

# GEN TEDAVİSİ VE BİYOGÜVENLİK

## Gene Therapy and Biosafety

Ayşen GÜNEL ÖZCAN

Kırıkkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Abd  
KIRIKKALE

İletişim:  
Ayşen GÜNEL ÖZCAN  
Kırıkkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Abd  
71100 KIRIKKALE  
Tel: 0318 357 35 71/1019  
E-posta: agozcan@yahoo.com

### ÖZET

Gen tedavisi hastalıkları tedavi etmek veya önlemek amacıyla bir kişinin genlerinin ekspresyonunun değiştirilmesi olarak tanımlanabilir. Akademik ve ticari laboratuvarların zorlu çalışmaları ile 2006 yılı verilerine göre 1273 gen tedavisi klinik deneme protokolü etik çevrelerce onaylanmıştır. Ancak henüz sadece baş-boyun kanserleri için geliştirilen bir gen tedavisi ürünü rutin kullanım için Çin'de lisans alabilmiştir. Gen tedavisi denemelerindeki başarısızlıklar terapötik genlerin yetersizliğinden kaynaklanmamaktadır. Başarılı gen tedavisinin önündeki en önemli engel toksik olmayan gen aktarım sistemlerinin olmayışıdır. Gen tedavisinde viral ve viral olmayan çeşitli vektör sistemleri kullanılmaktadır ve her biri kendine özgü avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Günümüzde en etkili gen aktarım araçları, genlerini hedef hücreye aktarma özellikleri nedeniyle, virüslerdir. Gen tedavisi kalıtsal tek gen hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıkları da içine alan bir dizi hastalığın tedavisi amacıyla geliştirilmekteyse de özellikle kanser tedavisi daha öne çıkmaktadır. Gen tedavisinin pratikte yaygın uygulama alanı bulabilmesi tedavi genlerinin hücrelere yeterli dozlarda aktarılabilmesine, genin hastalıklı hücreleri hedefleyebilmesine ve aktarılan yeni genlerin vücut tarafından sıkı kontrol altında tutulabilme yollarının geliştirilmesine ve dolayısıyla da biyogüvenlik problemlerinin aşılmasına bağlıdır. Bu derlemede gen tedavisinde kullanılan vektör sistemleri anlatılacak ve biyogüvenlik açısından değerlendirme kriterleri tartışılacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Gen tedavisi, biyogüvenlik, viral vektörler, non-viral vektörler

### ABSTRACT

Gene therapy can be described as the approach to change gene expression of an individual to treat a disease. According to the annual gene therapy records in 2006, hard work of both academic and industrial laboratories resulted 1273 gene therapy clinical protocols that have been approved by ethical committees. In spite of all these attempts there is only one licence so far and that has recently been given by China for the routine use of head and neck cancer treatment. A major obstacle to the successful application of gene therapy trials is not a insufficient amount of therapeutic genes, but the lack of nontoxic gene delivery systems. A variety of viral and non-viral systems are used for gene therapy and each system owns its specific advantages and disadvantages. In the current status, the most effective gene delivery tools are viruses because of their natural ability to transfer genes to target cells. Gene therapy is being developed for a range of diseases including inherited monogenic disorders and cardiovascular diseases, but this approach has been most evident for cancer. In order that gene therapy can be used in clinical practice, delivery of therapeutic genes to cells at efficient doses, gene-targetting to the disease cells and tight-control of the delivered genes should be improved, by another means, biosafety problems needs to be solved. In this review, vector systems used in gene therapy will be explained and evaluation criterias for their biosafety will be discussed.

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

## GİRİŞ

Gen tedavisi hastalıkları tedavi etmek veya önlemek amacıyla bir kişinin genlerinin ekspresyonunun değiştirilmesine denir. Gen tedavisi değişikliğe uğrayan hücrelerin tipine ve değişikliğin şekline göre sınıflandırılmaktadır (1).

Gen tedavileri hücre tipine göre, germ hücrelerine ve somatik hücrelerine yapılan tedaviler olarak sınıflandırılabilir:

**Germ hücre serisi gen tedavisinde** yapılan değişiklik soylar boyu aktarılabilecek şekilde kalıcıdır. Gamet, zigot veya erken dönem embriyoda yapılan değişiklik ile mümkündür. Çoğu ülkede etik olarak gelecek kuşakları etkileme yetisi nedeniyle germ hücre serisi tedavisi yasaklanmıştır. Ancak, mitokondriyal hastalıklar için çekirdek gen transferi etik açıdan “kabul edilebilir” bulunmaktadır. Mitokondri DNA'sı sitoplazmada bulunduğundan dolayı *in vitro* fertilizasyonu takiben (dört hücre aşamasında) tüm hücrelerin çekirdekleri izole edilir ve çekirdeği çıkarılmış donörün yumurta hücrelerine verilir. Çekirdek transferi olan bu yöntem aslında teknik anlamda klonlamadır.

**Somatik hücre serisi gen tedavisinde** ise amaç bir hastanın belli hücreleri veya dokularında ilgili hastalığı düzelterek şekilde genetik değişiklik yapmaktır. Somatik gen tedavisinde kişinin genomu değişikliğe uğramakta ancak bu değişim gelecek kuşaklara aktarılmamaktadır. Günümüzdeki tüm gen tedavisi denemeleri ve protokolleri somatik hücre serisi tedavileri içindir.

Somatik hücreler çeşitli yollarla değişikliğe uğratılabilir. Bu gen tedavisi yaklaşımlarını dört grup altında toplayabiliriz: gen ilavesi, gen değişimi, gen ifadesinin (ekspresyonunun) inhibisyonu, özgün hücrelerin öldürülmesi:

**Gen ilavesinde** bozuk genin işlevsel kopyasının verilmesi amaçlanır. Hücrede mutant gen kalmakta ancak buna fonksiyonel gen ilave edilmektedir. Fonksiyon kaybına yol açan genetik hastalıkların düzeltilmesinde faydalıdır. Örneğin kistik fibrozis gen ilavesi için uygun bir hastalıktır. Ancak kalıcı hasarların meydana gelmiş olduğu durumlarda bu

yaklaşım sonuç vermeyecektir. Kanser tedavisinde tümöre karşı immün cevabı artırmanın veya kusurlu tümör baskılayıcı genin işlevsel kopyasının ilavesinin amaçlandığı durumlarda da bu yöntem uygundur. Gen ilavesi, hipertansiyon kontrolünde damarları korumak (ör. endotel nitrik oksid sentetaz gen aktarımı) veya koroner arter hastalarında vasküler büyümeyi uyarmak (ör. VEGF gen aktarımı) amacıyla da denenmektedir.

**Gen değişimi** ise çok daha zor ve karmaşıktır. Amaç, mutant geni fonksiyonel kopyası ile değiştirmek veya mutasyonu *in situ* düzeltmektir. Mutant gen ürününün hücreye zarar verdiği işlevin geri kazanımı sonucu düzelebilecek genetik hastalıklarda tercih edilecek bir yöntemdir.

**Gen ifadesinin baskılanması** özellikle enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir yaklaşımdır. Bu yöntemde hedef patojenin fonksiyonunun baskılanması amaçlanır. Ayrıca bu yaklaşım kanserde aktif hale geçmiş onkogenlerin sessizleştirilmesinde, otoimmün hastalıklarda ve belki fonksiyon kazanımına bağlı genetik hastalıklarda kullanılabilir.

**Spesifik hücrelerin öldürülmesi** yöntemi ise özellikle kanser tedavisinde yer bulmaktadır. Bu amaçla toksik kemoterapötik ajan, toksik olmayan ön ilaç (prodrug) formunda vücuda verilirken, bu ön ilaç aktifleyen enzimi kodlayan gen de kanser hücrelerine aktarılmaktadır. Bu yaklaşıma *gen güdümlü enzim prodrug tedavisi (gene directed enzyme prodrug therapy-GDEPT)* veya *intihar gen tedavisi* denilmektedir. Uygulamada, aktif ön ilaç hedeflenmemiş komşu hücrelere de yayıldığından güçlü bir ilave (*bystander*) etki oluşturmaktadır.

## GEN TEDAVİSİNDE KULLANILAN GEN AKTARIMARAÇLARI

Genlerin alıcı hücreye aktarılması laboratuvar ortamında (*ex vivo*) veya hastanın vücudunda (*in vivo*) gerçekleştirilebilir:

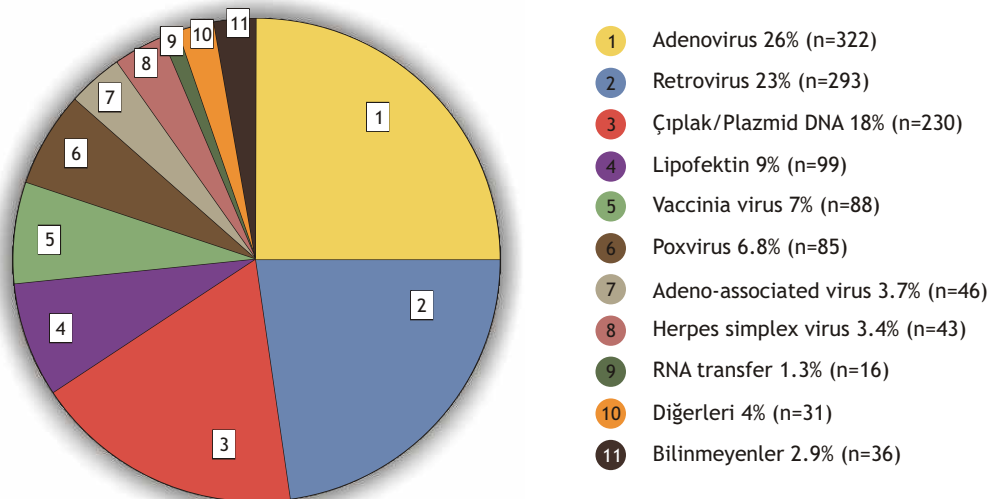
**Ex vivo gen tedavisinde**, hücreler hastadan alınır ve hücre kültürü ortamında çoğaltılarak klonlanan gen aktarılır. Gen aktarımının

gerçekleştiği hücreler seçilerek hücre kültüründe *in vitro* olarak çoğaltılır ve hastaya verilir. Hastanın bağışıklık sistemi tarafından bu hücrelerin red edilmemesi için mümkün olduğunca hastanın kendi hücreleri (otolog hücreler) tercih edilir. Ancak bu yöntem, hastadan alınabilecek hücrelere (Hematopoetik sistem hücreleri, deri hücreleri vs.), hücrelerin engraft indüklenebilmesi ve hastaya tekrar verildikten sonra uzun süre yaşayabilmesi ile sınırlıdır.

***In vivo gen tedavisi*** ise, alıcı hücrelerin *in vitro* kültürünün yetersiz olduğu (ör. beyin hücreleri) veya kültürü yapılan hücrelerin hastaya re-implantının etkili bir şekilde yapılamadığı durumlarda tek seçenektir. Doku hedeflemesi bu yöntemde önemli bir sorundur. Transfer edilen gen doğrudan hedef dokuya veya genel dolaşıma verilebilir ancak aktarım için kullanılan vektör sadece hedeflenen hücreler tarafından alınacak şekilde veya sadece hedeflenen hücrelerde gen ifadesi olacak şekilde tasarlanmış olmalıdır. Bu yöntemde geni almış veya ifade eden hücreleri çoğaltma ve seçme imkanı olmadığından *in vivo gen tedavisinin* başarısı gen aktarımı ve ifadesinin (ekspresyonunun) etkinliğine bağlıdır.

Aktarılacak gen, alıcı hücrenin kromozomuna girecek ya da epizom olarak kalacak şekilde tasarlanabilir. Uzun süreli gen ifadesinin sağlanabilmesi için yabancı genin alıcı hücrenin kromozomuna entegre olması (özellikle kök hücrelerde) tercih edilebilir. Böylelikle hücre döngüsünde hücre bölündükçe gen de çoğalacaktır. Ancak kromozoma entegrasyon bazı sorunlar taşımaktadır. Çoğu genin kromozoma entegrasyonu rasgele olmaktadır ve bu entegrasyon hastanın değişik hücrelerinde farklı şekilde gerçekleşir. Entegre olan genin ekspresyonu kromozomdaki yerleşimine bağlı olarak beklenmeyen etkiler ortaya çıkartabileceği gibi, gen ekspresyonunun tamamen durması da söz konusudur. Genin düşük düzeyde eksprese edilebilmesi veya kısa süreli ifade edilip tamamen sessizleşmesi de mümkündür. Daha da kötüsü endojen genlerin ekspresyonunu değiştirebilir. En büyük endişe ise yüksek düzeyde ifade edilen bir genin kromozoma entegre olduğu bölgedeki bir onkogeni uyarmasıdır. Şiddetli kombine immün yetmezlik (SCID; Severe Combined Immune Deficiency) için tedavi edilen üç hastada terapötik geni taşıyan retroviral vektörün

Şekil 1. Gen tedavisinde kullanılan vektörler ( [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical) )



Tablo 1. Gen tedavisinde kullanılan vektörlerin karşılaştırması

Vektör	Aktarılan gen büyüklüğü (kB)	Titre (cfu.ml <sup>1</sup> )	Genoma entegrasyon	In vivo transfeksiyon etkinliği	Dezavantajları	Avantajları
RV	5-7	10 <sup>6-7</sup>	+	↑	Sadece bölünen hücrelere transfeksiyon ±RCV*	Bölünen hücrelere kararlı transfeksiyon
AV	8-30	10 <sup>11-12</sup>	-	↑	↑İmmünojenite + RCV Geçici ekspresyon	Hem bölünen hem bölünmeyen hücrelere transfeksiyon
AAV	2-4	10 <sup>6-9</sup>	+(?)	↑	Küçük klonlama bölgesi	Kararlı transfeksiyon
HSV	< 30	10 <sup>8-10</sup>	-	↓	↑İmmünojenite + RCV	Büyük klonlama bölgesi, nöron özgünlüğü
HSV	< 25	Veri yok	-	↑	Çiçek aşısıyla aşılınmamış immün yetmezliği olmayan kişilerle sınırlı	Çok çeşitli hücreyi etkin olarak enfekte edebilme
Vaccinia	~ 8	10 <sup>6-7</sup>	+	↑	Sadece bölünen hücrelere transfeksiyon ±RCV*	Bölünen hücrelere kararlı transfeksiyon
Lipozom	> 20	Veri yok	-	Değişken	Geçici ekspresyon Bazı hücrelere toksisite	Geniş klonlama kapasitesi
Çıplak DNA	> 20	Veri yok	-	↓	Geçici ekspresyon	Geniş klonlama kapasitesi, sadece kasda ekspresyon sürekliliği

\*RCV: replikasyon komponenti virüs

kromozoma entegrasyonu sonucunda 10<sup>6</sup> modifiye T hücresinden birinde LMO2 onkogeni aktive olmuş ve lösemi gelişmiştir (2, 3). Tedavi sonrası, hastaların T hücrelerinde 50 farklı insersiyon bölgesi saptanmış, ancak bu klonlardan bir tanesi diğerlerinden daha fazla çoğalarak T-hücre lösemisine yol açmıştır. Bu olumsuz gelişmeler, kromozoma rastgele entegre olan vektörleri gen tedavisi aracı olarak kullanan klinik protokollerin reddine yol açmış ve tüm dünyada retroviral transdüksiyonu yapılmış geniş lenfosit havuzlarının kullanımı yasaklanmıştır. Tüm bu nedenlerden dolayı, 2006 yılı verilerine göre onay almış 1273 gen tedavisi klinik deneme protokollerinin %23'ü retroviral kaynaklı olmasına rağmen, ekstrakromozomal olarak kalan (epizomlar halinde) vektörler gen tedavisinin ana aracı olarak görülmektedir (Şekil 1). Epizomal vektörlerin dezavantajı gen tedavisinin sınırlı bir süre

sürdürülebilmesidir. Eğer hedef hücreler aktif olarak bölünüyorsa hücre popülasyonu genişledikçe epizomlar seyrecektir. Dolayısı ile kalıcı bir tedavi imkansızlaşacak ve tedavinin tekrarlanmasını gerektirecektir. Bazı durumlarda, örneğin kanser hücrelerinin öldürülmesi veya akut bir enfeksiyonun tedavisi amaçlandığında, bu yöntem problem teşkil etmez çünkü tedavi amaçlı aktarılan genin uzun süreli ifadesine gerek yoktur. Genin epizomal ekspresyonu sınırlı olması istenmeyen ve beklenmedik durumların ortaya çıktığı durumlarda ise avantaj sağlamaktadır.

İdeal bir gen transferi yöntemi henüz mevcut değildir. Herbirinin farklı avantaj ve dezavantajları vardır (Tablo 1). İnsan hücrelerine transdüksiyon etkinliğinin yüksek olması nedeni ile memeli virüsleri gen transferinde en çok kullanılan vektörlerdir. Onaylanmış gen tedavisi klinik deneme

protokollerinin %70'i viral vektörleri kullanmaktadır (**Şekil 1**) ve bu virüslerin başlıcaları retrovirüsler (RV), adenovirüsler (AV), adenoasosiy virüsler (AAV), herpes simpleks virüs (HSV), ve vaccinia virüs'dür. Seçilecek virüs, hedef hücreye ve geçici veya uzun süreli gen ekspresyonu ihtiyacına göre belirlenmektedir. Geliştirilen çeşitli vektör sistemleri aşağıda özetlenmiştir (4).

## 1. VİRAL SİSTEMLER:

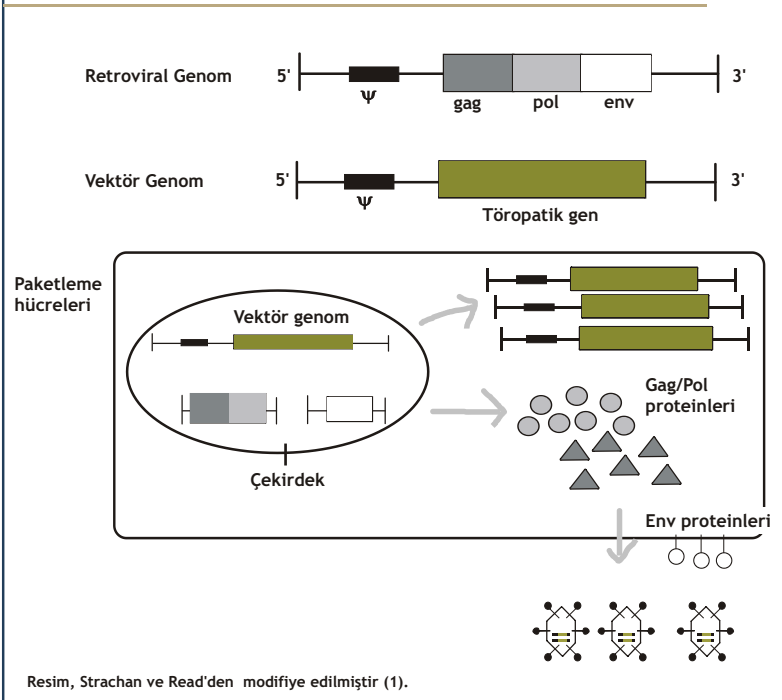
### a. Retroviral vektörler:

Çoğunlukla Moloney fare lösemi virüsü (MoMLV) kaynaklı vektörlerdir(5). Retrovirüsler RNA virüsleridir ve taşıdıkları reverz transkriptaz sayesinde genomlarından cDNA sentezleyebilirler. Retrovirüsler, enfekte ettikleri hücrelerin sitoplazmalarına nükleoprotein kompleksi (preintegrasyon kompleksi) taşırlar. Bu kompleks viral RNA genomunun reverz-transkripsiyonunu ve oluşan cDNA'nın konakçı hücrenin kromozomunda herhangi bir yere rastgele girmesini sağlar. Konakçı kromozomuna ulaşabilmesi için retroviral cDNA gereklidir ve erişim sadece hücre bölünmesi esnasında çekirdek membranı kaybolduğunda gerçekleşebilir. Bu nedenle retrovirüsler sadece bölünen hücreleri enfekte edebilirler. Bu durum retroviral vektörlerin kullanımını sınırlamaktadır. Ancak sadece çoğalan hücrelere gen aktarılabilir potansiyeli olması kanser tedavisinde avantaj yaratmaktadır. Örneğin beyin tümörlerinde kullanımı (çoğalmayan normal beyin hücreleri arasında aktif olarak çoğalan kanser hücrelerine terapötik geni seçici olarak aktarabileceğinden dolayı) oldukça güvenlidir.

Doğal retrovirüslerin hücreleri transformasyona uğratma

yeteneğinden dolayı bu olasılığı ortadan kaldırmak için gen tedavisinde kullanılan retrovirüsler genetik olarak değiştirilmiştir. Retrovirüslerin normalde üç transkripsiyon ünitesi vardır. Bunlar; *gag*, *pol* ve *env*'dir. *sis*-etkili RNA elemanı ise viral proteinlerin RNA'yı paketleyebilmesi için gerekli olan RNA tanıma bölgesidir. Vektörde *gag*, *pol* ve *env* genleri çıkarılmıştır ve bu bölgeye terapötik gen klonlanır. Retroviral vektörlerin klonlama kapasitesi 8 kb'dir. Terapötik geni taşıyan vektörün paketlenmesi *gag*, *pol* ve *env* fonksiyonu olan ama bütün retroviral genomu içermeyen özel bir hücre ile sağlanır (**Şekil 2**). Homolog rekombinasyon ile vektörün bu hücrelerden viral proteinleri kodlayan genleri tekrar kazanmaması, yani replikasyon komponenti virüs (RCV) oluşumunu önlemek için, bu genlerin hücrede lokalizasyonu tek bir ekspresyon vektörü üzerinde bulundurulmamaktadır. Her bir gen farklı ekspresyon vektörü üzerinde bulunacak şekilde hücre tasarımı yapılmaktadır. Böylelikle gen tedavisinde kullanılan retroviral vektörün doğal virüs formuna dönüşme olasılığı çok

**Şekil 2.** Retroviral vektörler ve paketlenme hücre serileri



Resim, Strachan ve Read'den modifiye edilmiştir (1).

azaltılabilmektedir. *Gag* ve *pol*'un bir vektörde, *env*'nin diğer vektör üzerinde bulunduğu hücre serilerinde (rekombinasyon olasılığının 1/10 000 olduğu göz önüne alındığında) retroviral vektörün patojenite kazanma olasılığı  $10^{-8}$  olacaktır. Retroviral vektörlerin üretildiği paketleme hücrelerinin (*virus producer cells-VPC*) fare kaynaklı olması insanlarda antikor oluşumu ve kompleman aktivasyonuna bağlı olarak gen tedavisi etkinliğinin düşük olmasına yol açabilmektedir (6). Bu nedenle insan hücresi kaynaklı paketleme hücre serileri geliştirilmeye ve klinik deneme protokolleri oluşturulmaya çalışılmaktadır (7). Retroviral vektörlerin uzun uç tekrarları (5'-LTR) bölgesindeki promotor bölgeleri dokuya özgü promotorlar ile değiştirilerek gen tedavisinde doku hedeflemesi de sağlanabilmektedir (8).

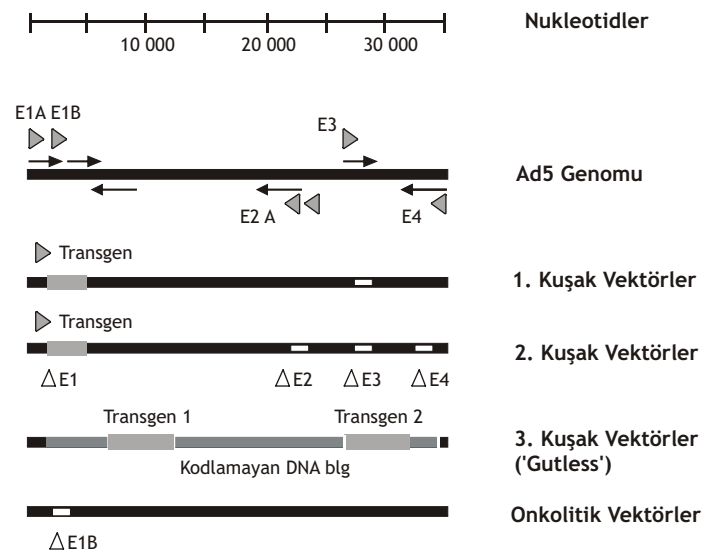
Retroviral vektörlerin hücelere DNA aktarım etkinliği yüksektir ve erken dönem gen tedavisi

denemelerinin çoğunluğunda kullanılmışlardır. Ancak, insersiyonal mutasyon riski nedeni ile aşağıda anlatılan diğer vektörlere yönelinmiştir.

### b. Adenoviral vektörler:

Adenovirüsler (Ad) insanlarda üst solunum yolu enfeksiyonu yapan zarfsız çift iplikli DNA virüsleridir. Şimdiye kadar 51 farklı insan adenovirüs serotipi bilinmektedir. Gen tedavisi vektörleri genellikle Ad2 ve Ad5 virüs kaynaklıdır. Ad virüsler, yüksek nükleer transfer etkinliği, geniş doku tropizmi ve düşük patojenite özellikleri nedeniyle vektör geliştirilmesinde tercih sebebi olmuşlardır. Adenoviral vektörler yüksek titrelerde (retrovirallerden çok daha fazla) üretilebilmektedir ve hem çoğalan hem de çoğalmayan hücelere etkin gen transferi yapabilmektedirler. Lineer çift-sarmal DNA'sı hücre nükleusunda konakçı genomuna entegre olmadan epizomal kalmaktadır. Yukarıda

Şekil 3. Adenoviral Vektörler



Adenoviral vektörlerin 1. kuşağında E1(+/- E3)-delesiyonları, 2. kuşağında E1(+/- E3) ve E2/4 delesiyonları vardır. 3. kuşakta viral genomun kodlayan kısmının büyük bölümü çıkarılmıştır. Onkolitik vektörler ise E1B geni dışında tüm viral genomu taşımaktadır. Resim, Volpers ve Kochanek'in makalesinden modifiye edilmiştir (9). E1; Erken fonksiyonları düzenler. Virüs replikasyonu için gerekli, E2; Replikasyonda rol oynayan proteinler ve DNA polimerazı kodlar, E3; Patojenitede önemli: Enfekte olmuş hücrelerin yüzeyine MHC I'in gelmesini engeller, enfekte hücrelerin lizisini önler, E4; Gen ekspresyonunu düzenleyen genleri kodlar.

anlatıldığı üzere, bu özellik biyogüvenlik açısından avantaj, uzun süreli ekspresyon sağlayamadığından dezavantaj oluşturmaktadır. Retroviral vektörler de olduğu gibi adenoviral vektörlerin de üretilebilmesi için yardımcı hücelere ihtiyaç vardır. Adenoviral vektörlerin genomu (26-45 kb; ör. Ad5 35 kb'dır) büyük olduğundan dolayı başlangıçta farklı defektif gen bölgeleri içeren çeşitli vektörler üretilebilmiştir (9). Birinci kuşak vektörlerde DNA sentezini ve geç viral ekspresyonu kodlayan E1 bölgesi çıkarılmıştır. İkinci kuşak vektörler de ise E1'e ilaveten E2 ve E4 bölgeleri çıkarılmıştır (Şekil 3). Ancak bunların adenoviral proteinlere bağlı immünojenitesi yüksek olduğundan dolayı, daha sonra tüm viral genlerin çıkarıldığı ve replikasyon orijin bölgesinde olan ITR ('tersdönmüş uç tekrarlar-inverted terminal repeats' ve paketleme sinyalinin ( $\Psi$ ) bırakıldığı

'gutless' veya yardımcı-bağımlı vektörler geliştirilmiştir (9). 'Gutless' vektörler 35 kb'lık terapötik DNA'yı taşıyabilmektedir. Viral gen ekspresyonunun olmaması bu vektörlerin toksisitesini ve immünojenitesinin çok azaltmıştır. 'Gutless' Ad vektörler karaciğer hücrelerinde transgen ekspresyonunu bir yıldan fazla sağlayabilmektedir. Ancak, 'gutless' vektörlerin üretilebilmesi için viral gen fonksiyonlarının sağlandığı yardımcı hücrelere ihtiyaç vardır. Düzenleyici ve yapısal viral proteinlerin hepsini gerektiği zamanda ve miktarda üretebilen hücre serileri henüz istenilen düzeyde geliştirilebilmiş değildir. Bu nedenle, 'gutless' vektörleri üretmek halihazırda çok zordur.

Ad2 ve 5 serotipinin, birçok hücrede bulunan Coxsackie ve adenovirüs reseptörleri ile primer olarak hücreye tutunması ve  $\alpha_v$  integrinler ile de hücreye girmesi geniş doku tropizmi sağlamaktadır (10, 11). Dolayısı ile hedeflenmeyen dokularda da gen ekspresyonuna yol açacağından sistemik kullanımları sakınca oluşturmaktadır. En büyük problem ise yüksek immünojeniteleridir. 1999 yılında Faz I ornitin transkarbamilaz (OTC) yetmezliği gen tedavisi denemesi esnasında Jesse Gelsinger  $6 \times 10^{13}$  ikinci kuşak rekombinant adenoviral partikülünü intra-hepatik enjeksiyon ile aldıktan iki gün sonra kuvvetle muhtemel Ad vektörün tetiklediği sitokin salınımın yol açtığı yaygın intravasküler koagülasyon, akut pulmoner ve multiorgan yetmezliği nedeniyle ölmüştür (12). Diğer denemelerdeki hastalar daha az ama belirgin bir inflamatuvar cevap geliştirmiştir. Adenoviral vektörlerin diğer bir dezavantajı ise kısa süreli ekspresyon sağlayabilmeleridir. Birinci kuşak rekombinant adenoviral vektörlerin kullanıldığı kistik fibrozis gen tedavisi denemelerinde transgen ekspresyonu ikinci hafta sonunda azalmaya başlamış, dördüncü haftada ise kaybolmuştur. Sürekli ekspresyon için tekrarlayan uygulamalar gerekmektedir ve bu da immün cevabı şiddetlendirmektedir. Ad vektör partiküllerine karşı tipe özgü nötralizan antikörlerin gelişmesi vektörün tekrarlayan uygulamalarını sınırlayabilmektedir. Bu sorunu çözmek için gen transferi esnasında geçici

immün supresyon yapılması yanı sıra tekrarlayan uygulamalarda farklı serotip veya hayvan adenovirüs kaynaklı vektör alternatifleri üzerinde çalışılmaktadır (13, 14).

Belki de adenoviral vektörler gerçek kullanım yerini yüksek fakat geçici transgen ekspresyonunun istendiği durumlarda bulacaklardır (örneğin kanser hücrelerinin öldürülmesi için). Bu amaçla, Ad virüslerin onkolitik vektör olarak tasarlanan formlarında, virüsün sadece replikasyon orijininde modifikasyon vardır. Kondisyonel replikatif vektör olarak da isimlendiren bu vektörler herhangi bir transgen taşımaz (Şekil 3). Ad vektörlerin replikasyon bölgeleri bazı hücre döngüsü düzenleyici proteinlerine bağlanmaktadır. Örneğin Ad-E1A replikasyon bölgesi pRB'e bağlanır. E1A, S-fazına girişi uyarır ve viral enfeksiyon için kritik olan viral ve hücre genleri trans-aktif eder. E1A bölgesi defektif virüsler (dl922-947) pRB'e bağlanmadığından E2F'i (hücreyi S fazına geçiren faktör) pRB'den kurtaramaz ve dolayısı ile virüs çoğalması gerçekleşemez. Bu nedenle normal hücrelerde Ad-E1A virüsleri çoğalamaz, ancak pRB yolağı anormallikleri olan tümörlerde çoğalarak tümör hücrelerini lizise uğratmaktadır. Ad-E1B ise p53'e bağlanarak virüsün çoğaldığı hücrelerin apoptozise gitmesini önler. E1B bölümü defektif adenoviral virüsler (ONYX-015 veya dl1520) normal hücrelerde p53 blokajı yapamayacağından apoptozis ve büyüme tutuklanması nedeniyle çoğalamayacaktır, p53 mutasyonu ile giden kanser hücrelerinde ise virüsler çoğalarak hücreleri lizise uğratacaktır. ONYX-015, baş-boyun kanserlerinde faz II klinik denemelerde kemoterapi ile birlikte kullanılmaktadır (15). Diğer bir yaklaşım ise E1A ve E1B gen ekspresyonunu tümör veya doku tipine özgü promotörlerin kontrolünde sağlamaktır. Onkolitik adenovirüsler ile elde edilen sınırlı klinik denemeler bu ajanların güvenli olduğunu, ancak kombine tedaviler ile yeterli klinik cevaplar alınabildiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, intihar (GDEPT) gen veya immün-modulator gen eksprese eden rekombinant onkolitik vektörler geliştirilmeye



çalışılmaktadır (16).

### c. Adeno-asosiyal viral vektörler:

Adeno-asosiyal virüsler (AAV) zarfsız, tek-iplikli DNA virüsleridir. Parvovirüs ailesine ait olan AAV'lerin replikasyonları için adeno- veya herpes virüslerin yardımına ihtiyaçları vardır. Çoğu AAV-kaynaklı vektörlerde AAV serotip 2 kullanılmıştır. AAV-2'nin primer reseptörleri heparin sülfat proteoglikanlar, yardımcı reseptörleri ise fibroblast büyüme faktör 1 reseptörü ve  $\alpha_v\beta_5$  integrinler'dir ve yaygın doku tropizmleri vardır. Retina ve havayolu epitel hücreleri tropizmi olan AAV-5, iskelet kaslarına gen aktarımı çok etkin olan AAV-6, karaciğer tropizmi gösteren AAV-8 serotipleri sırası ile kistik fibroz, kas distrofileri ve hemofili gen tedavileri için geliştirilmektedir (16). Patojenik olmayan modifiye edilmemiş AAV 2, insan hücrelerinde 19. kromozomun q13.3-qter bölgesinde özgün bir bölgeye entegre olarak latent enfeksiyona yol açar. Bu özelliği sayesinde, risk oluşturmadan uzun süreli transgen ekspresyonu yapabilmektedir. Ancak, spesifik entegrasyonu sağlayan virüsün *rep* proteinidir ve *rep* geni gen tedavisi vektörlerinden çıkarılmıştır. AAV vektörlerinde *rep* geni yanı sıra *cap* geni de olmak üzere AAV genomunun %96'sı çıkarılmıştır. Vektörde virüsten sadece uçlardaki ters dönmüş tekrarları kalmıştır. Diğer sistemlerde olduğu gibi virüs partiküllerinin üretilmesi için gerekli genler (*rep* ve *cap* AAV genleri, *E2a*, *E4 adenoviral genleri dahil*) paketleme hücreleri (HEK 293) tarafından sağlanmaktadır. Paketleme hücrelerinde eksik olan ise AAV'nin ters dönmüş uç tekrarlarıdır. Rekombinant vektör hiç viral gen içermediğinden yüksek düzeyde güvenlik sağlar. Ancak, AAV genomu çok küçük olduğundan sadece 4.5 kb uzunluğunda DNA taşıyabilir. Nispeten kısa DNA dizileri taşıyabilmesi ve yüksek titrelerde üretilmemesi bu vektörün de kullanım alanını sınırlamaktadır (17). AAV vektörler ile kistik fibrozis faz I klinik denemelerinde cesaret verici sonuçlar alınmış ve hücre immün cevabın gözlenmemiş olması AAV vektörlerin gen tedavisinde etkili bir sistem olabileceği konusunda umut ışığı olmuştur. Ancak Hemofili B deneme protokolü intrahepatik artere

uygulanması nedeniyle karaciğer hasarı ve vektöre karşı immün cevap geliştirme potansiyeli taşımaktadır. AAV vektörler için diğer bir sorun da, çok kişide nötralizan antikorların bulunmasıdır. Değişik serotiplerin kullanılması bu sorun için bir çözüm olabilir (16).

### d. Herpes simplex virüs (HSV) vektörleri:

HSV vektörleri santral sinir sistemi için tropizm gösterir. 152 kb'lık çift-iplikli DNA genomu ve en az 80 gen içermesi ile kompleks bir virüstür. Kromozoma entegre olmaz ancak duysal ganglionlarda yaşam boyu süren latent enfeksiyon oluşturabilirler. Latent kalma mekanizması ile transgenin uzun süreli ekspresyonunu sağlayabilme potansiyeli mevcuttur. Parkinson hastalığı ve santral sinir sistemi tümörleri gibi durumlarda nöronlara gen transferi ana uygulama alanı olabilecektir ancak pratikte kullanım için henüz erken dönemde olan vektörlerdir (18). Gen taşıma kapasitesinin en az 30 kb olması en önemli avantajıdır. Ayrıca sistemik toksisite çıktığı taktirde asiklovir gibi antiherpetik ilaçlar ile viral replikasyonun durdurulma avantajına sahiptir. Ancak latent duruma geçince HSV'nin, vektöre takılan terapötik gen dahil tüm genlerin ekspresyonunu susturması dezavantaj oluşturmaktadır. Latent dönemde sadece HSV'nin LAT bölgesi aktif kalmaktadır. LAT bölgesi LATP1 ve LATP2 promotörlerinin kontrolü altındadır ve latent süreçle ilişkili transkriptleri oluşturmaktadır. Terapötik genin LAT bölgesine klonlanması belki de bu problemi çözebilecektir (19). HSV I genleri de modifiye edilerek onkolitik özellik kazandırılmaktadır. Onkolitik HSV I vektörleri ve klinik denemeleri ile ilgili daha ayrıntılı bilgi Young ve ark. tarafından yayınlanan derlemede bulunabilir (16).

### e. Poxvirus/Vaccinia virüs vektörleri:

Çiçek hastalığının eradikasyonundan önce aşı suşu olarak kullanılan Poxvirüs kaynaklı Vaccinia virüsü günümüzde gen tedavisi aracı olarak tekrar gündeme gelmiştir. 200 kb büyüklüğünde genoma sahip Vaccinia virüsünün klonlama kapasitesi yüksektir (25 kb) ve konakçı genomuna entegre



olmaz. Çoğu memeli hücrelerini enfekte edebilir. Ancak tüm virüs genlerini bünyesinde bulundurması ve replikasyon özelliği olması nedeniyle immün cevap gibi yan etkiler oluşturabilir. Tümör hücreleri söz konusu olduğunda bağışık yanıt avantaj olabilmektedir. Vaccinia ile melanomada immünoterapinin Faz III klinik deneme verileri açıklanmıştır (20).

#### f. Diğer:

Klinik deneme protokolleri oluşturulmuş yukarıdaki vektörlere ilaveten laboratuvarlarda birçok farklı virüs grubundan da vektör geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunların başlıcaları ise Alfavirüs ve Lentiviral vektörlerdir. Alfavirüsler, Togaviridae ailesinin bir üyesidir ve tek-iplikli RNA virüsüdür. Vektör olarak benzer özelliklere sahip üç değişik virüs kullanılmaktadır. Bunlar: *Semliki forest virüs (SFV)*, *Sindbis virüs (SIN)*, ve *Venezuelan equine encephalitis virüs (VEE)*'dir. Gen aktarım aracı olarak kullanılan çoğu alfavirüs vektörü replikasyon yapamaz ve replikasyonu için gerekli genler yardımcı hücrelerden sağlanır. Ancak intratümöral gen aktarımında kullanılmak için replikasyon özelliği olan vektörler de yapılmıştır. Bu vektörler doğal alfavirüsün tüm genlerini taşımaktadır. Alfavirüslerin hücre toksitesi yüksek ve hücre tropizmi geniş olduğundan birçok tümörün gen tedavisi için uygundur. Rekombinant alfavirüslerin intratümöral enjeksiyonu tümör hücrelerinde apoptozisi tetiklemektedir (21). Lentiviral virüsler ise bölünmeyen hücreleri de enfekte edebilen özelleşmiş diploid retrovirüslerdir (22). İmmün sistemi tetiklememeleri ve yüksek düzeyde gen ekspresyonu sağlamaları diğer önemli avantajlarıdır. Çoğu lentiviral vektörlerin kaynağı insan HIV (*human immunodeficiency virüs*) virüsüdür. Diğer retrovirüsler gibi genoma rastgele entegre olması nedeniyle benzer güvenlik sorunları taşımaktadır. HIV genomu standard retrovirüslerin genomundan çok daha karmaşıktır. Standard retrovirüslerde bulunan transkripsiyon ünitelerine ilaveten *tat* ve *rev* genleri vardır. Gereksiz genlerin çıkarılması, güvenli paketleme hücre serilerinin oluşturulması ve bunları yaparken vektörün

bölünmeyen hücrelere transdüksiyon kabiliyetinin korunması için çok çaba harcanmıştır. Güvenliği artırmak amacıyla kendini inaktive eden vektörler geliştirilmeye çalışılmaktadır (23). Rekombinasyon komponenti virüslerin oluşma potansiyeli nedeniyle domestik kedilerde HIV benzeri tabloya yol açan FIV (*feline immunodeficiency virüs*) ve atlarda anemiye yol açan bir lentivirüs olan EIAV (*equine infectious anemia virus*) virüs tabanlı vektör sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Lentiviral vektörleri kullanan sınırlı sayıda klinik deneme protokolü onaylanmış bulunmaktadır.

## 2. VİRÜS HARİCİ VEKTÖR SİSTEMLERİ :

Virüs haricindeki vektör sistemlerinin üretimi kolay ve göreceli olarak ucuzdur, paketleme kapasiteleri büyüktür ve herşeyden önemlisi biyogüvenirliliği yüksektir. Laboratuvarında yabancı DNA'yı hücre içine aktarma görece olarak kolaydır ve viral sistemlerin güvenlik problemlerinin kontrol altına alınmadığı durumlarda bu yöntemlerin bazılarının gen tedavisinde kullanılma potansiyeli vardır. Ancak günümüzde tüm bu yöntemlerin, düşük gen transfer etkinliği ve kısa süreli ekspresyon oluşturabilme problemleri vardır.

### a. Lipozomlar:

Lipozomlar, memeli hücrelerinin membran yapısı model alınarak yapay olarak belli lipidlerin sıvı ortamda karıştırılması ile oluşturulan sentetik araçlardır. Lipozomlar, virozomlar, katyonik lipidler, lipopolilizinler, polikasyon konjugatlar gibi çeşitli formları vardır. Örneğin fosfolipidler, biyolojik membranların yapısını taklit eden çift tabakalı araç oluşturur. Fosfolipidlerin oluşturduğu araçta hidrofilik fosfat grupları dış tarafta, hidrofobik lipid kuyrukları iç tarafta bulunur. Aktarılabilecek DNA in vitro lipozom ile paketlenir ve in vivo hedef dokuya doğrudan gen transferi için kullanılır. Lipozom-DNA kompleksi lipopleks, polimer-DNA kompleksi ise polipleks olarak adlandırılır. Katyonik lipozomların pozitif yüzey yükü olduğundan DNA ile doğal olarak kompleks oluşturur. Ancak anyonik ve nötral lipozomların DNA ile kompleks oluşturabilmesi için

DNA'nın başka araçların içine konulması gerekir. DNA'nın lipid kılıf ile sarılması DNA'nın in vivo ortamda parçalanmasını önler ve hücre içine endositoz ile alınmasını sağlar. Katyonik lipozomların gen aktarım etkinliği daha iyi olduğundan (negatif yüklü membranlara kolaylıkla penetre olur) ve hücre içinde aktarılan DNA'yı yıkımdan etkin bir şekilde koruyabildiğinden, gen aktarım deneylerinde en fazla tercih edilen formdur (24). Viral vektörlerden farklı olarak DNA-lipid kompleksini hazırlamak kolaydır ve aktarılan genin büyüklüğünü sınırlayan bir durum yoktur. Ancak, gen aktarım etkinliği viral vektörlerden 10 000 kez düşüktür ve aktarılan DNA kromozomal DNA içine entegre olacak şekilde tasarlanmamıştır. Özellikle çoğalan hücrelerde gen yoğunluğunun düşmesi önemli bir problemdir ve transgen ekspresyonunun kısa süreli olmasına yol açmaktadır.

#### **b. Elektroporasyon:**

Çıplak DNA, bazı durumlarda hedef dokuya, örneğin kasa, enjeksiyon ile doğrudan uygulanabilir. Direkt uygulamada diğer bir seçenek ise elektroporasyondur. Bu metod, kısa elektrik uyarıları vererek transmembran potansiyelinin indüklenmesine ve hücre zarında küçük aralıklar açılmasını sağlar. Oluşan bu aralıklardan DNA hücreye daha kolay girer. Her doku özgün ve kendine has özellikleri olduğundan dolayı etkin bir transfeksiyon için optimal elektroporasyon koşulları yoktur. Transfeksiyon etkinliği hem elektrik akımının amplitüd ve süresine hem de DNA yoğunluğuna bağlıdır. İn vitro koşullarda birkaç kilovoltluk voltaj ve birkaç mikrosaniyelik akım süresi optimal olabilirken, in vivo koşullarda onlar hatta yüzlerce kilovolt ve milisaniyelik akım gereklidir (25). Elektroporasyonun in vivo uygulaması hedef dokuya in situ elektrodlar takılarak uygulanmaktadır. Kas, beyin, deri, karaciğer ve tümör dokularına elektroporasyonla başarılı gen aktarımları yapılmıştır.

#### **c. Doğrudan enjeksiyon veya partikül bombardımanı:**

Elektroporasyona benzer diğer bir yöntem

partikül bombardımanı (biyolistik veya 'gene gun') tekniğidir. Metal (altın) parçacıklarının üzerine kaplanan DNA özel bir tabancadan hücreye yüksek basınç ve hız altında (sıkıştırılmış helyum yardımı ile) ateşlenir. Bu basit ve nispeten güvenli yöntemle bazı dokulara başarılı gen aktarımı yapılmıştır. Ancak bu enjeksiyon yöntemiyle de gen aktarım etkinliği düşüktür ve enjekte edilen DNA hücre genomuna kararlı bir şekilde entegre olamamaktadır. Kas gibi düzenli olarak çoğalmayan dokularda DNA dayanıklılığı çok önemli olmayabileceğinden ve aylarca enjekte edildiği kasta ekspresyonuna devam edebileceğinden dolayı, bu yöntemin ilk uygulamaları 'Duchenne muscular dystrophy' fare modelinde (*mdx fareleri*) distrofin geninin aktarımı şeklinde olmuştur (26). Distrofin geninin büyüklüğü nedeni ile bir minigen kullanılmıştır. Minigen, distrofin cDNA ve buna takılı yüksek düzeyde ekspresyonu güvence altına alan düzenleyici bir dizi (örneğin *kuvvetli bir viral promotor*) içermiştir ve kasa doğrudan intramüsküler enjeksiyon ile uygulanmıştır.

#### **d. Reseptör aracılı endositoz:**

Bu yöntemde aktarılacak DNA, özgün hücre yüzey reseptörüne bağlanabilen ve dolayısı ile endositozu indükleyip DNA'nın hücre içine alınmasını sağlayabilecek hedefleyici bir moleküle takılır. Örneğin; hepatositler serumu asialoglikoproteinlerden yüzeylerindeki reseptörler sayesinde temizleyebilirler. Polilizine (pozitif yüklü) kovalan bağla bağlı asialoglikoproteinler DNA'ya (negatif yüklü) elektrostatik etkileşimler ile dönüşebilir nitelikte bağlanır. Eğer bu kompleksin karaciğere infüzyonu safra yolu veya vasküler olarak gerçekleştirilirse hepatositler tarafından seçici alınır. Daha genel bir yaklaşım ise, bir çok hücrede eksprese edilen ancak proliferen olan hücrelerde ve hematopoetik hücrelerde daha fazla olan transferrin reseptörünü kullanmaktır.

Bu şekilde alınan maddeler genelde lizozoma yönlendirilir ve DNA'nın hücre çekirdeğine ulaşabilmesi için bazı kaçış mekanizmaları olması gerekir. Özellikle taşıdığı DNA'yı sitoplazmaya

bırakamayan bazı polipeksler endozom-litik ajanlar ile birlikte kullanılmalıdır. Bir seçenek adenovirüs veya adenovirüs proteinlerini birlikte vermektir. Bu erken endozomu yıkar ve içeriğinin kaçmasını sağlar (17). Gen transfer etkinliği yüksektir ancak bu metod transfer edilen genin hücrenin genomuna entegrasyonuna izin vermez.

#### e. Bakteri aracılı gen transferi:

Bakteri aracılı DNA aktarımı son yıllarda çalışılan yeni bir gen aktarımı yaklaşımıdır. Saklama ve üretme koşullarının kolaylığı, taşıyabilecekleri ve aktarabilecekleri DNA miktarının büyük olması, hücreden hücreye yayılabilme özelliği ile non-replik vektörlerin ulaşamayacağı yerlere gidebilmesi nedeniyle gerek in vitro gerekse in vivo transgen uygulamaları için umut vermektedir. Bakteri aracılı gen transferinde aktarılacak gen öncelikle ökaryotik ekspresyon vektörüne takılır. Bakteriyel sistemler enfeksiyon hastalıklarında heterolog antijen taşıyarak aşılama için kullanılabilirdiği gibi onkolojide immünotedavi, onkolitik ve tümör hedefleme yetisi vardır. Bu amaçla kullanılan bakteriler arasında zayıflatılmış *S. typhimurium* suşları başta olmak üzere *L. monocytogenes*, *Shigella*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* ve *invaziv E. coli* sayılabilir (27). *Bifidobacteria* ve *Clostridia* zorunlu anaerobik bakteri olmalarından dolayı nekrotik/hipoksik merkezli büyük tümörlerin lizisini sağlayabilmekte ancak küçük metastatik lezyonlarda etkisiz kalmaktadırlar. 1960'lı yıllarda insan klinik denemelerinde kullanılan toksin oluşturmeyen *Clostridia* sporları tümör kitleleri içinde abse oluşturmaya rağmen tümör gerilemesini sağlayamamıştır (28). Klinik etkinliğin saptanamamasından dolayı klinik denemelere devam edilmemiştir. Son zamanlarda *Clostridium*'un tümör hedefleme özelliği pro-drug aktive eden enzimlerin selektif aktarımı için denemeye başlamıştır ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. *Clostridia*'nin daha güvenli alternatifi nonpatojen ve spor oluşturmeyen *Bifidobacteria*'dır. Endostatin genini kodlayan plazmidi taşıyan *Bifidobacterium adolescentis* deneysel karaciğer tümörlerinde anjiogenezi ve

tümör büyümesini baskılamıştır (29). Fakültatif anaerobik olan *Salmonella*'nın ise onkolitik potansiyeli hipoksik merkezli büyük tümörlerin yanısıra oksijenlenen küçük metastatik lezyonlarda da vardır. İmmünomodulator sitokin (TGF-1, IL-10) genlerini taşıyan *invaziv E. coli* ve *Lactococcus lactis* suşları ise enflamatuar barsak hastalıklarında denenmektedir.

Bu yöntemin aktarım etkinliği yüksek olmasına rağmen bizim (henüz yayınlanmamış bulgularımızda) ve diğer birçok çalışma grubunun gözlemlediği önemli bir problem, plazmid kararsızlığı ve bunun sonucunda plazmidin hücrede kaybolması ve kararsız ekspresyon göstermesidir (30). Bu problemlerin en önemli sebeplerinden birisi yüksek kopya sayılı plazmidler kullanılmasıdır. Rekombinant proteinlerin üretiminde tercih edilen yüksek kopya sayılı plazmidler yüksek gen dozajına bağlı yüksek ekspresyon düzeyi sağlamaktadır. Ancak bazı durumlarda kopya sayısının artması gen ürününün artışını sağlayamaz. Bu muhtemelen hücrenin sınırlı transkripsiyon ve translasyon kapasitesinden dolayıdır. Plazmid replikasyonu ve rekombinant gen ekspresyonundan kaynaklanan metabolik yük büyüme hızını yavaşlatarak ürün oluşumunu düşmesine yol açabilir. Protein ekspresyonu sadece plazmid kopya sayısına değil, aynı zamanda promotör gücüne, mRNA kararlılığına, proteolize, ve protein katlanmasına da bağlıdır. Tüm bu faktörler plazmid kararlılığını etkilemektedir. Çeşitli araştırma merkezleri daha kararlı düşük kopya sayılı plazmidler geliştirmeye çalışırken diğer yandan da aktarılan plazmidin hücre içindeki kaderini belirleyen olayları aydınlatmaya çalışmaktadır (30, 31). Regulasyon veya replikasyon proteinlerini kodlayan yapısal genlerdeki delesyon, insersiyon veya nokta mutasyonları kopya sayısını değiştirebilir. Plazmid üzerindeki ters dönmüş tekrarlar veya özgün ikincil yapılar DNA onarım sistemlerinin hedefi haline gelmekte, UV onarım sistemi ve SOS sistemi tarafından plazmid DNA'sını parçalara ayırabilmektedir. İlgili DNA onarım genlerini taşımayan üretim suşları plazmid

kararlılığını artırmaktadır.

Töropatik geni taşımak üzere kullanılan plazmidlerin hücre bölünmesi esnasında dağılımı eşit olmamakta ve bazı hücreler birden fazla plazmid içerirken bazıları ise hiç plazmid içermemekte, dolayısı ile bir süre sonra ortama rekombinant plazmidi içermeyen hücreler hakim olmaktadır. Bu nedenle bakteri aracılı gen tedavisinde plazmid kararlılığı için selektif ortamlar kullanılmaktadır. Rekombinant protein üretiminde en yaygın kullanılan selektif sistemler antibiyotiklerdir. Ancak, bakteri aracılı gen tedavisinde kullanılan plazmidler antibiyotik geni taşımamalıdır çünkü dirençlilik genleri horizontal gen transferi ile patojenik mikroorganizmalara aktarılabilir. Ayrıca allerjik problemler ortaya çıkabilmektedir. Amerikan Besin ve İlaç Yönetimi FDA tarafından onaylanan tek antibiyotik ise insanlarda az kullanılmaları nedeni ile kanamisinidir ([www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-armg.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-armg.html)). Plazmidlere direnç geni eklemekten ama yine antibiyotikli ortamda kararlılığı sağlanabilen bir yöntem Williams ve arkadaşlarının geliştirdiği represör titrasyon metodudur (32). Bu yöntemde dirençlilik geni plazmidi taşıyan suşun kromozomuna örneğin lac promotörünün aşağısına entegre edilir. Lac represör geni de kromozoma lokalizedir. Normal koşullarda dirençlilik geni ekspresyonu represör protein nedeniyle baskılanmış durumdadır ve kanamisinli ortamda üremez. Bir veya birden fazla lac promotör taşıyan yüksek kopya sayılı plazmid hücreye aktarıncaya represör yetersiz kalacağından hücreler kanamisinli ortamda üreyebilir. Bunun yanı sıra antibiyotiksiz seleksiyon sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlardan pCOR sistemi klinik denemelere girmiştir. pCOR plazmidi supresör tRNA geni taşımaktadır ve bunun protein ürünü antibiyotik yerine seleksiyonda kullanılmaktadır. Çoğaltıldığı E.coli hücresinde ise argE geninde amber mutasyon vardır. Yani arginin için 'auxotrophic'tir. argE arginin sentezinde önemli olan N-asetil ornitinazi kodlar. Supresör tRNA ise amber mutant bölgeyi okuyup protein sentezinin devamını sağlayabilir. Böylelikle ancak plazmidi taşıyan hücreler çoğalabilmektedir

(33). Segregasyon sonrası plazmidsiz hücrelerin eleyen diğer bir sistem ise Hok/sok stabilizasyon sistemidir (34). Hok gen ürünü öldürücüdür. Hok geni bakteri kromozomu üzerinde zayıf konstitüf promotör altındadır fakat mRNA'sı kararlıdır. Katil Hok genini baskılayan Sok geni ise plazmid üzerine takılıdır. Sok geni Hok mRNA'sına komplementer 'antisense' RNA kodlar ve plazmid üzerinde güçlü konstitüf promotör altındadır fakat mRNA'sı kararsızdır. Dolayısı ile hücre bölünmesi sonrası plazmid içermeyen bakteriler kontrolsüz kalan Hok protein ürünü nedeniyle eleneceklerdir.

Daha kararlı plazmid sistemlerinin geliştirilmesi üretilme ve kontrol kolaylığı olan bakteri aracılı gen transferinin daha etkin bir hale getirilmesini sağlayabilecektir.

### 3. HİBRİD VEKTÖR SİSTEMLERİ:

Her vektör sisteminin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunduğu vektörlerin kombine olarak kullanılmaları dezavantajlarını aşabilmenin bir yolu olabilir. Çeşitli hibrid vektörler bilinmekte olup bunların başlıcaları virozomlardır (17, 24). Virozomların bazı formları, Lipopleks (DNA-lipozom kompleksi) ve inaktive HVJ virüs (Japon hemaglutinasyon virüsü) veya influenza virüsü kombinasyonu ile oluşturulmuşlardır. Solunum yoluna gen transferi potansiyeli yalnız başına katyonik lipozomlar veya viral vektörleri uygulayan yöntemlere göre daha yüksektir. İmmünolojik olarak iyi tolere edildiklerinden tekrarlayan uygulamaların transfer etkinliği ve güvenliği üzerinde olumsuz etkisi yoktur. Katyonik lipozomlar veya polimerler basitçe adenoviral vektörler ile karıştırılıp uygulanır. Bu yöntem özellikle viral reseptörü olmayan hücrelere gen aktarımında faydalıdır. Ayrıca, inaktif adenovirüsler katyonik lipozomların veya polimerlerin transfer etkinliğini artırmaktadır. Virüs-virüs kombinasyonları diğer bir hibrid sistemdir. Böylelikle, her bir viral vektörün avantajlarından faydalanılır. Örneğin adenovirüs ile Epstein-Barr virüsünün (EBV) hibridleri yüksek titrelerde elde edilebilir (adenovirüs sayesinde) ve

hücrede epizom olarak uzun süreli kalabilir (EBV'in EBNA1 geni vektörün nükleusa transferini güvence altına alarak gen dilüsyonunu önler).

## GEN TEDAVİSİ VEKTÖRLERİNİN GÜVENİRLİLİĞİ

Gen tedavisinin pratikte yaygın uygulama alanı bulabilmesi tedavi genlerinin hücrelere yeterli yüksek dozlarda aktarılabilmesine, genin hastalıklı hücreleri hedefleyebilmesine ve aktarılan yeni genlerin vücut tarafından sıkı kontrol altında tutabilme yollarının geliştirilmesine ve dolayısı ile biyogüvenlik problemlerinin aşılmasına bağlıdır. Diğer biyoteknoloji ürünlerinde olduğu gibi prelinik hayvan modellerini kullanarak güvenilirlik değerlendirmesinde iki nokta göz önünde bulundurulur: 1) hayvan türünün ve fizyolojik/hasta durumun seçimi ve; 2) doz, uygulama yolu ve tedavi rejimini (sıklığı ve süresi) kapsayacak şekilde aktarım yolunun değerlendirilmesi. Biyogüvenlik için değerlendirme terapötik genin üretiminden verilmiş sonrasına kadar (aktarılan genin güvenilirliği, vektörün güvenilirliği, patojenite, etrafa yayılma, genom içine girme, konakçıdaki viral gen dizileri ile rekombinasyon, paketlenme hücre serilerinin güvenilirliği, yardımcı hücre kontaminasyonu, *ex vivo* çoğaltılan alıcı hücrelerin güvenilirliği ve aktarılan DNA'nın gen ekspresyonunun düzenlenmesi olmak üzere) birçok aşamada yapılması gerekmektedir. Gen ürününde değişikliğe yol açan genetik dizi modifikasyonlarının yapılması, veya alternatif promotör/enhancer dizilerinin kullanılmış olması hayvan çalışmalarında ilave güvenilirlik değerlendirmelerini gerektirebilir. Bu tip yaklaşımlar için bilimsel gereklilik ortaya konmak zorundadır. Terapötik gen ürününün immünomodulatör aktivitesi varsa bağışıklık sisteminin aşırı uyarımına bağlı gelişebilecek otoimmünite potansiyeli de göz önünde bulundurularak güvenilirliği değerlendirilmelidir. İstenmeyen yan etkiler eksprese olan terapötik genin istenmeyen bölgelerde ve/veya istenmeyen miktarlarda, örneğin, reseptör/iyon kanallarının normalde eksprese olmayan yerlerde ekspresyonu,

enzimlerin fazla ekspresyonu, veya büyüme faktörleri veya büyüme faktör reseptörlerinin uzun süreli ekspresyonu sonucu ortaya çıkabilmektedir. Dolayısı ile aktarılan genin yeri, dağılımı ve istenmeyen ekspresyon düzeyleri de değerlendirmeye alınmaktadır. Genin *ex vivo* transdüksiyonu yapılarak, genetik modifikasyona uğramış terapötik hücrelerde meydana gelen değişiklikler (morfoloji, fonksiyon ve proliferasyon, ölümsüzlük gibi davranışlar veya malign-transforme fenotip indüksiyonu) incelenmelidir. Ayrıca transdüksiyon, hücrelerin *in vivo* trafiğini ve dağılımını etkileyebileceğinden hayvan deneyleri ile terapötik hücrelerin etkinliği saptanmalıdır.

Gen tedavisinin vektörlerinin güvenilirliğinin değerlendirilmesi için 1999 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, *NIH*, tarafından detaylı bir yol haritası çizilmiştir. Buna göre gen tedavisinin vektörlerinin güvenilirliği, aktarım sistemi, gen transferi ve ekspresyonu, retrovirüs aktarım sistemleri, retrovirüs harici aktarım/ekspresyon sistemleri olmak üzere dört ana sınıfta incelenmektedir (35):

### 1. AKTARIM SİSTEMLERİ:

a. Rekombinant DNA'nın hedeflendiği hücreler nedir? Hangi hedef hücreler *ex vivo* olarak işlem gerektirir ve bu hücrelerin işlemden önce ve sonra karakterizasyonları nasıl yapılacaktır?

b. Aktarım sistemi etkin midir? Hücrelerin yüzde kaç aktarılan DNA'ları içermektedir?

c. Aktarılan DNA dizisinin yapısı nasıl monitorize edilecektir ve analizin duyarlılığı nedir?

d. Aktarılan DNA ekstrakromozomal mıdır yoksa kromozoma entegre olacak mıdır? Aktarılan DNA tekrar düzenlenmiş midir?

e. Hücre başına aktarılan DNA kopya sayısı nedir? Eklenen DNA'nın hücrede gerek kalımlılığı ve gerekse yapısı kararlı mıdır?

### 2. GEN TRANSFERİ VE EKSPRESYONU

a. Laboratuvar çalışmalarında gen transfer sisteminin *in vivo* ve *in vitro* etkinliğini belirlemek

için hangi hayvan ve hücre kültürü modelleri kullanılmıştır? Bu sistemlerin insan tedavisi ile ne gibi benzerlik ve farklılıkları bulunmaktadır?

**b.** İnsanda başarılı olabilmesi için ilgili gen transfer protokolünde tahmin edilen gen transfer ve/veya ekspresyonunun minimal düzeyi nedir? Bu düzey nasıl saptanmıştır?

**c.** Gen transfer ve ekspresyonunun minimum gerekli düzeyini elde edebilmek için kullanılan aktarım sisteminin etkinliğini değerlendiren hayvan ve hücre kültürü model deneylerine ait tüm sonuçları detaylı açıklanmış mıdır?

**d.** Ekspresyonun ne kadarı sadece istenen gendendir (ve ne kadarı etraftaki diğer DNA'dandır)? Gen insersiyonu diğer genlerin ekspresyonunu ne düzeyde değiştirmektedir?

**e.** Aktarılan DNA'dan ekspresyon, hücrelerin yüzde kaçında gerçekleşmektedir? Normal aktivitenin yüzde kaç eklenen genden kaynaklanmaktadır?

**f.** Gen, hedef hücreler dışında da ekspresyon olmakta mıdır? Eğer oluyorsa, hangi düzeydedir?

### 3. RETROVİRÜS AKTARIM SİTEMLERİ

**a.** Retroviral vektör hazırlanması aşamasında hangi hücre tipleri enfekte olmuştur? Eğer varsa, hangi hücreler enfeksiyöz partikülleri üretmektedir?

**b.** Retroviral vektörün ve oluşan provirüsün (kayıp, yeniden düzenlenme, rekombinasyon, veya mutasyon açısından değerlendirildiğinde) kararlılığı nedir? Hastanın hücrelerinde aktarılan genin endojen veya diğer viral DNA dizileri ile yeniden düzenlenme veya rekombinasyona ne düzeyde maruz kalacağı hakkında mevcut bilgi nedir? Karasızlık veya varyasyonu azaltmak için vektör tasarımında hangi önlemler alınmıştır? Kararlılığı test etmek için hangi laboratuvar çalışmaları yapılmıştır, ve analizlerin duyarlılığı nedir?

**c.** Transfer sonucu oluşacak potansiyel zararlı etkiler (ör. neoplazi gelişimi, zararlı mutasyonlar, enfeksiyöz partiküllerin yeniden oluşması veya immün reaksiyon) hakkında laboratuvar verileri nelerdir? Patojeniteyi azaltmak için vektör tasarımında hangi önlemler alınmıştır? Patojeniteyi

test etmek için hangi laboratuvar çalışmaları yapılmıştır ve analizlerin duyarlılığı nedir?

**d.** Hayvan çalışmalarında vektör DNA'nın tedavi edilmeyen hücrelere, özellikle germ hücre serisine girişi ile ilgili bir bulgu mevcut mu? Bu amaçla yapılan analizlerin duyarlılığı nedir?

**e.** Klinik deneme için önerilen protokolün insan dışı primatlar ve/veya diğer hayvanlarda yapılmış benzerleri mevcut mu? Sonuçlar nelerdir? Özellikle retroviral vektörün herhangi bir endojen veya diğer viral DNA dizileri rekombine olduğuna dair hayvan deneylerinde bulgu var mı?

### 4. RETROVİRÜS HARİCİ AKTARIM/ EKSPRESYON SİTEMLERİ

**a.** İnsana uygulanacak retrovirüs harici aktarım sistemlerinin de güvenilirlik değerlendirilmesi titizlikle yapılmalıdır. Nükleik asitler örneğin lipozomlar ile kompleks haldeyse ve inhalasyon yolu ile uygulanacaksa kompleks halde olmayan lipozomlardan farklılık gösterebileceği göz önünde bulundurulmalı ve klinik çalışma için önerilen lipozom /DNA kompleksinin güvenilirlik değerlendirilmesi kompleks olmayan lipozomlardan bağımsız olarak değerlendirilmelidir. Ekspresyon olacak geni taşıyan plazmidin tamamının tasarlanması promotör, diğer transkripsiyonel elemanların ve homolog rekombinasyonu tetikleyebilecek herhangi bir dizinin seçim nedenini de kapsayacak şekilde açıklanmalıdır. Aktarım sisteminin patolojik ve istenmeyen etkileri olup olmadığına yönelik (DNA'nın tedavi edilen hücreler dışındaki hücrelere özellikle germ hücre serisi hücrelerine girip girmediğini de saptar şekilde) yapılan hayvan çalışmaları, tedaviden sonra hayvanların ne kadar süre boyunca incelendiği ve hangi güvenlik çalışmalarının yürütüldüğü, bu analizlerin duyarlılık düzeyleri ile ilgili verilerle birlikte bildirilmelidir.

Bir gen tedavisi protokolü onay almadan önce yukarıdaki sorulara ilaveten halk sağlığı açısından da aşağıdaki kaygıları gidermelidir:

**a.** Aktarılan DNA'nın hastadan diğer kişilere veya



çevreye yayılması ile ilgili belirgin bir olasılık söz konusu mu?

**b.** Böyle bir yayılım durumunda hangi önlemler alınacaktır (ör. aynı odayı paylaşan hastalar, sağlık görevlileri veya aile bireyleri için)?

**c.** Halk sağlığına riskler varsa bunu hafifletmek için hangi önlemler alınacaktır?

**d.** Yenidoğanların maruz kalabileceği olası riskleri, dikey aktarım da dahil, önlemek amacıyla hastalara doğum kontrol önlemleri önerilecek mi? Benzer kaygılar sağlık personeli için de geçerli midir?

## SONUÇ

Gen tedavisi klinik denemelerine günümüze kadar tüm dünyada binlerce hasta katılmış olmasına rağmen başarılı sonuçlar henüz çok azdır. OTC yetmezliği olan bir hastanın hepatik artere terapötik geni taşıyan adenoviral vektörlerin enjeksiyonu sonucu ölümü ve retroviral aracılı gen tedavisi alan 17 SCID hastasından 3'ünde retroviral insersiyon sonucu lösemi gelişmesi viral vektörlerin toksisiteyi ile ilgili kaygıları artırmıştır. Tüm bu süreç içinde **baş-boyun** kanserleri için geliştirilen ve p53 tümör baskılayıcı geni taşıyan rekombinant adenoviral vektör (Gendicine) rutin kullanım için Çin'de lisans almıştır ve hepatoselüler kanserlerde kullanılmaya başlanmıştır (36, 37). İnsan gen-transfer ürünlerinin ve protokollerinin değerlendirilmesi bu makalenin içeriğinden anlaşılacağı üzere oldukça karmaşıktır ve buna uygun yapılanmayı gerektirmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) Amerika Birleşik Devletlerindeki gen tedavisi çalışmalarının denetimini yapmaktadır. ABD'de klinik denemelere girecek bir gen tedavisi ürünü önce FDA'dan onay almalıdır ([www.fda.gov/cber/infosheets/genezn.htm](http://www.fda.gov/cber/infosheets/genezn.htm)). Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH-National Institute of Health) gen tedavisi araştırmalarının güvenliğinde rol oynayan diğer önemli bir kuruluştur. NIH araştırmacılar ve enstitüler için gen tedavisi klinik denemelerinde izlenecek kılavuzları sağlamaktadır. Klinik deneme protokolleri veya planları öncelikle NIH Biyoteknoloji Aktiviteleri Ofisine kaydı yapılmakta, daha sonra NIH

Rekombinant DNA Danışma Komitesi (RAC-*The Recombinant DNA Advisory Committee*) tarafından tıbbi, etik ve biyogüvenlik açısından değerlendirilmektedir. Her bir gen tedavisi klinik denemesine başlanmadan önce ise enstitünün IRB (*Institutional Review Board*) ve IRC (*Independent Review Consulting*) kuruluşları tarafından onaylanmak zorundadır. Geleceğin tedavi metodlarına hazırlıklı olabilmek ve bu alanda ülkemizde de güvenli araştırmaların yürütülebilmesini güvence altına almak için benzer yapılanmalara ihtiyaç vardır ve en kısa zamanda gerekli alt yapı kurulmalıdır.

## KAYNAKLAR:

1. Strachan T, Read AP. Chapter twenty one: New approaches to treating disease. New York: Garland Science, 2004.
2. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, ve ark. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003; 302: 415-19.
3. Cavazzana-Calvo M, Lagresle D, Hacein-Bey-Abina S, ve ark. Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu Rev Med*, 2005; 56: 585-602.
4. Kay M, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Med*, 2001; 7: 33-40.
5. Pages JC, Bru T. Toolbox for retrovectorologist. *J Gene Med*, 2004; 6: 67-82.
6. Takeuchi Y, Porter CD, Strahan KM, ve ark. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase. *Nature*, 1996; 379: 85-88.
7. Cosset F, Takeuchi Y, Battini JL, ve ark. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol*, 1995; 69: 7430-36.
8. Diaz R, Eisen T, Hart IR, ve ark. Exchange of viral promoter/enhancer elements with heterologous regulatory sequences generates targeted hybrid long terminal repeat vectors for gene therapy of melanoma. *J Virol*, 1998; 72: 789-95.
9. Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*, 2004; 6: 164-71.
10. Bergelson J, Cunningham JA, Droguett G, ve ark. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 1997; 275: 1320-23.
11. Wickham T, Mathias P, Cheresch DA, ve ark. Integrin-

- alpha-V-beta-3 and integrin-alpha-V-beta-5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 1993; 73: 309-19.
12. Report of the National, Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. NIH Report. Assessment of adenoviral vector safety and toxicity. *Hum Gene Ther*, 2002; 13: 3-13.
  13. Havenga M, Lemckert AAC, Ophorst O, ve ark. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol*, 2002; 76: 4612-20.
  14. Roy S, Gao GP, Lu Y, ve ark. Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*, 2004; 15: 519-30.
  15. Kirn D, Niculescu-Duvaz I, Hallden G, ve ark. The emerging fields of suicide gene therapy and virotherapy. *Trends Mol. Med*, 2002; 8: S68-S73.
  16. Young L, Searle PF, Onion D, ve ark. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol*, 2006; 208: 299-318.
  17. Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, ve ark. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*, 2005; 11: RA110-21.
  18. Fink D, Glorioso JC. Engineering herpes simplex virus vectors for gene transfer to neurons. *Nature Med*, 1997; 3: 357-59.
  19. Carpenter D, Stevens JG. Long-term expression of a foreign gene from a unique position in the latent herpes simplex virus genome. *Hum Gene Ther*, 1996; 7: 1447-54.
  20. Wallack M, Sivanandham M, Balch CM, ve ark. Surgical adjuvant active specific immunotherapy for patients with stage III melanoma: the final analysis of data from a phase III. randomized, double-blind, multicenter vaccinia melanoma oncolysate trial. *J Am Coll Surg*, 1998; 187: 69-77.
  21. Lundstrom K. Alphavirus vectors as tools in cancer gene therapy. *Technol Cancer Res Treat*, 2002; 1: 83-8.
  22. Vigna L, Naldini L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med*, 2000; 5: 308-16.
  23. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, ve ark. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*, 1998; 72: 8150-57.
  24. Schmidt-Wolf GaS-WI. Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends Mol Med*, 2003; 9: 67-72.
  25. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Gene Ther*, 2003; 177: 437-47.
  26. Acsadi G, Dickson G, Love DR, ve ark. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature*, 1991; 352: 815-18.
  27. Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, ve ark. Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol*, 2006; 208: 290-98.
  28. Carey R, van Zijl P, Foz ME, ve ark. Clostridial oncolysis in man. *Eur J Cancer*, 1967; 3: 37-46.
  29. Li X, Fu GF, Fan YR, ve ark. Bifidobacterium longum as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid liver cancer. *Cancer Gene Ther*, 2003; 10: 105-11.
  30. Bauer H, Darji A, Chakraborty, T, ve ark. Salmonella-mediated oral DNA vaccination using stabilized eukaryotic expression plasmids. *Gene Ther*, 2005; 12: 364-372.
  31. Zelmer A, Krusch S, Koschinski A, ve ark. Functional transfer of eukaryotic \_expression plasmids to mammalian cells by Listeria monocytogenes: a mechanistic approach. *J Gene Med*, 2005; 7: 1097-112.
  32. Williams SG, Cranenburgh RM, Weiss AME, ve ark. Repressor Titration: A Novel System for Selection and Stable Maintenance of Recombinant Plasmids. *Nucleic Acids Research*, 1998; 26 (9): 2120-24.
  33. Soubrier F, Cameron B, Manse B, ve ark. pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Ther*. 1999; 6(8): 1482-8.
  34. Gerdes K, Thisted T, Martinusse J. Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1: sok antisense RNA regulates formation of a hok mRNA species correlated with killing of plasmid-free cells. *Mol Microbiol*, 1990; 4(11): 1807-18.
  35. Doblhoff-Dier O, Collins CH. Biosafety: future priorities for research in health care. *J Biotechnology*, 2001; 85: 227-39.
  36. Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Human Gene Ther*, 2005; 16: 1013-24.
  37. Guan YS, Liu Y, Zhou XP, ve ark. p53 gene (Gendicine) and embolisation overcame recurrent hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2006; 55(11): 1684