

17. Bölüm

Retina Replasmanı ve Retinada Restoratif Tedavi Yaklaşımları

RETİNADA GEN TEDAVİSİ

Prof Dr Ayşe Öner

Acıbadem Sağlık Grubu, Kayseri Acıbadem Hastanesi/KAYSERİ

ÖZET:

Hereditör retina distrofileri (HRD) klinik ve genetik açıdan çeşitlilik gösteren retinanın dejeneratif hastalıklar grubudur. Bu hastalıklar gece görme bozukluğu, renk görme bozukluğu, görme alanı kaybı ve total körlükle sonuçlanabilir. Bu hastalık grubunda gelişimsel ve fonksiyonel aşamada rol alan 120'den fazla gen mutasyonunun sorumlu olabileceği saptanmıştır. Ayrıca aynı aile içinde bile aynı gen içinde farklı mutasyonlar olabilir ve bu mutasyonlar farklı fenotiplere yol açabilir. Bu durum hastalıklarla ilgili genetik çeşitliliği daha da karmaşık hale getirmektedir. Hastalıklarla ilişkili genlerin retinal hücre yapısında, fototransdüksiyonda görme siklusunda, fotoreseptör yapısında bulunan proteinleri kodladığı bilinmektedir. Son yıllarda meydana gelen gelişmeler genetik patogenezin daha iyi anlaşılmasına ve gen replasman ve gen inaktivasyon tedavilerinin uygulanabilmesine yol açmıştır. Anatomik ve immunolojik özelliklerinden dolayı göz, gen tedavilerinin uygulanabilmesi için uygun bir organdır. Gen tedavisinin etkinliği ve güvenilirliği konusunda elde edilen son gelişmeler ışığında, vektör aracılı gen replasman tedavileri oldukça yol katetmiştir. Hayvan çalışmalarında umut verici sonuçların alınması klinik çalışmaların planlanmasına yol açmıştır. İlk klinik çalışmalardan alınan cesaret verici sonuçlar viral vektörlerin insanlarda güvenli ve etkin bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir. Bu yazıda retina hastalıklarında gen tedavisi konusundaki son gelişmeler ve klinik çalışmaların sonuçları gözden geçirilecektir.

RETİNADA GEN TEDAVİSİ:

1-GİRİŞ

Gen tedavisi ile ilgili düşünceler DNA'nın keşfinden hemen sonra başlar. İnsanda gen tedavisi çalışmalarının geçmişi 1960-1970 yıllarına dayanır. Ancak gen ekspresyonunun çok iyi anlaşılammış olması ve gen uygulaması için uygun yöntemin bulunamamış olması nedeniyle ilk uygulamalar başarısız olmuştur. Son 20 yılda değişik hastalık gruplarında 1500'den fazla gen tedavisi ile ilgili klinik çalışma başlatılmıştır.¹⁻⁶

Şu anda 30/07/20 tarihi itibarıyla clinicaltrials.gov sitesinde kayıtlı retinal hastalıklarda gen tedavisini içeren 60 dan fazla klinik çalışma vardır. Hedeflenen hastalıklar arasında Leber'in konjenital körlüğü (LKK), retinitis pigmentosa (RP), koroideremi, akromatopsi, yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) ve diyabetik retinopati (DR) gibi retina hastalıkları bulunmaktadır. Genetik incelemelerdeki gelişmelerle birlikte, günümüzde retinal hastalıklarla ilişkisi bilinen 269 gen ve 300'den fazla lokus bulunmaktadır (RetNet, <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm>; 30/07/2020).

Göz, gen tedavisi için ideal bir organdır. Öncelikle küçüktür ve dışarıya kapalıdır. Gen tedavileri günümüzde vektörler (taşıyıcılar) aracılığıyla yapılmaktadır. Vektör olarak çoğunlukla Parvovirüs ailesinden olan Adeno-associated virus (AAV) tercih edilir. Göze yapılacak uygulamalar için çok küçük miktarda vektör yeterlidir, dolayısıyla vektöre bağlı toksik etkiler de minimum olur. Ayrıca gözün retina pigment epiteli (RPE) hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ve kan-retina bariyeri nedeniyle immün açıdan ayrıcalığı mevcuttur. İntraoküler ayrıcalıklı mikroçevre nedeniyle, oluşan immün yanıtlar lokal olarak inhibe edilir. Gözün bu özellikleri vektörün göz dışına yayılımını engeller ve vektöre karşı sistemik yanıt gelişimi önlenmiş olur. Bu durum sistemik yan etki oluşumu riskini oldukça azaltır. Retinal hücreler post-mitotik hücreler olduğu için genler arası etkileşim olmadan uzun süreli gen ekspresyonu sağlanabilir. Çok sayıda retinal distrofi hayvan modelinin olması, prelinik çalışmalarla tedavinin etkinliğini değerlendirme sürecini hızlandırır. Gözün yapısı, tedavi sürecinin takibini kolaylaştırır. Retinanın direk olarak görülüyor olması, ayrıca invivo değerlendirmeye imkan tanıyan tekniklerin var olması, gen tedavisinin etkinliğini hem hayvan modellerinde hem de insanda non invaziv olarak değerlendirmemizi sağlar. Ayrıca distrofilerin bilateral ve simetrik olması bir gözün kontrol olarak kullanılmasına ve tedavinin hastalık progresyonuna etkisinin değerlendirilmesine imkan verir. Cerrahi olarak göze yaklaşımın kolay olması, genetik materyalin gözün istenilen tabakasına ve hedeflenen hücre kitlesine ulaştırılabilmesini mümkün kılar. İntraoküler kullanımda en sık kullanılan 2 yol vardır: İntravitreal ve subretinal. İntravitreal enjeksiyonda tedavi edici ajan vitreusa

dağılır ve ön retina katları ajana maruz kalır. Subretinal uygulamada ise vektör RPE ile nörosensoryel retina arasında verilir ve bu uygulama sırasında bleb denilen küçük, reversibl, dekolman alanları oluşturulur. İntravitreal uygulanan ajanın difüzyonu sınırlıdır. Öncelikle vitreus, daha sonra internal limitan membran (İLM) ve iç retina katları difüzyonu engeller. Dolayısıyla subretinal uygulama, hedeflenen hücre grupları dış retina katlarında olduğu için daha etkili bir uygulama yoludur. Cerrahi işlem sırasında standart bir vitrektomi cerrahisi sonrası, 39 ya da 41 gauge subretinal kanül kullanılarak vektör subretinal alana uygulanır. Enjeksiyon alanı olarak büyük damarlardan uzak, vasküler arkin içi ya da dışında bir saha seçilir. Foveaya yakın bir alana da uygulama yapılabilir. Tedavi ile ilgili komplikasyonlar daha çok cerrahi ile ilgilidir. Yapılan klinik çalışmalarda vektör ile ilişkili sistemik komplikasyonlara rastlanmamıştır.¹⁻¹⁰

Gen tedavisinin en çok çalışıldığı hastalık grubu, henüz etkin bir tedavisi olmayan herediter retina distrofileridir (HRD). Nadir görülen bu hastalık grubunun insidansı 1/3000'dir. HRD içinde en sık görüleni RP'dir. Bunun yanında LKK, Stargardt'ın makula distrofisi (SMD) ve çok daha nadir görülen diğer retina distrofileri de bu grubun içinde bulunurlar. Tüm HRD'leri düşünüldüğünde 250'nin üzerinde etkilenmiş genden bahsedilebilir. Aynı gen içinde farklı mutasyonlar olabilir ve bu mutasyonlar farklı fenotiplere yol açabilir. Bu durum hastalıklarla ilgili genetik çeşitliliği daha da karmaşık hale getirmektedir. Son yıllarda meydana gelen gelişmeler genetik patogenezin daha iyi anlaşılmasına ve gen tedavilerinin uygulanabilmesine yol açmıştır.¹⁰

2-GEN TEDAVİSİNDE TEMEL YAKLAŞIMLAR

Gen tedavisi sırasında hastalığa neden olan mutasyonu düzeltmek için değişik yaklaşımlar kullanılabilir. 1. Gen replasmanı ile endojen mutasyonlu gen çıkarılmadan bu genin sağlam bir kopyası vektörler aracılığıyla dokuya uygulanır. Günümüzde en çok çalışma yapılan yöntem budur. 2. Gen silencing (susturma) yönteminde ise mutasyonlu genin ekspresyonu mRNA'nın modifikasyonu ile inhibe edilir. 3. Gen editing (düzenleme) ile de mutasyonlu genin mutasyonlu parçasında düzenleme yapılır. HRD'lere neden olan genlerin sayısının çok yüksek olduğu düşünülürse mutasyondan bağımsız stratejilerin geliştirilmesi, yaşayan hücrelerin canlılığının artırılması, retinal dejenerasyonun yavaşlatılması tedavide kullanılabilecek daha kolay alternatiflerdir. Mutasyon bağımlı ya da bağımsız, başarılı bir gen tedavisinde kilit noktası vektörlerdir. Vektörler non-viral ve viral olmak üzere 2 grupta incelenir.^{9,10}

3-GEN TEDAVİSİNDE KULLANILAN VEKTÖRLER

3A-NON-VİRAL VEKTÖRLER

Non-viral vektörlerde DNA, ya tek başına ya da diğer kimyasallarla kombine edilerek taşınır. Kimyasal madde olarak lipozomlar, polimerler, nanopartiküller (NP) kullanılabilir. Elektroporlaştırma ve iyontoforez gibi yöntemlerle de vektörün retina içine taşınma ve uyum sağlama işlemleri arttırılmaya çalışılır. Nonviral vektörler daha güvenli, immunojenitesi düşük, mutagenез riski düşük, kapasitesi yüksek taşıyıcılarıdır. Yüksek kapasiteleri nedeniyle büyük genleri, tüm genomik DNA'yı, gen düzenleyici elementleri, intronik sekansları taşıyarak maksimum etkinlik sağlayabilirler. Ancak non-viral vektörlerin aşması gereken bazı engeller mevcuttur. Bunlar 1) Ekstrasellüler DNA degradasyonu 2) Hücre membranı 3) Lizozom ya da endozom bağlantılı degradasyon 4) Sitoplazmik degradasyon enzimleri 5) Nukleus zarıdır (postmitotik retinal hücrelerde geçilmesi oldukça zordur). Gözün içinde bulunan fiziksel bariyerler [vitreus, eksternal limitan membran (ELM), İLM vb] DNA'nın hücre içine geçişini zorlaştırır. Bazı fiziksel ve kimyasal işlemler yardımıyla DNA'nın bu engelleri aşması için çalışılmaktadır. Fiziksel metodlardan biri olan elektroporizasyon yönteminde hücre zarına elektriksel uyarılar verilerek zarın geçirgenliği arttırılmaya çalışılır. Bu uygulama DNA'nın subretinal uygulanması sonrası yapılır. Deneysel çalışmalarda bu yöntemle DNA'nın retinal ganglion hücrelere (RGH) ve diğer retina hücrelerine geçişi sağlanabilmiştir. Diğer bir fiziksel metod olan iyontoforezde ise dokuya düşük dozda elektriksel uyarı verilerek moleküllerin doku içinde hareket etmesi sağlanır. Yine deneysel çalışmalarda transpalpebral iyontoforezin uygulanan ajanların etkinliğini arttırdığı ve güvenli olduğu belirtilmiştir. Literatürde suprakoroidal penetran deneysel uygulamalar da vardır.

Kimyasal yöntem olarak da lipozomlar, polimerler, NP'ler non-viral gen taşınımında kullanılmaktadır. Bu ajanlar bazen DNA ile kompleks oluşturarak, bazen de reseptörler aracılığıyla hücre membranından geçişi kolaylaştırırlar. Lipozomlar yuvarlak veziküler yapıda ampifilik lipit parçacıklarından oluşan, bioindirgenabilir moleküllerdir. RPE hücrelerine geçiş yapabilirler. Katyonik polimerler (polipeksler) negatif yüklü DNA ile yüklenebilir ve intravitreal enjeksiyon sonrası iç retinal hücrelere geçiş yapabilirler. Ancak subretinal uygulama sonrası hem lipozomlarla hem de polipekslerle toksik etkiler görülmüştür. Solid lipid nanopartiküllerin (SLN) de subretinal ve intravitreal uygulama sonrası RPE ve fotoreseptörlere geçiş yapabildiği gösterilmiştir. Konsantre NP'ler tek DNA molekülü ve pozitif yüklü peptid molekül-

leri içerirler. Bu grupta en son çalışılan moleküller 'Peptides for ocular delivery' (POD) ve CK30PEG-NP'dir. POD nanopartiküllerinin subretinal enjeksiyon sonrası RPE ve fotoreseptörlere geçiş yapabildiği gösterilmiştir. CK30PEG-NP, polietilen glikol (PEG) ile konsantre edilmiş DNA molekülü içerir. Boyutu 25 nm'den küçük olduğundan nukleus porlarından aktif transport olmadan geçebilir ayrıca direk hücre yüzey reseptörüne bağlanabilir. CK30PEG-NP göz içi uygulamalarda inflamatuvar reaksiyona neden olmadan retina içine geçiş yapabilir. En önemli avantajı da 14 kb gibi çok geniş bir taşıma kapasitesine sahip olmasıdır. Uygulamadan 1 yıl sonra hala etkinliğinin korunduğu görülmüştür. Deneysel çalışmalarda periferin geni (PRPH2) ve ABCA4 geni taşıyan CK30PEG-NP'nin farelerde subretinal uygulanması ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Bu sonuçlar non-viral vektörlerle büyük genlerin başarılı bir şekilde retina içine taşınabildiğini gösteren ilk sonuçlardır.¹¹⁻²³

3B- ADENO-ASSOCIATED VİRAL VEKTÖRLER

Adeno-associated virus (AAV), küçük (25 nm) zarfsız, lineer tek sarmallı DNA genomu (4.7 kb) içeren ikosaedral bir virustür. Parvovirüs ailesindedir. Adeno, herpes ya da papillomavirus gibi yardımcı virüsler varlığında çoğaldığından bu adı almıştır. AAV bazı avantajları nedeniyle günümüzde gen tedavisinde en çok kullanılan vektördür. Küçüktür ve subretinal alanlara rahatlıkla geçebilir. İmmunojenitesi düşük ve güvenlidir. Uzun dönem ekspresyonu nedeniyle tek uygulamada uzun süreli etkinlik gösterebilir. Çok sayıda varyantı ve her varyantın kendine özgü eksternal kapsid proteini vardır. Varyantlar arasında kapsid değişimi mümkündür bu da hibrid vektörlerin geliştirilmesine imkan tanımaktadır (Örn: AAV2/8).

AAV uyum özellikleri: Her AAV serotipinin uyum karakterleri farklıdır. Her AAV kapsidi farklı reseptörlerle ve farklı hedef hücrelerle etkileşir. Hayvan modellerinde subretinal uygulama sonucu RPE hücrelerine uyum sağlayıp geçiş yapabilen serotipler AAV2/1, AAV2/4 ve AAV2/6 şeklindedir. RPE'ne ek olarak fotoreseptörlere en iyi uyum sağlayan vektör serotipleri ise AAV2/5, 2/7, 2/8 ve 2/9'dur. İntravitreal uygulamalarda retinal hücrelere en iyi geçiş gösteren serotipler AAV2/2, AAV2/6 ve AAV2/8'dir. Vitreustan retinaya geçişte en önemli bariyer kalın İLM'dir. İLM dejeneratif bir nedenle ya da enzimatik bir işlemle bozulursa vektör geçişi daha fazla olabilir.

AAV'ün vektör olarak kullanımında 2 temel kısıtlama vardır. Birincisi retina içinde yavaş eksprese olması, diğeri ise sınırlı taşıma kapasitesidir. İlk kısıtlama self-complementary AAV (scAAV) (kendini tamamlayan AAV) kullanılarak

çözülmüştür. Bu vektörlerde tamamlayıcı sarmal bulunur ve nukleusta çift sarmallı AAV oluşturabilir. Çift sarmallı AAV'ler tek sarmallıdan daha hızlı etki gösterebilir. Deneysel çalışmalarda scAAV kullanımı ile 4 gün içinde retinada etkinin ortaya çıktığı saptanmıştır. Ancak çift sarmallı genomun boyutunun biraz daha büyük olması zaten sınırlı olan taşıma kapasitesini daha da azaltmaktadır. AAV'lerin en büyük sorunu 4.7 kb ile sınırlı taşıma kapasitesidir. Bu nedenle **büyüklüğü**

5 kb'ı geçen ABCA4, MYO7A, CEP290, USH1B gibi genlerin tedavisi için kullanılamamaktadır. Bu problemi çözmek için büyük genler iki parçaya bölünerek 2 ayrı vektöre yüklenmiş ve hibrid dual-AAV oluşturulması üzerine çalışılmıştır. Deneysel çalışmalarda dual-AAV ile birlikte kullanılan ABCA4 ve MYO7A tedavilerinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Dual-AAV'ün retinaya uygulanması ile RPE ve fotoreseptörlere yeterince gen aktarımı yapılabildiği gösterilmiştir.

RPE hastalıklarında AAV kullanımı: RPE'ne gen aktarımı fotoreseptörlerden daha kolay olduğu için RPE kaynaklı hastalıklarda gen tedavisi daha başarılı sonuçlar vermektedir. Son yıllarda mer-reseptör tirozin kinaz (MERTK) ve RPE65 genine yönelik çalışmalar buna en iyi örnektir. MERTK fotoreseptör dış segmentlerinin RPE tarafından fagosite edilmesinde görev alan bir genidir. Eksikliği retinal dejenerasyona yol açar. MERTK geni taşıyan AAV2/2 ve AAV2/8 vektörleri ile yapılan deneysel çalışmalarda retinal anatomi ve fonksiyonun korunması açısından başarılı sonuçlar alınmış ve klinik çalışmalar başlatılmıştır. Bu konuda en başarılı olan gen tedavisi RPE65 ile ilgilidir ve günümüzde ticari bir ürünü mevcuttur. Bu konunun ayrıntılarından ilerleyen kısımlarda bahsedilecektir.

Fotoreseptör hastalıklarında AAV kullanımı: Daha etkin vektörlerin elde edilmesi ile RP, LKK, koroideremi ve retinoskizis hastalıklarında etken olan PDE6B, PRPH2, GNAT2, CNGB3, GUCY2D, AIPL1, RPGRIP1, RS1, CHM/REP1 genlerine yönelik deneysel çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışmaların büyük bir kısmı başarılı olmuş ve bazı genler için klinik çalışma aşamasına geçilmiştir. İleriki bölümlerde bunlardan bahsedilecektir.

RGH hastalıklarında AAV kullanımı: Leber'in herediter optik nöropatisi (LHON) mitokondride NADH-ubiquinone oksidoredüktaz kompleksini (Kompleks I) kodlayan birkaç gende mutasyon sonucu oluşur ve genç erişkinlerde RGH kaybı ve görme kaybıyla sonuçlanır. Olguların yaklaşık yarısı NADH dehidrogenazın 4. subünitini (ND4) kodlayan mitokondriyal gende mutasyonla oluşur. AAV2/2-ND4 ve AAV2/2-ND2 ile yapılan deneysel uygulamalarda mitokondriye yeterli geçişin gösterilmesi sonucu LHON'nde gen teda-

visine yönelik klinik çalışmalar başlatılmıştır (NCT01267422, NCT02064569).

AAV'ün gen susturmada kullanılması: Bu konuda yapılan çalışmalarda henüz başarılı sonuçlar bildirilmemiştir.

AAV'ün mutasyondan bağımsız kullanımı: Tüm genetik bozukuklarda son nokta fororeseptör apoptozisi olduğu için hastalığı durdurmak ya da yavaşlatmak adına nörotrofik, antiapoptotik, antioksidatif, antiinflamatuvar moleküllerin ve büyüme faktörlerinin kullanımı üzerinde çok çalışılmıştır. Nörotrofik büyüme faktörlerinin [Fibroblast derive growth faktör (FGF), lens epiteli derive growth faktör (LEDGF), siliyer derive nörotrofik faktör (CNTF), brain derive nörotrofik faktör (BDNF), glial derive nörotrofik faktör (GDNF), pigment epitel derive faktör (PEDF), eritropoetin (EPO)] AAV'lerle intraokuler uygulanması, genetik mutasyondan bağımsız olarak fotoreseptör kaybını yavaşlatmıştır. Ancak bu ajanların fizyolojik sınırlar dışında ekspresyonu konusunda hala güvenilirlik açısından kaygılar mevcuttur. CNTF'ün intraokuler kullanımı sonrasında ERG amplitüdlерinin azalması çalışmanın sonlandırılmasına neden olmuştur. Bu alan-daki çalışmalar devam etmektedir.²⁴⁻³²

3C- RETROVİRAL – LENTİVİRAL VEKTÖRLER

Retrovirüsler 2 adet tek sarmallı RNA'ya sahip virüs ailesidir. Bu ailede 7 kuşak mevcuttur: alfaretrovirus, betaretrovirus, gammaretrovirus, deltaretrovirus, epsilonretrovirus, lentivirus ve spumavirus. Retroviral vektörler arasından sıklıkla lentivirüsler (LV) kullanılmıştır.

LV'ler zarflı retrovirüslerdir. Pozitif tek sarmallı RNA genomu içerirler ve hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri etkilerler. Genomlarını hedef hücrenin kromozomuna entegre edebildikleri için uzun süreli ekspresyon sağlayabilirler ve hücre bölünse de genomları kaybolmaz. Rekombinant LV genomunda viral genlerin büyük bir kısmı çıkarılabileceği için, 8 kb'lık geniş bir taşıma kapasitesi oluşturmak mümkündür. İntraokuler kullanımları sonrası immunolojik yanıtı tetiklemezler. Dezavantajları ise mutasyona uğrama potansiyelleri, üretim aşamalarının kompleks olması ve büyük boyutları (~80–100 nm) nedeniyle doku içindeki dağılımlarının etkilenme ihtimalidir. Vektörün doku içinde daha kolay dağılımını sağlamak için enzimatik yöntemlerle interfotoreseptör matriksi zayıflatma konusunda çalışmalar yapılmaktadır.^{10,33-35}

3D-ADENOVİRAL VEKTÖRLER

Adenovirüsler lineer çift sarmallı DNA'ya sahip bir ailedir. Bu ailenin A-F arasında gruplanmış oldukça geniş 50 adet

insan serotipi bulunmaktadır. Subgrup C içinde bulunan A2 ve A5, gen tedavisinde kullanılan ve nononkojenik olan virüslerdir. Adenovirüsler post-mitotik hücreleri de etkilerler bu nedenle 48 saat içinde etkinlik gösterirler. Ev sahibi hücrelerin hücre siklusüne girmezler, dolayısıyla hücre ölümüne yol açmazlar. Ayrıca viral DNA'sı ev sahibi hücrelerin genomuna entegre olmadığı için bu hücrelerde mutageneze yol açmazlar. Adenovirüs geni uyum sağladığı hücre içinde stabildir. Ayrıca kapasitesi de oldukça yüksektir. Bu nedenlerle gen tedavisinde daha çok dikkat çekmektedir. Viral DNA'nın replikasyonda görev yapan bölümü çıkarılarak virüs vektör haline getirilir. Çıkarılan bölümün büyüklüğüne göre taşıma kapasitesi artırılır.¹⁶⁻¹⁸ 37 kb'a kadar ulaşabilen oldukça büyük bir taşıma kapasitesine sahiptirler. Başka bir avantajları da kolay üretilebilmeleridir. Ancak kapasite büyük olunca vektör boyutu da büyük olmaktadır (~100 nm). Bu durum doku içindeki dağılımını olumsuz etkilemektedir. Vektörün diğer bir dezavantajı da immun reaksiyon oluşturma potansiyelidir. Adenovirüs serotip 2 ve 5 in vektör olarak kullanıldığı RPE65, MERTK, PDE6B genleriyle ilgili deneysel çalışmalarda başarılı sonuçlar bildirilmiştir.^{10,36-38}

4-CRISPR/CAS 9 TEKNOLOJİSİ

Son yıllarda genom-editing teknolojisi hızlı bir ilerleme kaydetmiştir. Bu yöntemde öncelikle mutasyonlu gen bölgesi belirlenir, nükleazlar yardımıyla bu bölgede DNA kesilir, daha sonra da bölgenin büyüklüğüne bağlı olarak DNA onarımı yapılır. Bu teknolojide DNA'yı kesmek için sıklıkla 4 nükleaz-bazlı yöntem kullanılır: zinc finger nükleaz (ZFN), transcription activator like efektör nükleaz (TALEN), meganükleaz ve clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) ile buna bağlantılı CRISPR-associated protein 9 (Cas9) (CRISPR/Cas9) sistemi.³⁹ Önceki teknolojilerde hedef şaşıma oranları çok yüksek iken CRISPR/Cas9 sistemi ile daha etkin ve güvenilir bir genom düzenleme yapılabilen, hedeften şaşma daha az görülmektedir. Son yıllarda geliştirilen yazılımlar ile hedef dışı (off-target) etkileşim daha nadir olmaktadır. Spy Cas9 inhibitor olarak da bilinen "anti-CRISPR" protein AcrIIA4 yardımıyla hedef dışı etki azaltılabilmekte ve genin mutasyonlu alleli hedef alınabilmektedir.⁴⁰⁻⁴²

CRISPR/Cas9 tekniği HRD'de sıklıkla çalışılmaktadır. Bu teknikte öncelikle hastalığa neden olan mutasyonlu bölge saptanır ve mutasyonlu DNA kesildikten sonra büyüklüğüne göre DNA onarım metodu belirlenir. DNA'daki mutasyonlu alanların onarımı 3 metodla yapılır. A) Homology-directed repair (HDR): DNA şablonu olarak benzer (kardeş) bir kromatid parçası kullanılır. B) Nonhomologous-end joi-

ning (NHEJ): Bozuk DNA'nın uçları benzer olmayan parçalarla kapatılır. C) Microhomology-mediated end joining (MMEJ): DNA uçları benzer birkaç nükleotid kullanarak bir araya getirilir. Bozuk DNA parçalarının hedeflenmesinde ve kesilmesinde o bölgeye spesifik endonükleazların kullanılması çok önemlidir.⁴³

Bu amaçla programlanabilir 4 temel nükleaz platformu kullanılır: Meganükleazlar, ZFN, TALEN, and CRISPR-associated nuclease/Cas9 (CRISPR/ Cas9).³⁹

CRISPR/ Cas9 sisteminin avantajları:

(1) Bu sistemde kullanılan short guide RNA (sgRNA)'nın dizaynı ve üretimi diğer sistemlerden daha kolay ve çabuktur.

(2) Bu yöntemle daha spesifik bir şekilde genom düzenleme yapılabilir.

(3) CRISPR sistemi daha güçlü bir sistemdir. Aynı anda farklı sgRNA'lar kullanılarak çok sayıda gen aynı zamanda ve daha güçlü bir şekilde düzenlenebilir. Bu nedenle poligenik hastalıklarda kullanım için daha uygun ve etkin bir sistemdir.⁴⁴⁻⁴⁶

Kaygılar ve Çözümleri:

Off target (Hedef dışı) etkiler:

CRISPR/Cas9 hedeflenen sekansı tanısa da, hedeflenmeyen bazların kesilmesi ve istenmeyen gen kırılmalarının olması mümkündür. Bu kırılmalar tümör supresör genleri aktive edebilir. Klinik uygulamalara geçilmeden off-target etkilerin azaltılması gerekir. Bu amaçla hedef belirleyici bazı araçlar ve bazı yöntemler geliştirilmektedir.⁴⁷⁻⁴⁹

CRISPR/Cas9 sisteminin retinal dejenerasyon hastalıklarında kullanılması:

Tür kısıtlaması olmadan CRISPR/Cas9 sistemi hayvan modellerinde gen modifikasyonu için kullanılabilir. Şu ana kadar RP, LKA, retinoblastoma ve katarakt hayvan modellerinde kullanımı söz konusu olmuştur. Fare ve ratlarda yapılmış başarılı çalışmalar vardır.⁵⁰⁻⁵³

Sonuç olarak, mevcut çalışmalar CRISPR/Cas9 sisteminin retinal dejenerasyonlarda genom editing için kullanılmasının etkin ve güçlü bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir. Halen çözülmesi gereken zorluklar bulunmaktadır ve bu nedenle klinik kullanıma geçmeden önce daha çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca CRISPR/Cas9 teknolojisinin kök hücre teknolojisiyle birleştirilmesi ile daha başarılı sonuçlar elde edilebilir.

5- GEN TEDAVİSİNİN UYGULANDIĞI HASTALIKLAR

5A-LEBER'İN KONJENİTAL KÖRLÜĞÜ VE RETİNİTİS PİGMENTOSA

Leber'in konjenital körlüğü (LKK) nadir görülen (1/50-100 bin), çok ağır seyreden, konjenital RP formudur. Olgularda fundus bulgularının yanında bozulmuş ışık refleksi, elektroretinografi (ERG)'de kayıt alınmayacak derecede belirgin azalma ve nistagmus mevcuttur. Görme kaybı doğumla ya da hayatın ilk birkaç yılında başlar ve erken erişkinlik döneminde total körlükle sonuçlanır. Günümüze dek LKK'ne neden olan 20 gen, 65 de mutasyon saptanmıştır.⁵⁴⁻⁶⁴ Bu genlerden sadece RPE'ye spesifik protein 65 kDa (RPE65) genine yönelik bir tedavi mevcuttur. RPE65 geni, RPE hücrelerinde eksprese edilir ve all-trans retinil esterinin 11-cis retinale dönüşümünü sağlayan izomerohidrolazı kodlar. 11-cis retinal olmadan opsiner ışığı yakalayıp elektriksel uyarıya çeviremez. RPE65 mutasyonu görme siklusunu bozarak, RPE hücrelerinde lipid damlacıkları içinde retinil ester birikimine, lipofuksin granüllerinde artışa neden olur. Sonuçta progresif bir retinal dejenerasyon ve görme kaybı meydana gelir.

RPE65 gen mutasyonu ile ilişkili hereditör retina hastalıkları, RP 20 (O-R geçişli RP) ve RP'nin en ağır formu olan LKK tip 2'dir. RPE65 gen mutasyonu O-R RP'lerin %1-2'sinde, LKK olgularının da %7-16'sında görülür.^{54,56}

Hastaların tedaviye uygunluğunu anlamak için öncelikle genetik tanı yapılmalı ve retinal hastalığın RPE65 mutasyonuna bağlı olduğu gösterilmelidir.⁶⁵

Genetik tedavi ile ilgili öncelikle preklinik çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. RPE65 gen mutasyonu olan farelerde bu geni taşıyan AAV vektör uygulaması hastalığın evresinden bağımsız olarak RPE transdüksiyonunu arttırmıştır. Enjekte edilen RPE65'in 7 ay sonra bile immunohistokimyasal olarak saptanabildiği görülmüştür. Tedavi edilen farelerde retina normal morfoloji göstermiş, retinil ester ve rodopsin seviyeleri normal olarak saptanmıştır. Tedaviden 2 ay sonra yapılan ERG'lerde retina fonksiyonlarının iyileştiği belirlenmiştir.⁶⁴ 1-2 aylık RPE65 defektli farelerde ve rd12 farelerde subretinal AAV2 ile paketlenmiş RPE65 gen uygulaması retinanın korunmasına ve ERG'de düzelmeye yol açmıştır.⁶⁵

LKK'li köpeklerde tek enjeksiyonla gen tedavisinin etkili olduğu görme fonksiyonunun düzeldiği gösterilmiştir. Enjeksiyondan 2 hafta sonra görme iyileşmesi başlamış, 3 ayda pik yapmış ve 7 yıla dek devam etmiştir.^{66,67} RPE65 defektli farklı köpek modellerinde yapılan çalışmalarda uzun vadede devam eden, görme düzeylerinde ve ERG bulgularında da

iyileşmeye neden olan sonuçlar elde edilmiştir.⁶⁸⁻⁷¹ Preklinik köpek çalışmaları güvenli sonuçlar verse de gen tedavilerinin olası doz bağımlı retinal incelmeye gibi bir potansiyel yan etkisi olabilmektedir.⁷²

Hayvan deneylerinde elde edilen cesaret verici sonuçlardan sonra 2008 yılında RPE65-LKK klinik çalışmaları başlamıştır. Yapılan klinik çalışmalarda AAV2-RPE65 gen replasman tedavisi toksisitesi olmayan, cerrahi ve immunolojik olarak güvenli bir tedavi olarak bildirilmiştir. Bu çalışmaların ayrıntılarından aşağıda bahsedilecektir.

RPE65 Geni İle İlgili Klinik Çalışmalar

Hayvan deneylerinde elde edilen cesaret verici sonuçlardan sonra 2008 yılında RPE65 gen tedavisi (voretigene neparvovec: VN) ile ilgili klinik çalışmaları başlatılmıştır.

Faz Çalışmaları

Bu hasta grubunda yapılan çalışmalarda sonuçları değerlendirmek için görme keskinliği, görme alanı yanında FDA tarafından onaylanan multiluminance mobility test (MLMT) ve full-field light sensitivity testi (FST) kullanılmıştır.

MLMT farklı aydınlanma ortamlarında hareket etme yeteneğini, FST ise ışığa duyarlılığı değerlendiren testlerdir. MLMT'nden kısa şekilde bahsetmek uygun olacaktır. Hareket etme yeteneğini etkileyen bileşenler görme keskinliği, görme alanı ve kontrast duyarlılıktır. Görme düzeyi düşük olan kişilerde hareket etme yeteneği, görme keskinliğinden çok görme alanı ve kontrast duyarlılıktan etkilenir. Görme alanı 70 derecenin altına düştüğünde hareket etme yeteneği de belirgin olarak bozulur. MLMT bir odada 9 farklı aydınlatma seviyesi kullanılarak yapılır (1, 4, 10, 50, 100, 150, 200, 250 ve 400 lüks). Çalışmalar sırasında birbirinden farklı, gerçek hayatta daha çok karşılaşılabilecek aydınlatma seviyeleri kullanılmıştır.

Oda içinde hasta için değişik kontrastta cisimlerden engellerden oluşan labirent şeklinde bir yürüme rotası oluşturulmuştur. Test sırasında temel amaç hastanın bu yürüme rotasında başarısız ve başarılı olduğu aydınlatma seviyelerini belirlemektir. Her kontrolde farklı bir aydınlatma seviyesi kullanılarak test yapılır ve amaca ulaşmaya çalışılır. Test yapılırken gözler ayrı ayrı test edilir ve testten önce en az 40 dakika karanlık adaptasyonu yapılır. Test sırasında sesli video kaydı alınır. Hastaya test sırasında sesli ipucu verilmez ve temas edilerek yönlendirme yapılmaz. Hastanın hatasız testi tamamladığı süre de kaydedilir. Az gören hastalarda yapılan bu çalışmalar, rutinde uyguladığımız yöntemlerin bu hastaları

değerlendirme konusunda yeterli olmayacağını da göstermiştir.⁷³⁻⁷⁵

RPE 65 geni ile ilgili üç farklı grup tarafından az sayıda olgu içeren faz I sonuçları yayınlanmıştır.⁷³⁻⁷⁵

Bainbridge ve ark. larının yaptığı faz I çalışmada 3 olguya subretinal rAAV 2/2- RPE65 uygulaması yapılmıştır. Olguların hiçbirinde ciddi yan etkiye rastlanmamıştır. Olguların 3'ünde de görme keskinliği ve Goldmann perimetri ile bakılan görme alanı testlerinde klinik olarak anlamlı bir iyileşme olmamıştır. ERG ile değerlendirilen retina yanıtlarında da değişiklik kaydedilmemiştir. 1 olguda mikroperimetride ve karanlık adaptasyon perimetrisinde belirgin iyileşme görülmüş bu olgunun MLMT'nde de belirgin düzelmeler saptanmıştır.⁷³

Hauswirth ve ark.'nın⁷⁴ yaptığı faz I çalışmada 21-24 yaş aralığında 3 olguya tek göze subretinal 150 mikrolitre içinde 5.96×10^{10} vektör genomu (vg) uygulanmıştır. Olgularda ciddi bir yan etkiye rastlanmamış, 1 olguda OKT'de foveal incelmeye görülmüştür. Görme keskinliği aynı olmasına rağmen, tüm olgular görme duyarlılıklarının arttığını ifade etmişlerdir. Karanlık adapte FST testinde tüm olgularda tedavi edilen gözlerde belirgin artış görüldükçe, kontrol gözlerde farklılık bulunmamıştır.

Maguire ve ark.'nın yaptığı diğer faz I çalışmaya yine 3 olgu dahil edilmiş, tüm olgularda retinal fonksiyonlarda orta dereceli iyileşme olurken 1 olguda, görmeyi etkilemeyen asemptomatik makuler hol gelişimi izlenmiştir.⁷⁵

Faz I çalışmalarda ilacın güvenli olduğunun gösterilmesi üzerine Maguire ve ark. yaşları 8 ile 44 yıl arasında değişen 12 hastada doz belirleme çalışmasını yaparak 3 farklı dozu subretinal olarak kullanmıştır. Dozlar düşük (1.5×10^{10} vg), orta (4.8×10^{10} vg) ve yüksek (1.5×10^{11} vg) olacak şekilde belirlenmiş ve olgular 2 yıl takip edilmiştir. Tüm olgularda hem subjektif hem objektif ölçümlerde (karanlık adaptometri, pupillometri, ERG, görme alanı, nistagmus ve hareket etme yeteneği gibi) benzer iyileşmeler elde etmişlerdir. Görme alanındaki artışların kurtarılabilir retina alanı ile korele olduğu belirtilmiştir. Hiçbir dozda inflamasyon bulgusu ve retinal toksisite bulgusu görülmemiştir. 2 olguda PCR ile kanda düşük düzeyde vektör saptanmış, geçici olarak sistemik maruziyet olabileceği vurgulanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda en yüksek etkinliği sağlamak için doz olarak 0.3 ml'de 1.5×10^{11} vg seçilmiştir.⁷⁶

Maguire ve ark.'nın uzun dönem takip sonuçlarını sundukları çalışmada faz I çalışma grubundan 11 olgunun 4 yıl, faz III çalışma grubundan ise 29 olgunun 2 yıllık takip sonuçları sunulmuştur. MLMT testinde başlangıç değerine kıyasla

aydınlatma (lüks) değişim skoru faz 1 olgularda 1. yılda 2.6, 4. yılda 2.4 olarak bulunmuştur. Aynı skor faz 3 olgularında 1. yılda ve 2. yılda 1.9 olarak bulunmuştur. Tüm olgularda FST testinde ışık hassasiyetinde $2 \log_{10}$ (cd.s/m²) ve üzerinde artış saptanmıştır. Hiçbir olguda virusa karşı immün reaksiyon görülmemiştir. Elde edilen verilerle tedavinin etkisinin uygulamadan 30 gün sonra başladığı ve 4 yıl süreyle korunduğu belirtilmiştir.⁷⁷

5 olgunun 3 yıllık takiplerini içeren başka bir çalışmada tüm olgularda görme keskinliğinde artış ve görme alanında genişleme olduğu ve bu iyileşmelerin 3 yıl süreyle korunduğu bildirilmiştir. Takip boyunca herhangi bir yan etki oluşmamıştır.⁷⁸

Faz I/II çalışmalarında elde edilen başarılı sonuçlardan sonra 2012 yılında Spark Therapeutics sponsorluğunda Faz III çalışması planlanmıştır. ABD'de 2 ayrı merkezde yapılan, randomize, kontrollü çalışmaya 3 yaş ve üzeri olgular dahil edilmiştir. Görme keskinliği 20/60'ın altında, görme alanları 20 derecenin altında, biallelik RPE65 mutasyonu olan, yeterli canlı retinası olan, testleri yapmakta problemi olmayan olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Cerrahi işlem bilateral uygulanmış, subretinal olarak 0.3 mL içinde 1.5×10^{11} vg içeren VN yapılmıştır. 1 yıllık takip sonunda MLMT skorundaki değişim tedavi grubunda (1.8) kontrol grubundan (0.2) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tedavi grubunda olguların % 65'i MLMT'de en düşük aydınlatmada bile başarılı olmuşlardır. Tedavi sonrasında ilk 1 ayda başlayan iyileşmeler 4 yılın sonuna dek korunmuştur.

Görme keskinliğinde tedavi grubunda ortalama 8.1 harflik, kontrol grubunda ise 1.6 harflik artış saptanmış olmasına karşın, değerler arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

Olguların çoğu Goldmann perimetri testini en küçük hedefle (III4e) yapmayı başarmışlardır. Görme alanında ölçülen toplam derece miktarı tedavi grubunda 2 katına çıkarken, kontrol grubunda azalmaya devam etmiştir. Tedavi edilen olgularda ayrıca nistagmus sıklığında azalma, multifokal ERG yanıtlarında artış ve mikroperimetride fiksasyon stabilitesinde artış saptanmıştır. En iyi sonuçlar retinal yanıtları daha iyi olan genç hastalarda alınmıştır.

Vektörle ilişkili yan etkiler hafiftir ve göz içi basıncı artışı ve hafif inflamasyon şeklindedir. Bunlar dışında vitrektomi ile ilişkili yan etkiler görülebilir.^{79,80} Tedavi grubunda FST testinde ışık hassasiyetinde ortalama $2 \log_{10}$ (cd.s/m²) iyileşme saptanırken kontrol grubunda hiç değişiklik olmamıştır.⁷⁹

VN ile ilgili çalışmalarda görme keskinliğinde artışlar saptansa da istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Aslında

artış olması da beklenmemektedir. Çünkü görme keskinliği fovea ile ilgili bir ölçümdür ve kon yanıtlarını içermektedir. Dolayısıyla rod hücrelerine yönelik bir tedavide temel hedef görme keskinliğinde artışı sağlamak değildir. Görme keskinliğinde kısıtlı artış olmasının başka nedenleri de olabilir. Örneğin verilen ilacın foveaya temas etmemesi, kon hücrelerinin çok sağlıklı olmaması gibi.⁷⁹

Gen terapisi ile ilgili uzun dönem etkileri tam bilinmemektedir. Jacobson ve ark.⁸⁰ tedaviden sonra 5-6 yılını dolduran 3 olgunun takip sonuçlarını sunmuşlardır. Takip süresince görmede artışlar olmasına rağmen fotoreseptör kaybının devam edebileceğini görülmüştür. Tedavi edilen retina alanlarında topografik haritalarla ölçülen retinal sensitivitedeki artışın uzun dönemde devam ettiği ancak bir miktar daralma gösterdiği belirtilmiştir. Benzer bir şekilde Bainbridge ve ark.⁸¹ nın çalışmasında ilk 1 yıl içinde iyileşme gösteren hastaların yarısında 3. yıl sonunda retinal sensitivite de azalma görülmüştür.⁸¹ Ancak faz I çalışmasının devamında 3 yıllık takibi tamamlanan hastaların halen gen ekspresyonunu devam ettirdikleri ve görme siklusundaki onarımın devam ettiği belirtilmiştir.⁷⁸

İlacın yan etki profilini değerlendirmek için faz çalışmalarına dahil edilen toplam 41 olgunun 81 gözünden elde edilen veriler incelendiğinde, olguların %66'sı, gözlerin %57'sinde yan etkiye rastlandığı bu yan etkilerin VN enjeksiyonu, cerrahi işlem, kortikosteroid kullanımı ile ilgili olduğu belirtilmiştir. En çok görülen yan etkiler cerrahi ile ilişkili konjonktival hiperemi, katarakt, göz içi basıncı artışı, retinal yırtık, dellin, makula deliği, subretinal depositler, gözde enflamasyon ve iritasyon ve makula yüzeyinde kırışıklık şeklindedir.

Ciddi okuler yan etki olarak 1 olguda foveal inceleme, 1 olguda da steroidlere bağlı glokom ve optik atrofi, 1 olguda retina dekolmanı görülmüştür.⁸¹

On yıldan fazla süren çalışmaların sonucunda 2017 Aralık ayında ilk gen tedavisi ilacı olan voretigene neparvovec-rzyl (VN) (Luxturna, Spark Therapeutics, Philadelphia, PA, USA) Amerika'da Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır. İlaç homozigot (biallelik) RPE65 gen mutasyonu ile ilişkili herediter retina hastalıklarında günümüzde kullanılan tek farmakolojik ajan olup 2018 yılında da Avrupa Birliği tarafından onaylanmıştır. İlaç sağlam RPE65 genini taşıyan modifiye AAV2 içermektedir. Ömür boyu tek doz olarak uygulanan ilaç, 1 yaşından büyük olan, canlı retinal hücresi olan ve genetik olarak uygun olan tüm olgularda önerilmektedir. Uygulama dozu vitrektomi sonrasında subretinal olarak tek göze 0.3 mL içinde 1.5×10^{11} vg şeklindedir. İki gözün cerrahisinin aynı günde yapılmaması, cerrahiler

arasındaki zamanın 6 günden uzun, 18 günden kısa olması tavsiye edilmektedir. Cerrahiden 3 gün önce başlayarak 10 gün süreyle oral steroid kullanımı önerilmektedir.⁸²

RP'da Farklı Genlere Yönelik Devam Eden Klinik Çalışmalar:

RPE65 dışında en çok çalışma yapılan genler MERTK ve RPGR genleridir.

MERTK geni (İnsan reseptör tirozin kinaz MER) RP tip 38 de bulunan, RPE'de fotoreseptör dış segment artıklarının temizlenmesinde rol alan, fagositik fonksiyon için önemli bir genidir. Hayvan çalışmalarında MERTK geni taşıyan AAV2 vektörünün subretinal uygulaması ile fotoreseptör dejenerasyonunun engellendiği gösterilmiş ve sonrasında insanlar üzerinde klinik çalışmalar başlatılmıştır. Faz I klinik çalışmada 6 olguya subretinal MERTK geni taşıyan rAAV2 verilmiş ve olgular 2 yıl takip edilmiştir. Herhangi bir komplikasyon görülmemiş, olguların %50'si (3 olgu) ilk aydan itibaren görme keskinliğinde iyileşme göstermiş ancak bunların 2'si 2. yıldan

sonra eski görme düzeylerine geri dönmüştür. Bu sonuçta kataraktında etkisi olduğu düşünülmüştür.^{83,84}

Son yıllarda X geçişli RP'de gen tedavisi konusunda da gelişmeler olmuştur. X'e bağlı RP olguların %70'inde RPGR-Paz Regulator geninde (RPGR) mutasyon saptanmıştır.⁸⁵ RPGR geni X kromozomu üzerindedir. Bu gen fotoreseptör iç ve dış segmentlerini bağlayan silyumda bulunur ve segmentler arasında protein transportunda rol alır. Çoğunlukla erkekler bu gen bozukluğundan etkilenir. Hayvan modellerinde RPGR geni yüklü AAV'nin subretinal uygulaması sonrası retinal dejenerasyonun durduğu gösterilmiştir.⁸⁶ Bunun üzerine klinik çalışmalar başlatılmıştır. Nightstar Therapeutics tarafından 2017 yılında başlatılan faz I/II klinik çalışmada (NCT03116113) subretinal verilen 3 farklı doz AAV-RPGR uygulamasının güvenilirliği araştırılmakta ve 24 hastanın 12 ay takibi planlanmaktadır. Benzer şekilde MeiraGTx ve AGTC tarafından XL-RP olgularında RPGR genini hedefleyen faz çalışmaları devam etmektedir. Sonuçları henüz yayınlanmamıştır. Bunlar dışında PDE6B, RLBP1 gibi genlere yönelik klinik çalışmalar mevcuttur.

Tablo 1: RP ile ilgili devam eden klinik gen tedavi çalışmaları

Hedef Hastalık	Faz/ Durum	Hedef Gen	Vektör	Uygulama Yolu	Sponsor	Klinik çalışma No
LKK	I-II Aktif	RPE65	AAV-RPE65	Subretinal	MeiraGTx UKII Ltd	NCT02781480 NCT02946879 (5 yıl takip)
LKK	I-II Aktif	CEP290	QR-110 (RNA antisens oligonükleotid)	Intravitreal	ProQR Therapeutics	NCT03140969
RP	I-II Henüz inaktif	RLBP1	CPK850 (rAAV8 - hRLBP1)	Subretinal	Novartis Pharmaceuticals	NCT03374657
RP	I-II Aktif	PDE6B	AAV2/5-hPDE6B	Subretinal	Horama S.A.	NCT03328130
XLRP	I-II Aktif	RPGR	AAV2/5hRkP.RPGR	Subretinal	MeiraGTx UK II Ltd	NCT0325284
XLRP	I-II Aktif	RPGR	rAAV2tYF-GRK1- RPGR	Subretinal	Applied Genetic Technologies Corp.	NCT03316560
XLRP	I-II Aktif	RPGR	AAV-RPGR	Subretinal	Nightstar Therapeutics	NCT03116113
İleri RP	I-II Aktif	RST-001	AAV2 -rodopsin2	Intravitreal	Allergan	NCT02556736
Non Sendromik RP	I-II Aktif		rAAV2.7m8-CAG	Intravitreal	GenSight Biologics	NCT03326336

LKK: Leber'in konjenital körlüğü

RP: Retinitis pigmentosa

XLRP: X linked retinitis pigmentosa

Tablo 1'de RP'ye yönelik clinical.trials.gov'da kayıtlı, devam eden gen tedavi çalışmaları görülmektedir.

RP'da gen tedavisi ile ilgili oldukça yol alınmış olmasına rağmen birtakım kısıtlamalar da mevcuttur. RP'da genetik geçiş paterni O-D, O-R, X-linked ve mitokondriyal olabilmektedir. Ayrıca bu geçiş paternleriyle ilişkili çok sayıda gen mutasyonu varlığı bilinmektedir. Aynı aile içinde, aynı genin farklı mutasyonları söz konusu olabilmektedir. Bu durum hastalıkla ilgili değerlendirmeleri ve tedaviyi karmaşık hale getirmektedir.

5B-STARGARDT'IN MAKULA DİSTROFİSİ

Stargardt'ın makula distrofisi (SMD) hem erişkinlerde hem de çocuklarda en sık görülen herediter makula distrofisidir. Prevalansı 1/8 bin ile 1/10 bin arasında değişmektedir. O-R geçiş gösterir. Hem klinik hem de genetik olarak oldukça heterojendir. Olgularda her iki gözde santral görme kaybı, renkli görmede bozukluk, karanlık adaptasyonunda gecikme, makulada atrofi ve arka kutupta RPE düzeyinde sarı beyaz lekelenmelerle seyredir. Hastalarda RPE içinde lipofuksin granülleri birikir ve lipofuksinin major floroforlarından A2E birikimi artar. A2E retina için toksiktir. Zamanla retinal fonksiyonda yavaş, progresif bir kayıp olur. Olgular arasında klinik seyir açısından belirgin değişkenlik olması fenotipi etkileyen genetik etkenler ve çevresel faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. Henüz etkin bir tedavisi olmasa da kök hücre ve gen tedavileri ile ilgili olumlu sonuçlar bildirilmektedir.⁸⁷

Hastaların büyük bir kısmında (yaklaşık %80'inde) ABCA4 mutasyonu mevcuttur. ABCA4 geni ABCR proteini ni kodlar. Bu protein ise fotoreseptör spesifik ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcısıdır. All- transretinaldehitin (RAL) diskten sitoplazmaya taşınmasını kolaylaştırır.⁸⁸ ABCA4 mutasyonları değişik retinal hastalıklarla birlikte görülebilir. ABCA4/- farelerde karanlık adaptasyonunun geciktiği, ışığa maruziyet sonrası all-trans-RAL miktarının arttığı, RPE içinde A2E birikiminin arttığı görülmüştür. Ayrıca farelerin fundusunda atrofik bir görünüm ve beyaz-sarı birikintilerin varlığı görülmüştür.⁸⁹ Bu fareler günümüzde deneysel amaçlı kullanılmaktadır.

SMD, monogenik tutulumu nedeniyle genetik tedavi için elverişli bir hastalıktır. Gen tedavisi için en önemli kısıtlama ABCA4 geninin büyüklüğüdür. (6.8 kb) Ancak yapılan bazı çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır.⁹⁰⁻⁹²

Gen tedavilerinde en sık kullanılan vektör olan AAV'ün maksimum kapasitesi yaklaşık 4.7 kb civarındadır. Buna rağmen ABCA4'ü bölerek, AAV'in modifiye bir formu olan

serotip 5 yüklemeye çalışılmış ancak sonuçlar başarılı olmamıştır.^{92,93}

Ancak dual vektörlerle yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Dual vektör DNA'nın iki parçaya bölünüp vektörlere yüklenmesi ile yapılır. DNA'nın ortak çakışan parçaları uygulama sonrasında birleşir. Bu yöntemle ABCA4 geninin dual vektöre yüklemesi mümkün olabilmektedir. ABCA4/- farelerde yapılan çalışmalarda uygulama sonrası bisretinoid üretiminin yeterli düzeyde azaltılabildiği gösterilmiştir. Bu çalışma dual vektörlerin klinik kullanımı için uygun olabileceğini göstermiştir.

Kullanılan diğer bir vektör, kapasitesi daha yüksek olan (8 kb) LV'tür.⁹⁵⁻⁹⁷ Kong ve ark. ABCA4/- farelerde ABCA4 geni taşıyan lentiviral vektörleri subretinal olarak uygulamışlardır.⁹¹ Hayvanlar 1 yıl takip edilmiş ve tedavi edilen gözlerde A2E birikiminin daha az olduğu, RPE hücre toksisitesinin azaldığı retinal dejenerasyonun yavaşladığı görülmüştür. LV'lerin en büyük dezavantajı genom içine rastgele entegre olmasıdır. Bunu çözmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır.⁹⁸

Daha önce de bahsedildiği gibi NP'lerin 20 kb büyüklüğe kadar DNA taşınması mümkündür. Naash ve ark. SMD'li farelere NP'leri kullanarak normal ABCA4 genini uygulamıştır. Bu uygulama görmenin korunmasını sağlamıştır.^{99,100}

Bu teknoloji kullanılarak ABCA4 DNA'sı NP'lerin içine yerleştirilmiştir. NP'leri içeren başka bir çalışmada amino lipid ECO ve ABCA4 plasmid içeren ABCA4- farelerde subretinal olarak uygulanmışlardır. Rodopsin promoter ilavesiyle oluşturulan ECO/pRHO-ABCA4 NP'leri fotoreseptörlerin dış segmentlerinde ABCA4 ekspresyonunu sağlamışlardır. Subretinal yerleştirilen bu NP'lerin gen ekspresyonunu 8 aylık takip sonuna kadar koruduğu belirlenmiştir. A2E birikiminin %35 azaldığı saptanmıştır. Ayrıca ERG ile belirlenen karanlık adaptasyonunda belirgin düzelme, fundus lezyonlarında azalma görülmüştür. Ayrıca toksik etkiye rastlanmamıştır. Bu deneysel çalışmadan elde edilen başarılı sonuçlar NP'lerin büyük genleri taşımada başarılı olacağını göstermektedir.¹⁰¹ Gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hayvan çalışmalarından elde edilen veriler sonucunda LV'e yüklü ABCA4 geni içeren StarGenTM'nin subretinal olarak kullanıldığı ilk klinik çalışması 2011 yılında Amerika'da Portland'da Casey Eye Institute kliniğinde başlatılmıştır. SMD'de saptanan ABCA4 gen mutasyonuna yönelik bu klinik çalışma halen devam etmektedir. (STGD1; NCT01367444) (SAR422459 Gene Therapy Trial).¹⁰² Çalışmaya yaşları 24 ile 66 arasında değişen ve ABCA4 geninde en az bir kromozomda mutasyon saptanan 22 ileri evre SMD hastası dahil edilmiştir. Çalışmanın sonuçları henüz yayınlanmamıştır. Bunu

takip eden ikinci klinik çalışma Fransa'da başlatılmıştır. Faz I/II aşamasında olan bu çalışmalara 28 hasta dahil edilmiş güvenilirlik, tolerabilite ve biyolojik aktivite açısından inceleme yapılmıştır. Sonuçları beklenmektedir.

5C-YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU

YBMD, progresif seyreden, merkezi görmeyi bozan, ileri yaş grubunda geri dönüşümsüz görme kaybına yol açan, dejeneratif makula hastalığıdır. 2 grupta incelenir. 1:Kuru tip (Nonneovasküler) 2: Yaş tip (Neovasküler)

Neovasküler YBMD'de (nYBMD) koroidal ya da retinal damarlardan gelişen anormal vaskülarizasyon söz konusudur. Oldukça kompleks bir oluşum mekanizmasından bahsedilse de temelde proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasında dengenin bozulması söz konusudur. VEGF'in bu mekanizmada kilit rolü oynadığı bilinmektedir. Günümüzdeki tedavinin ana unsuru anti-VEGF faktörlerdir. Ancak maliyetlerin yüksek olması ve sık tedavi ihtiyacı yeni tedavi arayışlarının devam etmesine neden olmuştur. Hipoksi varlığında retinal nöronlardan, Müller hücreleri ve mikrogliyalardan VEGF salınımı artar. Bunun yanında plasental growth faktör (PIGF), platelet-derive growth faktör (PDGF-β), angiopoietin-1 (Ang1) and angiopoietin-2 (Ang2) gibi faktörler de neovaskülarizasyon gelişiminde etkili olur. VEGF reseptörlerinden VEGFR1 (FLT1) and VEGFR2 (FLK1/KDR) endotelial hücreler ile nöronlarda eksprese edilir ve hücre proliferasyonu, migrasyonu ve vasküler geçirgenlik artışından sorumludur. VEGF-A2'nin bu reseptörlere affinitesi yüksektir. nYBMD'de gen tedavileri ya direk olarak ya da reseptörleri yoluyla VEGF'i hedef alır.

YBMD'li hasta grubu diğer gen tedavi gruplarından daha ileri yaşta. İleri yaş, tedaviye immun yanıtın daha az gelişmesine neden olabilir. Ancak yaşlı olgular altta yatan diğer hastalıkların fazla olması nedeniyle yan etkilere daha açık olabilir ve immün supresif tedaviden daha çok etkilenebilir.¹⁰³ YBMD'li olgularda gen tedavileriyle ilgili çalışmalar aşağıdaki şekildedir.

Pigment Epitel Derive Faktör:

Farelerde pigment epitel derive faktör (PEDF) yüklü AAV5'in (AdGVPEDE.11D) intravitreal uygulanması KNV gelişimini inhibe etmiştir.¹⁰⁴ Bunun üzerine faz I doz belirleme çalışması planlanmış, intravitreal AdPEDF uygulanan bu çalışma nYBMD'na yönelik ilk klinik gen tedavi çalışması olmuştur. (NCT00109499). Takip sonunda olguların %25'inde keratik presipitat, ön kamarada flare gibi orta dereceli inflamasyon bulguları görülmüş ancak genel olarak tedavi iyi to-

lere edilmiştir.¹⁰⁵ Kontrol grubu olmayan çalışmada yüksek doz AdPEDF alan olgularda daha düşük doz alanlara kıyasla neovaskülarizasyon boyutunda küçülme ya da **stabilizasyon** daha yüksek oranda görülmüştür. Ve doz bağımlı bir etkiden bahsedilmiştir.

sFLT-1

sFLT-1 VEGF-A'nın en etkili inhibitörlerinden biridir. Lions Eye Institute ve Adverum Bioteknolojileri işbirliğiyle bu moleküle yönelik faz I/II, randomize, kontrollü, klinik çalışma tamamlanmıştır. Çalışmada 65 yaş üzeri, görmesi 3/60-6/24 arasında olan olgular 3 gruba ayrılmıştır. İlk gruba (3 olgu) 1×10^{10} rAAV.sFLT-1 vg (düşük doz), 2. gruba (3 olgu) 1×10^{11} rAAV.sFLT-1 vg (yüksek doz) ajan verilmiş, son grup ise (2 olgu) kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada tek doz subretinal uygulama yapılmıştır (AVA-101) (NCT01494805). Tüm olgulara başlangıçta, 4 hafta sonra ve daha sonra ihtiyaç oldukça kurtarma tedavisi olarak intravitreal ranibizumab uygulanmıştır. Subretinal enjeksiyon sonrası ilaca bağlı yan etki görülmemiş, cerrahi işleme bağlı olarak ortaya çıkan yan etkiler (subkonjonktival hemoraji, subretinal hemoraji, ön kamarada hafif reaksiyon gibi) hafif ve geçici olmuştur. Korioretinal atrofi oluşmamış, 6 olgunun 4'üne (%67) hiç kurtarma enjeksiyonu yapılmamış, 2 olguda ise tek doz enjeksiyon gerekmiştir.¹⁰⁶ AVA-101'in güvenli olduğu belirlenince çalışma genişletilerek olgu sayısı 32'ye çıkarılmıştır. 24 olguya 1×10^{11} vg rAAV.sFLT-1 (yüksek doz) subretinal **verilmiş**. 13 olgu kontrol olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada ciddi bir yan etkiye rastlanmamış; çalışma grubunda 2, kontrol grubunda 4 ranibizumab enjeksiyonu yapılmıştır. Görme keskinliğinde istatistiksel anlamlı artış saptanmasa da tedavinin güvenli olduğu ve iyi tolere edildiği gösterilmiştir.¹⁰⁷

Bu sonuç sonraki çalışmalara yön vermiştir. Sanofi Genzyme tarafından sponsorluğu yapılan başka bir doz belirleme çalışmasında tek doz intravitreal AAV2- sFLT-1 enjeksiyonu sonrası güvenilirlik çalışılmıştır (NCT01024998). Yaşları 50'nin üzerinde, görme keskinlikleri 20/100'den daha düşük olan 19 hasta, 4 ayrı doz grubuna bölünerek olgular 52 hafta takip edilmiştir. Olguların 2'sinde makuler sıvıda belirgin azalma (128 ve 443 mikron) saptanmıştır. Görme keskinlikleri altta yatan skar dokusu nedeniyle sınırlı artış göstermiştir. Genel olarak intravitreal enjeksiyon iyi tolere edilmiştir. Sadece yüksek doz alan (2×10^{10} vg) bir olguda geçici intraokuler inflamasyon saptanmıştır. 2 olguda retinal hemoraji, 1 olguda retinal yırtık saptanmıştır. Bu bulguların genetik ürünle değil, cerrahi işleme ilgili olduğu belirtilmiştir. Yüksek doz alan 10 olgudan 5'inde serumda anti-AAV2 saptanmamıştır.¹⁰⁸

Intravitreal Aflibercept (ADVM-022)

Viral vektöre yüklenmiş aflibercept hayvan deneylerinde etkili bulunmuş ve iyi tolere edilmiştir.¹⁰⁹ Bu nedenle Adverum Bioteknoloji faz I, doz belirleme çalışmalarını başlatmış (NCT03748784), olgulara tek doz intravitreal ADVM-022 (AAV2.7m8- aflibercept) uygulaması yapılmıştır. 34 haftalık takiplerde 6 hastada bu gen ürününün iyi tolere edildiği ve herhangi bir ciddi yan etkiye yol açmadığı saptanmıştır. Hafif düzeyde intraoküler inflamasyon bulgularına rastlanmıştır, bunlar da topikal steroidlerle düzelmiştir. Retinit, vaskülit, koroidit görülmemiş, santral makula kalınlığındaki düzelme 34 haftanın sonuna kadar korunmuş, kurtarma enjeksiyonuna gerek kalmamıştır. 44 haftalık takiplerin sonunda hala kurtarma enjeksiyonu gerekmemiş ve elde edilen anatomik ve fonksiyonel iyileşmeler korunmuştur. Bir olguda spontan psödofovak retina dekolmanı gelişmiş bu komplikasyonun ürünle ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Çalışma halen devam etmekte 2022'de tamamlanması öngörülmektedir.¹¹⁰⁻¹¹²

Ranibizumab-benzeri molekül RGX-314

Bu ürün ranibizumab ile ilişkili solubl anti-VEGF proteini taşıyan AAV8 vektörü içerir. Regenxbio faz I/II doz belirleme ve güvenilirlik çalışmasını yürütmektedir. Bu çalışmada subretinal RGX-314 daha önce herhangi bir anti-VEGF ile tedavi edilmiş olgularda kullanılacaktır (NCT03066258). 42 olgu 5 gruba ayrılmış ve 5 farklı doz uygulaması planlanmıştır. Çalışma halen devam etmektedir. İlk sonuçları oldukça umut vericidir. İlk yayınlanan sonuçlara göre 11 olgunun 8'inde (%73) görme keskinliği artmış, retina kalınlığı azalmış ve 6 ay süreyle anti-VEGF ihtiyacı olmamıştır.¹¹³ RGX-314 uygulamasından 1.5 yıl sonra takipte olan 6 olgudan 3'ünde (%50) anti-VEGF ihtiyacı olmamıştır. Ürün her dozda çok iyi tolere edilmiş, inflamasyon görülmemiştir. Regenxbio 2020 yılı içinde nYBMD ve diabetik retinopati (DR) olgularında suprakoroidal uygulama için bir çalışma planlamaktadır.¹¹³⁻¹¹⁵

Angiostatin ve endostatin

RetinoStat, angiostatin ve endostatin eksprese eden bir lentiviral vektördür. Hayvan modellerindeki uygulamalarda güvenli olduğu ve yeterli ekspresyon yapabildiği görülmüştür.¹¹⁶ Faz I doz belirleme çalışmasına 21 olgu dahil edilmiştir. Sadece 1 olguda makuler hole görülmüştür. Subretinal RetinoStat enjeksiyonu güvenli bulunmuş ve iyi tolere edilmiştir. Ayrıca gen ekspresyonunu etkin bir şekilde yapabilmektedir. (NCT01301443). Uzun dönem etkisini görebilmek için yapılan çalışma devam etmektedir (NCT01678872).¹¹⁷

Kompleman kaskadı

Hemera Biosciences son zamanlarda intravitreal AAV-CAGsCD59 kullanıldığı hem nYBMD hem de kuru tip YBMD için 2 farklı faz I çalışması başlatmıştır (NCT03585556 ve NCT03144999). Bu molekül membran atak kompleksini (MAK) oluşturan son basamak olan kompleman aktivasyonunu hedeflemektedir. AAV-CD59, laser ile indüklenen KNV'da subretinal uygulanmış ve %60 oranında gerileme sağlamıştır.^{118,119}

Tie-2 tirozin kinaz reseptörü

Tie-2 tirozin kinaz reseptörü endotelial hücrelerde bulunan potansiyel bir hedefdir. Angiopietin (Angpt)-Tie2 sistemi vasküler hemostazda önemli rol alır. Hayvan modellerinde intravitreal Ang-1 kullanımı VEGF-trap gibi rol oynayarak KNV oluşumunu engellemiştir. Bu konudaki çalışmalar devam etmektedir.¹²⁰

Gen Susturma (Silencing)

Small RNA interference (siRNA-bevasiranib) kullanılarak yapılan hayvan çalışmalarında VEGF ekspresyonunun suprese olduğu görülmüştür.¹²¹ İnsanlarda yapılmış Faz I çalışmada (NCT00363714) yaş ortalaması 82 olan, aktif KNV'ü olan 26 hastanın 26 gözünde tek doz farklı dozlarda (100, 200, 400, 800, 1200, veya 1600 mikrogram) bevasiranib uygulaması yapılmıştır. Tüm dozlar iyi tolere edilmiş, doza bağlı toksisite görülmemiştir. Yan etkiler hafif ve orta düzeylidir. Ortalama makula kalınlığında en iyi azalma 100 ve 200 mikrogram dozlarda olmuştur.¹²² Ancak insanlarda yapılan intravitreal siRNA-bevasiranib (NCT00499590) faz III çalışması, 60 haftayı tamamlayan hasta oranı hedeflenen oranın altında kaldığından takip eden bağımsız komite tarafından durdurulmuştur.¹²³

Özet olarak, YBMD patogeneğinde pek çok yolağın olduğu kompleks bir hastalıktır. YBMD ile ilgili gen tedavisinin temel hedefi VEGF molekülü olacaktır. Tablo 2'de nYBMD'ye yönelik gen tedavisi ile ilgili klinik çalışmalar görülmektedir.

5D-KOROİDEREMİ

Koroideremi X'e bağlı geçiş gösteren erkeklerde ortaya çıkan, progresif retinal dejenerasyonla seyreden 50 binde bir görülen bir retina hastalığıdır. Etkilenen erkek bireylerde gece görmede azalma, periferik görme kaybı ve 6. dekatta total görme kaybı ile seyredir. Fundus bulgusu olarak sentripedal olarak ilerleyen RPE, koroid ve fotoreseptör atrofisi izlenir. Bu hastalıkta %94 oranında koroideremi (CHM) geninde mutasyon saptanmıştır. CHM geni Rab escort pro-

Tablo 2: nYBMD'ye yönelik gen tedavisi ile ilgili klinik çalışmalar

Kayıt no	Eksprese ettiği gen	Vektör	Faz	Veriliş yolu	Durumu	Sponsor	Yer	Hasta sayısı
NCT00109499	PEDF	AAV5	I	Intravitreal	Tamamlanmış	GenVec	ABD	28
NCT01494805	sFLT01	AAV2	I/II	Subretinal	Tamamlanmış	Lions Eye Institute, Adverum Biotechnologies	Australia	40
NCT03748784	Aflibercept	AAV2	I	Intravitreal	Devam ediyor	Adverum Biotechnologies	ABD	30
NCT01024998	sFLT01	AAV2	I	Intravitreal	Tamamlanmış	Sanofi Genzyme	ABD	19
NCT03066258	Anti- VEGF Fab	AAV8	I/IIa	Subretinal	Devam Ediyor	Regenxbio	ABD	42
NCT01301443	Endostatin ve angiostatin	EIAV	I	Subretinal	Tamamlanmış	Oxford BioMedica	ABD	21
NCT03585556	sCD59	AAV2	I	Intravitreal	Devam ediyor	Hemera Biosciences	ABD	25

AAV, adeno- associated viral vektör; EIAV, equine infeksiyöz anemi lentiviral vektör; nYBMD, neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonu

tein-1 (REP1) proteinini kodlar. REP1 proteini Rab GTPaz enziminin düzenlenmesinde retinada ve RPE'de vezikül taşınmasında kilit rol aynar. ¹²⁴ Preklinik çalışmalarda ¹²⁵⁻¹²⁷ elde edilen cesaret verici sonuçlar sonrasında planlanan bir klinik çalışmada sağlam CHM geni vektör ile (AAV-REP1) subretinal alana enjekte edilmiştir. 2014 yılında, İngilterede başlatılan Faz I/II çalışmanın (Gene Therapy for Blindness Caused by Choroideremia, clinicaltrials.gov ID: NCT01461213) 6 aylık sonuçları yayınlanmıştır. Bu çalışmada AAV serotip 2 kullanılmıştır. 6 olgunun 2' sinde erken dönemde görme artışı elde edilmiş (21 harf ve 11 harf olmak üzere) ve bu artış tedaviden 3.5 yıl sonra da devam etmiştir. Kalan 4 olguda da 1-3 harf arası iyileşme olmuştur. Tüm olgular değerlendirildiğinde ortalama görme artışı 3.8 harf düzeyindedir. 3.5 yıl sonunda tedavi edilen gözlerde görme artışının korunduğu görülmüştür. Tedavi edilen tüm gözlerde mikroperimetri hassasiyet ortalama 2.3 dB yükselmiştir. Retinal hassasiyette artış her mm² alana uygulanan vektör dozuyla koreledir. Tedavi edilmeyen kontrol gözlerde ise ortalama hassasiyette istatistiksel anlamlı azalmalar saptanmıştır (ortalama -1.6 dB). Vektörün fovea dışına uygulandığı bir olguda uygulanan alanda ekzantrik fiksasyon gelişmiştir. ^{128,129}

Almanya'da yapılan faz II klinik çalışma tek merkezli randomize bir çalışmadır (NCT02671539) THOR (Tübingen Choroideremia Gene Therapy). 6 erkek olguya (51-60 yaş aralığında) vitrektomi sonrası tek doz 0.1 ml subretinal 10¹¹ vg AAV2-REP1 uygulaması yapılmış ve 12 aylık sonuçları sunulmuştur. 6 olgunun 4 ünde görme keskinliğinde artış saptanmıştır. Başlangıçtaki ortalama görme keskinliği 60.3 harf iken, takip sonunda 69.3 harfe yükselmiştir (1 ile 24 harf arası artış olmuştur). Olguların 1'i 17 harf kazanırken birinde

14 harf kayıp gelişmiştir. Retinal sensitivitede 2.3 dB artış saptanmıştır. Yan etkilerin vektöre değil cerrahi prosedüre bağlı olduğu belirtilmiştir.

24 aylık takip sonunda ortalama görme artışının 3.7 harf olduğu, retinal hassasiyette artışın da tedavi edilen gözlerde 10.3 dB, kontrol gözlerde de 9.7 dB olduğu belirlenmiştir. Yan etkiler konjonktival hiperemi, yabancı cisim hissi gibi hafif düzeyde yan etkiler olup cerrahi prosedürle ilişkili oldukları bildirilmiştir. ¹³⁰⁻¹³¹

ABD'de yapılan Faz II klinik çalışmada yine 6 erkek olguya (32-72 yaş arası) 0.1 ml içinde 10¹¹ AAV2-REP1 vg'u subfoveal olarak uygulanmıştır. Başlangıçtaki ortalama görme keskinliği tedavi edilen gözlerde 65.3±8.8 harf, kontrol gözlerde 77.0±4.2'dir. 2 yıllık takip sonunda 1 olguda 10 harf, diğer olguda 5 harf iyileşme olmuştur. Diğer gözlerde kazanım 2 harf olmuştur. Tedavi edilen gözlerde başlangıçtaki mikroperimetrideki hassasiyet oldukça düşüktür (1.2±2.1 dB) ve tedavi sonrasında anlamlı değişiklik olmamıştır. Ciddi yan etki hiçbir olguda oluşmamıştır. 2 olguda makula dışında retinal incelleme olan alanda tedavi sonrasında makuler hole gelişmiştir. Bu çalışmada intraoperatif OKT kullanımının istenmeyen makula değişikliklerinden ve makuler hole gelişiminden koruyacağı vurgulanmıştır. Bir olguda daha önceden var olan kataraktın kötüleştiği görülmüş ve gen tedavisinden 6 ay sonra katarakt cerrahisi yapılmıştır. ¹³²

Kanada'da yapılan faz I çalışmada 30-42 yaşları arasında 6 erkek olguya, daha az gören göze 0.1 ml'de tek doz 10¹¹ vg rAAV2-REP1 subfoveal olarak uygulanmıştır. Olgular 2 yıl takip edilmiş, 1 olguda 8 harf, 1 olguda 15 harften fazla görme artışı olmuştur. Mikroperimetride anlamlı artış bulun-

Tablo 3: Koroideremide gen tedavisi ile ilgili klinik çalışmalar

Kayıt no	Faz	Yer	Hasta Sayısı	Vektör	Başlama tarihi
NCT01461213	I/II	İngiltere	14	rAAV2.REP1	2011
NCT02341807	I/II	ABD	15	rAAV2.hCHM	2015
NCT02077361	I/II	Kanada	6	rAAV2.REP1	2015
NCT02553135	I/II	ABD	6	rAAV2.REP1	2015
NCT02671539	I/II	Almanya	6	rAAV2.REP1	2016
NCT02407678	II	İngiltere	30	rAAV2.REP1	2016

mazken, otofloresans ile yapılan korunmuş RPE alanı ölçümlerinde hem tedavi edilen hem de tedavi edilmeyen gözlerde benzer şekilde küçülme olmuştur. Bir olguda ciddi yan etki gelişmiş, lokalize intraretinal immün yanıt gelişerek görme fonksiyonunda belirgin kayıp ve OKT'de dış retinal katlarda kayıp saptanmıştır.¹³³

Önceki klinik çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak 2015 yılında İngiltere'de Faz II REGENERATE (REP1 Gene Replacement Therapy for Choroideremia) (NCT01461213) çalışması başlatılmıştır. Randomize çalışmada tek doz 10^{11} vg kullanılmış ve erken dönemdeki görme düzeyleri iyi olgular dahil edilmiştir. Spark Therapeutics Inc. (Philadelphia, ABD) firması da 2015 yılında aynı vektörü kullanarak benzer bir çalışma başlatmıştır. (NCT02341807). Bu çalışmaların sonuçları halen beklenmektedir. (Tablo 3)

5E-AKROMATOPSİ:

Akromatopsi O-R geçişli olup görülme oranı 1/30 bin dir. Bu hastalarda ileri düzeyde gündüz görme bozukluğu, azalmış görme keskinliği, fotofobi, nistagmus ve renk ayırt etmede güçlükler saptanır. Kon fotoreseptörlerinde değişken düzeylerde dejenerasyon mevcuttur. Günümüze dek 6 gende mutasyon saptanmıştır (ATF6, CNGA3, CNGB3, GNAT2, PDE6C ve PDE6H). Hastaların %80'inde CNGA3 ve CNGB3 genlerinde mutasyon görülür. Bu genler kon fotoreseptörlerinin dış segmentlerinde bulunan kanalların siklik nükleotid kapılarının (cyclic nucleotide-gated) (CNG) iki subüniti ni kodlar. Kon kanalları heterotetramerik yapıdadır, 3 adet CNGA3 ve 1 adet CNGB3 subünitinden oluşur. CNG kanalları fototransdüksiyon kaskadının önemli bir komponentidir ve ışıkla uyarılan değişikliklerin yönetiminde rol alır.

Karanlıkta cGMP'nin CNG kanallarına bağlanması ile kanallar açılır ve kon hücreleri depolarize olur. Işıktaki cGMP, kon fosfodiesteraz enzimi (PDE) ile hidrolize edilir, CNG kanalları kapanır ve kon hiperpolarize olur. Bu hiperpolarizasyon sinaptik terminalden glutamat nörotransmitter salınımını azaltır ve görme sinyalinin diğer hücrelere iletimini tetikler.¹³⁴ Günümüze dek CNGA3'te 100'den, CNGB3 'te de

50'den fazla mutasyon saptanmıştır. CNGB3 mutasyonları Avrupa ve ABD'de daha sık görülürken CNGA3 mutasyonları Orta Asya ve Çin'de daha sık görülür. Akromatopsi ile ilgili ATF6 dışındaki diğer gen mutasyonları da kon fototransdüksiyon kaskadı ile ilişkilidir.^{134,135}

Preklinik gen tedavi çalışmaları:

Hayvan çalışmalarında CNGA3, CNGB3 ve GNAT2 genleri için rAAV-bazlı gen tedavileri denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Hayvan çalışmalarında elde edilen ve ERG ile gösterilebilen kon fonksiyonundaki iyileşmenin 3 yıl süreyle korunduğu tespit edilmiştir.^{136,137}

Akromatopside gen tedavisi için yapılan klinik çalışmalar:

Akromatopside OKT ve adaptif optiks ile yapılan klinik çalışmalar ve hayvan modelleri kon dejenerasyonunun ilerleyici olduğunu göstermektedir. Patolojik incelemelerde kon hücrelerinin iç ve dış segment morfolojilerinde bozulmalar bazen de tüm hücre katında bozulmalar saptanmaktadır.^{138,139}

Akromatopside gen tedavisinin temeli kurtarılabılır kon hücrelerinin varlığına bağlıdır. Morfolojisi bozulmamış hücrelerin dejenerasyondan korunması mümkündür.

Başarılı deneysel çalışmalardan sonra 2015 yılında Almanya'da Tübingen Üniversitesi ve Ludwig-Maximilian Üniversitesi birlikte RD-CURE çalışma grubu faz I/II çalışmasını başlatmışlardır (NCT02610582). Bu çalışmada CNGA3 mutasyonu olan olgulara subretinal olarak tek doz rAAV8.hCNGA3 uygulaması yapılmıştır.¹⁴⁰ Bu konudaki ikinci Faz I/II çalışması CNGB3-ilişkili ACHM (NCT02599922) ile ilgilidir. Applied Genetic Technologies Corp (AGTC) ve National Eye Institute (NEI) işbirliği ile planlanmıştır. Bu çalışmada CNGB3 mutasyonu olan olgulara rAAV2tYF-PR1.7-hCNGB3 uygulaması yapılmıştır (NCT02935517). Bu güvenilirlik ve doz belirleme çalışmasında 9 olgu 3 doz grubuna ayrılmıştır. Doz grupları 1.0×10^{10} , 5.0×10^{10} ve 1.0×10^{11} vg AAV8-CNGA3 şeklinde belirlenmiş ve subretinal uygulama

sonrası 12 aylık takipler yapılmıştır. 9 olgunun yaşları 24 ile 59 yıl, başlangıç görme keskinliği 20/200 ile 20/100 Snellen sırası, başlangıç kontrast duyarlılık ise 0.1 ile 0.9 log arasında değişmektedir. Tüm olgulara subretinal AAV8.CNGA3 uygulaması komplikasyonsuz tamamlanmış ve 12 aylık takip boyunca hiçbir komplikasyon izlenmemiştir. Tüm olgularda değişken derecelerde kon fonksiyonlarında artış ve ortalama görme keskinliğinde 2.9 harf artış saptanmıştır. Kontrast duyarlılık testlerinde de 0.33 log artış olmuştur.¹⁴¹

DIABETİK RETİNOPATI

Diyabetik retinopati (DR) gelişmiş ülkelerde görme kaybına neden olan en önemli retina hastalıklarından biridir. Günümüzde DR ve diyabetik makula ödeminin temel tedavisi VEGF molekülü üzerinden yapılmaktadır. Bu da sık intravitreal enjeksiyon gerektirmektedir. Alternatif tedavilerin uzun terapotik etkileri, daha seyrek enjeksiyon gerektirmesi, hastalığın gelişimini önleyebiliyor olması ve daha az yan etkisinin olması gerekmektedir.

DR'de gen tedavisinin stratejisi DR patogenezi üzerinden olacaktır. Gen tedavisi ya neovaskülarizasyonun (NV) inhibisyonu ya da nörovasküler dejenerasyonun inhibisyonu üzerinden etki etmelidir. Günümüze kadar yapılan hayvan çalışmalarında başarılı sonuçlar alınmıştır.

Retinal vaskülopatiyi hedefleyen ilaçlar:

Bu amaçla yapılan çalışmalar VEGF yolunu ilgilendirmektedir. VEGF reseptör 1 (VEGFR-1 ya da Flt-1) soluble faktörü olan sFlt-1'e yönelik yapılan hayvan çalışmalarında retinal NV inhibe edilmiştir. Bir anti-VEGF intraseptörü olan Flt23k, VEGF yolunda rol alan ve intrasellüler VEGF'i degrade eden bir moleküldür. AAV-Flt23k enjeksiyonu sonrası hayvanlarda koroidal NV belirgin olarak inhibe olmuştur. siRNA-expressing plasmid enjeksiyonu VEGF'i hedefleyerek, retinal NV'ü inhibe eder.

Anjiojeniz inhibisyonunun diğer bir yolu da endojen anjiojeniz inhibitörlerinin kullanımınıdır. Pigment epitel-derive faktör (PEDF), angiostatin, endostatin, tissue inhibitor metalloproteinaz-3 ve calreticulin antiangiogenik domain (CAD) bu moleküller arasındadır. AAV-PEDF uygulaması VEGF düzeylerini belirgin olarak azaltmıştır. Hayvanlarda angiostatin, endostatin, tissue inhibitor metalloproteinaz-3 ve CAD uygulamaları ile yapılan çalışmalar VEGF düzeyini belirgin olarak azaltmış ve retinal NV'ü inhibe etmişlerdir. Endotelial hücre proliferasyonunu inhibe eden amino-terminal fragment (ATF) ve hepatosit growth faktörün (HGFK1) AAV ile uygulanması, retinal NV'ü inhibe etmiştir. Vasküler

permeabilite inhibitörlerinden sFlt-1 ve vazoinhibinin AAV ile uygulaması vasküler permeabiliteyi azaltmıştır.

Nörovasküler korumayı hedefleyen ilaçlar:

Early growth response 1 (EGR1) hiperglisemi ile birlikte vasküler hücrelerde artan bir faktördür ve DR'i gelişiminin erken dönemlerinde önemli rol oynamaktadır. EGR1 ekspresyonunun azaltılması retinal endotelial hücrelerin fonksiyonlarını regüle etmekte, migrasyon ve vaskülarizasyonu engellemektedir. Bu faktöre yönelik deneysel çalışmalar mevcuttur. Mikrotübül-associated protein 1 light chain 3-II (LC3B-II) otofajik aktiviteyi gösteren bir markırdır. AAV-anti-microRNA-204 intravitreal enjeksiyonu LC3B-II ekspresyonunu artırarak hayvansal deneylerde DR gelişimini azaltmıştır.

MAK'inin aktive olması vasküler ve nöral hücrelerinin apoptozisine neden olur. Soluble CD59 (sCD59), MAK'ini inhibe edebilir. AAV-sCD59 intravitreal uygulaması hayvanlarda vasküler sızıntıyı %60 azaltmıştır.

Nörotrofik faktörlerin uygulanması diğer bir nöroprotektif yaklaşımdır. AAV-BDNF intravitreal uygulanması retinal ganglion hücrelerinin yaşam oranlarını arttırmıştır. Subretinal AAV2-EPO nöronal apoptozisten korunmaya yardımcı olmuştur.

Oksidatif stress DR gelişmesine neden olan başka bir mekanizmadır. Bu mekanizmaya yönelik AAV-manganez superoksit **dismutase** (MnSOD), AAV-ACE2 uygulamaları kan retina bariyerinin korunmasına yardımcı olmuşlardır.

CRISPR/Cas-bazlı tedaviler:

Bu teknoloji ile VEGF'in ve hipoksi indüklenebilir faktör 1a (HIF1a)'nın fazla ekspresyonunu sağlayan genler bulunarak bunların düzeltilmesi mümkün olacaktır. Hayvan çalışmalarında bu yöntemle başarılı sonuçlar alınmıştır.

DR'de gen tedavisi ile ilgili zorluklar:

Deneysel çalışmalarda alınan başarılı sonuçlara rağmen DR'de gen tedavisi ile ilgili klinik çalışmalara henüz geçilememiştir. Hastalığın patogenezinin kompleks olması, güvenilirlik ve spesifik ajan tedavisi konusundaki zorluklar, hasta seçiminin ve sonuçların standardize edilememesi zorluklara neden olmaktadır. DR, poligenik ve heterojen bir hastalıktır. Progresif bir hastalık olması farklı evrelerde tutulum yapması, genetik polimorfizmin çeşitliliği, patogenezin karmaşıklığı gen tedavisi için hasta seçimini zorlaştırmaktadır.^{142,143}

6-GEN TEDAVİLERİNE GENEL BAKIŞ:

İlk olarak 2012 yılında familial lipoprotein lipaz deficiency (LPLD) hastalığında kullanılmak üzere AAV-bazlı ali-pogene tiparovec (Glybera, Uniqure, Hollanda), European Medicines Agency (EMA) tarafından kabul edilmiştir. Daha sonra FDA voretigene neparovec-rzyl (Luxturna®, Spark Therapeutics Inc., ABD) ilacını RP ve LKK hastalıklarında saptanan RPE65 mutasyonu için kabul etmiştir. Bu FDA tarafından onaylanan ilk retinal gen tedavi ilacıdır. Bundan sonra gen tedavileriyle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. LKK'da RPE 65 tedavisi ile görme keskinliğinden çok görsel navigasyon hedef alınmıştır. Bu durum RP gibi kompleks görme kaybı olan olgularda sadece görme keskinliğinin değerlendirilmesinin yeterli olmadığını göstermektedir.

Gen tedavisi ile ilgili ilk sonuçlar iyi olsa da bazı soruların cevabı henüz bilinmemektedir. Viral vektörler gen taşımada diğer vektörlerden daha etkilidir. Ancak AAV'ler RPE hücrelerine çok iyi uyum göstermesine rağmen diğer retinal hücrelere uyumu yeterli değildir. RPE dışında diğer retinal hücrelere özellikle de fotoreseptörlere uyum sağlayacak yeni vektörlere ihtiyaç vardır. Ayrıca AVV'ün mevcut kapasitesi 4.7 kb'dır ve bu kapasite daha büyük genlerin tedavi edilmesi için yeterli değildir. Dual AAV, LV, adenovirüsler ve non-viral vektörler kullanılarak kapasite problemi aşılmaya çalışılmaktadır. Bu sayede LKK'de CEP290, SMD'de ABCA4, ve Tip 1 Usher sendromunda MYO7A gibi genler şu anda kapasite dahilindedir.

Önümüzdeki yıllar içinde koroideremi için yapılan çalışmaların sonuçlarının yanı sıra diğer monogenik retina hastalıklarına yönelik gen tedavilerinin de klinik çalışma sonuçları yayınlanacaktır. X geçişli RP için RPGR, MERTK, akromatopsi için CNGA3 ve CNGB3 SMD için ABCA4 ve Usher 2A için MYO7A tedavisi de mümkün olacaktır. Gelişen diğer teknoloji de CRISPR/Cas9-bazlı genom editing teknolojisidir. Bu yöntemle çoklu DNA mutasyonlarının da tedavi edilmesi mümkün olacaktır. Heyecan verici bir alan olan gen tedavilerinin uygulamaya geçmesi ile bu tedavilerin üretim, dağıtım, uygulama ve finansman süreçleri ile ilgili yeni sorunlar ortaya çıkacaktır.

KAYNAKLAR:

1. Ku CA, Pennesi ME. Retinal Gene Therapy: Current Progress and Future Prospects. *Expert Rev Ophthalmol.* 2015; 10: 281–299. doi:10.1586/17469899.2015.1035711.
2. Trapani I, Banfi S, Simonelli F, Surace EM, Auricchio A. Gene Therapy of Inherited Retinal Degenerations: Prospects and Challenges. *Human Gene Therapy.* 2015; 26:193–200. DOI: 10.1089/hum.2015.030.
3. Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;5:pii: a017111.
4. Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29: 335–375.
5. Dalkara D, Sahel JA. Gene therapy for inherited retinal degenerations. *C R Biol* 2014; 337: 185–192.
6. Nash BM, Wright DC, Grigg JR, Bennetts B, Jamieson RV. Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Transl Pediatr.* 2015;4(2):139-163. doi:10.3978/j.issn.2224-4336.2015.04.03
7. Bordet T, Behar-Cohen F. Ocular gene therapies in clinical practice: viral vectors and nonviral alternatives. *Drug Discov Today.* 2019; 24: 1685-1693. doi:10.1016/j.drudis.2019.05.038
8. Ramlogan-Steel CA, Murali A, Andrzejewski S, Dhungel B, Steel JC, Layton CJ. Gene therapy and the adeno-associated virus in the treatment of genetic and acquired ophthalmic diseases in humans: Trials, future directions and safety considerations. *Clin Exp Ophthalmol.* 2019;47:521–536. doi:10.1111/ceo.13416.
9. Oner A. Recent Advancements in Gene Therapy for Hereditary Retinal Dystrophies. *Turk J Ophthalmol* 2017;47:338-343. DOI: 10.4274/tjo.41017.
10. Trapani I, Puppo A, Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog Retin Eye Res* 2014;43:108–128.
11. Battaglia, L. et al. Application of lipid nanoparticles to ocular drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2016,13, 1743–1757
12. Wang, Y, Rajala A, Rajala RV. Lipid nanoparticles for ocular gene delivery. *J. Funct. Biomater.* 2015; 6: 379–394.
13. Tsai CH, Wang PY, Lin IC, Huang H, Liu GS, Tseng CL. Ocular Drug Delivery: Role of Degradable Polymeric Nanocarriers for Ophthalmic Application. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2830. Published 2018 Sep 19. doi:10.3390/ijms19092830
14. Oliveira AV, Rosa da Costa AM, Silva GA. Non-viral strategies for ocular gene delivery. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;77:1275-1289. doi:10.1016/j.msec.2017.04.068
15. Zulliger R, Conley SM, Naash MI. Non-viral therapeutic approaches to ocular diseases: An overview and future directions. *J Control Release.* 2015;219:471-487. doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.007
16. Koirala A, Makkia RS, Conley SM, Cooper MJ, Naash MI. S/MAR-containing DNA nanoparticles promote persis-

- tent RPE gene expression and improvement in RPE65-associated LCA. *Hum Mol Genet.* 2013;22(8):1632-1642. doi:10.1093/hmg/ddt013
17. Adjianto J, Naash MI. Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015; 95: 353–367
 18. Kelley RA, Conley SM, Makkia R, et al. DNA nanoparticles are safe and nontoxic in non-human primate eyes. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 1361-1379. Published 2018 Mar 8. doi:10.2147/IJN.S157000.
 19. Souied EH, Reid SN, Piri NI, Lerner LE, Nusinowitz S, Farber DB. Non-invasive gene transfer by iontophoresis for therapy of an inherited retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 2008;87(3):168-175. doi:10.1016/j.exer.2008.04.009
 20. Cervia, LD, Yuan, F. Current progress in electrotransfection as a nonviral method for gene delivery. *Mol. Pharm.* 2018; 15,: 3617–3624.
 21. Rosazza C, Meglic SH, Zumbusch A, Rols MP, Miklavcic D. Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective. *Curr Gene Ther.* 2016;16(2):98-129. doi:10.2174/156652321666160331130040
 22. Johnson CJ, Berglin L, Chrenek MA, Redmond TM, Boatright JH, Nickerson JM. Technical brief: subretinal injection and electroporation into adult mouse eyes. *Mol Vis.* 2008;14:2211-2226.
 23. Touchard E, Berdugo M, Bigey P, et al. Suprachoroidal electrotransfer: a nonviral gene delivery method to transfect the choroid and the retina without detaching the retina. *Mol Ther.* 2012;20(8):1559-1570. doi:10.1038/mt.2011.304
 24. Cao H, Koehler DR, Hu J. Adenoviral vectors for gene replacement therapy. *Viral Immunol.* 2004; 17: 327–333.
 25. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10, 440–447.
 26. Parks, R.J. Improvements in adenoviral vector technology: overcoming barriers for gene therapy. *Clin Genet.* 2000; 58, 1–11.
 27. Hirsch ML, Agbandje-McKenna M, and Samulski RJ. Little vector, big gene transduction: fragmented genome reassembly of adeno-associated virus. *Mol Ther.* 2010; 18, 6–8.
 28. Grieger JC, Samulski RJ. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J. Virol.* 2005; 79: 9933–9944
 29. Maddalena A, Tornabene P, Tiberi P, et al. Triple Vectors Expand AAV Transfer Capacity in the Retina. *Mol Ther.* 2018; 26(2): 524-541. doi:10.1016/j.ymthe.2017.11.019
 30. Lopes VS, Boye SE, Louie CM, et al. Retinal gene therapy with a large MYO7A cDNA using adeno-associated virus. *Gene Ther.* 2013;20(8):824-833. doi:10.1038/gt.2013.3
 31. Trapani I, Colella P, Sommella A, et al. Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol Med.* 2014;6(2):194-211. doi:10.1002/emmm.201302948
 32. Sieving PA, Caruso RC, Tao W, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(10):3896-3901. doi:10.1073/pnas.0600236103
 33. Bartholomae CC, Arens A, Balaggan KS, et al. Lentiviral vector integration profiles differ in rodent postmitotic tissues. *Mol Ther.* 2011; 19:703–710.
 34. Yanez-Munoz RJ, Balaggan KS, MacNeil A, et al. Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med.* 2006; 12: 348–353.
 35. Grüter O, Kostic C, Crippa SV, et al. Lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse photoreceptors is impaired by the presence of a physical barrier. *Gene Ther.* 2005;12(11):942-947. doi:10.1038/sj.gt.3302485
 36. Li T, Adamian M, Roof DJ, et al. In vivo transfer of a reporter gene to the retina mediated by an adenoviral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(5):2543-2549.
 37. Planul A, Dalkara D. Vectors and Gene Delivery to the Retina. *Annu Rev Vis Sci.* 2017;3:121-140. doi:10.1146/annurev-vision-102016-061413
 38. Lam S, Cao H, Wu J, Duan R, Hu J. Highly efficient retinal gene delivery with helper-dependent adenoviral vectors. *Genes Dis.* 2014;1(2):227-237. doi:10.1016/j.gendis.2014.09.002.
 39. Yanik M, Müller B, Song F, et al. In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. *Prog Retin Eye Res.* 2016;56:1
 40. Zhu H, Misel L, Graham M, Robinson ML, Liang C. CT-finder: a web service for CRISPR optimal target prediction and visualization. *Sci Rep.* 2016; 6:25516
 41. Stemmer M, Thumberger T, Del SKM, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS.* 2015: One 10:e0124633
 42. Shin J, Jiang F, Liu JJ, et al. (2017) Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic. *Sci Adv.* 2017; 3:e1701620
 43. Jasin M, Haber JE. The Democratization of gene editing: insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA Repair.* 2016; 44:6
 44. Lim Y, Bak SY, Sung K, et al. Structural roles of guide RNAs in the nuclease activity of Cas9 endonuclease. *Nat Commun.* 2016; 7:13350

45. Auer TO, Durooure K, De CA, Concordet JP, Del BF. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res.* 2014; 24:142
46. Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol.* 2017; 35:31
47. Shin J, Jiang F, Liu JJ, et al. Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic. *Sci Adv.* 2017; 3:e1701620
48. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013; 154:1380–1389
49. Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013; 31:822.
50. Arno G, Agrawal SA, Eblimit A, et al. Mutations in REEP6 cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 2016; 99: 1305
51. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015; 21:121
52. Zheng A, Li Y, Tsang SH. Personalized therapeutic strategies for patients with retinitis pigmentosa. *Expert Opin Biol Ther.* 2015; 15:391–402
53. Ma Y, Zhang X, Shen B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/ Cas9. *Cell Res.* 2014; 24:122
54. Sahel JA, Roska B. Gene therapy for blindness. *Annu Rev Neurosci* 2013; 36: 467–488.
55. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125(2):151–158.
56. Liu MM, Tuo J, Chan CC. Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95(5): 604–612. doi:10.1136/bjo.2009.174912.
57. Friedmann T. A brief history of gene therapy. *Nat Genet.* 1992; 2: 93–8.
58. Cao H, Molday RS, Hu J. Gene therapy: light is finally in the tunnel. *Protein Cell* 2011; 2(12): 973–989 DOI 10.1007/s13238-011-1126-y.
59. Cideciyan, AV. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29, 398–427.
60. Herzog RW, Cao O, Srivastava A. Two decades of clinical gene therapy: success is finally mounting. *Discov Med.* 2010; 9, 105–111.
61. Stein L, Roy K, Lei L, Kaushal, S. Clinical gene therapy for the treatment of RPE65-associated Leber congenital amaurosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11, 429–439.
62. Liang FQ, Anand V, Maguire, AM.; Bennett, J. Intraocular delivery of recombinant virus. In: Rakoczy, PE., editor. *Methods in Molecular Medicine: Ocular Molecular Biology Protocols.* Humana Press. Inc; Totowa, NJ: 2000. p. 125-139
63. Cai X, Conley SM, Naash MI. RPE65: role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic Genet.* 2009;30(2):57.
64. Redmond TM, Yu S, Lee E, et al. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet.* 1998; 20(4):344–351.
65. Li X, Li W, Dai X, et al. Gene therapy rescues cone structure and function in the 3-month-old rd12 mouse: a model for midcourse RPE65 leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;5;52(1):7-15. doi: 10.1167/iovs.10-6138. Print 2011 Jan.
66. Bencicelli J, Wright JF, Komaromy A, et al. Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther.* 2008;16(3):458-65. doi: 10.1038/sj.mt.6300389. PubMed PMID: 18209734; PubMed Central PMCID: PMC2842085.
67. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet.* 2001;28(1):92-5.
68. Stieger K, Lh riteau E, Moullier P, Rolling F. AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models. *ILAR J.* 2009;50(2):206–24.
69. Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, et al. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther.* 2005; 12(6):1072–1082. [PubMed: 16226919]
70. Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, et al. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther.* 2007; 14(4):292–303. [PubMed: 17024105]
71. Narfstr m K, Vaegan Katz M, Bragadottir R, Rakoczy EP, Seeliger M. Assessment of structure and function over a 3-year period after gene transfer in RPE65–/– dogs. *Doc Ophthalmol.* 2005; 111(1):39–48. [PubMed: 16502306]
72. Aguirre GK, Komaromy AM, Cideciyan AV, et al. Canine and human visual cortex intact and responsive despite early retinal blindness from RPE65 mutation. *PLoS Med.* 2007; 4(6):e230. [PubMed: 17594175]
73. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber’s congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008. 358(21): p. 2231-9.

74. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, et al. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther*, 2008. 19(10): p. 979-90.
75. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 2008. 358(21): p. 2240-8. 34.
76. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2009. 374(9701): p. 1597-605.
77. Maguire AM, Russell S, Wellman JA, et al. Efficacy, Safety, and Durability of Voretigene Neparvovec-rzyl in RPE65 Mutation Associated Inherited Retinal Dystrophy: Results of Phase 1 and 3 Trials. *Ophthalmology*, 2019. 126(9): p. 1273-1285.
78. Testa F, Maguire AM, Rossi S, et al. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology*, 2013. 120(6): p. 128391.
79. Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390: 849-60.
80. Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, et al. Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *N Engl J Med* 2015; 372: 1920-6.
81. Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, et al. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2015; 372: 1887-97.
82. LUXTURNA (voretigene neparvovec-rzyl) US Full Prescribing Information. 2017; Available from: http://sparktx.com/LUXTURNA_US_Prescribing_Information.pdf.
83. LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, et al. Gene Therapy for MERTK-Associated Retinal Degenerations. *Adv Exp Med Biol*. 2016;854:487-493.
84. Ghazi NG, Abboud EB, Nowilaty SR, et al. Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. *Hum Genet*. 2016;135(3):327-343. doi:10.1007/s00439-016-1637-y
85. Moore NA, Morral N, Ciulla TA, Bracha P. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve degenerations. *Expert Opin Biol Ther* 2018; 18: 37-49.
86. Pawlyk BS, Bulgakov OV, Sun X, et al. Photoreceptor rescue by an abbreviated human RPGR gene in a murine model of X-linked retinitis pigmentosa. *Gene Ther* 2016; 23: 196-204.
87. Tanna P, Strauss RW, Fujinami K. et al. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol* 2017;101:25-30. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-30882
88. Illing M, Molday LL, Molday RS. The 220-kDa rim protein of retinal rod outer segments is a member of the ABC transporter superfamily. *J Biol Chem*. 1997; 272(15):10303-10310
89. Weng J, Mata NL, Azarian SM, et al. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell*. 1999; 98(1):13-23
90. Han Z, Conley SM, Makkia RS, et al. DNA nanoparticle-mediated ABCA4 delivery rescues Stargardt dystrophy in mice. *J Clin Invest* 122(9):3221-3226
91. Kong J, Kim SR, Binley K, et al. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Gene Ther*. 2008; 15(19):1311-1320
92. Allocca M, Doria M, Petrillo M, et al. Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118(5):1955-1964
93. Hirsch ML, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Little vector, big gene transduction: fragmented genome reassembly of adeno-associated virus. *Mol Ther*. 2010; 18(1):6-8
94. McClements ME, Barnard AR, Singh MS, et al. An AAV Dual Vector Strategy Ameliorates the Stargardt Phenotype in Adult Abca4^{-/-} Mice. *Human Gene Therapy*. 2019; 30: 5 DOI: 10.1089/hum.2018.156.
95. Balaggan KS, Binley K, Esapa M, et al. Stable and efficient intraocular gene transfer using pseudotyped EIAV lentiviral vectors. *J Gene Med*. 2006; 8(3):275-285
96. Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(19):10319-10323
97. Greenberg KP, Geller SE, Schaffer DV, Flannery JG. Targeted transgene expression in muller glia of normal and diseased retinas using lentiviral vectors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(4):1844-1852
98. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA, et al. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2003 4(5):346-358 21.
99. Sarkis C, Philippe S, Mallet J, Serguera C. Non-integrating lentiviral vectors. *Curr Gene Ther*. 2008; 8(6):430-437

100. Naash M. Nanoparticle-based gene therapy preserves vision in lab study for Stargardt disease. Foundation Fighting Blindness. Web: <<http://www.blindness.org>>; 22.07.12.
101. Sun D, Schur RM, Sears AE, et al. Non-viral gene therapy for Stargardt Disease with ECO/pRHO-ABCA4 self-assembled nanoparticles. *Mol Ther*. 2020;28(1):293-303. doi:10.1016/j.ymthe.2019.09.010
102. Parker MA, Choi D, Erker LR, et al. Test-retest variability of functional and structural parameters in patients with Stargardt disease participating in the SAR422459 gene therapy trial. *Transl Vis Sci Technol*. 2016;5:10.
103. Guimaraes TAC, Georgiou M, Bainbridge JWB, Michaelides M. Gene therapy for neovascular age-related macular degeneration: rationale, clinical trials and future directions. *Br J Ophthalmol* 2020;0:1–7. doi:10.1136/bjophthalmol-2020-316195
104. Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P, et al. Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF.11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum Gene Ther* 2001;12:2029–32
105. Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, et al. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 2006;17:167–76.
106. Rakoczy EP, Lai C- M, Magno AL, et al. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase 1 randomised clinical trial. *Lancet* 2015;386:2395–403.
107. Constable IJ, Pierce CM, Lai C- M, et al. Phase 2A randomized clinical trial: safety and post hoc analysis of subretinal rAAV.sFLT-1 for wet age-related macular degeneration. *EBioMedicine* 2016;14:168–75.
108. Heier JS, Kherani S, Desai S, et al. Intravitreal injection of AAV2-sFLT01 in patients with advanced neovascular age-related macular degeneration: a phase 1, open-label trial. *Lancet* 2017;390:50–61
109. Grishanin R, Vuilleminot B, Sharma P, et al. Preclinical evaluation of ADVM-022, a novel gene therapy approach to treating wet age-related macular degeneration. *Mol Ther* 2019;27:118–29.
110. Kiss S. 24-Week cohort 1 data from the optic trial – intravitreal gene therapy with ADVM-022 (AAV.7m8-aflibercept) for neovascular age-related macular degeneration. London: Retina Society Annual Meeting, 2019.
111. Kiss S. Interim 24-week cohort 1 data from the optic trial – intravitreal gene therapy with ADVM-022 (AAV.7m8-aflibercept) for neovascular age-related macular degeneration. San Francisco, 2019.
112. Wykoff CC. Phase 1 study of intravitreal gene therapy with ADVM-022 for neovascular age-related macular degeneration (optic trial cohort 1). New York: ACRC Macula, 2020. <http://investors.adverum.com/static-files/f233ae69-89e3-4c69-8571-9c12e33de011>
113. REGENXBIO. REGENXBIO reports continued progress across programs in Year-End 2019 corporate update, 2020. Available: <https://www.prnewswire.com/news-releases/regenxbio-reports-continued-progress-across-programs-in-year-end-2019-corporate-update-300983973.html> [Accessed 21 Jan 2020].
114. REGENXBIO. REGENXBIO Announces additional positive interim phase I/IIa trial update for RGX-134 for the treatment of wet AMD at the American Academy of ophthalmology 2019 annual meeting, 2019. Available: <https://www.prnewswire.com/news-releases/regenxbio-announces-additional-positive-interim-phase-iiia-trial-update-for-rgx-314-for-the-treatment-of-wet-amd-at-the-american-academy-of-ophthalmology-2019-annual-meeting-300937385.html> [Accessed 10 Dec 2019].
115. AAO 2019 Daily. Gene therapy for wet AMD? 2019. Available: <https://www.aao.org/eyenet/academy-live/detail/gene-therapy-wet-amd-3> [Accessed 10 Dec 2019].
116. Binley K, Widdowson PS, Kelleher M, et al. Safety and biodistribution of an equine infectious anemia virus-based gene therapy, RetinoStat®, for age-related macular degeneration. *Hum Gene Ther* 2012;23:980–91.
117. Campochiaro PA, Lauer AK, Sohn EH, et al. Lentiviral vector gene transfer of Endostatin/Angiostatin for macular degeneration (GEM) study. *Hum Gene Ther* 2017;28:99–111
118. Kumar-Singh R. The role of complement membrane attack complex in dry and wet AMD - From hypothesis to clinical trials. *Exp Eye Res* 2019;184:266–77.
119. Cashman SM, Ramo K, Kumar-Singh R. A non-membrane-targeted human soluble CD59 attenuates choroidal neovascularization in a model of age-related macular degeneration. *PLoS One* 2011;6:e19078.
120. Lee J, Park D- Y, Park DY, et al. Angiopoietin-1 suppresses choroidal neovascularization and vascular leakage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:2191–2199.
121. Xia X, Xiong S, Song W et al. Inhibition of retinal neovascularization by siRNA targeting VEGF(165). *Mol Vis* 2008;14:1965–73.

122. Kaiser PK, Symons RCA, Shah SM, et al. Rnai- Based treatment for neovascular age- related macular degeneration by Sirna-027. *Am J Ophthalmol* 2010;150:33-9.
123. Garba AO, Mousa SA. Bevasiranib for the treatment of wet, age- related macular degeneration. *Ophthalmol Eye Dis* 2010;2:OED.S4878-83.
124. Simunovic MP, Jolly JK, Xue K, et al. The spectrum of CHM gene mutations in choroideremia and their relationship to clinical phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57:6033-6039. [PubMed: 27820636]
125. Black A, Vasireddy V, Chung DC, et al. Adeno-associated virus 8-mediated gene therapy for choroideremia: preclinical studies in in vitro and in vivo models. *J Gene Med*. 2014; 16:122-130. [PubMed: 24962736]
126. Anand V, Barral DC, Zeng Y, et al. Gene therapy for choroideremia: in vitro rescue mediated by recombinant adenovirus. *Vision Res*. 2003; 43:919-926. [PubMed: 12668061]
127. Vasireddy V, Mills JA, Gaddameedi R, et al. AAV-mediated gene therapy for choroideremia: preclinical studies in personalized models. *PLoS One*. 2013; 8:e61396. [PubMed: 23667438]
128. MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet*. 2014; 383:1129-1137. [PubMed: 24439297]
129. Edwards TL, Jolly JK, Groppe M, et al. Visual acuity after retinal gene therapy for choroideremia. *N Engl J Med*. 2016; 374:1996-1998. [PubMed: 27120491]
130. Fischer MD, Hickey DG, Singh MS, et al. Evaluation of an optimized injection system for retinal gene therapy in human patients. *Hum Gene Ther Methods*. 2016; 27:150-158. [PubMed: 27480111]
131. Fischer MD, Ochakovski GA, Beier B, et al. Efficacy and Safety of Retinal Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vector for Patients With Choroideremia: A Randomized Clinical Trial *JAMA Ophthalmol*. 2019;137(11):1247-1254. doi:10.1001/jamaophthalmol.2019.3278
132. Lam, BL; Verriotto, J; Gregori, N; , et al. Choroideremia gene therapy phase II clinical trial: 6month results. *Proceedings of the ARVO Annual Meeting*; May 7-11; Baltimore (MD). 2017. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2640714&resultClick=1>
133. MacDonald, IM; Dimopoulos, I; Chan, S; , et al. Ocular gene therapy for choroideremia: the Alberta experience. *Proceedings of the ARVO Annual Meeting*; May 1-5; Seattle (WA). 2016. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2560404&resultClick=1>
134. Zobor D, Zobor G, Kohl S Achromatopsia: on the doorstep of a possible therapy. *Ophthalmic Res* 2015; 54: 103-108. DOI: 10.1159/000435957
135. Remmer MH, Rastogi N, Ranka MP, et al. Achromatopsia: a review. *Current opinion in ophthalmology* 2015; 26: 333-340. DOI: 10.1097/ICU.000000000000018
136. Pang JJ, Deng WT, Dai X, et al. AAV-mediated cone rescue in a naturally occurring mouse model of CNGA3-achromatopsia. *PloS one* 2012; 7: e35250. DOI: 10.1371/journal.pone.0035250
137. Alexander JJ, Umino Y, Everhart D, et al. Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nature medicine* 2007; 13: 685-687. DOI: 10.1038/nm1596
138. Genead MA, Fishman GA, Rha J, et al. Photoreceptor structure and function in patients with congenital achromatopsia. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011; 52: 7298-7308. DOI: 10.1167/iovs.11-7762
139. Thiadens AA, Roosing S, Collin RW, et al. Comprehensive analysis of the achromatopsia genes CNGA3 and CNGB3 in progressive cone dystrophy. *Ophthalmology* 2010; 117: 825-830 e821. DOI: 10.1016/j.ophtaha.2009.09.008
140. Kahle NA, Peters T, Zobor D, et al. Development of Methodology and Study Protocol: Safety and Efficacy of a Single Subretinal Injection of rAAV.hCNGA3 in Patients with CNGA3-Linked Achromatopsia Investigated in an Exploratory Dose-Escalation Trial. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2018;29(3):121-131. doi:10.1089/humc.2018.088
141. Fischer MD, Michalakis S, Wilhelm B, et al. Safety and Vision Outcomes of Subretinal Gene Therapy Targeting Cone Photoreceptors in Achromatopsia: A Nonrandomized Controlled Trial [published online ahead of print, 2020 Apr 30]. *JAMA Ophthalmol*. 2020;138(6):1-9. doi:10.1001/jamaophthalmol.2020.1032
142. Wang JH, Roberts GE, Liu GS. Updates on Gene Therapy for Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2020;20(7):22. Published 2020 May 16. doi:10.1007/s11892-020-01308-w
143. Wang JH, Ling D, Tu L, van Wijngaarden P, Dusting GJ, Liu GS. Gene therapy for diabetic retinopathy: Are we ready to make the leap from bench to bedside?. *Pharmacol Ther*. 2017;173:1-18. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.01.003