

David Lillicrap: Merhaba, ben David Lillicrap. Ben, Kanada'da bulunan Queen's University'de Patoloji ve Moleküler Tıp Bölümü'nde profesörüm ve sizlere hemofili için gen terapisi hakkında bir dizi slayt sunacağım. Bu slaytların öğrenme hedefi, temel terimleri ve kavramlarıyla gen terapisini doğru şekilde tanımlamaktır.

Bu 65 yıl önce başlamış bir hikâyedir ve bu slaytta sağ tarafta Francis Crick'in ve sol tarafta James Watson'ın 1953 yılında Cambridge'de tanıttıkları DNA'nın çift sarmallı yapısını gösteren zarif modele işaret ederken çekilmiş bir fotoğrafını görüyorsunuz.

Pıhtılaşma faktör genlerinin ilk tanımlandığı 1980'li yılların başına atlayalım. Nature'da, benim mentörüm Arthur Bloom tarafından yayımlanan bu haberler ve görüşler makalesinde, pıhtılaşma bozukluğu patojenezine dair artan bilgilerle, gelişen teşhislerle ve en nihayetinde bu slayt gösterisinin de konusu olan, genetik terapiyle bu klonlama deneylerinin faydalarını açıklıyor.

Gen terapisinin prensipleri oldukça basit. Terapötik transgeni alıp, hücre içine sokup, nükleusta DNA ile birleşmesini sağlamayı kapsıyor. Sonrasında nükleus, proteine dönüşecek olan mRNA sentezler ve bu terapötik protein ya hücre içinde kalır veya hücreden dışarı salgılanır ve terapötik fayda için vücutta dolaşıma girer.

Gen terapi işlemlerinin detaylarına girmeden önce, şu anda asıl sorunuz olan, somatik hücre gen terapisiyle sınırlı oluşumuzdan bahsetmeliyiz. Bu, normal bir gen aktarmak veya bir bireyin hücrelerinin içindeki geni onarmaktır ve bir sonraki nesile fayda sağlamayacaktır. Somatik hücre gen terapisi, işlemin uygulandığı bireyle sınırlıdır, germ hücresi DNA'sını değiştirmeyi veya etkilemeyi amaçlamıyoruz.

Bu slaytta, gen terapisine her zaman iyi yanıt vermiş hastalıkların bir listesini görüyorsunuz. Bunlar monogenik hastalıklardır, bu klinik fenotip, tek gen defekti nedeniyle olur ve bu slayttaki listede hemofilinin de bulunduğunu görebiliyorsunuz. Pıhtılaşma faktöründe küçük protein artışları kayda değer klinik fayda sağladığı için hemofili de o listede bulunuyor. Protein hücreden salgılanır, bu yüzden sadece dolaşıma girmesi yeterlidir. Sıkı protein sentezi gerekli değildir ve üzerinde bu gen terapi stratejilerini deneyebileceğimiz, fareler ve büyük hayvanlar gibi, iyi hayvan modellerine sahibiz.

Bu slaytta somatik hücre terapisine dair dört olası seçenek göreceksiniz. Bu seçeneklerden ilki mutasyon onarımı. Sonraki slaytta bunu daha detaylı şekilde açıklayacağım. Sırada, viral olmayan gen transferiyle transgen aktarma olasılığı var. Bunlar teoride mümkün fakat kliniğe yakın değil. Sırada hücre temelli gen terapisi var, sonraki slaytta bununla ilgili daha detaylı açıklama yapacağım ve son olarak, güncel olarak yürütülen hemofili için insan gen terapisi çalışmalarında kullanılan strateji olan viral vektör gen transferi var.



Sonrasında bu slaytta, gen düzenleme stratejileriyle, olası bir genleri etkileme veya onarma konusuna dair açıklamalar bulunuyor. Slaytın sol tarafında, bir gen onarma yöntemi olarak homolog rekombinasyon olasılığını görüyorsunuz. Bu teoride mümkün fakat çok verimsiz bir işlem. Slaytın sağ tarafında nükleaz düzenlemeye dayalı birkaç farklı yaklaşım görüyorsunuz. Soldan sağa doğru okursak, ZFN'ler, TALEN'ler veya CRISPR aracılı, genomun çift sarmal kopmasının gerçekleştiği bölgesine protein veya nükleik asit temelli nükleaz aktarım yöntemlerini içeren stratejileri, slaytın alt tarafına bakarsak bu çift sarmalın farklı yöntemlerle değiştirildiğini veya onarıldığını görüyoruz. Bu çalışmalar, klinik çalışmalara giriş yapmak üzereler ve potansiyel olarak kullanılabilirler fakat hemofili için in vitro ve hayvan modellerinde kullanılabileceğini düşünmeme rağmen, bunlar klinik uygulamadan bir hayli uzaklar.

Gen terapisi stratejisinin elemanları nelerdir? Bu slaytta listelenmişlerdir. Terapötik transgenden, bir aktarım sistemi ve uygun konak hücreden ve sonra ölçümlerden, transgenik proteinin sonuç metriklerinden bahsedeceğim.

Transgen kaset taşıyıcı neye benziyor? Genellikle bir kodlayan DNA sekansı veya intronları eksik olan bir cDNA sekansı içerir. cDNA'ların çoğunluğu büyüklük olarak 2 ile 7 kilobaz aralığındadır ve sonraki slaytta kodlama sekansını nasıl değiştirebileceğinize dair iki yöntemden bahsedeceğim.

Bu slaytta nükleotit sekansında, yani amino asitleri kodlayan nükleotit üçlüsünde, yapılan bir değişiklik olan fakat amino asit sekansını değiştirmeyen kodon optimizasyonu anlatılıyor. Bu özel stratejinin hedefi mRNA transkripsiyon oranını arttırmak, mRNA işlemlerini optimize etmek ve geride kalan intronik elemanları kesip çıkarmak ve son olarak mRNA translasyonunu, hedeflenen konak hücrenin içinde bulunan transfer RNA'ların miktarına eşitlemektir.

Transgen kaset taşıyıcısında bulunması gereken 2 diğer eleman grubu, transgenin "5" ucunda bulunan bazı düzenleyici elemanlardır. Bunlar, hücre tipine özgü olarak, gelişime özgü olarak veya ilaçla indüksiyon yapılabilen olarak regüle edilebilir promotör elemanlardır ve sonrasında gen ekspresyonunu arttırmak için gerekli olan, artırıcı elemanlar olarak isimlendirilen, uzak elemanlar, genellikle belirli bir konak hücre tipiyle eşlenir.

Daha sonra transgen kaset taşıyıcısının diğer ucunda, genellikle cDNA dizisi tarafından kodlanan mRNA'yı stabilize etmek için mevcut olan 3' dizisi bulunur.

Sıradaki iki slaytta transgen aktarımı için genel stratejiler anlatılıyor. Bunlardan ilki, sıklıkla intravenöz infüzyon veya belki de intramüsküler enjeksiyon yöntemiyle gerçekleştirilen direkt in vivo gen transferini açıklıyor. Uygulanması kolay olması, doktorun ve hastanın minimal zaman harcaması



gibi avantajları vardır. Dezavantajları, konak bağışıklık yanıtının in vivo olarak vektör aktarım sistemine maruz kalmasıdır, bu daha sonra üzerine konuşacağımız bazı problemlere sebep olabilir. İkincisi ise, hedefleme etkinliğinde değişkenler olmasıdır, yani transgen aktarımı yapmayı tercih etmediğiniz hücre tiplerine de aktarım yapıyor olabilirsiniz.

Transgen aktarımı için ikinci strateji bu slaytta gösteriliyor. Transgen aktarımının vücut dışında yapıldığı bu strateji, indirekt veya ex-vivo gen transferi olarak isimlendirilir. Slaytın sol tarafında, yapılacak ilk işin, hastadan otolog, uzun ömürlü progenitör veya kök hücre alınması veya izole edilmesi olduğunu görüyorsunuz. Bu hücreler izole edildiği anda, hastanın mutant geni yerine bu genin normal kopyasını aktarabilir veya hastanın hücrelerinde bulunan mutant gen üzerinde değişiklikler yapabilirsiniz. Genetiği değiştirilmiş bu hücreler, vücudun dışında çoğaltılır ve daha sonra hastaya geri verilir, burada hastanın hücrelerinde eksik olan normal faktörü, hemofili durumunda normal pıhtılaşma faktörü, barındıracakları ve üretecekleri bir yer bulacaklardır.

Bu aktarım sisteminin birkaç avantajı olduğu gibi zayıflıkları da var. İn vivo vektöre maruz kalınmaması, immünolojik açıdan önemli olduğu için bir avantajdır. Direkt hücre hedeflemesi vardır, bu yüzden yeni transgeni taşıyan vektörle karşılaşan hücreler, toplanıp vücut dışına alınmış ve ulaşılabilir hücrelerdir. Dezavantajlarından biri yoğun emek gerektiren bir prosedür olmasıdır. Özel olanaklar gerektirirler. Ayrıca, genetiği değiştirilmiş hücrelerin başarılı re-implantasyonu için konağın bir hazırlama işleminden geçmesi gerekliliği büyük önem taşır.

Güncel hemofili gen terapi çalışmalarının tamamı viral vektör gen transferi içerir ve adenovirüs, retrovirüsler ve adeno ilişkili virüs olmak üzere üç tip virüs kullanılır.

Adenovirüs konusunu ele alan sadece bir slaytım var. Bu viral vektör sistemiyle bir hasta tedavi edildi. Çoğalabilen ve çoğalamayan hücrelere transdüksiyon yapmakta oldukça etkilidirler ve bu vektörler büyük miktarda kolaylıkla yapılabilirler. Adenoviral gen transferinin en belirgin dezavantajları, bu vektörlere bağlı ciddi bir doğal bağışıklık yanıtı olmasıdır. Bu nedenle, pro-inflamatuar sitokinlerde ve karaciğer toksisitesinde artış olur, trombositopeni görülür ve aşırı durumlarda, bazen ölümcül olabilen sistemik inflamatuvar yanıt sendromu geliştirebilirsiniz. Mevcut hâliyle bu aktarım sistemi hemofili hastalarına uygun değildir.

İkinci viral temelli aktarım sistemi, lentiviral aracılığıyla yapılan gen transferidir ve bu, daha sonraki hemofili klinik translasyonu için birkaç grup tarafından araştırılmaktadır. Lentiviral vektörler hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelere transdüksiyon yapar. Vektör kapasitesi, yani transgen ekinin büyüklüğü, maksimum 8 kilobaza ulaşan boyutuyla gayet uygundur. Minör



doğal bağışıklık yanıtları var. Lentiviral sistemin bir avantajı, en azından hayvan modellerinde yapılan geniş çaplı çalışmalarda görüldüğü üzere, doğada rastgele ve onkojenik olmayan hâlde görülen istikrarlı genomik integrasyonun olmasıdır.

Son olarak, viral vektör sistemlerin üçüncüsü adeno ilişkili virüstür. Bu birçok küçük AAV partikülünü gösteren bir elektron mikroskobu görüntüsü. Slaytın ortasına doğru, büyük bir adenoviral partikül görebilirsiniz. Bu güncel hemofili gen terapi çalışmalarında kullanılan viral vektör sistemidir.

İlerde AAV şeklinde tanımlayacağım virüs, patojenik olmayan bir insan parvovirüsüdür. Slaytın en üstünde gösterildiği üzere, tek zincirli bir DNA genomuna sahiptir. Yani büyüklük olarak 4,7 kilobazdır. Bir rep geni ve bir cap geni olmak üzere iki adet kodlayan bölgesi vardır ve genomun iki ucu da ters terminal tekrar sekanslarıyla kapatılmıştır. Bu viral vektör sistemi minimal doğal immünojenisiteye neden olur. Kapsit protein varyanslarıyla temsil edilen birçok farklı serotip vardır. Rekombinant vektörün çok küçük bir kısmı, konakçı genomuna entegre olur ve vektörün çoğu, stabil ekstrakromozomal dairesel konkatemerler hâlinde bulunur.

Bu slayt temel olarak doğal (wild-type) bir AAV genomunu, terapötik bir AAV vektör genomuna dönüştürmeyi anlatıyor. Hem rep hem de cap genlerini kaldırdığınızda, ikinci diyagramda alta yerleştirilmiş olan AAV vektör genomunun sağ tarafta terapötik bir gene sahip olduğunu ve belirli bir organda veya hücrede ekspresyona neden olan bir promotör veya regülatör sekansı görebilirsiniz. Slaytta gösterildiği üzere, bu, hepatositlerde, belirtilen transgenin ekspresyonuna neden olan karaciğere özgü bir promotördür. Şu anda hemofili için, burası vektörlerin hedeflendiği yer. Slaytın en altında, transgen eklerinin, cDNA sekansı boyut olarak yaklaşık 1,3 kilobaz olan faktör 9 ve B alanı kodlama sekansı silindikten sonra boyut olarak yaklaşık 4,7 kilobaz olan, B alanı silinmiş faktör 8 arasında değişmekte olduğunu görüyorsunuz.

AAV vektör partikülü nasıl yapılıdır? Bu, buradaki slaytta açıklanıyor. Slaytın en üstünde, transgenin "5" ve "3" uçlarında kalan ITR sekanslarıyla transgenik nükleik asit sekansını görüyorsunuz. Promotör sekansı ve ortadaki transgenik gen daha sonra bir AAV vektör partikülü yapmak için AAV vektör kapsit içerisine yerleştirilir ve hastaya enjekte edilen bu partiküller karaciğer için terapötik materyaldir.

Burada daha detaylı olarak gösterilmektedir. Yani, partikülün bir konak hücre zarıyla etkileşime girdiğini görüyorsunuz. AAV ile bazı reseptör formlarının etkileşimi iyi sonuçlar verdi denebilir fakat yine de bilgide bazı eksiklikler var. Partikül, hücre içerisinde bir endozom içine alınır. En sonunda, partikül endozomdan ayrılır, kapsit protein parçalanır ve transdüksiyona uğramış hücre tipinin yüzeyinde eksprese edilir ve transgenik nükleik asit,



ekstrakromozomal konkatemerler hâlinde bulunacak şekilde nükleusta bırakılır veya bazı durumlarda, AAV ile daha az ölçüde gerçekleşse de, konak hücre DNA'sının içine entegre edilir.

Hemofili için bunları bir araya getirdiğinizde, gen transfer stratejisinin bileşenleri, wild-type veya genetiği değiştirilmiş faktör 9 cDNA dizisi ve B alanı silinmiş faktör 8 dizisi olan bir terapötik transgen içerir. Aktarım stratejisi olarak adeno ilişkili virüs kullanılıyor, daha önce de bahsettiğim gibi lentiviral çalışmaları içeren bazı çalışmalar sürse de, hâlâ erken gelişim sürecindedir. Terapötik geni, güncel olarak karaciğer olan, alıcı konak hücreye aktarmanız ve sonrasında ölçümlerle, yaptığınız çalışmaların başarılı olup olmadığını görmemiz gereklidir. Bunlar, plazmadaki pıhtılaşma faktör seviyelerinin ölçümünü, yıllık kanama oranı ölçümünü ve hastaların ekzojenus faktör 8 tüketimini içerirler. O zaman, elbette, güvenlik önlemlerini de dikkate almanız gerekir.

Bu slaytta Gartner hype cycle grafiğinin gen terapisine uyarlanmış bir versiyonu gösteriliyor. Bu slaytta sizi soldan sağa doğru götüreceğim. Teknolojinin tetiği 1970'li yıllarda çekildi ve tepenin en üstünde gördüğünüz üzere, 1990-1995 yıllarına gelindiğinde gen terapisinin olağanüstü şeyler gerçekleştirebileceğine inanıyorduk ve gerçekten de, ADA yetersizliği gibi, kalıtsal immün yetersizliği hastalıklarının bazı formları gen terapisiyle iyileştirilmişti. Ne yazık ki 1999 yılında talihsiz bir olay yaşandı ve adenoviral gen terapisi yöntemiyle tedavi edilmekte olan Jesse Gelsinger adlı hasta, sistemik inflamatuvar cevap sebebiyle hayatını kaybetti ve bu gen terapi stratejileri gelişiminde tam anlamıyla bir hayal kırıklığıydı.

Buna rağmen, 2000'den 2010'a kadar olan on yıl içerisinde, vektör gelişimi üzerine temel bilim çalışmaları ve gen terapi aktarımına verilen bağışıklık yanıtını daha iyi anlıyor olmamız sebebiyle şu anda bir verimlilik platosundayız. Bu plato hemofili için 2010 veya 2011 yılında, hemofili merkezli gen terapisinin ilk uzun süreli klinik başarısı ve gen terapi stratejilerinde kayda değer bir biyofarma sektörünün dahil olması sayesinde başladı. Şimdi 2019 yılındayız ve hem hemofili A hem de hemofili B için çok sayıda faz 3 klinik çalışmaların eşiğindedeyiz.

Bu, slayt dizisinin son slaytı ve hemofili için gen terapisinin ne vaat ettiğini açıklıyor. Slaytın en üst kısmında faktör replasmanının, uzatılmış yarı ömürlü faktör replasmanının, nonfaktör terapinin hemostaza etkilerini ve slaytın sağında gen terapisiyle nelerin gerçekleşme ihtimali olduğunu açıklıyor. Slaytın altında, dolaşımda ölçülebilen pıhtılaşma faktör seviyelerini görüyorsunuz. Eğer dikkatinizi slaytın solundaki bilgilere doğru verebilirseniz, hemostazdaki gelişmelere ve sonrasında gelişmelerdeki düşüşe karşılık gelen, aralıklı tepe ve dip faktör seviyelerini görebilirsiniz. Bunun olmasının sebebi dolaşımdaki proteinlerin yarı ömürleridir.



İkinci veri grubunda, hemostaz ve faktör seviyeleri sonuçlarında gördüğünüz üzere uzatılmış yarı ömürlü faktörler, kısaca EHL faktörler, sayesinde bahsedilen faydalarda artış oldu. Daha sağıdaki non-faktör terapilere doğru ilerlersek, bu faktörlerin, dolaşımında konvensiyonel pıhtılaşma faktörlerini kullanmadığından ötürü, pıhtılaşma faktör seviyelerinde artma sağlamıyor olduğunu fakat tabloda görüldüğü üzere, global hemostaz seviyelerinde düzelme sağladığını görebiliriz.

Sonrasında, slaytın sağı tarafında gen terapisiyle neler başarılabilceğini görüyorsunuz. Gen terapisi faktör 9 ve faktör 8 seviyelerinin terapötik olarak anlamlı seviyelere yükseltilmesi vaadini vermiştir ve bunlar, aktarılmış olan terapötik transgenlerden sürekli gerçekleşen faktör 9 ve faktör 8 ekspresyonu sebebiyle kalıcıdır, ve bu, aralıklı pıhtılaşma faktör replasmanına nadiren ihtiyaç duyulan uzun süreli korunmuş profilaksi oluşturmak için fazlasıyla yeterlidir.

