



UPPSALA
UNIVERSITET

Genterapi

En studie av genterapins användningsområden och potential som läkemedel



Emma Högberg

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2012
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Genterapi: En studie av genterapins användningsområden och potential som läkemedel

Emma Högberg

Självständigt arbete i biologi 2012

Sammandrag

Idén om genterapi som behandlingsform har funnits närmare 40 år, men det är först de senaste 20 åren som man på riktigt har insett dess potential. Genterapi kan användas som behandling av flera olika sjukdomar, inklusive cancer, immunsjukdomar, blodsjukdomar och hjärt- och kärlsjukdomar. Det är på grund av det breda användningsområdet man utvecklat så många olika typer av vektorer som går att använda vid genöverföring, en utveckling som fortfarande pågår. De element som man använder för att överföra genetisk information till en cell med en genetisk defekt kallas vektorer. De flesta är virus som berövats sina virala egenskaper men man kan även använda icke-virala vektorer och intresset för att utveckla dessa är stort. Trots hundratals kliniska försök är det ännu bara en studie som har lett till att ett genterapeutiskt preparat godkänts för sjukdomsbehandling. Det handlar om Gendicine som i Kina är godkänt för behandling av huvud- och nackcancer, något som väckt diskussioner i resten av världen på grund av obesvarade frågor kring studien som godkännandet grundade sig på. De största framstegen inom genterapin gjordes när de första kliniska försöken utfördes på människor. Det var inom behandling av en immunsjukdom och även om försöket inte gav signifikanta resultat var det ändå ett viktigt steg framåt. Det var också en immunsjukdom som botades när det första lyckade genterapiförsöket utfördes. Min slutsats efter denna studie är att genterapiförsöken ska fortsätta så att metoder och teknik kan utvecklas, och på så sätt minska risken för infektioner och insertionsmutationer. På sikt kan genterapi vara ett potentiellt botemedel mot flera av våra vanligaste sjukdomar samt några av de allvarligaste, däribland immunsjukdomar. Därför är det viktigt att forskningen fortsätter så att bättre resultat kan nås.

Inledning

Bakgrund

Ända sedan 1970-talet har genterapi varit en behandlingsteknik på uppgång och utvecklingen sedan dess har varit enorm. Det var främst tack vare utvecklingen inom molekylär genetik och rekombinationsteknik som genterapin blev praktiskt möjlig, men även upptäckten av mekanismerna bakom hur virus transformerar normala celler till tumörceller spelade en viktig roll. Eftersom det är just genöverföring man vill åstadkomma inom genterapi kunde virus studeras för att bättre förstå hur genöverföring går till (Friedmann 1997). Virus används fortfarande som vektorer inom genterapi men även ickeviral vektorer har tagits i bruk. Dessa har dock visat sig mindre effektiva än de virala vektorerna (Kay *et al.* 1997).

Genterapins grundidé är att överföra specifika gener eller DNA-sekvenser till en cell där motsvarande gen har en defekt (som leder till defekt genprodukt vilken i sin tur leder till sjukdom). På så sätt vill man kunna åstadkomma en fungerande gen med normal genprodukt (Kay *et al.* 1997, Beutler 1999). Från början fokuserade man på monogenetiska sjukdomar (sjukdomar som beror på defekt i bara en gen) men det blev snart klart att tekniken kunde användas även mot andra sjukdomar (Kay *et al.* 1997). Fram till idag har över 1700 kliniska

studier i över 30 länder genomförts, involverande tusentals patienter inom flera olika sjukdomsområden (Anonym 2012). Vanligast är genterapi inom behandling av olika cancerformer (Verma och Weitzman 2005).

Denna uppsats fokuserar på att beskriva olika sätt att utföra genterapi (bland annat de olika vektorer man kan använda för att överföra genetiskt material) och inom vilka sjukdomsbehandlingar man kan använda genterapi. Slutligen studeras mer ingående hur två former av svår kombinerad immunbrist kan behandlas med hjälp av genterapi, samt vilka problem forskarna och läkarna stött på under utvecklingen av material och metoder. Frågeställningar att försöka besvara är vad som utgör genterapins största problem och begränsningar samt genterapins potential för behandling av de vanligaste formerna av svår kombinerad immunbrist.

Vad är genterapi?

Från början var genterapin endast en teknik där man överförde en fungerande gen till en cell för att ersätta en muterad variant av genen och på så sätt få normalt genuttryck (eventuellt inte fullständigt men ändå tillräckligt). En sådan gen kallas transgen. Detta tillvägagångssätt är fortfarande grunden för genterapin men idag är det vanligare att använda komplementärt DNA (cDNA) som kodar för proteiner som kan påverka cellbeteende. Ett exempel är cDNA där genprodukten är proteiner som förhindrar cancercellsutveckling. Ytterligare ett exempel är proteiner som aktiverar immunceller så att de upptäcker och attackerar cancerceller och därmed verkar tumörhämmande (Giacca och Zacchigna 2012). Eftersom virus är välstuderade och under miljoner år utvecklat sin förmåga att överföra genetiskt material till en värdcell är dessa populära att använda som vektorer för genöverföring (Kay *et al.* 1997). Olika typer av vektorer och deras fördelar respektive nackdelar återkommer senare i uppsatsen.

I princip är det två olika tekniker som kan användas för överföring av en färdig vektor; *ex vivo* respektive *in vivo*. I behandling *ex vivo* tar man ut celler från patienten, överför önskade gener till cellerna med hjälp av transduktion (virusmedierad genöverföring) och återinför sedan den genmodifierade cellen i patienten. I *in vivo* överför man vektorn med de önskade generna direkt till patienten. Det finns fördelar och nackdelar med båda metoderna och det går att diskutera vilken metod som är mest lämplig. Vissa hävdar att *in vivo* är att föredra eftersom det är mer komplicerat att behöva extrahera celler och sedan plantera in dem igen (Kay *et al.* 1997), samt att *in vivo* visat sig ge högre och långvarigare effekt. Dock finns det risker i och med svårigheten att kontrollera vilka celler som tar emot generna, samt var i genomet de inkorporeras (Rosenqvist 2005). För att undvika mutagenes (att gensekvensen sätts in i en existerande gen och orsakar en insertionsmutation) är det fördelaktigt med vektorer som inkorporeras på specifika platser (så kallade site-specific vectors) och på sätt inte ”stör” cellens fungerande gener (Verma och Weitzman 2005).

Virala vektorer

Den ideala vektorn för genterapi är en viral vektor som går att odla till hög koncentration och inte orsakar toxiska infektioner (Verma och Weitzman 2005) eller en vektor som inte orsakar immunrespons när den överförs till patienten. Både virala och icke-virala vektorer används idag

(Kay *et al.* 1997), dock är virala vektorer vanligare. I 70 % av de kliniska studier som hittills utförts har man använt sig av virala vektorer (Young *et al.* 2006).

Eftersom genterapi används inom flera olika sjukdomsbehandlingar behövs också flera olika typer av vektorer. De virala vektorerna man använder sig av i kliniska studier är retrovirus, adenovirus och adenoliktande virus (adenoassociated viruses; AAV) (Kay *et al.* 1997). Det senaste decenniet har även herpesvirusvektorer introducerats i behandlingar där man vill överföra längre DNA-sekvenser (Verma och Weitzman 2005). Virus har en väl utvecklad förmåga att överföra sitt genetiska material till en värdcell, vilket man i genterapin utnyttjar för att kompensera för defekta gener. Många virus påbörjar efter infektion sin lytiska livscykel. Detta innebär att det bildas genprodukter som efter virusreplikation gör att värdcellen till slut lyserar och de nya viruspartiklarna sprids. För att undvika att viruset påbörjar sin lytiska cykel och orsakar en skadlig och ibland dödlig infektion kan man i förhand klippa ut de gener som kodar för genprodukter involverade i replikation och toxicitet, medan man lämnar gener ansvariga för inkapslingen av vektor-DNA (Kay *et al.* 1997).

Retrovirusvektorer

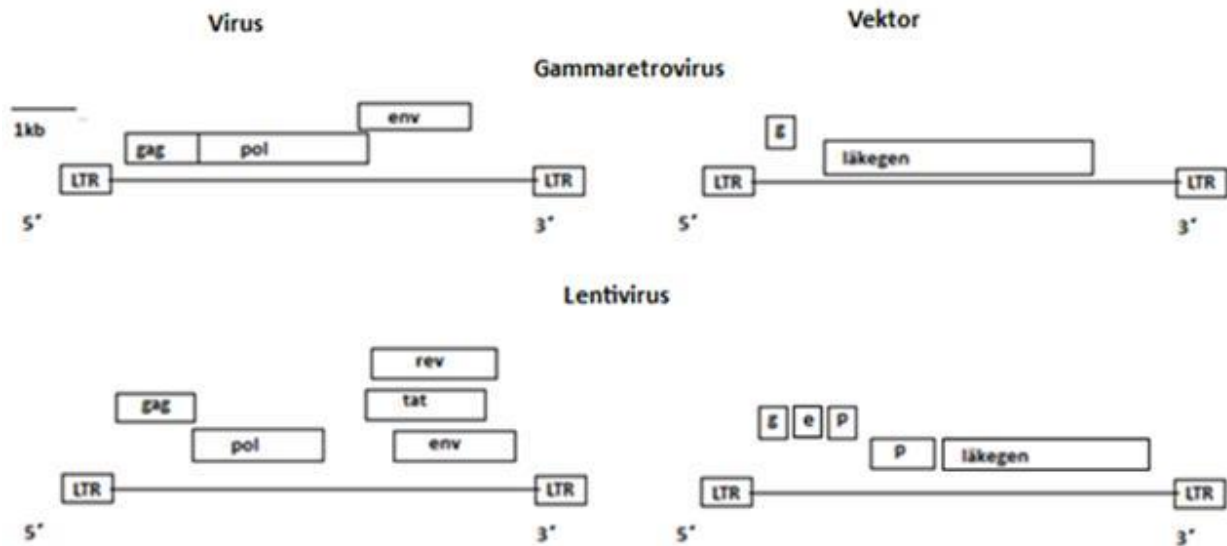
Retrovirus är virus med genetiskt material i form av RNA som med hjälp av omvänt transkriptas avkodas och bildar cDNA. Dessa virus används *in vivo* med fördelen att de inkorporerar sitt genetiska material i värdcellens genom med hjälp av färdiga proteiner som bärs med i viruskapseln (det skal som omger viruset) tillsammans med omvänt transkriptas och proteiner för cellinvasion. Viruset behöver alltså inte kunna replikera sig för att överföra sitt genom vilket gör att man kan klippa bort gener som ansvarar för lytisk aktivitet (Kay *et al.* 1997). Viktiga gener som om borttagna gör att viruset inte kan replikera sig är för retroviruset *gag*, *pol* och *env*. *Gag*-genen kodar bland annat för proteiner som ingår i viruskapseln, *pol*-genen kodar för proteas, omvänt transkriptas och integras, och *env*-genen kodar för glykoproteiner som finns i lipidhöljet som omger kapseln. På var sida om denna genkassetten sitter LTR-regioner (long terminal repeats) och det är vid dessa man kan klippa ut genkassetten och ersätta den med önskade gener (fig. 1) (Verma och Weitzman 2005).

Transduktion *in vivo* kräver dock att värdcellen har en aktiv cellcykel och genomgår celledelning, vilket är ett problem eftersom de flesta celler någon gång under sin livstid är passiva. Det är dessutom svårt att före transduktion få en odling med tillräckligt hög titer (koncentration viruspartiklar) (Kay *et al.* 1997). De vanligaste retrovirusen, som används i 50 % av genterapeutiska kliniska försök, är gammaretrovirus och lentivirus.

Gammaretrovirusvektorer användes frekvent inom genterapin fram till tidigt 2000-tal, främst på grund av att de gick att odla till relativt hög koncentration i en kultur *ex vivo* och inte orsakade stor immunrespons när de överförts till en värd. Deras förmåga att integrera sitt cDNA i värdgenomet var också god. På senare år har dock andra vektorer utvecklats och gammaretrovirus används mindre frekvent.

Den största skillnaden mellan gammaretrovirus och lentivirus är att de senare kan infektera celler som för tillfället inte har en aktiv cellcykel och alltså inte delar sig. De innehåller nämligen ett PIC (Pre Integration Complex) som interagerar med protein på värdcellens kärnmembran och på så sätt faciliterar integration till cellkärnan. Detta gör att lentivirus kan användas till flera olika typer av vävnader och att man inte behöver tillsätta tillväxtfaktorer (Giacca och Zacchigna 2012).

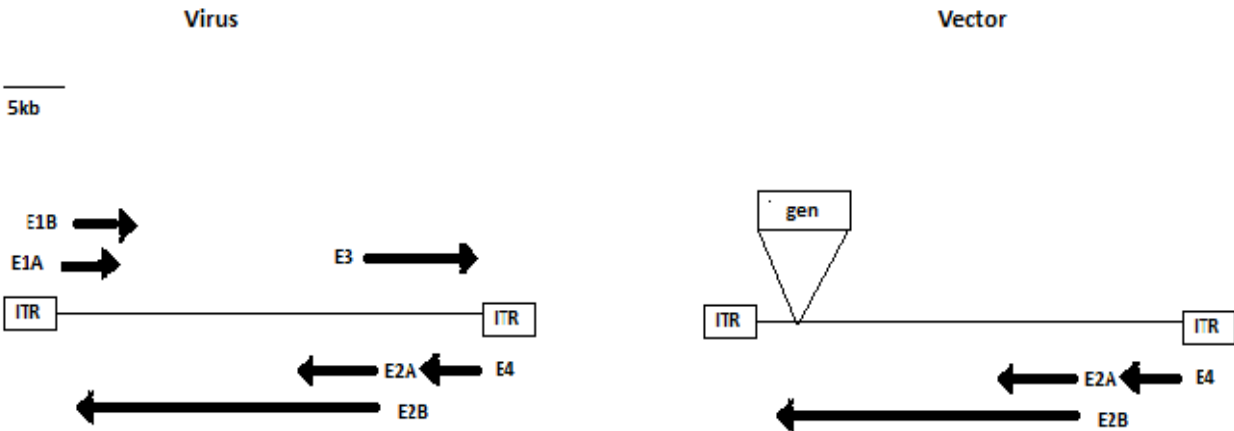
Utöver *gag*, *pol* och *env* har lentivirusvektorer även upp till sex andra virala gener vars genprodukter faciliterar replikation samt infektion av värdcellen. Alla lentivirus innehåller *tat* och *rev*-gener som aktiverar transkription av virala proteiner respektive export av viralt RNA (Verma och Weitzman 2005).



Figur 1. Gensekvenserna för retrovirus (vänster) samt vilka vektorer de utgör (höger). Gammaretrovirus innehåller tre essentiella gener, *gag*, *pol* och *env*, medan lentivirus förutom dessa även innehåller bland annat *rev* och *tat*. Dessa klipps i vektorn ut eller muteras för att minska vektorns patogena egenskaper (modifierad efter Giacca och Zacchigna 2012).

Adenovirusvektorer

Fler än 50 serotyper (undergrupper) av adenovirus kan infektera människan och replikera sig i andningsvägar, ögon, urinblåsan, magkanalen och lever (Verma och Weitzman 2005), men infektion ger oftast bara milda symtom och orsakar luftvägsinfektioner (Kay *et al.* 1997). Det är särskilt två typer av viruset, Ad5 och Ad2, som använts inom genterapi i kliniska studier av cancer och cystisk fibros (Kay *et al.* 1997). Viruset har fem gener som är involverade i virusinfektion; *E1A*, *E1B*, *E2*, *E3* och *E4*. För att minska risken för toxisk infektion klipps *E1A* och *E1B* eller *E1A*, *E1B* och *E3* ut, eftersom *E1A*:s och *E1B*:s genprodukter är ansvariga för replikation och *E3*s genprodukter interagerar med värdcellens infektionsrespons (Giacca och Zacchigna 2012). Det har emellertid visat sig att även små mängder virala proteiner triggat immunrespons, vilket gjort att man konstruerat en vektor som bara har kvar sina inverterade terminala repetitiva sekvenser (inverted terminal repeats, ITRs) för vektorspridning, samt en Ψ -sekvens som packar DNA (fig. 2) (Young *et al.* 2006).



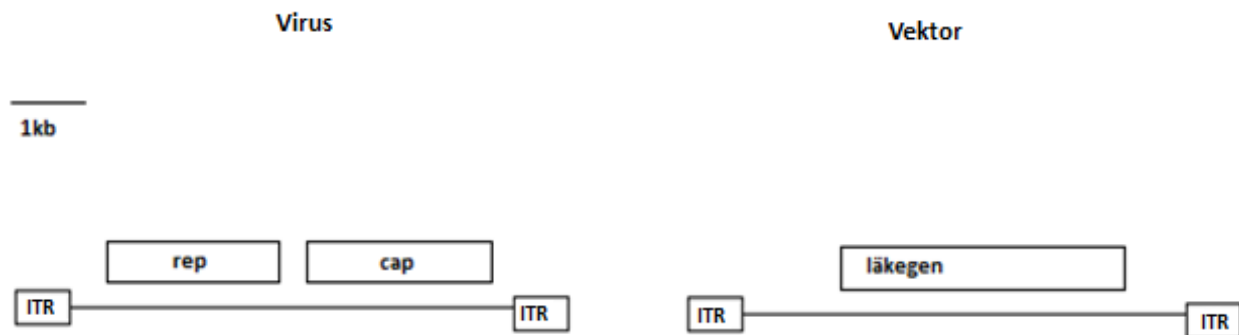
Figur 2. Adenovirusets genssekvens (vänster) och den genererade vektorn (höger). Virusets virulens regleras med hjälp av flera gener (bland annat *E1A*, *E1B* och *E3*) och som vektorer finns olika varianter med olika många virala gener borttagna (modifierad efter Giacca och Zacchigna 2012).

Nackdelen med adenovirus är dess höga immunogenicitet, det vill säga att viruset framkallar immunrespons, och därför ger en kortvarigare effekt. Detta skulle dock kunna vara en fördel inom behandling av hjärt- och kärlsjukdomar där man bara vill ha tillfälligt uttryck av en viss gen. Även inom cancer skulle hög toxicitet och immunogenicitet tillsammans kunna motverka tumörtillväxt. Adenovirusvektorer är emellertid den mest effektiva klassen av vektorer när det kommer till överföring av DNA till en värdcell, och utveckling av vektorer med mindre immunogenicitet gör att de förhoppningsvis ska kunna användas i behandlingar med längre varaktighet (Isner 2002).

Ett annat problem med adenovirusvektorer är svårigheten att kontrollera vilka vävnader som blir vektormottagare. Även om man lyckas specificera en mottagarvävnad kan vektorn spridas till omgivande celler, vilket kan ha allvarliga konsekvenser. Detta problem kan dock övervinnas med hjälp av promotorregioner som kontrollerar vilka celltyper som transgenen ska uttryckas i (Thomas *et al.* 2003 i Anonym 2002).

Adenolikhande virusvektorer

Adenolikhande virus (AAV) är ett ickepatogent virus vilket gör att man kan infektera patienter med relativt höga doser utan att orsaka immunrespons eller nå toxiska nivåer (Verma och Weitzman 2005). Eftersom man inte behöver klippa bort replikationsgener är viruset fullt kapabelt att replikera sig självt, och man är därför inte beroende av värdceller med aktiv cellcykel (Kay *et al.* 1997). Vektorn innehåller två öppna läsramar (open reading frames, ORFs), *rep* och *cap* (fig. 3), som båda kodar för virala proteiner. På sidorna av dessa finns ITRs som bland annat är viktiga för virusets förmåga att replikeras och integreras i värdcellen (Verma och Weitzman 2005).



Figur 3. Adenoliknande virus gensekvens (vänster) samt den vektor den utgör (höger). I vektorn har de virala generna *rep* och *cap* klippts ut (modifierad efter Giacca och Zacchigna 2012).

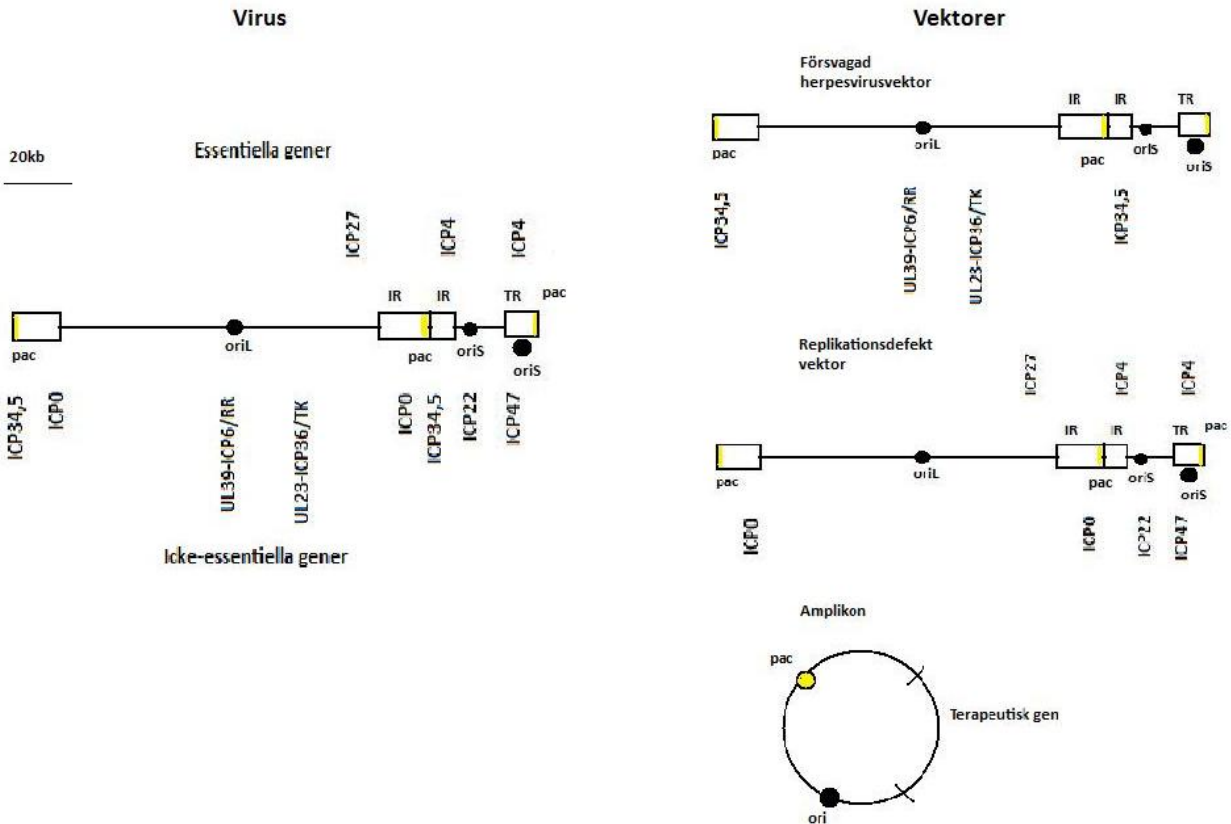
Ungefär hundra olika serotyper av AAV är kända och fler upptäcks hela tiden. Vid provtagningar har det visat sig att cirka 80 % av vuxna över 20 år har antikroppar mot viruset, vilket tyder på att de någon gång har exponerats för det. Hittills har cirka tolv serotyper av AAV isolerats (AAV1-AAV12) men det är AAV2 som har använts mest vid genterapi (Giacca och Zacchigna 2012).

Nackdelen med AAV är att viruset på grund av sitt lilla genom inte kan bära med sig större fragment främmande DNA, men försöken att ta fram en effektivare vektor fortsätter på grund av fördelarna med en icke-virulent vektor (Kay *et al.* 1997).

Herpesvirusvektorer

Herpes simplexvirus-1 (HSV-1) är en av de vanligaste typerna av herpesvirus, och kan inom genterapi användas som DNA-vektor. Tack vare att viruset är relativt stort kan det också överföra längre DNA-sekvenser. Genom att klippa ut alla eller vissa gener som är involverade i virusets lytiska cykel och har toxiska egenskaper (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 och ICP47) hindrar man viruset från att replikera sig vilket gör viruset mindre patogent. Ett problem med detta är dock att ICP0-genens genprodukt förutom att vara toxisk för den infekterade cellen även behövs för hög och långvarig expression av transgenen. Detta problem kan överkommas om man kan överföra en gen med genprodukt motsvarande proteinet från ICP0, som kan facilitera expression av transgenen (Verma och Weitzman 2005).

Herpesvirusvektorerna kan delas in i tre grupper beroende på vilka justeringar man gjort i dess genom (fig. 4). Försvagade herpesvirusvektorer (attenuated vectors) kan fortfarande replikera sig och innehåller vissa virulensgener. Studier har visat att när vektorerna inkorporerats i hjärnceller sprids de sedan också till andra områden, och tillsammans med kemoterapi kan dessa vektorer vara användbara inom cancerbehandling. I replikationsdefekta herpesvirusvektorer (replication-defective vectors) klippte man från början bara ut ICP4 vilket resulterade i mindre patogenicitet i hjärnan, men fortfarande neurotoxicitet i andra cellkulturer. Därför klippte man ut ytterligare gener vilket ledde till att vektorn fick en mer långvarig verkan. Den sista gruppen vektorer framställd från HSV-1 är så kallade amplikoner (amplicons). Dessa kan beskrivas som en plasmid med element från HSV-1 inkorporerade, och kan bära störst DNA-fragment av alla ovan nämnda vektorer (Giacca och Zacchigna 2012).



Figur 4. Herpesvirus (vänster) och de tre typer av vektorer man kan konstruera utifrån denna (höger). I den försvagade herpesvirusvektorn klipper man ut flera essentiella gener medan man i den replikationsdefekta vektorn även klipper ut några icke-essentiella gener. Amplikonen innehåller ett ori-S och ett pac (packningssignal) samt den terapeutiska genen (modifierad efter Giacca och Zacchigna 2012).

Icke-virala vektorer

Icke-virala vektorer kallas de vektorer som inte är virus. Där ingår bland annat fritt DNA som injiceras i målcellen, men även liposomer (runda fettlösliga partiklar) innehållande för behandlingen önskat DNA (Verma och Weitzman 2005). Problemet med icke-virala vektorer är att de ofta inte har bestående effekt och att inkorporeringen är ospecifik (Kay *et al.* 1997). Vektorerna riskerar också att brytas ned av enzymer, eller ”fastna” i cytosolen och därmed hindras från att transportera sitt genetiska material till cellkärnan. Ett annat problem som man fortfarande försöker överkomma är svårigheten att uppnå tillräckligt högt genuttryck av transgenen. Försök har visat att injicering av DNA direkt i cellkärnan resulterar i 50-100 % genuttryck, medan injicering i cytosolen resulterar i mindre än 0,01 % expression av transgenerna (van Gaal 2011).

Intresset för att utveckla de icke-virala vektorerna är stort eftersom man på så sätt kan undvika riskerna för toxiska effekter och immunrespons som medföljer de virala vektorerna (Verma och Weitzman 2005). En annan fördel med liposomer är att genernas storlek inte har någon betydelse och att vektorerna är enkla att preparera (Kay *et al.* 1997).

Behandlingsområden

Genterapi är aktuellt inom behandlingar av alla ärvda eller nyförvärvade genetiska sjukdomar, däribland cystisk fibros (Vile 1998), hjärt- och kärlsjukdomar (Young *et al.* 2006), Parkinson, Alzheimers (Giacca och Zacchigna 2012), sicklecellanemi, Gauchers sjukdom och flera immunsjukdomar (Beutler 1999). Störst är dock genterapin inom behandling av cancer; cancerbehandlingen står för cirka 70 % av de kliniska studier som idag görs (Verma och Weitzman 2005).

Kliniska studier, framgångar och bakslag

Fram till idag har över 1700 kliniska försök i genterapi i över 30 länder utförts (Giacca och Zacchigna 2012), de flesta med patienter som är döende. Kliniska studier utförs i tre steg (faser) innan eventuellt godkännande av behandlingsmetoden kan ske från lämplig myndighet. I första fasen studeras effekterna av behandlingen för första gången på människor och brukar utföras på ett litet antal friska försökspersoner som oftast är män. I andra fasen studeras effekterna av behandlingen på ett litet antal sjuka patienter och i fas tre studeras till sist effekterna under längre tid med ett större antal försökspersoner. Även dessa är ofta i slutskedet av sin sjukdom och behandlingen kan vara deras sista chans till botemedel (Melander 2012).

Ett av de största bakslagen för modern genterapi var ett dödsfall 1999 till följd av en inflammation orsakad av en adenovirusvektor. Patienten var en 18-årig amerikan som led av ornitintranskarbamylasbrist (OTC-brist), en ärftlig leversjukdom som kan leda till dödliga nervskador. Efter behandling med samma dos viruspartiklar som tidigare injicerats i en annan patient utan komplikationer fick patienten en kraftig inflammatorisk reaktion som fyra dagar senare orsakade hans död (Smith 2001). US Food and Drug Administration (FDA) stoppade det aktuella försöket plus andra kliniska försök som pågick. År 2005 infördes restriktioner mot de ansvariga läkarna, men försöken fick återupptas.

Efter bakslaget i USA tändes dock nytt hopp för genterapin, då läkare i Frankrike lyckades bota barn med en allvarlig typ av immunsjukdom med hjälp av retrovirusvektorer (Cavazzana-Calvo *et al.* 2000). Detaljer om försöket finns under rubriken *SCID-X1* i avsnittet om Genterapi inom immunsjukdomar på sidan 10.

År 2006 rapporterades om en lovande genterapistudie utförd av en schweiz-tysk grupp som hoppades kunna behandla kronisk granulomatös sjukdom (CGD). Detta är en ärftlig immunbristsjukdom som påverkar kroppens fagocyter (vita blodkroppar) och leder till ökad inflammationsrisk. Dessa inflammationer kan ibland leda till tumörliknande bildningar, så kallade granulom. Två av de tre patienter som ingick i studien visade stärkt immunförsvar och minskade infektioner i upp till två år efter behandling. Efter två år dog dock en av patienterna av en kraftig bakterieinfektion. Detta tros dock inte vara på grund av genterapin utan snarare att genterapins effekt avtog med tiden och att transgenerna inte längre uttrycktes tillräckligt frekvent (Ott *et al.* 2006).

En annan studie som fick stor uppmärksamhet 2006 och ingav stort hopp för genterapins framtid var behandlingen av metastatiskt melanom. Med hjälp av retrovirusvektorer som uttryckte T-lymfocyt-receptorer bildade patienterna efter transduktion tumörigenkännande lymfocyter (som verkar tumörhämmande). Två av patienterna som hade förutspåtts leva tre till sex månader visade

ett år efter behandlingen fortfarande höga nivåer av lymfocyter. Femton patienter visade samma resultat upp till två månader efter behandling, men försöket gav inget signifikant resultat. Forskningen fortsätter dock och behandlingsformen är under utveckling för att åstadkomma högre och långvarigare effekt (Morgan *et al.* 2006).

Gendicine

I Kina är genterapi godkänt som behandlingsform av huvud- och nackcancer (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC). HNSCC står för cirka 10 % av de 2,5 miljoner nya cancerfall som rapporteras i Kina varje år och kan nu behandlas med det av State Food and Drug Administration of China (SFDA) godkända preparatet Gendicine (Pearson *et al.* 2004). Gendicine är produkten av en adenovirusvektor och en fungerande humanversion av p53-genen. P53:s genprodukt har antitumöregenskaper och mutation i p53 är orsaken till ungefär hälften av alla cancerfall. Denna gen har därför studerats intensivt för att bättre förstå dess mekanism. Insatt i en vektor som sedan levereras till tumörceller har den visat sig uttryckas och även bidra till ökad immunrespons, vilket leder till effektivare attack mot tumörceller (Shiraishi *et al.* 2004).

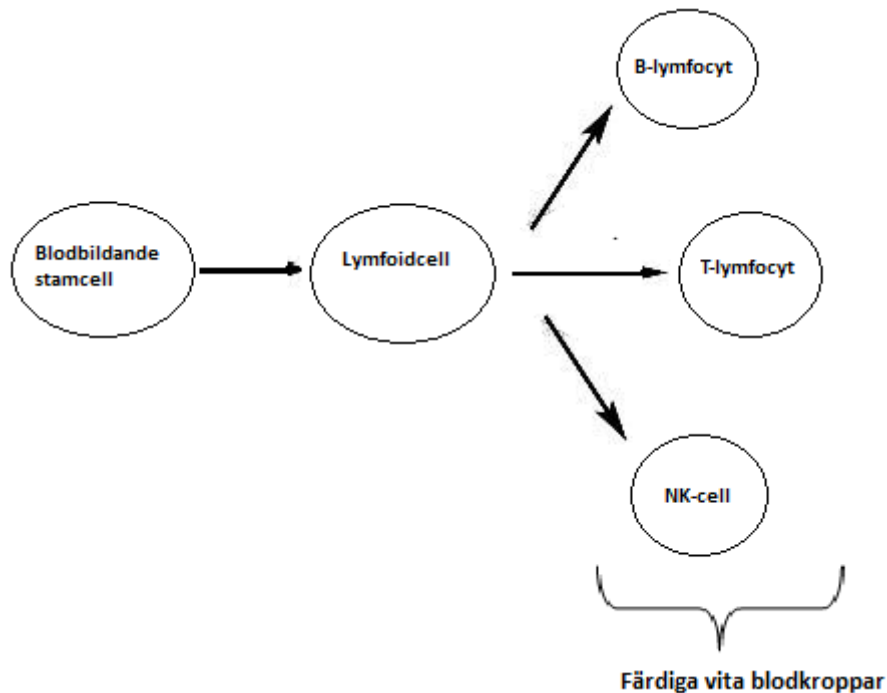
Kina är ett av de länder som har pågående kliniska försök inom genterapi och var först med att godkänna genterapi för behandling av p53-tumörer (Chen 2008). Preparatet kallas Gendicine. År 2003 hade kliniska försök pågått i fem år och enda biverkningen som påvisats var begränsad feber, vilket ledde till godkännandet av Gendicine som behandlingspreparat. I försöken användes det tillsammans med strålningsterapi på patienter med långt utvecklad HNSCC och efter åtta veckors behandling visade 64 % av patienterna full tumörregression och 32 % visade delvis tumörregression (Pearson *et al.* 2004). Forskare och läkare i andra delar av världen var dock inte säkra på att metoden var tillförlitlig, främst eftersom resultaten från fas 1 och fas 2 bara publicerats på kinesiska. Dessutom har det visat sig vid granskning av den enda till engelska översatta översiktsartikeln att vissa data inte stämmer överens med originalet. Resultat från fas 3-försök hade heller inte presenterats när preparatet godkändes. Ändå beräknades år 2006 att cirka 4000 patienter hade behandlats med Gendicine (Guo och Xin 2006).

Genterapi inom immunsjukdomar (SCID = severe combined immunodeficiency)

Det första försöket med genterapi på en mänsklig patient (Buckley 2000) samt den första lyckade genterapibehandlingen som resulterade i tillfrisknande var behandlingar av två immunbristsjukdomar som går under samlingsnamnet svår kombinerad immunbrist (SCID; severe combined immunodeficiency). Det gör att immunbristsjukdomar intressanta i detta sammanhang. SCID är ett samlingsnamn för flera ovanliga och allvarliga immunbristsjukdomar som drabbar en på 50 000-500 000 människor (Cavazzana-Calvo *et al.* 2000). Sjukdomarna orsakar brist eller frånvaro av T- och B-lymfocyter och Natural Killer-celler (NK-celler). Utan benmärgstransplantation dör de flesta patienter redan som barn.

T- och B-lymfocyter samt NK-celler utvecklas alla från lymfoidceller, som i sin tur utvecklas från pluripotenta blodkroppsstamceller i benmärgen (fig.4). Detta gör att mutationer i gener som reglerar tidig differentiering av lymfoider leder till ofullständig utveckling av dessa tre blodkroppstyper. Det är därför fördelaktigt att kunna använda stamcellstransplantation i

kombination med genterapi, eftersom man från en transplanterad cell kan få alla typer av lymfocyter att utvecklas (Ananworanich och Shearer 2001).



Figur 5. Lymfocyterna utvecklas från pluripotenta blodstamceller.

Benmärgstransplantation, som kräver en donator med humana leukocyt-antigener (HLA) identiska med mottagaren, är fortfarande förstahandsvalet av behandling för SCID. Genterapi kan dock erbjuda en alternativ behandling där man inte behöver hitta en HLA-identisk donator (ofta testar man syskon till patienten). Risken för att mottagaren ska stöta bort de nya cellerna minskar då radikalt (Bordignon 1995). Man kombinerar ofta transplantation med myeloablation, en teknik där man innan benmärgstransplantation behandlar patienten med kemoterapi eller strålning för att förstöra patientens egna benmärgsceller, samt minska risken för immunrespons (Fischer *et al.* 2011).

Svår kombinerad immunbrist-X1

Den vanligaste typen (cirka 40 %) av SCID är svår kombinerad immunbrist-X1 (SCID-X1) (Ananworanich och Shearer 2001). Det är en från X-kromosomen recessivt ärftlig sjukdom (och drabbar därmed oftare pojkar) som orsakar ofullständig utveckling av T-lymfocyter och NK-celler. Orsaken är mutationer i *IL2RG* (Hacein-Bey-Abina 2010) som kodar för cytokinreceptorers γ -kedjor (Buckley 2000). Dessa inkluderar interleukin 2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-11, IL-15 och IL-21, som har betydelse för antigenaktivering och därmed T-lymfocyters reaktionsbenägenhet (Noguchi *et al.* 1993).

Ett känt exempel på SCID-X1 är den så kallade bubblpojken, född 1971. På grund av sin sjukdom kunde han inte vistas i den bakterie- och virusexponerade miljön och blev därför isolerad i en tryckkammare från födseln. Allt som fördes in i kammaren måste vara noga dekontaminerat för att inte utsätta pojken för infektionsrisk. När pojken var sex år konstruerade

ingenjörer på National Aeronautics and Space Administration (NASA) en dräkt som gjorde det möjligt för honom att lämna sin isolering. Tre månader efter en benmärgstransplantation vid 12 års ålder avled pojken dock på grund av en virusinfektion, och han hade då också tumörbildningar i flera organ (Ananworanich och Shearer 2001).

År 2000 presenterades resultatet från en klinisk studie utförd i Frankrike av Cavazzana-Calvo och kollegor där två patienter som behandlats med retrovirusvektorer efter 10 månader påvisade full funktion samt normalt antal av T- och B-lymfocyter och NK-celler. Patienterna hade behandlats med sina egna benmärgsceller som fått en normalt fungerande gen för cytokinreceptorer insatt via transduktion *ex vivo*, och på så sätt återfått sina immunförsvar (Cavazzano-Calvo *et al.* 2000). De lyckade resultaten var ett stort framsteg inom genterapin och bidrog till att försök inleddes även i London. Fler patienter behandlades med samma lyckade resultat. 2002 rapporterades dock att två av de behandlade barnen drabbats av leukemi och kliniska försök i Europa och USA stoppades tills vidare (Richter *et al.* 2003). Blodprov visade att leukemicellerna innehöll en kopia av retrovirusvektorn nära *LMO2*-genen, som tros vara kopplad till utveckling av leukemi (Verma och Weitzman 2005). Totalt fem av de tjugo barn som behandlades i Paris och London utvecklade leukemi 2-5,5 år efter genterapibehandling och efter kemoterapi överlevde fyra av dem. Arton av de behandlade barnen överlevde 3-11,5 år efter behandling och sju av dem testade för bestående lymfocyter. De flesta hade dessutom naiva (outvecklade) T-lymfocyter, vilket visar på fortsatt pågående thymopoiesis (utveckling av lymfocyter) från överförda lymfoidceller även efter avslutad behandling (Fischer *et al.* 2011). Sedan dessa försök pågår arbete för att utveckla de vektorer man använder så att man kan ta bort de element i vektorn som orsakar insertionsmutationer och därmed leukemi. Man hoppas även att denna vektor dessutom ska kunna användas i behandling av adenosindeaminasbrist (Hayden 2011).

Brist på adenosindeaminas

Den första humana genterapin utfördes 1990 i försök att bota immunsjukdomen och metabolismsjukdomen adenosindeaminas-brist (ADA-brist) (Buckley 2000). ADA-brist står för cirka 15-20 % av sjukdomsfallen av SCID och är därmed den näst vanligaste formen av sjukdomen. Brist på adenosindeaminas leder till att höga halter av deoxyadenosin ackumuleras, vilket är giftigt för T- och B-lymfocyter som då bryts ner. I cirka hälften av fallen visar patienten också abnormaliteter i skelettet, främst ryggraden och revbenen (Ananworanich och Shearer 2001).

Resultaten från de första försöken var inte särskilt lyckade, på grund av flera faktorer. Dels var genterapitekniken i praktiken ännu relativt ny och outvecklad, och man hade svårt att framställa titers med tillräckligt hög koncentration viruspartiklar. Dels fick patienterna även enzymbehandling med bovinenzym (polyetylenglycolkonjugerat ADA, PEG-ADA) (Aiuti 2002), vilket gjorde att effekterna av de överförda cellerna blev mindre. På grund av att det redan fanns enzym från enzymbehandlingen fanns inte något selektionstryck på transgenerna och effekten blev mindre märkbar. Man hade heller ännu inte börjat kombinera genterapi med myeloablation, vilket gjorde att risken för immunrespons ökade och att de transplanterade cellerna fick lägre effekt.

Den moderna behandlingen av ADA-brist utförs genom att *ex vivo* överföra patientens egna benmärgsceller med retrovirusvektorer innehållande ett fungerande ADA-gentranskript (eftersom det är ett RNA-virus) och har utförts på ett 30-tal patienter med goda resultat (Grunebaum *et al.*

2011). Värt att notera är att trots att liknande teknik som i behandlingen av SCID-X1 användes mot ADA-brist visade ingen av patienterna i ADA-försöken tecken på leukemi, eller andra genotoxiska komplikationer. Av de 31 patienter som behandlades visade 21 utveckling av T-lymfocyter, medan 10 fortfarande behövde ersättande enzymbehandling. Varaktigheten av T-lymfocytsutveckling är sämre än för SCID-X1, men vid ADA-behandling uppvisar patienterna även överförda B-lymfocyter och NK-celler (Fischer *et al.* 2011).

Positivt med behandlingen är att överförda celler som kan syntetisera ADA kan favoriseras selektivt jämfört med celler utan ADA-syntes som därmed blir utsatt för toxicitet. Detta kräver dock att patienten inte får enzymsättning samtidigt som genterapibehandlingen. Försök har visat att vid transduktion av lymfocyter där patienten inte får enzymsättning selekterades T-lymfocyter med en funktionell ADA-gen, vilket leder till förbättrat immunförsvar. Den metaboliska defekten återställdes dock inte, något som är nödvändigt för att ett permanent resultat ska uppnås (Aiuti 2002).

Etik

Värt att notera är att det ända sedan det första genterapiförsöket genomfördes pågått en ibland hetsig diskussion om huruvida det är etiskt korrekt att försöka ändra en människas genetiska uppsättning (Kimmelman 2008). Den etiska debatten är dock inte relevant för uppsatsens frågeställningar och jag har därför valt att inte studera debatten närmare.

Diskussion

Risker/framgångar

Bortsett från de etiska problem som finns runt genterapin, kan man diskutera huruvida riskerna med genterapin väger mot chansen att hitta ett botemedel mot flera av våra vanligaste sjukdomar, samt några av de allvarligaste men mer ovanliga sjukdomarna. Riskerna för mutagenes, toxisk virusinfektion eller immunrespons måste vägas mot chansen att permanent kunna bota den aktuella sjukdomen. Det som oroade mest när man började med genterapiförsök var risken för att främst retrovirusvektorer skulle orsaka genotoxicitet eller insertionsmutationer. I försöken med SCID visade flera patienter bestående utveckling av lymfocyter, vilket är mycket positivt och visar att genterapin kanske kan vara en behandling med permanent resultat. De goda resultaten förmörkas dock av att några patienter utvecklade leukemi, som å andra sidan i de flesta fall kunde botas med kemoterapi. Dessa resultat kan dock vara till hjälp för att hitta problem med de vektorer man använder och förhoppningsvis kunna förbättra dem. Exempelvis kan man kanske förbättra specificiteten för vektorerna och på så sätt undvika insertionsmutationer. Precis som med all annan teknik går utvecklingen framåt och forskarna arbetar hela tiden för att utveckla säkrare vektorer och metoder.

Något som minskar genterapins effektivitet är svårigheten att framställa en virusvektorodling med tillräckligt hög titer, vilket leder till lägre transduktionsfrekvens. Patientens immunförsvar kan också reagera på de främmande cellerna och starta en immunrespons, vilket leder till att de överförda generna bara uttrycks en kortare tid efter genöverföringen och att man alltså inte får en permanent behandling av sjukdomen. Ett alternativ för att få säkrare vektorer är att på grundlig nivå studera till exempel retrovirus och retrovirusvektorer. Detta för att förstå exakt vilka gener

och mekanismer som orsakar bieffekterna vid transduktion, exempelvis leukemi som i fallen med SCID-X1. Retrovirusvektorer är redan de mest populära vektorerna och kan man utesluta de farliga bieffekterna skulle retrovirus kunna vara de ultimata vektorerna. Ett problem är att eftersom vektorerna inte är "site-specific" kan man inte kontrollera var i patientens genom de nya generna inkorporeras. Ett sätt att övervinna detta problem är att konstruera vektor-DNA:ts sekvenser på ett sätt så att de endast kan sättas in på vissa platser i patientens genom. På så sätt kan man kontrollera att de nya generna inte sätts in i redan existerande gener och orsakar insertionsmutationer.

Ett stort framsteg skulle också vara om man kunde utveckla de adenolikhande virusvektorerna till att kunna bära större DNA-sekvenser. Adenovirus har aldrig orsakat en virulent infektion hos en människa och vore därför optimala för användning inom genterapin. Man skulle då inte behöva klippa bort replikationsgener och virala gener, eller riskera att utsätta patienten för en farlig virusinfektion. Risken för att viruset orsakar en farlig infektion är annars ett stort problem och är tillsammans med risken för insertionsmutationer för tillfället genterapins största hinder. Kan man lösa detta växer genterapins potential enormt.

Kliniska studier

De flesta patienter som ingår i de kliniska försöken är i det sista stadiet av sin sjukdom, och genterapin är därför ofta sista alternativet när andra behandlingar inte gett resultat. Med de ändå övervägande goda resultaten från genterapiförsöken tror jag det är viktigt att inte låta några få bakslag hindra utvecklingen av en behandlingsmetod som har potentialen att bota annars döende patienter. Med detta självklart inte menat att man inte ska ta biverkningarna på allvar, men misstagen leder ofta till avgörande insikter som kan vara av betydelse i senare försök. Försöken kräver att patienten ger sitt godkännande, alternativt målsmans godkännande, och patienterna informeras alltid om riskerna med behandlingen. Försöken är därför positiva både för patienter och för vetenskapen.

Flera gånger har genterapiförsök stoppats på grund av att patienter utvecklat bieffekter till följd av genterapibehandling, men i de flesta fall har försöken sedan fått fortsätta, dock med restriktioner. Detta tycker jag visar att man tar motgångarna på allvar och att läkarna tar sitt ansvar för att inte utsätta patienterna för onödiga risker med behandlingen. Detta visar också att läkarna och resultaten granskas av högre instanser, så att läkarna inte får experimentera hur de vill.

Det är också viktigt att de kliniska försök som görs redovisas och förmedlas till resten av vetenskapvärlden i refereegranskade tidsskrifter. Resultaten bör även granskas av lämplig myndighet innan metoden godkänns som behandlingsform. Jag är personligen lite tveksam till om SFDA i Kina verkligen borde godkännt Gendicine så "snabbt". Det verkar vara många frågetecken kring studien, särskilt eftersom det var svårt för resten av världen att ta del av resultaten. Även om resultaten från de första faserna var goda, krävs det längre studier för att undersöka långvariga effekter och om terapin kan ge biverkningar efter längre tid. I fallen med SCID-X1 utvecklade patienterna inte leukemi förrän två år efter behandlingen vilket visar på att längre pågående studier är nödvändiga för pålitliga resultat. Att Gendicine godkännts endast i Kina tyder också på att något inte står helt rätt till. Om behandlingen fungerar felfritt borde ju andra länder också godkännt preparatet.

Slutsats

Genterapin har stor potential och eftersom den kan användas inom så många sjukdomsområden borde man fortsätta försöka utveckla den så att den blir säkrare och kan användas mot fler sjukdomar. Jag tror det är viktigt att man inte blir avskräckt från att fortsätta med genterapiförsöken på grund av de hinder och bakslag man stöter på. Det finns risker med alla behandlingar mot allvarligare sjukdomar och genterapi borde få samma chans som andra godkända behandlingsmetoder. Kan man utveckla vektorerna och metoderna så att riskerna för farliga infektioner och insertionsmutationer försvinner kan genterapi vara räddningen mot många av våra vanligaste sjukdomar.

Genterapin verkar också ha stor potential inom behandlingen av immunsjukdomar. Inom behandling av SCID-X1 gäller det "bara" att förstå varför vissa patienter utvecklade leukemi och hitta ett sätt att förhindra detta. Lovande resultat inom behandling av ADA-brist visar också att genterapin kan vara vägen att gå.

Tack

Jag vill tacka Frida Wennerholm, Magnus Andréasson, Fredrik Norrström och Martin Rosén som under seminarierna deltagit i diskussioner kring skrivprocessen och kommit med förslag på förbättringar. Särskilt tack till Frida och Magnus för de skriftliga synpunkter och förslag som jag fått under skrivandets gång. Stort tack även till Anders Ödeen för handledning och stöd, och för att du fått seminarierna att kännas mer som en fikarast i vetenskaplig anda än ett obligatoriskt moment på schemat.

Referenser

- Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo M G, Bordignon C. 2002. Correction of ADA-SCID by Stem Cell Gene Therapy Combined with Nonmyeloablative Conditioning. *Science* 296:2410.
- Ananworanich J, Shearer W T. 2001. Immune Deficiency: Severe Combined Immune Deficiency. *Encyclopedia of Life Science*.
- Anonym. 2012. Number of Gene Therapy Clinical Trials Approved Worldwide 1989-2012. WWW-dokument. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>. Hämtad 2013-01-16 kl.11.18.
- Anonym. 2002. Assessment of Adenoviral Vector Safety and Toxicity: Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. *Human Gene Therapy* 13:3-13. doi:10.1089/10430340152712629.
- Beutler E. 1999. Gene Therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 5:273.
- Bordignon C, Notarangelo L D, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, Ugazio A G, Mavilio F. 1995. Gene Therapy in Pheripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow for ADA⁻ Immunodeficient Patients. *Science* 270:470,479
- Buckley R. 2000. Gene therapy for human SCID: Dreams become reality. *Nature Medicine* 6:623

- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova J-L, Bousso P, Le Deist F, Fischer A. 2000. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency. *Science* 288:669
- Chen Z. 2008. Biomedical science and technology in China. *The Lancet* 372:1442.
- Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. 2011. Gene therapy for primary adaptive immune deficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127:1357
- Friedmann T. 1997. The Road toward Human Gene Therapy – A 25-year Perspective. *Annals of Medicine* 29: 575.
- Giacca M, Zacchigna S. 2012. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of Controlled Release* 161:383.
- Grunebaum E, Chung C T-S, Dadi H, Kim P, Brigida I, Ferrua F, Cicalese M P, Aiuti A, Roifman C M. 2011. Purine metabolism, immune reconstitution, and abdominal adipose tumor after gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127:1417.
- Guo J, Xin H. 2006. Chinese Gene Therapy Spicing Out the West? *Science* 314:1232-1235.
- Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang G P, Berry C C, Martinache C, Rieux-Laucat F, Latour S, Belohradsky B H, Leiva L, Sorensen R, Debré M, Casanova J L, Blanche S, Durandy A, Bushman F D, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. 2010. Efficacy of Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine* 363:356
- Hayden E C. 2011. Gene-therapy success spurs hope for embattled field. *Nature*, doi 10.1038/news.2011.500.
- Isner J M. 2002. Myocardial gene therapy. *Nature* 415:234.
- Kay M A, Liu D, Hoogerbrugge P M. 1997. Gene Therapy. *Proceedings of the National Academy of Science* 94:12744.
- Kimmelman J. 2008. The ethics of human gene transfer. *Nature Reviews Genetics* 9:239.
- Melander A. 2012. Klinisk prövning. WWW-dokument. <http://www.ne.se/klinisk-prövning>. Hämtad 2012-11-16 kl. 15.03
- Morgan R A, Dudley M E, Wunderlich J R, Hughes M S, Yang J C, Sherry R M, Royal R E, Topalian S L, Kammula U S, Restifo N P, Zheng Z, Nahvi A, de Vries C R, Rogers-Freezer L J, Mavroukakis S A, Rosenberg S A. 2006. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science* 314:126
- Noguchi M, Yi H, Rosenblatt H M, Filipovich A H, Adelstein S, Modi W S, McBride O W, Leonard W J. 1993. Interleukin-2 Receptor γ Chain Mutation Results in X-Linked Severe Combined Immunodeficiency in Humans. *Cell* 73:147.
- Ott M G, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kühlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins N A, Copeland N G, Lüthi U, Hassan M, Thrasher A J, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M. 2006. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nature Medicine* 12:401-409.
- Pearson S, Jia H, Kandachi K. 2004. China approves first gene therapy. *Nature Biotechnology* 22:3.
- Richter J, Relander T, Fasth A, Karlsson S. 2003. Två fall av leukemi i fransk studie. *Läkartidningen* 100:498

- Rosenqvist N. 2005. Mechanisms of Transgene Silencing in Neural Cells -Implications for *Ex vivo* Gene Therapy to the Brain. (Doktorsavhandling). Division of Neurobiology, Wallenberg Neuroscience Center, BMC A11, Lunds Universitet.
- Shiraishi K, Kato S, Han S-Y, Liu W, Otsuka K, Sakayori M, Ishida T, Takeda M, Kanamaru R, Ohuchi N, Ishioka C. 2004. Isolation of Temperature-sensitive p53 Mutations from a Comprehensive Missense Mutation Library. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 348-349
- Smith E I C. 2007. Genterapin kanske på väg att infria förväntningarna. *Läkartidningen* 98:924.
- Thomas C E, Ehrhardt A, Kay M A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 4:346
- van Gaal E V B, Oosting R S, van Eijk R, Bakowska M, Feyen D, Kok R J, Hennink W E, Crommelin D J A, Mastrobattista E. 2011. DNA Nuclear Targeting Sequences for Non-Viral Gene Delivery. *Pharmaceutical Research* 28: 1707
- Verma I M, Weitzman M D. 2005. Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. *Annual Review of Biochemistry* 74:711–717.
- Young L S, Searle P F, Onion D, Mautner V. 2006. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *Journal of Pathology* 208:300,302.