

Kanserde damar endoteline yönelik gen tedavisi ajanları geliştirilmesi

Designing gene therapy vectors targeting tumor cell endothelium

Pınar ÖZKAL BAYDIN,[#] Hakan AKBULUT

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, Ankara

Anjiyogenez tümör hücrelerinin büyüüp gelişmesi için de zorunlu bir süreçtir. Bu sürecin çok fazla sayıda molekül, protein ve yolak içeriyor olması onu gen tedavisinin hedeflerinden biri haline getirmiştir. Anti-anjiyogenik gen tedavisinde, kanser damar endoteline yönelik ajanlar geliştirmek yeni stratejiler arasındadır.

Anahtar sözcükler: Gen tedavisi; interselüler adezyon molekülü2; kanser; sitozin deaminaz vasküler endotel.

Angiogenesis is essential for tumor growth and metastasis. Targeting angiogenesis is one of the recent progresses in the therapeutic area of cancer. Gene therapy is one of the promising strategies in the treatment of cancer. The gene therapy vectors targeting tumor endothelium carry the great therapeutic potential in cancer.

Key words: Gene therapy; intercellular adhesion molecule2; cancer; cytosine deaminase vascular endothel.

Anjiyogenez

Oksijenin difüzyonla tüm vücut hücrelerine taşınma süreci, canlılarda vücut hacminin gelişmesiyle birlikte yerini, kanın vasküler bir ağ aracılığıyla taşınımına bırakmıştır. Kelime anlamı olarak yeni kapiller damar oluşumu demek olan anjiyogenez organ gelişiminde son derece önemli bir süreçtir. Ergenliğe ulaşıldığında çoğu kan damarı sessiz kalır; anjiyogenez sadece ovaryum ve hamilelik süresince plasentada görülür.^[1] Erişkinde özellikle yara iyileşmesi sürecinde ve bazı hastalıkların patogenezinde anjiyogenez gereklidir. Bu olaylarda anjiyogenezin başlatılması ya da durdurulması bir takım uyarıcı ve inhibitör faktörlerin dengesi ile sağlanır. Endotel progenitör hücreler (EPC), kemik iliğinden kan dolaşımına doku iskemisi, vasküler travma veya tümör gelişimi süresin-

ce yönlendirilebilirler.^[2] Endotel hücreleri hipoksi, enflamasyon, yara iyileşmesi ve tamiri gibi bir reaksiyon görülene kadar kan damarlarında ve lenf damarlarında bölünme yeteneklerini saklı tutarlar. Bu süre zarfında anjiyogenez inhibitörleri ve uyarıcıları arasındaki denge korunur. Malign oluşumlar, enflamatuvar ve otoimmün hastalıklar, obezite, astım, bakteriyel enfeksiyonlar, diyabet, siroz, endometriozis ve AIDS gibi pek çok hastalıkta bu denge ortadan kalkar.^[1] Uyarıcılar büyüme faktörleri, matriks ve adezyon molekülleri, farklılaşma/özelleşme sinyalleri, kemoatraktanlar ve yeni damar oluşumundan sorumlu enzim sistemlerinden herhangi biri olabilir. İnhibitörler ise, endotel hücre proliferasyonunu, sinyal iletimini, hücre migrasyonunu, matriks metalloproteinaz ekspresyonunu ve endotel hücre öncülerinin gelişimini inhibe etmek suretiyle fonksiyon gösterirler.^[3]

[#]Şimdiki kurumu: Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü, Ankara.

İletişim (Correspondence): Dr. Pınar ÖZKAL BAYDIN. Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü, Ceyhan Atuf Kansu Cad.

No: 169, Cevizlidere 06520 Balgat, Ankara, Turkey.

Tel: +90 - 312 - 583 67 00 e-posta (e-mail): ozkal@medicine.ankara.edu.tr

© 2013 Onkoloji Derneği - © 2013 Association of Oncology.

Tümör Anjiyogenezi

Tümör hücreleri karsinojenik etkiyle malin potansiyel kazanıp kontrolsüz çoğalmaya başlayana kadar oldukça uzun ve sessiz bir dönem geçirirler. Bu dönemden sonra özellikle damarlanmayla birlikte tümörlerde hızlı bir progresyon dönemi başlar. Buldukları dokuda yeni damar oluşumuna gerek duymadan ancak 2-3 mm büyüklüğe kadar ulaşabilirler.^[4,5] Daha fazla büyüebilmeleri için yeni damar oluşumuna gereksinim vardır. Yeni damar gelişimi olmayan tümörler semptomsuz lezyonlar olarak kalır. Tümörler çok sayıda anjiyogenik faktör (epidermal büyüme faktörü; EGF, fibroblast büyüme faktörü -1, -2, -3, -4; FGF-1, -2, -3, -4, granülosit koloni uyarıcı faktör; G-CSF, interlökin-8; IL-8, hepatosit büyüme faktörü; HGF, transforme edici büyüme faktör-a, -b; TGF-a, -b, vasküler-endotelial büyüme faktörü; VEGF gibi) salgılar ve bunların çoğu komşu küçük damarlara difüze olarak endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanır ve sonuçta yeni damar oluşumu ile sonuçlanacak olaylar dizisini aktive ederler.^[5,6] Endotel hücre aktivasyonunun yanı sıra tümör hücreleri: *i.* matriksi eritici enzimleri ile endotel hücrelerinin invazyonunu kolaylaştırır, *ii.* salgıladıkları bir takım kemotaktik faktörlerle ilave anjiyogenik faktör salgılayabilecek olan makrofajları ve mast hücrelerini kendilerine çekerler ve *iii.* stromadaki fibroblastları proanjiyogenik moleküller yapmalarını uyarmak suretiyle de anjiyogenezi hızlandırır.^[7]

Normal hücreler anjiyogenik değildirler, çünkü normalde az miktarda anjiyogenik faktör salgılayabilirken daha fazla miktarlarda anjiyogenez inhibitörleri (anjiostatin, interferonlar, interlökin -1, -12, retinoik asit, protamin, platelet faktör 4; PF4, trombospondin-1, doku metalloproteinaz inhibitörü; TIMP gibi) salgırlar.^[2] Dolayısıyla normal bir hücrenin malin transformasyona uğrarken aynı zamanda anjiyogenik fenotip kazanması da gerekmektedir. Anjiyogenez sürecinin merkezinde bulunan endotel hücreleri ise salgıladıkları bazı büyüme faktörleri (ör. Bazik fibroblast büyüme faktörü; bFGF, granulosit-stimüle edici faktör; G-CSF, platelet-kaynaklı büyüme faktörü, PDGF, insülin-benzeri büyüme faktörü; IGF, heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme

faktörü gibi) vasıtasıyla kendi aktivasyonlarını artırırken aynı zamanda bu faktörler tümör hücreleri için de parakrin büyüme faktörleri olarak rol oynar. Malin transformasyonda anjiyogenik özelliklerin kazanılmasında pek çok hücrede onkogenler rol oynamaktadır. Onkogenlerin en belirgin etkisi tümör hücrelerinde anjiyogenik faktörlerin yapımlarını ve salgılanmalarını uyarmalarıdır (örn. H-ras - G-CSF, IGF-1, VEGF, N-ras - TNF-a [tümör nekrozis faktör-a], G-CSF, v-src - VEGF gibi).^[8,9] Bazı aktive olmuş onkogenler (RAS ailesi gibi) VEGF ekspresyonunu uyarır.^[10]

Anjiyogenez normal kapillerin uzamasıyla başlar, geçirgen duruma gelir ve böylece fibrinojen gibi plazma proteinleri perivasküler boşluğa geçer. Bu durum, perivasküler hücrelerin (perisitlerin) doku içine göç etmekte kullandıkları matriksin yıkımına neden olur. Bununla birlikte, damarı çevreleyen bazal membran da yıkılır. Bu yıkımda aktif endotel hücrelerinden ve stromadan salınan matriks metalloproteinazları (MMP) etkilidir. Sonra endotel hücreler prolifer olmaya başlar ve kapiller çevre doku içine doğru damarlanır. Normal fizyolojik anjiyogenez sürecinde endotel hücreleri geçici bir süreyle prolifer olurken tümör anjiyogenezinde kalıcıdır. Yine fizyolojik anjiyogenezde, yeni oluşan kapiller perisitlerle ve vasküler bazal membranla kaplanırken anjiyogenezin bu bölümü tümör anjiyogenezinde tamamlanmaz. Tümör kapillerlerinin şekilleri ve oryantasyonları da düzensizdir.^[10]

Solid Tümörlerde Anjiyogenezi Önlemeye Yönelik Klinik Çalışmalar

Tümör hücrelerinin büyümesi, progresyonu ve yayılımında anjiyogenezin öneminin anlaşılmasıyla birlikte, anjiyogenezi hedef alan tedavilerin geliştirilmesi çalışmaları popülerite kazanmıştır. Anti-anjiyogenik tedavilerin öncüsü ve klinikte en yaygın kullanılanı VEGFA'yı bağlayan bir monoklonal antikor olan bevacizumab'dır. Başta kolorektal kanserler olmak üzere bir çok tümör türünde kemoterapi ile kombine edildiğinde hastalığın kontrolünde başarılı olmuştur. Son dönemde bevasizumab dışında bu alanda yapılan klinik çalışmaların çoğunda VEGFR inhibitörleri araştırılmakla birlikte, PDGFR, FGFR ve anjiyogenik faktör in-

hibitörlerine yönelik ilaçlar da klinikte araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır.

Endotel hücrelerinin aktivasyonunda esas rolü oynayan ve anjiyogenez sürecinin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan ana faktör pek çok kanser türünde normalden fazla eksprese olduğu gösterilmiş olan VEGF'dir. VEGF molekül ailesi ligandları [VEGF-A (VEGF), VEGF-B, -C, -D, -E (VEGF-E memeli hücrelerinde bulunmaz) ve plental büyüme faktörü (PIGF) -1 ve -2] damar ve lenfatiklerdeki endotel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar.^[11,12] VEGFA proteinleri endotel hücrelerinde eksprese edilen VEGFR-2 tirozin kinaz reseptörleri aracılığıyla kapiller geçirgenliği ve endotel hücre proliferasyonunu artırır. Bazı tümör hücreleri de VEGFR-1 veya VEGFR-2 eksprese edebilmekte ve bu durumda VEGF'ler bu tümör hücreleri için otokrin büyüme faktörleri gibi de davranabilmektedirler.^[10] Reseptör tirozin kinaz grubunda yer alan ve VEGF ligandlarını bağlayan başlıca 3 VEGF reseptörü tanımlanmıştır. VEGFR-1 (Flt-1) endotel hücreleri ile bazı tümör hücrelerinde eksprese edilir ve esas olarak VEGF'nin endotel migrasyonunu uyarıcı etkisine aracılık eder. VEGFR-2 (KDR, FLK-1) endotel hücreleri, primitif hematopoietik kök hücreler ve bazı tümör hücreleri ile az sayıda erişkin hücrelerinde eksprese edilir ve VEGF ligandlarının (VEGF, VEGF-C ve VEGF-D) endotel hücrelerinin proliferasyonu, sağ kalımı ve damar geçirgenliği etkilerine aracılık eder. VEGFR-3 (Flt-4) esas olarak VEGF-C ve VEGF-D'yi bağlar, lenfatik ve tümör endotel hücrelerinde eksprese edilir ve lenfanjiyogenezden sorumludur. Tümör anjiyogenezinde başlıca sorumlu VEGFR-2 aracılı sinyal iletim yoludur. VEGFR-2'nin bloke edilmesi hücre proliferasyonu, migrasyonu, sağkalımını ve damar permeabilitesini azaltmaktadır.^[11,12] VEGFR-1 (Flt-1)'in tümör anjiyogenezinin yanı sıra tümör hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazında da rol oynaması nedeniyle kanser tedavisinde önemli hedefler arasında yer almaktadır.^[13]

Çok yakın bir zamanda, sitotoksik T lenfositleri uyararak VEGFR-1'i hedefleyen bir aşının faz I çalışması yayınlanmıştır.^[14] VEGFR-1 mRNA'sını hedef alan bir antianjiyogenik ribozim olan angi-

ozyme (RPI.4610) meme kanserli hastalarda çalışılmıştır.^[15] Her ne kadar bu faz II çalışmanın sonucu çok başarılı olmasa da diğer tümör türlerinde yapılacak olan diğer çalışmalar bu ilacın etkinliği konusunda daha fazla bilgi sağlayacaktır. Refrakter solid tümörlü hastalarda sVEGFR-3 inhibitörü (CKD-732) ile bir başka anti-anjiyogenik ajan ve VEGF, PDGF, FGF reseptörleri inhibitörü olan BIBF 1120'nin maksimum tolere edilebilir dozu, güvenliği, farmakokinetiği ve farmakodinamik etkileri çalışılmıştır.^[16,17] VEGFR ve VEGF sinyal inhibitörlerini hedefleyen klinik çalışmaların sayısını artırmak mümkündür. VEGF'nin yanı sıra, anjiyogenik faktör antagonistleri de klinik çalışmalarda denenmektedir. Örneğin anjiyopoyetin-1/2'yi nötralize eden bir peptidobody olan trebananib (AMG 386) faz III bir çalışmada (TRINOVA 1 çalışması) over kanserli hastalarda kemoterapi ile kombine edildiğinde progresyonsuz sağkalım sürelerini uzattığı gösterilmiştir.^[18] Gelecek birkaç yıl içinde anjiyogenezi hedefleyen yeni ve inovatif tedavi ajanları ve bunlarla yapılacak klinik çalışma sayısının artması beklenmektedir.

Kanserde Gen Tedavisi

Kanserin aslında genetik temelli bir hastalık olduğunun ortaya konması ile birlikte özellikle hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan moleküler genetik süreçlerin aydınlatılmaya başlanması aynı zamanda bu hastalığa karşı yeni tedavi stratejilerinin de geliştirilmesi sürecini beraberinde getirmiştir. Bu yeni tedavi stratejilerden bir tanesi de gen tedavisidir. Gen tedavisinin esas amacı, tedavi edici etkiyi yaratmak üzere genetik materyalin hücrelere transfer edilmesidir. Gen tedavisinin temel ilkesi "tamir etme" veya "yerine koyma"dır. Fonksiyonu bozulmuş hücresel genin ekspresyonunu değiştirme "tamir etme" ilkesini tanımlarken; fonksiyonunu kaybetmiş bir genin yeniden hücre içerisine yerleştirilmesi ise "yerine koyma" ilkesini tanımlamaktadır.^[19] Günümüzde gen tedavisi çalışmaları başlıca onkogen ekspresyonunu baskılamaya, eksik olan tümör baskılayıcı gen aktivitesini yerine koymaya, immün sistemi uyarmaya, tümör damar endotelini ortadan kaldırmaya ve dışarıdan verilen ilaçlara karşı tümör hücre duyarlılığını arttırmaya (intihar genleri) yönelik olarak yapılmaktadır.

Anti-Anjiyogenik Gen Tedavisi Stratejileri

Anjiyogenezin tedavide kullanılması fikri son derece çekicidir çünkü anjiyogenezde proliferen olan hücrelerin büyük çoğunluğu genomik instabilitesi olmayan normal endotel hücreleridir. Bu yüzden diğer kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında tedaviye direnç geliştirme oranları daha düşüktür.^[10] Anjiyogenez kanser hastalığının klinik hale geçmesinde ve hastalığın prognozunda son derece önemli rol oynaması nedeniyle de tedavi stratejilerinde önemli bir hedef haline gelmiştir. Günümüzde VEGF'yi bağlayan antikolarlar (Bevacuzimab) ve anjiyogenezde rol oynayan reseptör tirozin kinazların baskılanmasını hedefleyen küçük moleküllu ilaçlar (Erlotinib, Sunitinib) ruhsat alarak klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Her iki yaklaşımda tek başlarına kullanıldıklarında pek etkili olmasalar da klasik kemoterapiye eklendiklerinde hastalarda tedavi başarısını bir miktar arttırmaktadırlar.^[20]

Anjiyogenez sürecinde rol oynayan genlerin ve proteinlerin hedef alınması ile ortaya çıkan antianjiyogenik gen tedavisi stratejileri başlıca iki noktada yoğunlaşmaktadır. Bunlardan birincisi doğrudan endotel hücrelerini hedefleyerek anjiyogenezin baskılanması, ikincisi ise tümör hücrelerinin hedeflenerek onların proanjiyogenik maddeler salgılamasını engelleme stratejileridir. Birinci stratejide tedavi ajanları (endostatin, anjiostatin, trombospodin-1 vb) endotel hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, tüp oluşumunu inhibe ederek endotel hücre apoptozunu uyarırlar.^[21,22] Endotel hücreler tümör hücrelerine göre daha kararlı bir yapıda oldukları için burada direnç gelişimi söz konusu olmaz. İndirekt inhibitörler, tümör hücrelerini hedef alırlar. Anjiyogenik büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin ekspresyonunu önlerler. Tümör hücreleri hedef alındığı için ve tümör hücreleri de kararlı bir yapıda olmadığı için burada direnç gelişimine hassasiyet vardır. (Örneğin interferon alfa, tirozin kinaz reseptörlerinin inhibitörleri gibi).^[23]

Anti-anjiyogenik gen tedavisinde kullanılan genler plazmid veya çıplak DNA gibi non-viral yollarla verilebileceği gibi, adeno-virus, adeno-ilişkili virus, retro-onkovirus ve lentivirus gibi viral stratejiler kullanılarak da verilebilir.

Endotel Spesifik Promotorlar

İnterselüler Adezyon Molekülü (ICAM)

Endotel hücrelerine spesifik promotorların kullanılması ile hem tümör damar endoteline hem de bir çok tümörde tümör hücrelerine spesifik gen ekspresyonu elde edilmesi mümkün olabilmektedir.^[24,25] Endotel hücre bağlantıları endotel bütünlüğünün devam ettirilmesi, dokulara olan hücre girişinin düzenlenmesi, endotel hücre yaşamının devam ettirilmesinde son derece önemlidir. İmmünglobulin süper gen ailesinin bir üyesi olan interselüler adezyon molekülü-2 (ICAM-2) endotel hücre bağlantılarında eksprese edilir. Çalışmalar ICAM-2 nin lökosit migrasyonunda uyarılara spesifik bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.^[26]

İnterselüler adezyon molekülü-2 lenfositler ve monositler üzerinde eksprese edilse de^[27] erişkin dokulardaki ekspresyonu genellikle damar endotel hücreleri ve megakaryositler ile sınırlıdır. Dolayısıyla ICAM-2 promotörü ile regüle edilen vektörler genellikle endotel hücrelerinde spesifik ekspresyon göstermektedirler.^[28,29] İnsan ICAM-2 promotörü, *in vivo* endotel spesifik transgen ekspresyonu için küçük bir bölgede (<350 bp) tüm gerekli sinyalleri içerir.^[30] Endotele spesifik olması olası olan çok sayıda promotör ile yapılan bir çalışmada Flt-1 ve ICAM-2 promotörleri ile elde edilen transgen ekspresyonunun en fazla olduğu ve bunun da sitomegalovirus (CMV) promotörü ile elde edilene eşdeğer olduğu bulunmuştur.^[31] Bütün bu çalışmalar ICAM-2 promotörlerinin endotel hücrelerine spesifik gen tedavisi çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Endoglin (CD105)

Endoglin proliferasyon-ilişkili, hipoksiyle indüklenebilir, çoğunlukla anjiyogenik endotel hücrelerde ifade edilen bir proteindir. TGF- β 1 ve β 3 reseptörüdür. İmmünohistokimyasal çalışmalar tümör dokusu kan damarlarında yüksek oranda CD105 ekspresyonu olduğunu göstermiştir.^[32] Endoglin promotörünün 741 bp'lik fragmentinin bölünen sıgır ve insan endotel hücrelerinde doku spesifik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Savontaus ve ark. yaptıkları çalışmada endoglin promotörünün adenoviral vektörü bölünen endotel hücrelere

yönlendirmede etkili olduğunu göstererek, antianjiyogenik tedavide yeni bir terapötik ajanı literatüre kazandırmışlardır.^[33]

İntihar Genleri

İntihar genleri olarak adlandırılan ve memeli hücrelerinde bulunmayan ancak bu hücrelere yerleştirildiğinde normal hücreler için toksik olmayan ilaçları metabolize ederek bunları sitotoksik ajanlara dönüştüren gen tedavileri doğrudan sitotoksik bir etkiyi amaçladığı için gen tedavisi yöntemleri arasında en fazla umut vaadeden yöntem gibi görünmektedir. Bazı bakteri ve mantarlarda bulunan sitozin deaminaz (CD) geni tümör hücrelerine yerleştirildiğinde 5-florositozini (5-FC) hücre içinde 5-florourasile (5-FU) dönüştürmekte ve böylece diğer normal hücreler zarar görmeden sadece tümör hücreleri spesifik olarak öldürülebilmektedir. 5-FU'nin sitotoksik özelliği 5-floro deoksiüridin monofosfat (5-FdUMP) ve 5-florouridin trifosfat (5-FUTP)'a dönüşümü ile ortaya çıkar. 5-FdUMP timidilat sentaz (TS) enzimini inhibe eder ki; bu enzim DNA sentezi boyunca replike olan hücrelere timidin nükleotidini sağlar. 5-FUTP ise üridin 5-trifosfat yerine RNA yapısına katılarak RNA sentezini dolayısıyla rRNA ve mRNA işlenmesini de inhibe eder.^[34-36] Ayrıca CD'nin kendisi de immünojeniktir; antijen olarak davranır ve efektör T hücrelerinin poliklonal aktivasyonuna neden olur.^[37]

Mevcut gen tedavisi yöntemlerinin çok başarılı olamamasında tümör hücrelerinin heterojenitesi ve her hücre için uygun olabilecek bir hedef genin bulunamaması gibi tümörlerin biyolojik davranışlarından kaynaklanan engellerin yanı sıra bir diğer önemli engel de gen tedavisi vektörlerinin tüm tümör hücrelerine etkin bir şekilde ulaştırılamamasıdır. İntihar gen tedavisi çalışmalarında transfekte hücrelerde vektörün hücreye yerleştiği enzimin aktifleştirdiği ilaç, komşu hücreleri de kolaylıkla etkileyebilmektedir.^[38,39] “Komşu etkisi (bystander effect)” olarak bilinen bu tanım, gen tedavisinde karışık bir popülasyonda bir hücrenin hedeflenip farklı tipte tümör hücrelerin de öldürülebilme kapasitesi anlamına gelir.^[40]

Anjiyogenik Gen Tedavisinde Klinik Çalışmalar

Anjiyogenez kanser hastalığının klinik hale geçmesinde önemli bir basamak olması nedeniyle uzun bir süredir gen tedavisi çalışmalarının da hedefi olmuştur. Bu çalışmalarda genellikle anjiyogenez inhibitörlerini kodlayan genlerin vektörler aracılığıyla tümörlü dokulara ulaştırılması hedeflenmektedir. Aralık 2013 tarihi itibarıyla www.clinicaltrials.gov adresine kayıtlı 23 adet anjiyogenez hedefli gen tedavisi klinik araştırma bulunmaktadır. Bunlardan sekiz tanesinin tamamlanmış ve iki tanesinde henüz hasta alımı devam etmektedir.^[41] Li ve ark. çalışmalarında, adenovirus aracılı-endostatin kodlayan gen tedavisi (E10A) ile ileri evre solid tümörlü hastalarda yaptıkları faz I çalışmada bu ajanın güvenilirliğinin yanı sıra anti-tümöral etkinliğinin de olduğunu göstermişlerdir.^[42] 2016'da bitmesi planlanan diğer bir çalışmada ise CD8+ lenfositlerin genetiği değiştirilerek anti-VEGFR-2 geni aracılığıyla metastatik solid tümörlerin (renal, kolorektal, ovaryum, akciğer) tedavisi amaçlanmaktadır (National Institutes of Health Clinical Center).^[41] Henüz klinik araştırma sayısı az olsa da anjiyogenezi hedef alan gen tedavisi ajanları gelecek için umut vaat etmektedir.

Genel Değerlendirme

İnsan gen tedavisi çalışmaları ilk olarak 1970'li yıllarda olası hale geldiğinde, kalıtsal tek gen hastalıklarının bu tedavinin hedefi olacağı düşünülmüştü. Fakat daha sonraları başta kanser olmak üzere diğer pek çok hastalık için gen tedavisinin temel ilkesi olan “tamir etme” veya “yerine koyma” çalışmalarının uygulanabileceği gösterilmiştir.^[19] Özellikle onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin kanser gelişiminde ve metastazdaki rolleri nedeniyle bu genlerin hedef olarak seçilmesi kanserde gen tedavi çalışmalarına büyük ivme kazandırmıştır. Bunların yanı sıra memeli hücrelerinde bulunmayan sitozin deaminaz gibi bir takım enzimlerin gen tedavisi yoluyla tümör hücrelerine iletilmesi ve bu enzimlerin hücre için nispeten zarsız maddelerden dönüştürdüğü toksik maddelerin yaptığı hücre ölümü (intihar geni tedavisi) de popüler yöntemlerden biri haline gelmiştir.^[43]

Gen tedavisinin en önemli sorunlarından birisi olan terapötik genlerin hedef dokulara ulaştırılması problemini yenmek için sık başvurulan stratejilerden birisi de tümöre veya dokuya özgü promotorlar kullanmaktır. Bu amaçla gen tedavisi vektörlerine terapötik genin aktivitesini düzenleyen spesifik promotorlar eklenerek, bu genlerin sadece hedef dokularda protein sentezi yapabildiği sağlanmaktadır.

Anjiyogenez pek çok büyüme faktörünü, onların reseptörlerini, sitokinleri, proteazları, adezyon moleküllerini içermesi yönüyle gen tedavisi için çoklu bir hedef oluşturur. Tümör endoteline spesifik adenoviral vektörler oluşturmak kanser anti-anjiyogenik tedavisinde yeni bir yaklaşımdır.

Nicklin ve ark. yaptıkları çalışmada, vasküler gen tedavisi için endotel hücelere spesifik promotorlar arasında en uygun iki promotordan birisinin ICAM2 olduğunu saptamışlardır.^[31] Yine ICAM2 promotoruna ilişkin yapılmış hayvan çalışmalarında da bu uygunluk doğrulanmış^[29] ve aktiviteyi etkileyen bağlantı bölgeleri tespit edilmiştir.^[30]

Kanserde damar endoteline yönlendirmenin yanı sıra, oluşturulan vektöre 5-FC ile birlikte verildiğinde sitotoksik etki oluşturması için CD gibi intihar genlerinin takılması da popüler yöntemler arasında yerini almıştır. Kanserlin metastatik özelliği nedeniyle tedavi ajanlarının tüm vücutta dağılması ve tüm tümör hücelere spesifik olarak ulaştırılması gerekmektedir. Teorik olarak gen tedavisi vektörlerinin vücuttaki tüm tümör hücelere ulaştırılması durumunda kanserin eradike edilebilmesi beklenmektedir. Nitekim yapılan *in vitro* çalışmalarda tümör hücelere tamınının CD geni taşıyan vektör ile enfekte edilebilmesi sağlandığı takdirde tümör hücelere eradikasyonunun mümkün olabileceğini gösterilmiştir.^[44] Daha önce CD/5-FC sistemi ile yapılan bir çalışmada tümör hücelere %10'unun CD transkripsiyon ünitesi taşıyan vektörle enfekte edildiğinde bile sentezlenen 5-FU'nun %50'ye ulaşan sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır.^[45] Bu durum komşu etkisinden ileri gelmektedir.

Kanser damar endoteline yönelik gen tedavisi çalışmaları tümör hücelere yerine kararlı endotel

hücelere hedeflemesi ve pek çok gen tedavisi yöntemiyle kombine edilebilir olması yönleriyle umut vaadeden tedavi yaklaşımları arasında yerini almıştır. Bu alanda yapılan klinik çalışmaların sayısı da gün geçtikçe artmaktadır.

Kaynaklar

1. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438(7070):932-6. [CrossRef](#)
2. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004;8(3):294-300. [CrossRef](#)
3. Polverini PJ. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ* 2002;66(8):962-75.
4. Hart IR. The spread of tumours. In: *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. 3rd ed. London: Oxford University Press; 2001.
5. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;57:1-18. [CrossRef](#)
6. Liu Y, Deisseroth A. Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. *Blood* 2006;107:3027-33. [CrossRef](#)
7. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
8. Yu JL, May L, Klement P, Weitz JI, Rak J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(1):21-30. [CrossRef](#)
9. Arbiser JL. Molecular regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction pathways: evidence of predictable and reproducible patterns of synergy in diverse neoplasms. *Semin Cancer Biol* 2004;14:81-91. [CrossRef](#)
10. Schulz WA. *Molecular biology of human cancers*. Netherlands: Springer; 2005.
11. Bruns CJ, Liu W, Davis DW, Shaheen RM, McConkey DJ, Wilson MR, et al. Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer* 2000;89(3):488-99. [CrossRef](#)
12. Inoue K, Slaton JW, Davis DW, Hicklin DJ, McConkey DJ, Karashima T, et al. Treatment of human metastatic transitional cell carcinoma of the bladder in a murine model with the anti-vascular endothelial growth factor receptor monoclonal antibody DC101 and paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2000;6(7):2635-43.
13. Kaliberov SA, Kaliberova LN, Stockard CR, Grizzle WE, Buchsbaum DJ. Adenovirus-mediated FLT1-targeted proapoptotic gene therapy of human prostate cancer. *Mol Ther* 2004;10(6):1059-70. [CrossRef](#)
14. Hayashi H, Kurata T, Fujisaka Y, Kawakami H, Tana-

- ka K, Okabe T, et al. Phase I trial of OTS11101, an anti-angiogenic vaccine targeting vascular endothelial growth factor receptor 1 in solid tumor. *Cancer Sci* 2013;104(1):98-104. [CrossRef](#)
15. Morrow PK, Murthy RK, Ensor JD, Gordon GS, Margolin KA, Elias AD, et al. An open-label, phase 2 trial of RPI.4610 (Angiozyme) in the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer* 2012;118(17):4098-104. [CrossRef](#)
 16. Shin SJ, Jeung HC, Ahn JB, Rha SY, Roh JK, Park KS, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of CKD-732, an antiangiogenic agent, in patients with refractory solid cancer. *Invest New Drugs* 2010;28(5):650-8. [CrossRef](#)
 17. Mross K, Stefanic M, Gmehling D, Frost A, Baas F, Unger C, et al. Phase I study of the angiogenesis inhibitor BIBF 1120 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16(1):311-9. [CrossRef](#)
 18. Monk BJ, Huang HQ, Burger RA, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, et al. Patient reported outcomes of a randomized, placebo-controlled trial of bevacizumab in the front-line treatment of ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 2013;128(3):573-8. [CrossRef](#)
 19. Brenner MK. Cancer gene therapy: historical perspective. In: Curriel D, Douglas JT, editors. *Cancer gene therapy*. Totowa, NJ: Humana Pres Inc., Chapter 1. 2005. p. 1-8. [CrossRef](#)
 20. Wanebo HJ, Argiris A, Bergsland E, Agarwala S, Rugo H. Targeting growth factors and angiogenesis; using small molecules in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25(2):279-92. [CrossRef](#)
 21. Rege TA, Fears CY, Gladson CL. Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro Oncol* 2005;7(2):106-21.
 22. Sridhar SS, Shepherd FA. Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer* 2003;42(Suppl 1):81-91. [CrossRef](#)
 23. Tandle A, Blazer DG 3rd, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med* 2004;2(1):22. [CrossRef](#)
 24. Work LM, Ritchie N, Nicklin SA, Reynolds PN, Baker AH. Dual targeting of gene delivery by genetic modification of adenovirus serotype 5 fibers and cell-selective transcriptional control. *Gene Ther* 2004;11(16):1296-300. [CrossRef](#)
 25. Everts M, Kim-Park SA, Preuss MA, Passineau MJ, Glasgow JN, Pereboev AV, et al. Selective induction of tumor-associated antigens in murine pulmonary vasculature using double-targeted adenoviral vectors. *Gene Ther* 2005;12(13):1042-8. [CrossRef](#)
 26. Huang MT, Larbi KY, Scheiermann C, Woodfin A, Gerwin N, Haskard DO, et al. ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood* 2006;107(12):4721-7. [CrossRef](#)
 27. Xu H, Tong IL, De Fougerolles AR, Springer TA. Isolation, characterization, and expression of mouse ICAM-2 complementary and genomic DNA. *J Immunol* 1992;149(8):2650-5.
 28. Richardson TB, Kaspers J, Porter CD. Retroviral hybrid LTR vector strategy: functional analysis of LTR elements and generation of endothelial cell specificity. *Gene Ther* 2004;11(9):775-83. [CrossRef](#)
 29. Cowan PJ, Shinkel TA, Fisicaro N, Godwin JW, Bernabéu C, Almendro N, et al. Targeting gene expression to endothelium in transgenic animals: a comparison of the human ICAM-2, PECAM-1 and endoglin promoters. *Xenotransplantation* 2003;10(3):223-31. [CrossRef](#)
 30. Cowan PJ, Tsang D, Pedic CM, Abbott LR, Shinkel TA, d'Apice AJ, et al. The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific in vitro and in vivo and contains critical Sp1 and GATA binding sites. *J Biol Chem* 1998;273(19):11737-44. [CrossRef](#)
 31. Nicklin SA, Reynolds PN, Brosnan MJ, White SJ, Curriel DT, Dominiczak AF, et al. Analysis of cell-specific promoters for viral gene therapy targeted at the vascular endothelium. *Hypertension* 2001;38(1):65-70. [CrossRef](#)
 32. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003;17(9):984-92. [CrossRef](#)
 33. Savontaus MJ, Sauter BV, Huang TG, Woo SL. Transcriptional targeting of conditionally replicating adenovirus to dividing endothelial cells. *Gene Ther* 2002;9(14):972-9. [CrossRef](#)
 34. Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujii H, Hamada H, Nakano H. Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of escherichia coli cytosine deaminase gene and Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther* 2000;7(7):1015-22.
 35. Chung-Faye GA, Chen MJ, Green NK, Burton A, Anderson D, Mautner V, et al. In vivo gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated, transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Ther* 2001;8(20):1547-54. [CrossRef](#)
 36. Miyagi T, Koshida K, Hori O, Konaka H, Katoh H, Kitagawa Y, et al. Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. *J Gene Med* 2003;5(1):30-7. [CrossRef](#)
 37. Pope IM, Poston GJ, Kinsella AR. The role of the bystander effect in suicide gene therapy. *Eur J Cancer* 1997;33(7):1005-16. [CrossRef](#)
 38. Wildner O, Morris JC, Vahanian NN, Ford H Jr, Ramsey WJ, Blaese RM. Adenoviral vectors capable of replica-

- tion improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1999;6(1):57-62. [CrossRef](#)
39. Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(17):8302-6. [CrossRef](#)
40. Hall EJ. The bystander effect. *Health Phys* 2003;85(1):31-5. [CrossRef](#)
41. <http://clinicaltrials.gov/>
42. Li HL, Li S, Shao JY, Lin XB, Cao Y, Jiang WQ, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intratumoral injection of an adenovirus encoding endostatin in patients with advanced tumors. *Gene Ther* 2008;15(4):247-56. [CrossRef](#)
43. Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J Cell Physiol* 2001;187(1):22-36. [CrossRef](#)
44. Akbulut H, Tang Y, Maynard J, Zhang L, Pizzorno G, Deisseroth A. Vector targeting makes 5-fluorouracil chemotherapy less toxic and more effective in animal models of epithelial neoplasms. *Clin Cancer Res* 2004;10(22):7738-46. [CrossRef](#)
45. Akbulut H, Zhang L, Tang Y, Deisseroth A. Cytotoxic effect of replication-competent adenoviral vectors carrying L-plastin promoter regulated E1A and cytosine deaminase genes in cancers of the breast, ovary and colon. *Cancer Gene Ther* 2003;10(5):388-95. [CrossRef](#)