin en önemli avantajları enfeksiyöz olmamaları ve çok düşük toksisitelerinin olmasıdır. Ayrıca teorik olarak taşıyacakları DNA'nın uzunluğunda bir limit bulunmamaktadır. Ancak uygun hücrelere hedeflenmeleri çok güçtür, geçici ekspresyon sağlarlar ve transfeksiyon kapasiteleri düşüktür.

Sentetik vektörlerin en önemli özelliği DNA'nın kondansasyonunu sağlayacak bir polikasyonun varlığıdır (17-19).

Katyonik lipozomlar veya polimerler aracılığı ile oluşturulan partiküllerde yüzlerce DNA'nın çöktürülmüş durumda olup, bu büyük komplekslerin hücre yüzeylerine sedimente ettiği gözlenmektedir. Ancak bu özellik in-vitro doku kültürü şartlarında ortaya çıkmakta, in-vivo şartlarda ise difüzyon zorluğu potansiyel bir problem olmaktadır. Sentetik vektörlerin doğru hedeflenebilmeleri için hücre membran füzyon proteinleri, uygun ligandlar (ör: kanser hücreleri için transferrin) ve nükleer lokalizasyon sinyalleri taşıyan formları yaratılmaktadır (11). Ayrıca kromozoma entegre olabilmeleri için "rep" geni taşıyan vektörler de bir avantaj sağlayacaktır (20).

### Hedefleme ve transgen ekspresyon kontrol sistemleri:

Vektörlerin ektopik ekspresyonunu ve buna bağlı yan etkilerini ortadan kaldırmak için vektörlerin doğru hücre/doku ya hedeflenmeleri gen tedavisinin başarısını artıracak etkenlerin başında gelir.

Hedeflemede kullanılan en bilinen fiziksel yöntemler "gene-gun" ve elektroporasyon (21) teknikleridir. Lokal aktarım için kullanılan bir yöntem biyoçözünür mikroküreciklerin kullanılmasıdır. Kateter aracılığı ile genlerin transferi uygulanmaktadır (kalp, karaciğer gibi organlardaki arterlere veya damarlara enjeksiyon) (22-24).

Viral kapsid proteinlerinin ve sentetik vektörlerin yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile hedeflenmenin artırılması üzerinde çok çalışılan bir konudur. Örneğin virüslerde genetik olarak modifiye edilmiş yüzey proteinleri, istenilen hücrelerin reseptörlerini tanıyacak hale getirilip transdüksiyon kapasitesi ve hedefleme artırılabilir.

İyi hedeflenmiş bir viral vektör sistemli olarak kullanılacak, immünojenitesi, toksik etkisi azaltacaktır (25,26).

Lipozomların plazma proteinlerine ve kendi-kendilerine bağlanmaları önleyecek modifikasyonlar da hedeflenmeyi artıracak faktörlerdir (27).

Son olarak doku veya hastalığa özgü promotorların vektörlere takılması ile hedefleme gerçekleştirilebilir.

Örneğin, PSA (prostate specific antigen) promotörü, HRE (hypoxia response element) gibi modeller hayvan modellerinde denenmektedir (28).

Vektör molekülündeki transgeninden hedef hücrede doğru zamanda ve seviyede protein ekspresyonu sağlayabilmek için, vektör sisteminin bazı kontrol elemanları da içermesi gerekmektedir. Bu sistemler çoğunlukla AD (aktivaşyon domain), DBD (DNA bağlayıcı domain) içeren transkripsiyon faktör proteinlerinin ligandlar ile bağlanmalarını takiben vektör sistemindeki indüklenbilir promotörü aktive etmesine bağlı olarak çalışmaktadır (29). Bu sistemler için hayvan modellerinde çalışılmış örnekler olarak şunlar verilebilir: tetracycline (Tet), Ecdysonel ve analogları, rapamycin ve analogları (30,31).

### Gen tedavisinde bugün gelinen nokta:

Eylül 2001 itibariyle toplam 3464 hastaya 596 gen tedavi protokolü uygulanmıştır (32). Yapılan bu klinik denemelerinin %80.5'i Amerika kıtasına aittir. Avrupa %16.6 ile ikinci sırada yer alırken Asya %1.5 ve Avustralya % 0.5 ile takip etmektedir. %0.2 ile Afrika'dan da 1 klinik protokol bildirilmiştir.

Uygulanan protokollerin hastalıklara göre dağılımına bakılacak olursa; kanser %63.1 ile ilk sırada yer alırken, monojenik hastalıklar (%12.6), enfeksiyon hastalıkları (%6.4), vasküler hastalıklar (%7.7) takip eden diğer hastalıklardır.

Gen tedavisi amaçlı kullanılan vektörlerin başında retroviruslar (%35.8) gelmektedir. Adenovirus %27.7 ile ikinci sırada yer alırken, lipofeksiyon %13 ile takip etmektedir. Protokollerin %66.3'ü faz I aşamasında olup, %11.4'ü ise faz II çalışmalardan oluşmaktadır. Faz III aşamasındaki protokoller de %0.7 oranındadır.

Gen aktarım sistemlerinin daha verimli hale getirilmesi ve klinik uygulamalardaki güvenilirlik oranlarının yükseltilmesi bugün için gen tedavisi alanında halen üzerinde durulması gereken en önemli iki noktadır. Buna rağmen klinik protokol sayıları artmaktadır ve yakın bir tarihte bu yöntemin de klasik tedaviler yanında yer alacağına dair kuvvetli beklentiler mevcuttur.

## KAYNAKLAR

1. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T-lymphocyte directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995;270:475-480.
2. Pilaro AM, Serebrian MA. Preclinical development strategies for novel gene therapeutic products. *Toxicol Pathol* 1999;27:4-7.
3. Regulatory issues. Gene therapy advisory committee: Report on the potential use of gene therapy in utero. *Hum Gene Ther* 10:689-692.
4. Shinnick TM, Lerner RA, Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus. *Nature* 1981;293:543-548.
5. Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells* 1999;17:191-202.
6. Dilber MS. Experimental gene therapy with special reference to plasma cell tumors. Stockholm 1996.
7. Romano G, Michell P, Pacilio C, Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: Achievements, perspectives and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 2000;18:19-39.
8. Federico M. Lentiviruses as gene delivery vectors. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:448-453.
9. Zahler MH, Irani A, Malhi H, et al. The application of a lentiviral vector for gene transfer in fetal human hepatocytes. *The Journal of Gene Medicine*, 2000; 2:186-193.
10. Yeh P, Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J* 1997;11:615-623.
11. Rubanyi GM. The future of human gene therapy. *Molecular Aspects of Medicine* 2001;22:113-142.
12. Schiedner G, Clemens PR, Volpers C, Kochanek S. High-capacity "gutless" adenoviral vectors: technical aspects and applications. *Adenoviral Vectors for Gene Therapy* (in press) 2001.
13. Synder RO. Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *The Journal of Gene Medicine* 1999;1:166-175.
14. Monahan PE, Samulski RJ. Adeno-associated virus vector for gene therapy: more pros than cons? *Molecular Medicine Today* 2000;6: 433-440.
15. Grimm D, Kleinschmidt J. Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Human Gene Therapy* 1999;10:2445-2450.
16. Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* 2000;7:31-34.
17. Kircheis R, Schüller S, Brunner S, et al. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *The Journal of Gene Medicine* 1999;1:111-120.
18. Clamme JP, Bernacchi S, Vuilleumier C, Duportal G, Mely Y. Gene transfer by cationic surfactants is essentially limited by the trapping of the surfactant/DNA complexes onto the cell membrane: a fluorescence investigation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1467:347-361.
19. Mounkes LC, Zhong W, Cipres-Palacin G, Heath TD, Debs RJ. Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1998;273:26164-26170.
20. Young Jr SM, McCarty DM, Degtyavera N, Samulski RJ. Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site specific recombination. *J Virol* 2000;74:3953-3966.
21. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, et al. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1999;96:4262-4267.
22. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994;89:2183-2189.
23. Boekstegers P, von Degenfeld G, Giehl W, et al. Myocardial gene transfer by selective pressure regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Therapy* 2000;7:232-240.
24. Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, et al. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation* 1999;99:2617-2620.
25. Wickham TJ. Targeting adenovirus. *Gene Ther* 2000;7:110-114.
26. Russell SJ, Cosset F-L. Modifying the host range properties of retroviral vectors. *The Journal of Gene Medicine* 1999;1:300-311.

## Gen tedavisinde kullanılan gen transfer sistemleri

27. Yanagihara K, Cheng H, Cheng PW. Effects of epidermal growth factor, transferrin and insulin on lipofection efficiency in human lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2000;7:59-65.
28. Pang S, Dannull J, Kaboo R, et al. Identification of a positive regulatory element responsible for tissue-specific expression of prostate specific antigen. *Cancer Res* 1997; 57:495-499.
29. Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor specific gene therapy. *Gene Ther* 2000;7:493-498.
30. Freundlieb S, Schirra-Müller C, Bujard H. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *The Journal of Gene Medicine* 2000;1:4-12.
31. Imhof OM, Chatellard P, Mermod N. A regulatory network for the efficient control of transgene expression. *The Journal of Gene Medicine* 2000;2:107-116.
32. <http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical>