

GENTERAPI VID PERIFER KÄRLSJUKDOM

En framtida behandlingsmetod?

Molekylärbiologins intåg i kliniska sammanhang har medfört nya metoder för diagnostik och behandling av sjukdomar. En sådan behandlingsstrategi är att påverka genexpression genom att föra in främmande genmaterial i celler. Denna teknik, genterapi, har förutsättningar att bli särskilt användbar för behandling av kärlsjukdomar där kärlväggens celler är lättåtkomliga terapeutiska mål via blodbanan.

Manipulering av genexpression kan användas för att studera den fysiologiska effekten av specifika gener in vivo. Strategin innebär identifiering eller »kloning» av en gen som kodar för ett protein involverat i en fysiologisk process eller en sjukdom, som sedan kopplas till en vektor, exempelvis en virusplasmid, som transfekterar celler i kärlväggen. Proteinet produceras sedan av den transfekterade cellen och utsöndras lokalt i kärlväggen eller in i blodbanan, och dess effekter kan då studeras (Figur 1) [1].

I Läkartidningen 5/96 beskrev Edward Smith den oerhört snabba utvecklingen av studier med målet att använda genmanipulering för att behandla olika sjukdomar, genterapi [2]. För närvarande har över 100 kliniska genterapistudier påbörjats över hela världen [3]. Majoriteten utförs i USA och domineras av behandling av cancer följt av medfödda sjukdomar, aids och hjärt-kärlsjukdomar. Utvecklingen av genterapi har dock endast börjat, och hittills har effektiv behandling med denna teknik inte demonstrerats [4].

Studier i djurmodeller har visat att hjärt-kärlsjukdomar är lämpade för både studier av genfunktion och genterapeutiska försök. Kärlbäddens anatomiska läge möjliggör god tillgång till målceller via blodbanan med och utan endovaskulär access. Kärlväggens celler kan både vara terapimål och manipuleras att utsöndra proteiner till blodet för behandling av systemsjukdomar. Vi har dock valt att beskriva de behand-

lingsförsök och studier som hittills utförts för att behandla olika manifestationer av perifer kärlsjukdom.

Tre olika verkningsprinciper

Det första steget vid genterapi är att isolera ett DNA-segment som kodar för det protein vars effekter man vill studera eller använda till behandling, ofta genom att extrahera mRNA från odlade celler och konvertera det till DNA. Denna DNA-blandning, cDNA, genomsöks för att finna fragment som överensstämmer med det sökta proteinets aminosyrasekvens. När rätt cDNA-fragment identifierats placeras det i en plasmid vilken innehåller komponenter för transkription av genen [5]. Eftersom celler normalt inte tar upp främmande DNA krävs en bärare, en vektor, för att föra in plasmiden i en målcell. När DNA väl överförs till cellen kan det

Författare

ERIC WAHLBERG

med dr, avdelningsläkare, kirurgklinikens kärlsektion, Karolinska sjukhuset, under 1995–1996 gästforskare vid University of California, San Francisco, USA

ULF HEDIN

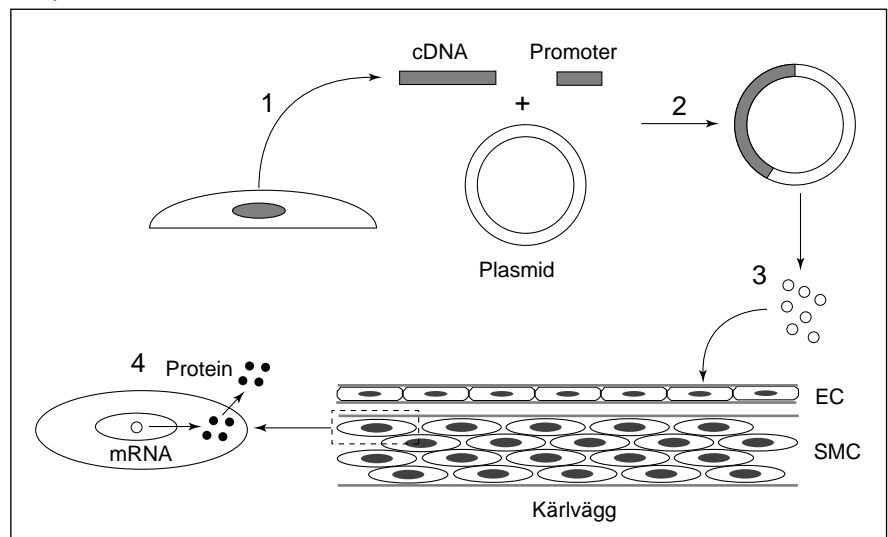
docent, ST-läkare, kirurgklinikens kärlsektion, Karolinska sjukhuset, under 1995–1996 gästforskare vid University of Washington, Seattle, USA.

verka på tre principiellt olika sätt: 1. genom att ersätta en defekt eller saknad gen, 2. genom att »överproducera» ett protein som då kan ge en lokal effekt (»gene augmentation»), 3. genom att hämma produktion av värdcellens egna gener (»anti-sense gene therapy») [6].

Gentranfer med hjälp av virus

DNA kan överföras till en värdcell direkt via kontakt, med en vektor eller via kemiska metoder. Effektiviteten vid överföring genom direkt kontakt med DNA är mycket låg (se ovan), men metoden medför få risker, vilket är skälet till att denna metod valts för den första kliniska prövningen med genterapi för behandling av perifer kärlsjukdom [7, 8].

Figur 1. Principen för överföring av genmaterial till kärlväggens endotel(EC)- och glatta muskelceller (SMC). 1. Den gen som kodar för det protein man avser att behandla med eller vars funktion man vill studera isoleras från odlade celler. 2. Genen (cDNA) kopplas till ett DNA-segment som reglerar gentranskription, en s k promoter, och dessa införs i en plasmid. 3. Plasmiden överförs till kärlväggen med en vektor, vanligtvis ett virus. 4. Den överförda genen transkriberas i cellkärnan, och proteinet syntetiseras.



Den mest använda transfermetoden är att utnyttja retro- eller adenovirus som vektorer. För att kunna använda virus till transfer måste de delar av virusets eget DNA som kodar för virusreplikation tas bort [9].

När retrovirus används konverteras överfört RNA i målcellens kärna till DNA och inkorporeras i värdcellens DNA, där det replikeras i varje cellcykel [10]. Förutsatt att värdcellen replikeras ger retrovirusvektorer en effektiv proteinproduktion under en lång tid [11]. I vävnad med långsam cellomsättning, som endotelceller och celler i intiman av aterosklerotiska kärl, är effekten sämre. Tyvärr är retrovirus ineffektiva för transfer in vivo, och vektorn används därför oftast till cellmediert gentransfer, vilket innebär att celler från den önskade vävnaden transfekteras i cellodling och därefter återförs.

Adenovirus innehåller DNA som vid överföring till en värdcell upptas i cellkärnan men transkriberas separat ifrån värdcellens DNA och replikeras därmed inte vid celledelning. Detta begränsar durationen av proteinproduktion, men transfereffektiviteten är avsevärt högre än för retrovirus. Olyckligtvis är det svårt att skapa adenovirusvektorer som helt saknar produktion och sekretion av egna proteiner, vilket leder till en immunreaktion mot den infekterade värdcellen. Reaktionen är ofta mycket kraftig [12]. På grund av den höga transfereffektiviteten kan genterapi med adenovirusvektor utföras genom intravenös infusion av virus suspension [13]. Aterosklerotiska kärl är troligen mindre benägna att transfekteras med adenovirusvektorer än normala artärer [14, 15], och överföringen kan behöva kompletteras med speciella tekniker för att skapa en tillräckligt lång och nära kontakt mellan virus och värdcell (se nedan).

Överföring av DNA kan också göras med liposomer. Dessa består av ett dubbel lipidlager som spontant kapslar in DNA-plasmiden. Lipiden samman-smälter med cellmembranet, och DNA införs på så sätt till cytoplasman [16]. Liposomvektorer är säkra och skapar ingen immunreaktion hos vävnaden, men samtidigt är överföringseffektiviteten lägre än för adenovirus [1, 6, 17]. Avsaknaden av immunreaktion med sådana kemiska vektorer har gjort att forskningen om dessa intensifierats under senare tid.

Endovaskulära metoder för att underlätta transfer

Som nämnts ovan krävs ofta en förbättring av överföringseffektiviteten, och endovaskulära metoder för detta ändamål har utvecklats under senare år [18-20]. De flesta instrument baseras på

en vanlig ballongkateter för dilatation av artärstenoser, vilket är en fördel vid perifer kärlsjukdom då genterapi (exempelvis för prevention av restenos eller/och trombos) kan utföras adjutant till en stenodilatation [19, 20].

Ett exempel på endovaskulärt instrument för genterapi är »dubbelballongen». Denna består av två ballonger som ockluderar ett kärlparti medan blodflödet leds centralt genom katetern. Vektorer och droger kan infunderas i mellanrummet mellan ballongerna med ett mycket lågt infusionsstryck, och kärlväggen skadas inte [21, 22]. Detta instrument är därför speciellt användbart då målet är genterapi riktad mot endotelceller (EC). Andra exempel är den »perforerade ballongen», som släpper igenom vektorsuspension vid infusion [23], och ballonger med ytan täckt av gel innehållande vektorn eller DNA [8]. I det senare fallet diffunderar drogen från gelen när ballongen blåses upp och pressas mot endotelet.

Behandling av benischemi

En ny strategi vid behandling av ischemi i benen är att förbättra kollateralblodflödet genom induktion av kärlnybildning (angiogenes). Denna strategi är särskilt lämplig för genterapi med endotelceller som mål, som kan transfekteras utanför kroppen eller direkt i kärlbädden. DNA som kodar för olika markörproteiner har överförts till celler i odling och återimplanterats i kärlsegment med stor framgång [24, 25]. DNA har även överförts till kapillärbäddens endotel efter injektion i skelettmuskel [26] och överförts till endotelceller med dubbelballongen [27]. I djurmodeller har dessutom transfermetoder använts till att visa att sekretion till blodet av detekterbara nivåer av erythropoietin och tillväxthormon är möjlig med genterapi [28-30].

Tillväxtfaktorer för endotelceller spelar en viktig roll vid angiogenes och kan troligen användas till att stimulera kollateralkärlstillväxt vid behandling av perifer kärlsjukdom [31]. Den första tillväxtfaktorfamilj som prövades, men visades vara alltför ospecifik för detta ändamål, var fibroblasttillväxtfaktor (FGF) [32-35]. I stället är för närvarande vasculär endotelcellstillväxtfaktor (vascular endothelial cell growth factor, VEGF), som är mer endotelcellsspecifik och ibland mer potent än FGF, den starkaste kandidaten [36]. En injektion av rekombinant VEGF antingen intravenöst eller arteriellt i en kaninmodell av benischemi ökar kapillärtätheten och blodflödet i det ischemiska benets kollateralkärlbädd under åtminstone 30 dagar [37-40]. Också in vitro tillväxer endotelceller kraftigt efter transfektion

med DNA som kodar för VEGF med både retro- och adenovirusvektorer [41,42].

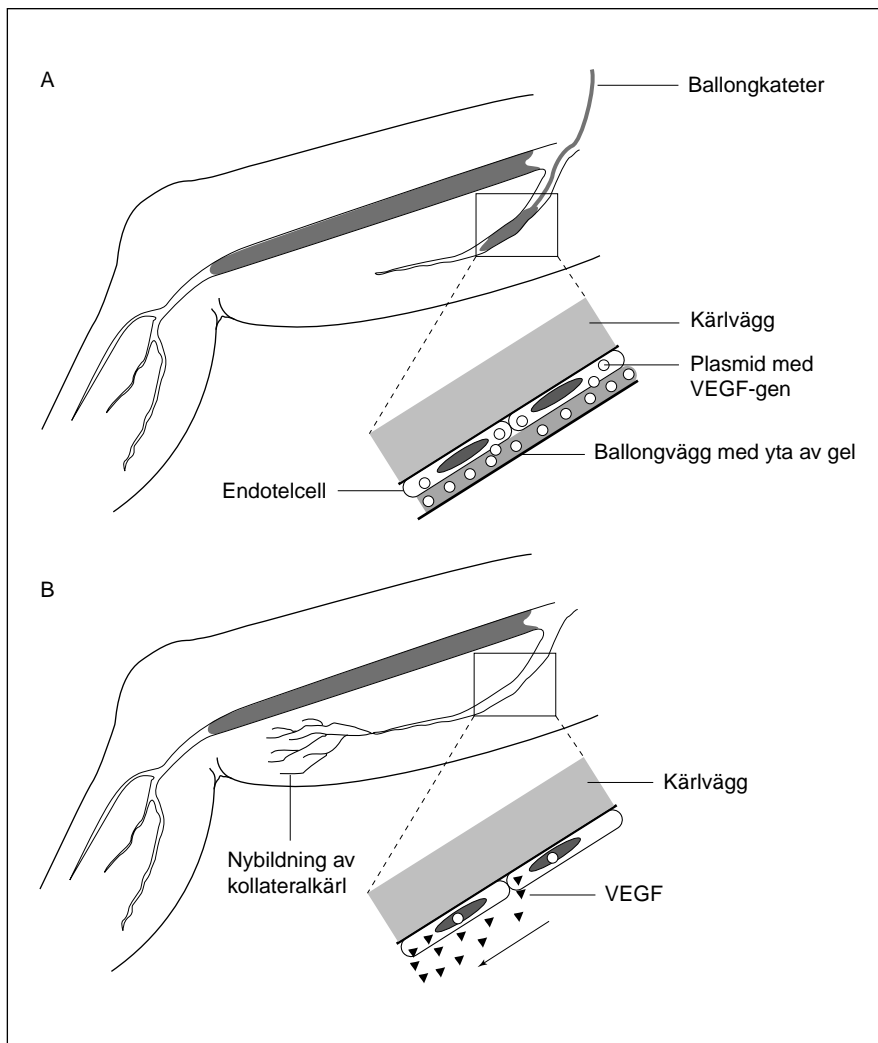
Samma behandling har också visats inducera kärltillväxt subkutant på friska möss [41, 42]. Nyligen rapporterades de första preliminära resultaten av den tidigare nämnda kliniska prövningen med VEGF på patienter med icke-kirurgiskt behandlingsbar grav benischemi [7]. I denna studie överförs DNA som kodar för VEGF direkt till endotelet i profundaartären från en vattenbaserad gel på ytan av en vanlig angioplastikballong (Figur 2). Hittills har sju patienter kunnat följas de tolv månader som studien föreskrev. Av dessa ökade tre sitt blodflöde i benet uppmätt med magnetisk resonansundersökning, angiografi och intravaskulärt ultraljud och förbättrades kliniskt [43]. Eftersom huvudmålet med studien var att evaluera säkerheten av den aktuella genterapi-metoden, så saknas kontrollpatienter, men även dessa blygsamma resultat kan ses som en framgång. Ingen av samtliga inkluderade patienter har hittills uppvisat immunreaktion eller drabbats av tillväxt av subkliniska tumörer, vilket är en möjlig biverkning av VEGF-behandling [36, 44].

En annan möjlig gen som kan visa sig vara lämplig för genterapi är den som kodar för cyklooxygenas. Detta enzym reglerar syntesen av prostacyclin, vilket inducerar vasorelaxation och hämmar trombocytfunktion och därmed kan förbättra mikrocirkulationen i ischemisk vävnad. Genen har överförts till både retro- och adenovirusvektorer, och transfer till djurmodeller har visat att sekretion av prostacyclin till blodet är möjlig [45].

Behandling av restenos

Rekonstruktion av blodkärl med konventionell kirurgi eller endovaskulära metoder medför alltid en skada och läkningsprocess i kärlväggen som på sikt kan orsaka nya förträngningar, restenos, och leda till ocklusion av det rekonstruerade kärlsegmentet. Trots intensiv forskning om dess patogenes kvarstår restenosproblemet som det största hindret mot framgångsrik kirurgisk behandling av aterosklerotisk kärlsjukdom. Hittills har huvudteorin för restenosutveckling varit att den orsakas av intimal hyperplasi. Denna läkningsprocess är framstående efter kärlskada i försöksdjur och orsakas av att glatta muskelceller vandrar in i intiman från kärlväggens media, där de tillväxer och deponerar extracellulär matrix [46, 47].

I analogi med detta har experiment med gentransfer utförts för att studera olika faktorer betydelse i denna process men också i försök att motverka in-



Figur 2. Behandling av extremitetsischemi genom gentransfer av VEGF (vascular endothelial cell growth factor)-genen enligt den nu pågående kliniska studien. A. En kateter med angioplastikballong nedförs i arteria profunda femoris. Ballongen, beklädd med gel innehållande plasmid med VEGF-genen, expanderas, och plasmiden passerar över till kärlets endotelceller. B. De endotelceller som tagit upp plasmiden producerar VEGF-proteinet, vilket utsöndras i blodet. Tanken är att VEGF där stimulerar tillväxt av endotelceller och kärlnybildning, och denna kollateralutveckling minskar ischemin.

timal hyperplasi [1]. De flesta terapeutiska försök har syftat till att motverka glatt muskelcellsproliferation. Oftast har antisensgenterapi använts där det DNA som transfererats hämmar expressionen av gener nödvändiga vid cellproliferation [48]. Hämning av protoonkgener (exempelvis *c-myc* och *c-myc*) [49-51] eller gener involverade i cellcykelkontroll begränsar effektivt intimal hyperplasi efter kärlskada i försöksdjur. Genom överexpression av gener som normalt hämmar cellproliferation (exempelvis retinoblastomgenen *Rb*) har samma effekt uppnåtts i både råttor och gris efter kärlskada [52]. Hämning av

intimal hyperplasi kan också uppnås genom transfektion med kväveoxidsyntetasgenen, vilket leder till ökad kväveoxidproduktion, vilket i sin tur hämmar celltillväxt [53, 54].

Även om djurexperimentella data visat att glatt muskelcellstillväxt och intimal hyperplasi är betydelsefulla komponenter i läkningsprocessen i kärnvägen efter skada, har kliniska försök med konventionell terapi riktad mot denna process på människa misslyckats [55]. Restenosutveckling i aterosklerotiska kärl hos människa förefaller vara betydligt mer komplex, och andra patofysiologiska faktorer än intimal hyperplasi bidrar troligen [56-63]. Eftersom kunskap om alternativa mekanismer till stor del saknas är det svårt att föreslå nya behandlingsstrategier eller att välja lämpliga gener att motverka eller förstärka i kliniska genterapiförsök [54-66].

Förbättring av kärlgraft

Den första applikationen av genterapi inom hjärt-kärlområdet var att genetiskt modifiera celler i kärlgraft för att motverka graftokklusion. Redan 1989 publicerades ett lyckat försök att transplantera endotelceller som *ex vivo* er-

hållit DNA för ett markörprotein via retrovirus till dakrongraft [67]. Effektiviteten var dock dålig, och få celler med förmåga att producera proteinet fanns kvar på graftet efter fem veckor. Sedan dess har flera studier utförts i djurmodeller för att försöka förbättra den dåliga effektiviteten, vilken tycks bero på både hemodynamiska faktorer och själva transfereringen [68-71]. I en studie på babian var effektiviteten förhållandevis god. Här användes en arteriovenös shunt med ett syntetgraft som försattes med endotelceller transfekterade med tromboplastinogenen. I dessa fann man signifikant lägre nivåer av trombocytaggregation och fibrinbeläggning än i kontrollsegment transfekterade med ett markörprotein [72]. I en senare studie där liknande syntetgraft placerats som artärsegment hos får, lossnade större delen av de transfekterade cellerna ifrån graftet efter endast en kort tid, troligtvis på grund av alltför kraftig plasmiproduktion [73, 74]. Många problem återstår således innan genterapi kan användas till att förebygga grafttrombos [75].

Liknande studier med målet att förhindra grafttrombos har också utförts i djurmodeller för vengraft [76, 77] och kärlstentar [78]. I vengraft har också flera försök gjorts att förhindra glatt muskelcellstillväxt och därmed graftokklusion på lång sikt (se restenosavsnittet). I dessa studier användes antisens teknik för att hämma uttryck av gener nödvändiga för proliferation [79, 80].

Alternativ metod i framtiden

Gentransfer i djurmodeller har varit och är ett utmärkt verktyg att bredda kunskapen om olika kärlsjukdomar. Det är därför naturligt att ett stort intresse riktas mot möjligheten att använda denna teknologi även till behandling av restenos och ischemi eller för att förbättra kärlgraft.

Ännu så länge har dock ingen lyckats visa att genterapi över huvud taget fungerar på människa. Möjligtvis med undantag av resultaten från det tidigare nämnda ADA-försöket har de flesta kliniska prövningar endast visat att gentransfer i sig är möjlig utan att någon effekt av de transfererade generna kunnat observeras [2-6].

Mot bakgrund av detta är det svårt att förutsäga framtiden för vaskulär genterapi. Lösningar på flera problem runt själva tekniken saknas fortfarande, och för flera kärlsjukdomar krävs ytterligare kunskap om patofysiologin för att kunna välja lämpliga gener för terapi. Med tanke på hur snabbt genterapiteknologi har etablerats inom forskningsvärlden torde dessa problem trots allt bli

ANNONS

ANNONS

ANNONS

ANNONS

lösta. Vi tror därför att genterapi i framtiden kommer att kunna användas som en alternativ metod eller adjuvant redskap i behandlingen av många kärlsjukdomar.

Referenser

1. Nabel EG, Pompili VJ, Plautz GE, Nabel GJ. Gene transfer and vascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 445-55.
2. Smith E. Genterapi. Förväntningar och förverkligande. *Läkartidningen* 1996; 93: 349-50.
4. Marshall E. Gene therapy's growing pains. *Science* 1995; 269: 1050-5.
6. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Gene transfer into vascular cells. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 189B-94B.
7. Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1995; 91: 2687-92.
12. Newman KD, Dunn PF, Owens JW, Schlick AH, Virmani R, Sukhova G et al. Adenovirus-mediated gene transfer into normal arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1995; 96: 2955-65.
18. Lincoff MA, Topol EJ, Ellis SG. Local drug delivery for the prevention of restenosis. Fact, fancy, and future. *Circulation* 1994; 90: 2070-84.
20. Dichek DA, Anderson J, Kelly AB, Hanson SR, Harker LA. Enhanced in vivo anti-thrombotic effects of endothelial cells expressing recombinant plasminogen activators transduced with retroviral vectors. *Circulation* 1996; 93: 301-9.
33. Nabel EG, Yang Z, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC et al. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362: 844-6.
39. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N et al. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995; 21: 314-25.
40. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S et al. Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662-70.
45. Zoldhelyi P, McNatt J, Xu XM, Loose-Mitchell DS, Meidell RS, Clubb FJ et al. Prevention of arterial thrombosis by adenovirus-mediated transfer of cyclooxygenase gene. *Circulation* 1996; 93: 10-7.
47. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77: 445-65.
50. Simons M, Edelman ER, DeKeyser J, Langer R, Rosenberg R. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature* 1992; 359: 67-70.
52. Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang YQ, Nabel GJ, Nabel EG et al. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science* 1995; 267: 518-22.
64. Glagov S. Intimal hyperplasia, vascular modeling, and the restenosis problem. *Circulation* 1994; 89: 2888-91.
66. Lafont A, Guerot C, Lemarchand P. Which gene for which restenosis? *Lancet* 1995; 346: 1442-3.
67. Wilson JM, Birinyi LK, Salomon RN, Lib-

by P, Callow AD, Mulligan RC. Implantation of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cells. *Science* 1989; 244: 1344-6.

74. Huber TS, Welling TH, Sarkar R, Messina LM, Stanley JC. Effects of retroviral-mediated tissue plasminogen activator gene transfer and expression on adherence and proliferation of canine endothelial cells seeded onto expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg* 1995; 22: 795-803.
79. Mann MJ, Gibbons GH, Kernoff RS, Diet FP, Tsao PS, Cooke JP et al. Genetic engineering of vein grafts resistant to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4502-6.

En fullständig litteraturlista kan erhållas från Eric Wahlberg, kirurgiska kliniken, Karolinska sjukhuset, 171 76 Stockholm.

TILLVÄXT



FAKTORER

Särtryck av en serie i Läkartidningen 1995

Alla kroppens celler reagerar på olika signalämnen i omgivningen, ämnen som styr deras fundamentala livsprocesser.

Dessa ämnen kallas kollektivt tillväxtfaktorer. En serie i Läkartidningen 1995 om dem speglar tendenser i dagens medicinska forskning och pekar på några tillämpningsområden.

Området är i början av en snabb utveckling och många produkter är under utprovning för klinisk användning.

Häftet omfattar 12 artiklar på sammanlagt 56 sidor + färgomslag. Priset är 90 kronor. Vid köp av 11-50 ex 82 kronor, vid högre upplagor 77 kronor/exemplar.

Beställer härmed

..... ex Tillväxtfaktorer

Namn

Adress

Postnummer/Postadress

Insändes till Läkartidningen,
Box 5603, 114 86 Stockholm

Märk gärna kuvertet
» Tillväxtfaktorer »

Telefax: 08-20 76 19