UPPSALA
UNIVERSITET

Virala vs. icke-virala metoder i *in vivo* genterapi

Svanhildur Ólafsdóttir

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2017
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Virala vs. Icke-virala Metoder i *in vivo* Genterapi

Svanhildur Ólafsdóttir

Självständigt arbete i biologi 2017

Sammandrag

Ärftliga och förvärvade genetiska sjukdomar är ett ökande problem i dagens samhälle. Gemensamt för dessa sjukdomar är att de orsakas av mutationer i arvsmassan. Forskare har kommit så långt i tekniken att de kan reparera det skadade genomet genom ett flertal olika metoder som kallas för genterapi. Dessa är fortfarande under utredning i kliniska försök och har inte blivit tillåten som behandling. Genterapi innebär introduktion av exogen nukleinsyra till en cell eller vävnad med syfte att inaktivera eller ersätta en muterad gen, eller att bekämpa en sjukdom. Målet med behandlingen är att bota eller minska symtomen för en sjukdom som orsakas av mutation eller virusinfektion. En av de största utmaningarna med genterapi är att introducera den exogena nukleinsyran till cellen samt att undvika immunrespons. Introduceringen sker oftast med hjälp av ett verktyg i form av vektorer. Dessa vektorer kan vara både virala och icke-virala. I denna rapport tas för- och nackdelar med utvalda virala och icke-vitala metoder upp. Introducering av nukleinsyror med virala vektorer, också kallad transduktion, kan ge bättre introducerings resultat än vad introducering med icke-virala vektorer, eller transfektion, ger. Transduktion kan dock ha svårare biverkningar samt att de har förmågan att inducera immunrespons hos patienten. De exempel som tas upp på virala vektorer är lentivirala samt adeno-associerade vektorer. Icke-virala vektorer kan ha större genkapacitet än virala vektorer. Dessutom kan dessa vara säkrare att använda eftersom de har låg toxicitetsförmåga och lägre sannolikhet för att framkalla immunrespons. Det är mycket svårt att avgöra vilken av dessa metoder som är mest fördelaktig i *in vivo* genterapi. Alla fall måste utvärderas utifrån vilken sjukdom som ska behandlas samt vilka genmodifieringstekniker som ska användas. Mer kunskap om sjukdomarnas biologiska bakgrund och om behandlingsteknikerna ger fördel i kampen mot sjukdomar som förr i tiden ansågs vara obotliga. Med förbättrade introduceringssystem, både virala och icke-virala, kan genterapi eventuellt bli ett lika vanligt alternativ som läkemedelsbehandling.

Introduktion

Människokroppen består av trillion tals celler. Varje cell innehåller ens genetiska material där generna uttrycks på olika sätt beroende på cellens funktion. Ibland kan mutationer uppkomma som gör att generna inte uttrycks på rätt sätt och det kan orsaka sjukdomar på grund av att fel protein produceras. Dessa mutationer kan vara medfödda eller uppkomma senare i livet (Lodish *et al.* 2000). En av de behandlingar som forskare har kommit fram till i kampen mot det olika sjukdomarna är genterapi. Genterapi är relativt nytt område inom terapeutisk behandling och syftet är att använda den i kombination med eller som ersättning för kirurgiska ingrepp och läkemedelsbehandlingar (Flotte 2007).

Genterapi innebär modifiering av generna med målet att; slå ut eller en inaktivera den muterade genen för att tysta dess funktion, ersätta den gen som har muterats och orsakar

sjukdomen med en frisk gen, eller introducera en ny gen till kroppen för att bekämpa en sjukdom (Xiao-Jie *et al.* 2015). Genmodifieringen sker genom att introducera främmande nukleinsyror såsom DNA, mRNA, micro RNA, small interfering RNA (siRNA) eller antisense oligonukleotider till celler eller vävnader. De olika genterapimetoderna eller nuklein-syrorna som introduceras till cellen har olika mekanismer och baseras på olika tekniker (Yin *et al.* 2014).

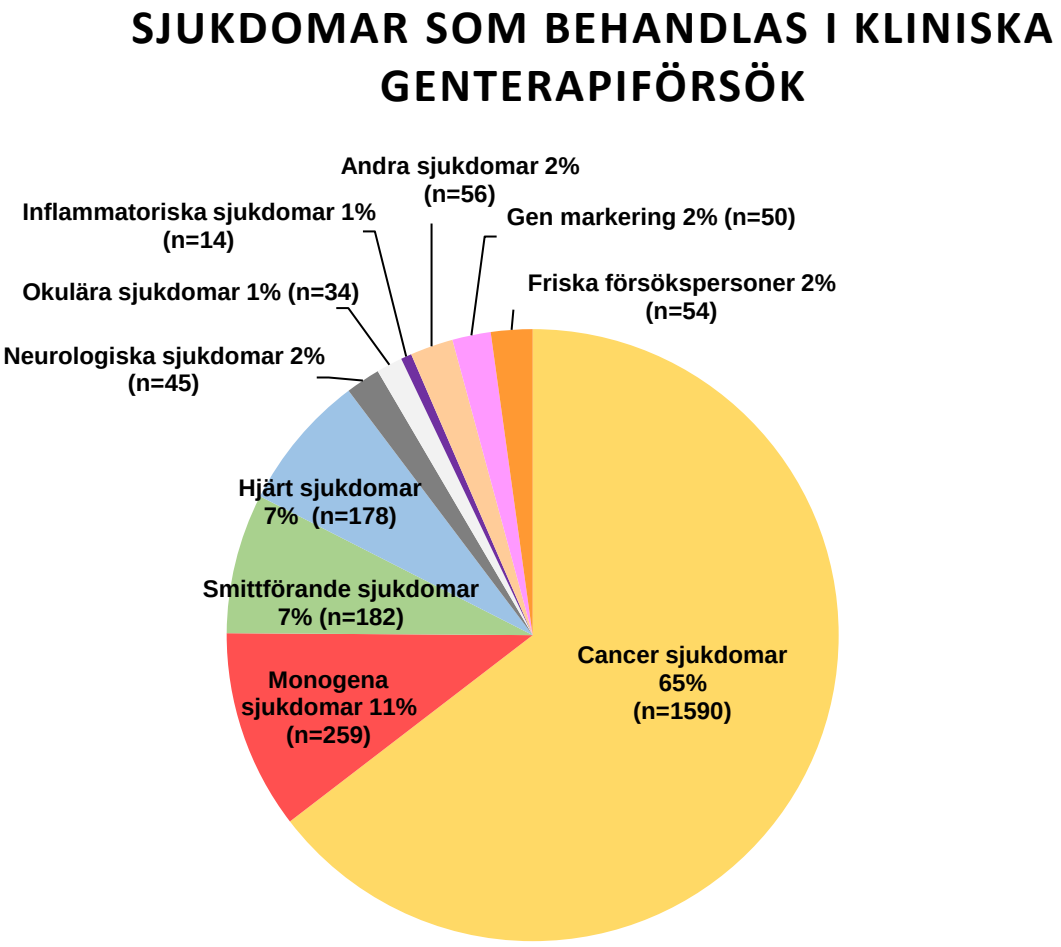
RNA interference är ett exempel på en genmodifieringsteknik som används inom genterapi. I denna teknik introduceras siRNA i cellen i syfte att tysta ned den oönskade genexpressionen. Denna metod är inte permanent utan nedreglerar genaktiviteten under behandlingen (Grimm & Kay 2007). Ett annat exempel på modifieringsteknik är en nyligen upptäckt metod som kallas för CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) och är ett väldigt omtalat ämne i forskarvärlden just nu. Det finns stora förhoppningar för denna metod i framtiden och det har redan påvisats att den har stora fördelar över andra tekniker. Den mest studerade CRISPR metoden är CRISPR/Cas9 (CRISPR assosierad nuclease 9) där nukleaset Cas9 kan utföra gen modifieringen med hjälp av guide RNA. Denna metod är mer permanent men det har inte gjorts tillräcklig forskning för at eventuella biverkningar kan klargöras (Xiao-Jie *et al.* 2015). Det finns många andra tekniker för att ändra det genetiska materialet som kan användas i genterapi.

Av de sjukdomar som undersöks med genterapi är cancer det största användningsområdet (*figur 1*). Andra typer av förvärvade genetiska sjukdomarna som undersöks är neurodegenerativa sjukdomar som Parkinson och Huntington sjukdom. Övriga förvärvade sjukdomar är bland annat hjärtsjukdomar, diabetes och virala infektioner som HIV och hepatit (Blaese M 1997, Husain *et al.* 2015). De vanligaste genetiska sjukdomarna som genomgår kliniska genterapiförsök är till exempel immunsjukdomar som ADA-SCID (Adenosindeaminas-Severe Combined Immune Dificiency) som gör att barn föds utan effektivt immunförsvar och CGD (Chronic Granulomatus Disorder) som leder till att immunförsvaret inte kan kämpa mot bakterie- och svampinfektioner. Hemofili är också en sådan sjukdom. Den orsakar blödningar på grund av att blodet inte kan koagulera. Sjukdomar som inducerar muskeldystrofi, medfödd blindhet och lysosomala lagringssjukdomar kommer förmodligen också att kunna behandlas med genterapi (Penati *et al.* 2017, Williams 2014).

Målcellerna för genterapi kan vara antingen könsceller eller somatiska celler. Könsceller är mer tillgängliga vilket gör att modifiering av dessa är enklare. Dock är genmodifiering i könsceller olagligt i många länder på grund av etiska skäl. Somatisk genterapi kan delas upp i *in vivo* och *ex vivo* metoder. *In vivo* metoder är slutförda i en organisms kropp som en helhet. Eftersom cellerna kan vara svårtillgängliga är det en utmaning att introducera nukleinsyrorna till cellen på ett säkert sätt så att positivt resultat uppnås. Vid *ex vivo* metoder tas cellerna ut ur kroppen för att behandlas och injiceras sedan återigen i patienten. Denna typ metoder är begränsad eftersom den endast kan användas för specifika vävnader såsom benmärg. (Mazarei G 2013)

För att få effektiv introducering av nukleinsyrorna i *in vivo* genterapi så används ofta speciella laborations verktyg i form av vektorer. De introduceringsvektorer som finns delas upp i två kategorier; virala och icke-virala vektorer (Yin *et al.* 2014). Exempel på virus som används som virala vektorer vid kliniska prövningar i människa är adenovirus, adeno-associerad virus (AAV), retrovirus, herpes simplex virus, lentivirus och vacciniavirus (Thomas *et al.* 2003). Icke-virala metoder är de genterapi behandlingar där virus inte används, till exempel injicering av naket DNA eller kemiska och fysikaliska metoder som till exempel lipofektion (Yin *et al.* 2014). Det är svårt att avgöra vilken metod som är säkrast och mest effektiv. I denna artikel diskuteras för- och nackdelar hos några av de mest studerade och använda virala

och icke virala introduceringsmetoderna som används i *in vivo* genterapi. Syftet är att försöka komma fram till vilken metod som är mest fördelaktig.



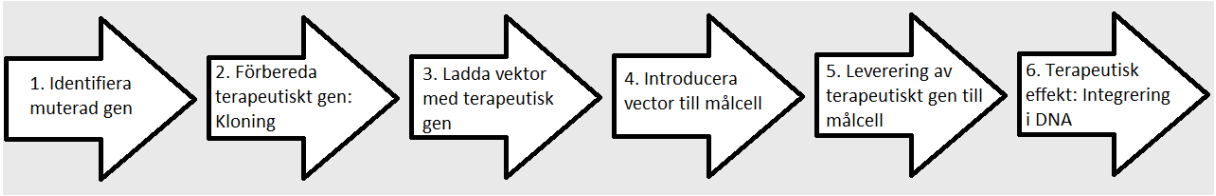
Figur 1. Sjukdomar som behandlas i kliniska genterapiförsök, registrerat i ”The Journal of Gene Medicine” fram tills år 2017. Modifierad från Wiley J *et al*. 2017.

Genterapi – Introducering av exogena nukleinsyror till celler i kroppen

Genterapi är en terapeutisk teknik som skulle kunna användas för att förhindra, dämpa eller bota vissa sjukdomar genom att introducera exogena nukleinsyror till specifika celler. Syftet är att förändra det genetiska materialet och på så sätt åstadkomma produktion av funktionella proteiner alternativt undvika produktion av proteiner som kan orsaka sjukdomar (Flotte 2007).

Nukleinsyror är negativt laddade och relativt stora molekyler. Följaktligen är *in vivo* introducering av dessa en utmaning eftersom de inte kan diffundera över cellmembranet på värdcellen (Yin *et al.* 2014). Därför måste introducering ske genom användning av olika hjälpverktyg, oftast i form av vektorer. Under de senaste 30 åren har en stor mängd virala och icke-virala vektorer konstruerats för att möta de farmakokinetiska utmaningarna som följer introducering av nukleinsyrorna (Merten & Al-Rubeai 2011).

Det flertal olika introduceringsmetoder som finns kan vara lämpliga för olika tekniker och olika sjukdomar. En del metoder är baserade på användning av virala vektorer och övriga metoder är icke-virala. De flesta genterapimetoderna baseras dock på samma nyckel-steg (*figur 2*) som innebär identifikation av den muterade genen som orsakar sjukdomen, följt av kloning av en terapeutiskt gen. Därefter laddas den terapeutiska genen oftast till en vektor som sedan introduceras i kroppen. När vektorn når målcellen levererar den terapeutiska genen till cellkärnan där genen sedan kommer att integreras i värdcellens DNA och eventuellt resultera i förbättring av patientens symptom (Ramamoorth & Narvekar 2015).



Figur 2. Visar de nyckel steg som finns i genterapeutisk behandling.

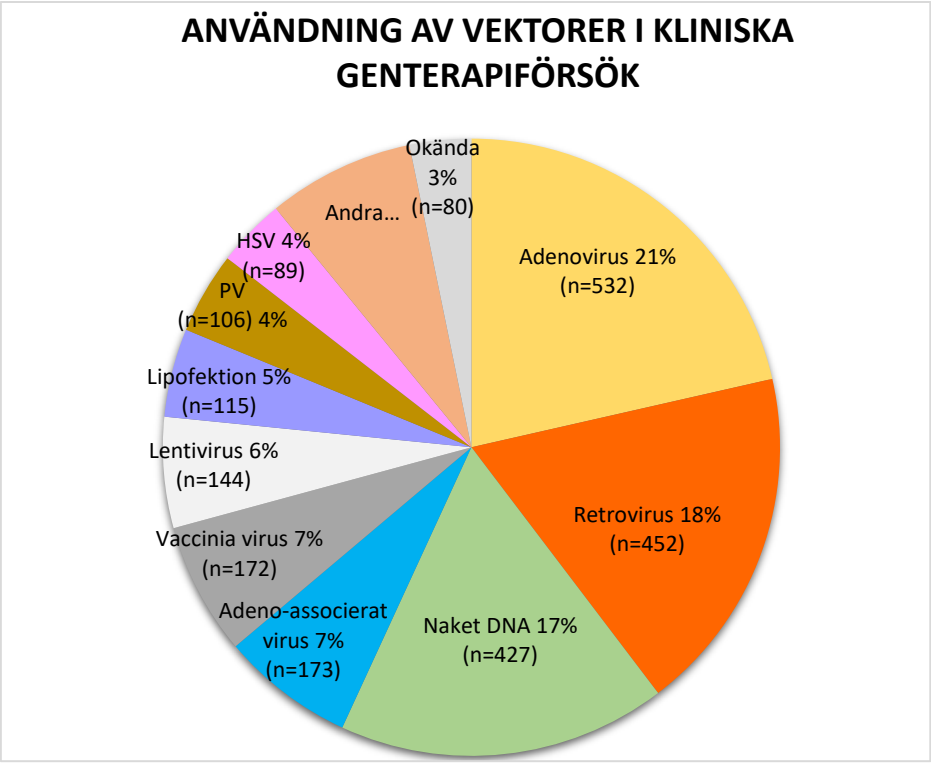
Genterapins historia

Begreppet genterapi myntades ganska många år innan det blev en erkänd eventuell terapeutisk metod för behandling av människliga sjukdomar. Det var tidigt på 1970-talet som studier gjordes där det hävdades att genterapi skulle kunna användas i människor för att förbättra och även bota vissa genetiska sjukdomar i framtiden. De hänvisade till en studie som hade gjorts år 1970 av forskaren Stanfield Roger som föreslog att muterat DNA kunde ersättas med vild typ DNA hos individer med genetiska sjukdomar för att förbättra tillståndet. De motiverade vidare forskning och utveckling av tekniker för genterapi, men de var emot försök på människor på grund av okända biverkningar och andra faktorer. De ville se till att genterapi tekniker inte skulle missbrukas och endast användas i fall där fördelar med behandlingen kunde bevisas (Friedmann & Roblin 1972).

Första försöket till att modifiera mänskligt DNA utfördes 1980 men den första framgångsrika genöverföringen i människor utfördes inte förrän år 1989. Utveckling av första retrovirala vektorn, som är ett välanvänt laborations verktyg, ägde rum på mitten av 1980 talet (Flotte 2007). Efter flera år av forskning och försök på djur påbörjade de första godkända kliniska genterapiförsöken i människan. Första patienten led av svår immunförsvarsbrist (ADA-SCID). I försöket använde de sig av en retroviral vektor för att transportera adenosindeaminas (ADA) genen i T-celler för att få funktionellt adenosindeaminas enzym. Detta och flera identiska försök påvisade att genterapi skulle kunna vara en säker och effektiv behandling för patienter med immunförsvarssjukdomar (Blaese RM *et al.* 1995).

Några dödsolyckor inträffade i tidiga försök som gjorde att genterapi behandlingar fick dåligt rykte. Första dödsfallet ägde rum år 1999 då patienten dog på grund av vektor associerad toxicitet. Sedan dessa försök har mycket förändrats i forskarvärlden angående genterapi (Flotte 2007). Efter att forskning påbörjade har över 2000 kliniska studier utförts i hela världen med fokus på olika sjukdomar och olika tekniker (Xiao-Jie *et al.* 2015). Nutida och framtida framgångar av genterapi grundas på kännedom av biologin bakom genterapin och förståelse för introduceringen av exogena nukleinsyror till kroppen, såsom vektorbiologi och farmakologi. Fram tills nu har flertal olika vektorer använts i olika kliniska genterapiundersökningar (*figur 3*). De introduceringsmetoder som tas upp i denna rapport, lentivirus, adeno-associerad virus och lipofektion, är nyare och skulle kunna ha bredare

användbarhet än de äldsta och mest använda metoderna, adenovirus, retrovirus och naket DNA.



Figur 3. Visar fördelningen av användning av vektorer i genterapi i världen, registrerat i ”The Journal of Gene Medicine” fram tills år 2017. HSV står för herpes simplex virus och PV står för poxvirus. Modifierad från Wiley J *et al*. 2017.

Virala vektorer – Transduktion

Virus kan förekomma i flera olika former och strukturer. Det genetiska materialet i virus är i form av nukleinsyra som kan antingen vara dubbel eller enkelsträngat DNA eller RNA som är cirkulärt eller linjärt strukturerat. Det genetiska materialet är bevarat inuti ett antal identiska proteinstrukturer som kallas för kapsomer och dessa bildar skyddande skal som kallas kapsid. Kapsomerna bildas inuti värdcellerna efter att viruset har injicerat den kodande nukleinsyran till värdcellen. Vissa virus har dubbla lipidskikt runt kapsiden, uppbyggd av lipider från värdcellens cellmembran, och kallas för hölje (MacLachlan & Dubovi 2017).

Virus kan delas upp i två kategorier; höljevirus som har detta lipidlager och nakna virus som sakna hölje. Virala glykoproteiner på höljet förmedlar bindning till receptorer på värdcellen. Ett exempel på höljevirus är retrovirus, lentivirus och herpes simplex virus. Hos de virus som saknar hölje sker bindningen genom andra kapsidproteiner. Dessa är oftast mer stabila och kan överleva längre och exempel på dessa är Adenovirus och Adeno-associerat virus. Kapsid och höljet avgör vilken metod viruset använder för att ta sig in och ut ur värdcellen (Doi & Takeuchi 2015).

Virus är helt beroende av andra organismer när det gäller reproduktion. Det kan bestridas om virus är en organism. Den virala ”livscykeln” kan delas upp i infektion och replikation. Under infektion binder viruset till receptorer på värdcellen. Viruset injicerar sedan sitt genom i värdcellen som leder till tidig genexpression på grund av förekomsten av reglerande

virusprodukter. Därefter sker expression av strukturella gener och sammansättning av nya viruspartiklar uppträder (MacLachlan & Dubovi 2017).

Som tidigare nämnts är nukleinsyror stora, laddade molekyler som inte kan diffundera över cellmembranet. Följaktligen kan det bli en utmaning att få effektiv genterapibehandling. En av de lösningar som forskare kommit fram till angående dessa utmaningar är att utnyttja virus som ett introduceringsverktyg i form av vektorer. Under de senaste åren har intensiva ansträngningar utförts och forskararbete har fokuserats på att förstå den molekylära grunden för hur virus och virala vektorer interagerar med värden (Merten & Al-Rubeai 2011).

Till att börja med ansågs virusvektorer vara de optimerade ”fordonen” som behövdes för introducering av främmande nukleinsyror till cellen. Men eftersom vektorerna är utvecklade från patogener, som i många fall orsakar sjukdomar, så kan människokroppen naturligt ha utvecklat ett försvar mot dessa (Merten & Al-Rubeai 2011). Vid användning av alla typer av vektorer finns alltid utmaningen att försöka undvika immunrespons. Detta problem gäller särskilt vid användning av virala vektorer. Vid igenkänning av virala antigener sätts det medfödda immunförsvaret igång. Därefter kommer det adaptiva immunförsvaret att eliminera viruset genom immunrespons samt att sätta antigenen, som är specifik för vektorn, i minnet. Därför är det svårt att återanvända en vektor som redan framkallat immunrespons. Fördelen med att använda virala vektorer vid genterapi är att de ger en effektiv behandling på grund av att vektorerna naturligt kan inkorporera den främmande nuklein syran i värdcellen (Thomas *et al.* 2003).

Virusvektorer som används vid genterapi innehåller virala partiklar med ett modifierat genom som inkluderar en specifik terapeutisk gen som används vid en viss behandling. Denna typ av teknik kallas för transduktion och innebär att infektionen inducerar en funktionell gen, som uttrycks från virala vektorn, in i målcellen. De fem mest använda vektorerna som används i genterapi kan också klassificeras i två grupper beroende på om deras genom integreras in i värdens cellulära kromatin; Retrovirus och Lentivirus, eller om det kvarstår i cellkärnan som extrakromosomala episomer; Herpes simplex virus, Adenovirus och Adeno-associerat virus. Denna klassificering är viktig för att bestämma vilken vektor som är lämplig för vilken applikation (Merten & Al-Rubeai 2011).

De flesta kliniska genterapiförsöken som har gjorts använder sig av adenovirus och retrovirus vektorer, eftersom de är bland de vektorer som upptäcktes först. Omfattande studier och forskning har gjorts i syfte att utveckla säkrare och mer effektiva metoder för genterapi. Bland de vektorer som har fått mer uppmärksamhet de senaste åren är lentivirusvektorer samt adeno-associerade virusvektorer (Merten & Al-Rubeai 2011). Nedan presenteras tidigare nämnda virusvektorer med större tonvikt på lentivirus och adeno-associerade vektorer.

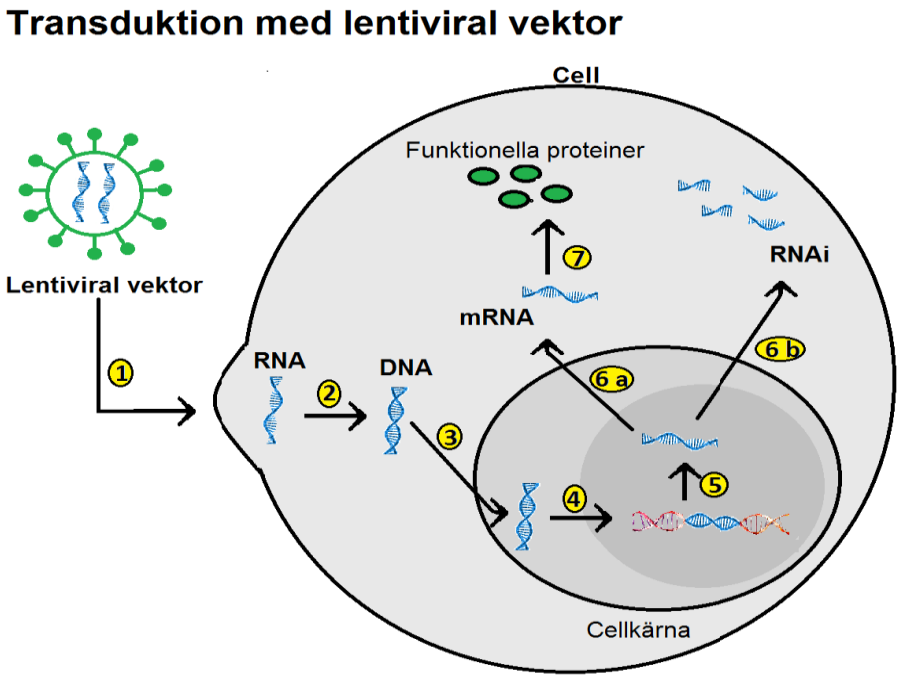
Höljevirus med fokus på lentivirus

De virala vektorer som har använts och är gjorda av virus med hölje är från retrovirus, lentivirus och herpes simplex virus. Den första virala vektorn som utvecklades var en retroviral vektor och sedan dess har den använts ofta i kliniska försök. De kan delas upp i simpla onkogena och komplexa retrovirus. Det genetiska materialet i retrovirus är enkelsträngat RNA och retrovirala vektorer används ofta för att inducera proteinproduktion. Enkla retrovirus kan endast transducera celler som är i delningsstadiet, eftersom cellkärnan endast är tillgänglig om kärnmembranet bryts ned. Därför har retrovirala vektorer vissa begränsningar när de används i genterapi (Doi & Takeuchi 2015). Herpes simplex virus är mest känt för att orsaka munsår (HSV-1). Det genetiska materialet i Herpes simplex virus är

dubbelsträngat DNA. Herpes simplex virusvektorer har förmåga att vara latenta mellan återkommande infektioner. Stora förhoppningar ligger på denna typ av vektorer. Dock har denna typ ganska hög potential för att framkalla immunsvar hos värden. Mer forskning måste göras innan vidare användning i kliniska genterapi prövningar (Ji *et al.* 2015, Merten & Al-Rubeai 2011). Lentivirus är en typ av komplexa retrovirus, och liksom hos simpla retrovirus, är det genetiska materialet enkelsträngat RNA. Det mest kända lentiviruset är HIV typ 1 (Human immuno deficiency virus). Lentivirus har förmågan att ta sig igenom värdcellens kärnmembran och kan därför infektera både celler i delningsstadie och icke delande celler (Naldini *et al.* 1996). Detta ger större möjligheter inom genterapin och är därför intressant att gå in djupare på lentivirus och dess användning i genterapi.

Lentivirus är det näst mest studerade höljeviruset i genterapi efter simpla retrovirus, de omfattar dock ett relativt nytt område i genetisk forskning. År 1996 blev lentivirus först avslöjat som ett verktyg inom genetiken. I första publikationen verifierades det att lentivirus, mer specifikt HIV, kunde användas som vektor i genterapi där det bevisades att det kunde transducera neuroner *in vivo* (Naldini *et al.* 1996). Kliniska försök med lentivirus vektorer blev tillåtna år 2002 och sen dess har mycket hänt i forskningsvärlden (D'Costa *et al.* 2009).

Genom att utnyttja lentivirusets infekteringsmekanism (*figur 4*) kan ett önskat resultat i genterapi uppnås. Som tidigare nämnts har lentivirus ett hölje där glykoproteiner produceras som förmedlar bindning till värdcellens membran. Lentivirus innehåller enkelsträngat RNA och revers transskriptas som utför transkription av virusets genetiska material när den inträder i värdcellen. Det genetiska materialet kodar för olika enzymer beroende på dess domän, som till exempel hölje och virusets yta, kapsid och andra strukturella delar samt enzymer såsom transskriptas (Brenner & Malech 2003).



Figur 4. Schematisk bild av mekanismen för transduktion med lentiviral vektor: 1) Infektion. 2) Revers transkription. 3) DNAt tar sig in i cellkärnan 4) Integrering i värdcellens DNA. 5) RNA expression. 6a-7) mRNA translaterar funktionella proteiner. 6b) Alternativt; nedreglering av gener.

Lentivirus, samt andra typer av retrovirus, har tre utmärkta egenskaper som gör de till önskvärda vektorer för genterapi. För det första har de förmågan att integrera sitt genetiska material i kromosomerna i målcellen, som kan vara en förutsättning för ett långvarigt uttryck.

De har också relativt stor kapacitet som tillåter introducering av de flesta komplementära DNA (cDNA) som används i genterapi, eller nära 10 kilobaspar. Slutligen finns det minde risk för immunförsvar hos värden, eftersom viruset inte inducerar sekvenser som kodar för proteiner härledda från själva viruset. Detta resulterar i mindre sannolikhet för att de blir igenkända och attackerade av immunförsvarets cytotoxiska T-lymfocyter eller mördarceller som är specifika för virus (Qasim *et al.* 2007).

Lentivirus kan användas för mycket effektiv genterapi eftersom den kan ändra genuttrycket i målcellen långvarigt. Till skillnad från tidigare metoder så kan lentivirus vektorer användas för icke-delande och terminalt differentierade celler, det vill säga celler som inte kan genomgå mitos och därför inte har förmåga att dela på sig (Naldini *et al.* 1996). Exempel på celler där lentivirus vektorer har använts för i genterapi prövningar är nervceller, fotoreceptorer i näthinnan, muskel- och leverceller och hematopoietiska stamceller som ger upphov till blodkroppar och makrofager (Zhou & Buchholz 2013).

HIV vektorn har visat sig vara väldigt effektiv i genterapi på grund av att den har förmågan att infektera T-hjälparceller och andra makrofager i människan. På vektorns yta finns ett hölje protein som kallas för Env. Detta protein förmedlar bindningen till målcellen. Env på HIV-1 känner igen en molekyl på makrofager och T-hjälparceller som kallas för CD4. Hos HIV-1 och andra retrovirus finns det möjligheten att ersätta höljeproteiner med ett annat virus protein i syfte att bredda cellspektrumet för målceller. Denna metod kallas för pseudotypning och ger mycket bättre användbarhet för lentivirala vektorer (Russell & Cosset 1999). Vid framställning av lentivirala vektorer är de ofta genererade av tre till fyra olika plasmider för att undvika de ursprungliga patogeneffekterna som viruset annars har (Mátrai *et al.* 2010).

Många olika sjukdomar skulle kunna behandlas med lentivirus eftersom de kan ha flera olika typer av målceller. Exempel på sjukdomar som har forskats på med lentivirala vektorer är diabetes, olika typer av cancer, hemofili och Parkinson. Den sist nämnda är en långvarig sjukdom i centrala nervsystemet som påverkar rörelseförmågan. Parkinsons behandlas ofta med dopamin. En av många applikationer hos lentivirala vektorer är en experimentell medicin, ProSavin. Dess verkan är att inducera produktionen av dopamin i Parkinson patienter. Kliniska prövningar på ProSavin har visat signifikant förbättring av sjukdomens symptom samt inga oönskade biverkningar (Palfi *et al.* 2014). Lentivektorer, särskilt de som är härledda från HIV-1, har uppvisat många önskvärda egenskaper som syftar på att öka både vektorns användbarhet och säkerhet i genterapi. Därför anses lentivirus vektorer vara ett av de mest användbara och lovande verktygen för forskning, diagnos och terapi inom genetik.

Nakna virus med fokus på Adeno-associerad virus vektor

Som tidigare nämnts är de nakna virus oftast mer stabila och kan orsaka infektion under en längre tid. De mest förekommande virala vektorer som saknar hölje är gjorda av adenovirus och adeno-associerad virus. Adenovirus har genetiskt material som består av dubbelsträngat DNA som inte integreras i arvsmassan och inte replikeras under celldelning. Adenovirus var den första vektorn som orsakade dödsfall, på grund av vektor associerad toxicitet. Adenovirus har hög kapacitet att trigga immunsvaret hos värden eftersom de ofta kommer i kontakt med människan. Därför kan redan existerande immunsvar, det vill säga antikroppar, avstanna infektionen innan de nått målcellen. Följaktligen är det enklare för inflammation att uppkomma. Dessa vektorer kan användas för genterapi prövningar och vaccinering, men hög risk för immunsvar och begränsande faktorer, såsom begränsad variation i målceller, gör att de är svårare att använda. Adenovirus är den mest studerade vektorn. Dock anses den inte vara det alternativet som är lättast att använda i genterapi (Wold & Toth 2013). Däremot

verkar adeno-associerad virus vektor eller AAV-vektor vara ett mer använt alternativ för introducering av genterapi än vad adenovirus vektorn är.

AAV är ett litet virus utan hölje med enkel strängat linjärt DNA som genetiskt material. AAV kan infektera människan men inducerar ingen känd sjukdom och därför har den väldigt låg risk för att orsaka immunrespons. AAV måste ha ett medhjälpar-virus för att kunna infektera en värd, oftast adenovirus eller herpesvirus. I frånvaro av medhjälpar-viruset kan AAV lagras genom att integreras i en specifik kromosom. Detta gör den till det enda däggdjursvirus som kan integreras på specifika platser i genomet (Daya & Berns 2008).

Till skillnad från adenoviruset så kan AAV infektera både celler i delningsstadier och celler som inte delar på sig och kan även inkorporeras i värdcellens genom. De används ofta som introduceringsverktyg i genterapi på grund av dess effektivitet och säkerhet (Xiao-Jie *et al.* 2015). Detta innebär att AAV-vektorer skulle kunna vara en av den mest lämpliga virala vektorerna för *in vivo* leverering i genterapi eftersom den är stabil, ger långvarande expression och inte framkallar starkt immunrespons hos värden (Münch *et al.* 2013).

En studie utfördes med en AAV-vektor som introducerings system för *in vivo* genterapi med CRISPR-Cas9. Syftet med studien var att undersöka för- och nackdelar med tekniken. CRISPR-Cas9 är en genmodifieringsteknik som används för att endonukleaset Cas9 ska klyva värdcellens DNA med hjälp av guide RNA i syfte att ändra cellens genetiska material. Denna teknik kräver mycket specifikt introducerings system och därför är AAV-vektorer det optimala valet av vektor. I detta och andra kliniska försök har det påvisats att AAV-vektorer är säkra och ger effektivt resultat i användning hos människan och har därför blivit tillåtna vid kliniska genterapi prövningar (Dai *et al.* 2016).

Trots att AAV-vektorer har påvisats vara fördelaktiga har de också begränsningar som minskar deras användbarhet. AAV vektorer kan introducera ganska låg kapacitet av exogena nukleinsyror, endast runt 4,7 kilobaspar (Dai *et al.* 2016). Några AAV-vektor tekniker har blivit utvecklade i syfte att antingen öka genkapaciteten eller förbättra genuttrycket, såsom trans-splicing AAV som tillåter genleverering av gener som är 9 kilobaspar eller mindre. Med mer forskning kring AAV vektorn skulle den kunna bli utvecklad med både större kapacitet och möjlighet till bredare målgrupp av celler (Yan *et al.* 2000). Såsom lentivirus skulle AAV vektorn kunna bli en av de mest användbara introducerings verktygen i genterapi genom vidare forskning.

Icke-virala vektorer – Transfektion

Som tidigare nämnts har forskare utvecklat både virala och icke-virala vektorer som används som levereringssystem vid kliniska försök. Introducering av exogena nukleinsyror med icke-virala vektorer kallas ofta för transfektion. Endocytos är en faktor som möjliggör denna typ av introducering. Det specifika upptaget av stora exogena molekyler kallas för receptor-medierad endocytos eller klathrin-medierad endocytos. Denna typ av endocytos innebär att receptorerna är associerade med cytosoliska proteinet klathrin som startar bildningen av endocytosiska vesiklar genom att bilda kristalliskt skikt på cellmembranets insida (McMahon & Boucrot 2011). Denna mekanism kan utnyttjas för att, med hjälp av icke-virala vektorer, få större partiklar in i cellen, såsom terapeutisk gen i genterapi.

Syftet med icke virala vektorer är att undgå de begränsningar som virala vektorer har, särskilt när det gäller säkerhet angående biverkningar och immunrespons. Med de icke-virala vektorerna förekommer inte människans förexisterande immunsvar och finns därför inte i immunförsvarets minne mot virala vektorer. De icke-virala vektorerna kan också vara lättare

att syntetisera och de kan också ge möjligheten för introducering av större nukleinsyror än de virala vektorerna. Dock har vissa av de icke-virala vektorerna lägre transfektion effektivitet jämfört med virala vektorer (Yin *et al.* 2014).

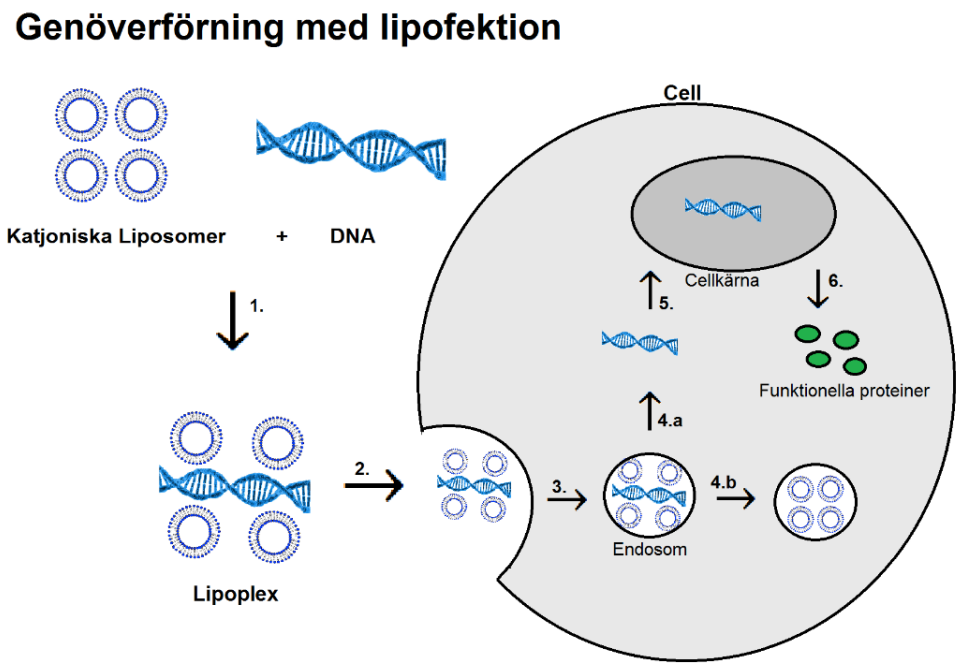
Teorin bakom användningen av icke-virala vektorer tycks vara ganska enkel men kan uppvisa svårigheter i praktiken. Största utmaningen för de flesta syntetiska vektorer är att överstiga alla de barriärer som förekommer innan nukleinsyran når sitt mål, samt att få effektiv icke-viral introducering i *in vivo* metoder i genterapi. Ett idealiskt genleveranssystem för att få en effektiv behandling måste kunna skydda DNAt under transport, det vill säga undvika nedbrytning, vara biokompatibelt, icke-immunogen, stabil i blodomloppet, tillräckligt små och cell- och vävnadsspecifik. De icke-virala vektorerna har många egenskaper som gör de till ett idealiskt genleveranssystem, men de måste även kringgå immunförsvaret precis som virala vektorer, även fast de icke-virala vektorerna har låg potential för immunrespons och toxicitet (Villate-Beitia *et al.* 2017).

Icke-virala metoder kan delas upp i fysikaliska och kemiska metoder. Exempel på fysikaliska icke-virala metoder är elektroporering, mikroinjektion och sonikering men dessa är inte optimala för *in vivo* genterapi. De kemiska metoderna kan vara alltifrån injektion av naket DNA upp till introducering av kemiska partiklar i komplex med terapeutiska DNAt, såsom lipofektion eller liposom transfektion. Injektion av naket DNA är svår i användning i in vivo genterapi på grund av att DNAt kan brytas ned innan det når målcellen. För en effektiv genterapi behandling genom injektion av naket DNA i till exempel en muskel skulle det krävas orimligt många injektioner. Denna metod är mer lämplig vid forskning på cellkulturer (Ramamoorth & Narvekar 2015). Det finns ett flertal olika kemikaliska icke-virala vektorer som kan vara baserade på olika tekniker som till exempel nanoteknik.

Under de senaste åren har nanoteknik baserad på icke-virala vektorer vunnit intresse inom forskarvärlden. Studier har visat att de är ett lovande verktyg för introducering av terapeutiska gener i centrala nervsystemet, samt andra vävnader, på ett säkert och kontrollerat sätt. Exempel på icke-virala vektorer som har använts i forskningen är magnetoplexer, lipoplexer och polyplexer (Saul *et al.* 2007,Villate-Beitia *et al.* 2017)

Lipoplexer är en av de mest lovande icke-virala metodena. Dessa består av katjon liposomer som har bildat ett stabilt komplex med polyanjoniskt DNA. Lipoplexer är mycket säkra verktyg i genterapin men de är inte så effektiva jämfört med de virala metoderna. Mekanismen för som lipoplexerna genomgår kallas för lipofektion (*figur 5*). Lipofektion, som många andra transfektionsmetoder, använder sig utav cellens endocytosiska vägar för att introducera den terapeutiska genen till cellkärnan (Caracciolo & Amenitsch 2012).

De flesta katjon-liposomer som används vid genöverföring får mycket minskad effektivitet vid närvaro av serum, en komponent i blodet. Detta gör att värdcellen inte tar upp lika mycket av den terapeutiska genen vilket resulterar i lägre transfektionseffektivitet. I en studie som gjordes visade det sig att när lipofektion utfördes i närvaro av serum blev endosomer, med lipoplexer inuti, betydligt mindre än i frånvaro av serum. Endosomerna blev också hetrogena i storlek och struktur i fånvaro av serum. Vid analysering av endosomernas storleksdistribution visade det sig att lipoplexer i frånvaro av serum hade en tendens att aggregera medans aggregationen blev hämmad i närvaro av serum. För att kringgå detta problem formade de stora partiklar som gav högre lipofektionseffektivitet i både från- och närvaro av serum (Escriou *et al.* 1998). Genom att kringgå de hinder som förekommer vid användning av icke-virala introducerings vektorer skulle dessa kunna vara optimala för introducering av terapeutiska gener i genterapi.



Figur 5. Mekanismen för genterapimetoden lipofektion i 6 steg: 1. bildning av lipoplex 2.-3. Endocytos 4.b. Nedbrytning av liposomer 4.a Frisättning av terapeutiska genen från endosomen 5. Terapeutiska genen tar sig in i cellkärnan 6. Translation av funktionella proteiner. Modifierat från Srinivas *et al* 2009.

Diskussion

I dagsläget finns det ett flertal ärftliga och förvärvade genetiska sjukdomar som är ett stort och ökande problem. Orsakerna till denna ökning är inte helt kända men det kan troligen vara en blandning av mutationer som sedan ärvs och miljöfaktorer som påverkar människan på ett dåligt sätt. Både de ärftliga och de förvärvade genetiska sjukdomarna beror på ändringar i det genetiska materialet, det vill säga mutationer. Förut behandlades dessa sjukdomar endast på farmakologiskt eller kirurgiskt sätt men nuförtiden har forskare kommit så långt att de kan ändra människans genetiska material. Bakom human genterapi ligger komplex biologi. För att människan ska kunna använda genterapin på ett lämpligt sätt i framtiden måste många av de olika genterapiteknikerna som finns utvecklas vidare samt att förståelsen för de olika sjukdomarna som kan behandlas med genterapi måste öka.

Som de flesta andra behandlingar förekommer genterapi inte utan hinder och biverkningar. Trots att tanken med genterapi är att ersätta högriskoperationer och läkemedelsbehandlingar med en säkrare behandling så är genterapi inte riskfri. Svåra biverkningar har uppkommit som kan härledas till både genförändringsteknikerna och introduceringsvektorerna. Immunförsvaret är också en faktor som ger en ökad utmaning vid genterapi eftersom immunrespons kan induceras vid introducering av genterapibehandlingen (Dai *et al.* 2016, Merten & Al-Rubeai 2011, Yin *et al.* 2014). Dessutom är området relativt nytt och därför är inte alla biverkningar kända. Forskning med fokus på introduceringsmetoderna är väldigt viktig eftersom introducering av nukleinsyran är en av de största utmaningarna i in vivo genterapi.

Genterapi i samhället

Etiska frågeställningar diskuterades långt innan de första humana kliniska genterapiförsöken ägde rum. Genterapi går ut på att ändra genetiskt material och kan därför ha oväntade konsekvenser om inte tillräcklig kunskap och forskning om metoderna finns. Om dessa tekniker inte hanteras med försiktighet kan de ge negativa konsekvenser. Hittills har inga genterapibehandlingar blivit tillåtna utan endast kliniska genterapiförsök. Innan en genterapimetod skulle kunna accepteras som en terapeutisk behandling måste kliniska prövningar göras på både djur och människor för att bestämma om den eventuella behandlingen är säker och framgångsrik, samt för att ta ställning till vilken levereringsmetod som är lämplig att använda. De flesta kliniska prövningarna når inte så långt att de prövas på människor. En vanlig fråga inom genterapi är vilka sjukdomar som ska behandlas och vad som räknas som en sjukdom. Vilka som ska bestämma över detta är svårt att fastställa och det kan vara svårt att dra gränsen för vilka sjukdomar som räknas som berättigade till genterapibehandling. De sjukdomar som har forskats mest på angående bakgrund och möjlighet till genterapi är de sjukdomar som förekommer mest och som det inte har funnits någon lämplig behandling för. Exempel på dessa är ärftliga sjukdomar som autoimmuna sjukdomar, samt förvärvade genetiska sjukdomar som cancer och HIV.

De genterapibehandlingar som är tillåtna för kliniska försök är endast i somatiska celler med genen som orsakar sjukdomen. Genterapi i könsceller är ärftlig och därför kommer nästa generationer att få den nya genetiska informationen. Därmed kommer den genetiska sjukdomen som har blivit behandlad inte ärvas. Dock är inte alla genetiska sjukdomar ärftliga utan endast de som har mutationer i könscellerna. Av etiska skäl är genterapi i könsceller förbjudet i de flesta länderna, eftersom man inte har rätt att bestämma över de kommande generationernas egenskaper, även fast det är tillåtet att bestämma behandlingar för ens egna barn.

Eftersom genterapi är ett relativt nytt område är det svårt att veta om eventuella biverkningar som kan uppträda senare i livet. Fortsatt forskning inom området är därför nödvändig för säkrare och effektivare behandlingar. Med upptäckten av CRISPR/Cas9 har forskare kommit på god väg att lösa multipla problem som har påvisats inom genterapin, till exempel biverkningar som oönskade mutationer och inkorrekt proteinuttryck som kan ha skadliga effekter (Xiao-Jie *et al.* 2015). Framtiden för genterapi har diskuterats mycket i samhället. Det kan finnas risk för att myndigheter kommer att tillåta genterapi i andra syften än att bota sjukdomar samt att gränsen för vad som är en sjukdom kan förändras. De tekniker som används i genterapi möjliggör val av fördelaktiga fenotyper över andra. Strikta regler måste gälla angående genterapi för att undvika etiska dilemman.

Virala vektorer

Det är inte bara genmoduleringsmetoderna som kan ha oönskade konsekvenser utan också vissa av introduceringsmetoderna som har tagits upp tidigare. Immunförsvarets huvuduppgifter är att kämpa mot virala och bakteriella infektioner. Detta gör att immunförsvaret arbetar emot terapeutiska behandlingar där till exempel virus och bakterier används. Vid utveckling av genterapitekniker och tillverkning av nya vektorer för specifika sjukdomar måste immunresponsen som eventuellt kan uppkomma tas hänsyn till. Ett stort forskningsfokus ligger på utvecklingen av vektorer som inte framkallar immunsvar. Ett alternativ skulle kunna vara manipulering av kroppens immunförsvar i syfte att inducera tolerans för vektorn. För att tillämpa vektorer till de applikationer som behövs skulle de tekniker som finns idag kunna användas för att konstruera vektorer för att eventuellt få

effektivare och säkrare behandling. Som ett exempel skulle adeno-associerad virusvektor kunna konstrueras för större kapacitet (Xiao-Jie *et al.* 2015). Det kan diskuteras om möjligheten att bota sjukdomen genom kliniska genterapiförsök kan överväga eventuella biverkningar.

Icke-virala vektorer

Det finns många lovande icke-virala introduceringsverktyg i genterapin. Med icke-virala metoder har forskare lyckats undvika risken för immunrespons och svåra biverkningar, såsom toxicitet. Dessa är mycket säkrare vid användning i genterapi. Dock finns det nackdelar vid användning av icke-virala vektorer. Transfektionseffektiviteten är lägre jämfört med de virala vektorerna. Detta innebär att behandling med icke-virala vektorer ger lägre effekt än vad användning av virala vektorer gör. Detta beror på kunskapsbrist om interaktionerna mellan ett komplex och cellulära komponenter. Dessutom kan strukturen hos lipoplexer förändras när den interagerar med cellulära membran och det påverkar transfektionseffektiviteten. För att nå effektivare icke-virala lipidvektorer har forskning på korrelationen mellan strukturen och aktiviteten hos lipoplexer gjorts. I framtiden kommer icke-virala vektorer eventuellt att bli lika effektiva som virala vektorer, men säkrare (Caracciolo & Amenitsch 2012).

Slutsats - Virala vs. Icke-virala vektorer

Både virala och icke-virala metoder i genterapi har fördelar och nackdelar. Virala vektorer ger bra transduktionseffekt medans icke-virala vektorer ger sämre transfektionseffekt. Virala vektorer har sämre genkapacitet än icke-virala vektorer. Virala vektorer har större risk för att framkalla immunsvar hos värden samt större risk för biverkningar såsom toxicitet. Icke-virala vektorer har större risk att bli nedbrutna. Många av dessa problem som följer användning av dessa kan lösas genom modifiering av vektorn. Det är därför svårt att avgöra vilken metod som är bäst utan man måste sätta introduceringsmetoden i förhållande till den genmoduleringsteknik som ska användas samt till den sjukdom som ska behandlas. En fråga som måste tas i åtanke är om sjukdomen verkligen kan botas trots alla de oönskade biverkningar som kan uppstå. Denna frågeställning togs upp redan i början av genterapiforskning när Friedman och Roblin (1972) ville säkerställa att genterapi inte skulle missbrukas och endast användas i fall där fördelar med behandlingen kunde bevisas. Fortsätt forskning är grunden till förbättrade behandlingar för de olika sjukdomar som ganska stor procent av jordens befolkning drabbas av. Kännedom bakom sjukdomarna och behandlingsteknikerna ger oss fördel i kampen mot det som för i tiden ansågs vara obotligt. Med förbättrade introducerings system, både virala och icke-virala, kan genterapi eventuellt bli lika vanligt alternativ som läkemedelsbehandling. Vidare forskning på alla de olika metoderna i genterapi återstår. Möjligtvis kommer kanske nya terapeutiska metoder uppfinnas i framtiden.

Tack

Jag vill tacka mina klasskamrater Alice Simu och Erik Sjöberg för förslag på förbättringar av arbetet genom muntliga diskussioner samt skriftliga synpunkter under skrivandet. Jag vill också tacka Helena Malmström för en bra handledning under arbetets gång. Samt Kristina Olsson hos språkverkstaden för hjälp med det svenska språket.

Referenser

Blaese M. 1997. Gene Therapy for Inherited and Acquired Immunodeficiency Diseases 1. Pediatric Research 41: 727–727.

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. 1995. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA− SCID: Initial Trial Results After 4 Years. Science 270: 475–480.

Brenner, Malech HL. 2003. Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1640: 1–24.

Caracciolo, Amenitsch H. 2012. Cationic liposome/DNA complexes: from structure to interactions with cellular membranes. European Biophysics Journal 41: 815–829.

Dai, Zhu L-Y, Yan Z-Y, Xu Y, Wang Q-L, Lu X-J. 2016. CRISPR-Cas9 for in vivo Gene Therapy: Promise and Hurdles. Molecular Therapy Nucleic Acids 5: e349.

Daya, Berns KI. 2008. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. Clinical Microbiology Reviews 21: 583–593.

D'Costa, Mansfield SG, Humeau LM. 2009. Lentiviral vectors in clinical trials: Current status. Current Opinion in Molecular Therapeutics 11: 554–564.

Doi, Takeuchi Y. 2015. Gene therapy using retrovirus vectors: vector development and biosafety at clinical trials. Uirusu 65: 27–36.

Escriou, Ciolina C, Lacroix F, Byk G, Scherman D, Wils P. 1998. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1368: 276–288.

Flotte. 2007. Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the-art. Journal of Cellular Physiology 213: 301–305.

Friedmann, Roblin R. 1972. Gene therapy for human genetic disease? Science (New York, NY) 175: 949–955.

Grimm, Kay MA. 2007. RNAi and gene therapy: a mutual attraction. Hematology American Society of Hematology Education Program 473–481.

Husain, Han J, Au P, Shannon K, Puri RK. 2015. Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. Cancer Gene Therapy 22: 554–563.

Ji, Weng D, Liu C, Gu Z, Chen S, Guo Y, Fan Z, Wang X, Chen J, Zhao Y, Zhou J, Wang J, Ma D, Li N. 2015. Adenovirus-mediated delivery of herpes simplex virus thymidine kinase administration improves outcome of recurrent high-grade glioma. Oncotarget 7: 4369–4378.

Lodish, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. Mutations: Types and Causes.

MacLachlan, Dubovi EJ (red). 2017. Chapter 2 - Virus Replication. Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition), s. 17–45. Academic Press, Boston.

Mazareei G, 2013. in vivo, in vitro, ex vivo. WWW-dokument 2013-11-09: http://www.askmedicalresearchers.com/in-vivo-in-vitro-ex-vivo/. Hämtad 2017-04-25.

Mátrai, Chuah MKL, VandenDriessche T. 2010. Recent advances in lentiviral vector development and applications. Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy 18: 477–490.

McMahon, Boucrot E. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 12: 517–533.

Merten, Al-Rubeai M (red). 2011. Viral Vectors for Gene Therapy. doi 10.1007/978-1-61779-095-9.

Münch, Janicki H, Völker I, Rasbach A, Hallek M, Büning H, Buchholz CJ. 2013. Displaying High-affinity Ligands on Adeno-associated Viral Vectors Enables Tumor Cell-specific and Safe Gene Transfer. Molecular Therapy 21: 109–118.

Naldini, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science (New York, NY) 272: 263–267.

Palfi, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavisse S, Buttery PC, Watts C, Miskin J, Kelleher M, Deeley S, Iwamuro H, Lefaucheur JP, Thiriez C, Fenelon G, Lucas C, Brugières P, Gabriel I, Abhay K, Drouot X, Tani N, Kas A, Ghaleh B, Le Corvoisier P, Dolphin P, Breen DP, Mason S, Guzman NV, Mazarakis ND, Radcliffe PA, Harrop R, Kingsman SM, Rascol O, Naylor S, Barker RA, Hantraye P, Remy P, Cesaro P, Mitrophanous KA. 2014. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. The Lancet 383: 1138–1146.

Penati, Fumagalli F, Calbi V, Bernardo ME, Aiuti A. 2017. Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccaridosis I. Journal of Inherited Metabolic Disease, doi 10.1007/s10545-017-0052-4.

Qasim, Mackey T, Sinclair J, Chatziandreou I, Kinnon C, Thrasher AJ, Gaspar HB. 2007. Lentiviral vectors for T-cell suicide gene therapy: preservation of T-cell effector function after cytokine-mediated transduction. Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy 15: 355–360.

Ramamoorth, Narvekar A. 2015. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR 9: GE01-GE06.

Russell, Cosset FL. 1999. Modifying the host range properties of retroviral vectors. The Journal of Gene Medicine 1: 300–311.

Saul, Linnes MP, Ratner BD, Giachelli CM, Pun SH. 2007. Delivery of non-viral gene carriers from sphere-templated fibrin scaffolds for sustained transgene expression. Biomaterials 28: 4705–4716.

Srinivas, Samanta S, Chaudhuri A. 2009. Cationic amphiphiles: promising carriers of genetic materials in gene therapy. Chemical Society Reviews 38: 3326–3338.

Thomas, Ehrhardt A, Kay MA. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nature Reviews Genetics 4: 346–358.

Villate-Beitia, Puras G, Soto-Sanchez C, Agirre M, Ojeda E, Zarate J, Fernandez E, Luis Pedraz J. 2017. Non-viral vectors based on magnetoplexes, lipoplexes and polyplexes for VEGF gene delivery into central nervous system cells. International Journal of Pharmaceutics 521: 130–140.

Wiley J *et al*. 2017. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. WWW-dokument: http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/. Hämtad 2017-05-06.

Williams. 2014. Curing Genetic Disease with Gene Therapy. Transactions of the American Clinical and Climatological Association 125: 122–129.

Wold, Toth K. 2013. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. Current gene therapy 13: 421–433.

Xiao-Jie, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. 2015. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. Journal of Medical Genetics 52: 289–296.

Yan, Zhang Y, Duan D, Engelhardt JF. 2000. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 6716–6721.

Yin, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. 2014. Non-viral vectors for gene-based therapy. Nature Reviews Genetics 15: 541–555.

Zhou, Buchholz CJ. 2013. Cell type specific gene delivery by lentiviral vectors. Oncoimmunology, doi 10.4161/onci.22566.

Etikbilaga - Bör kliniska genterapi-prövningar göras på djur eller människor?

Genterapi är en terapeutisk metod för att behandla ärftliga och förvärvade genetiska sjukdomar. Dessa sjukdomar berör dem flesta på ett eller annat sätt och är stort problem i dagens samhälle. Därför är genterapi ett nödvändigt forskningsområde. Flera olika metoder har kommit upp på ytan under de senaste åren. Det kan dock vara väldigt riskabelt att modifiera människors genetiska material och därför måste kunskap och forskning bakom metoderna vara tillräcklig innan kliniska prövningar påbörjas. Om inte tillräcklig kännedom ligger bakom tekniken innan kan okända och allvarliga biverkningar uppkomma eller dödsfall. Innan varje metod kan accepteras som terapeutisk behandling mot mänskliga sjukdomar måste metoden genomgå kliniska prövningar. Dessa provningar utförs först på djur och sedan människor. Men vad är etiskt rätt i detta sammanhang? Bör vi göra kliniska försök på djur eller människor för att utveckla genterapin vidare?

De djur som används i forskning har endast ett syfte med livet. De föds för att människan ska kunna testa en hel del olika applikationer innan de själva kan använda dem. Anledningen för att det är fördelaktigt för människan att använda djur i forskning är att kunna forska djupare kring sjukdomar och eventuella botemedel på enklare sätt. De modellorganismer som används ofta i forskning har det gemensamt att ha relativt kort livscykel som möjliggör flera försök på kortare tid än vad det skulle göra på människan. Däremot finns det nackdelarna med att använda djur i kliniska försök som innebär att det är inte säkert att applikationen påverkar människan på samma sätt som djuret, eftersom de inte har identiskt genom med människan.

Ärftliga och förvärvade genetiska sjukdomar, som till exempel cancer, har ökat i världen med tiden. Denna ökning kan, i en viss grad, relateras till människan själv och den miljö som har skapats. Med ökad kännedom och tekniker har människan det ansvar att försöka bota de sjukdomar som uppkommit. Kliniska försök på människan är väldigt viktigt innan tillstånd fås för varje applikation. Dock har några människor dött sedan kliniska prövningar påbörjades i genterapi, men det är endast en droppe i havet jämfört med de djur som har dött. Största och viktigaste skillnaden mellan den forskning som utförs på människor och djur är att människan måste ge sitt explicita samtycke som djuren inte gan ge. Detta gäller även för spädbarn. Ett exempel på detta är genterapins första tillåtna kliniska prövning på människan. Patienten var endast fyra år gammal och inte kapabel till att ta egna beslut. Å andra sidan så led patienten av svår immunbrist som ledde till försämrad livskvalité (Blaese *et al.* 1995). Det är forskares och vuxna människors ansvar att fatta rätt beslut och se till att de tekniker som idag finns inte missbrukas, varken på djur eller människan. Genterapi ska endast användas i fall där fördelar med behandlingen kan bevisas.

Sveriges som en helhet har svarat ganska bra på denna frågeställning. Sverige är en bra förebild för många andra länder där det gäller väldigt strikta regler angående djurförsök och kliniska prövningar. Alla djurförsök ska göras med respekt mot djuren och de ska hållas i så låg grad som möjligt. Om andra alternativ än djurförsök finns borde de göras. Försök på människor ska inte göras förrän godkända resultat har fåtts från djurförsök, om inte så måste det vara absolut sista alternativet för patienten. Alla etiska aspekter bör övervägas, alltid.