

Genterapi blir förmodligen ett ganska begränsat behandlingsalternativ, som bara används vid svåra sjukdomar, tror professor Stefan Karlsson i Lund. Efter åtta år och en stor mängd kliniska försök har dock ännu ingen patient botats. »Resultaten av alla kliniska försök visar att vi behöver mer grundforskning om cellen och dess funktion. Men parallellt måste de kliniska försöken fortsätta för att vi ska kunna utvärdera nya metoder», säger Stefan Karlsson.

Obruten forskaroptimism till genterapi trots uteblivna "genombrott"

Åtta år av kliniska försök – men ännu har ingen botats

Efter åtta år och hundratals kliniska försök finns det ännu inte en enda patient som blivit botad med enbart genterapi. Men forskarnas entusiasm för teknikens möjligheter har för den skull inte minskat, menar professor Stefan Karlsson i Lund.

– De kliniska försöken har varit allt för begränsade, nya tekniker har prövats och patientgrupperna har varit små, säger Stefan Karlsson.

INTERVJU

FOTO

PETER ÖRN FREDRIK HAGBLOM

Genterapi på grundforskningsnivå har pågått sedan i början av 1980-talet, först enbart i cellodlingar och vid mitten av 1980-talet i benmärgsceller som transplanterades till djur. Vid slutet av 1980-talet lyckades forskare även integrera nya gener i arvsmassan i hematopoetiska stamceller hos mus.

Uppmuntrande resultat efter genterapiförsök i djurmodeller, framför allt möss, ledde till det första kliniska försöket på människa, med början i september 1990. Patientgruppen var barn med den allvarliga immunbristsjukdomen »severe combined immunodeficiency», till följd av utebliven produktion av adenosindeaminas, ADA-SCID [1].

Försöken, som leddes av French Anderson vid University of Southern California, har varit hoppgivande och yt-

terligare studier har bekräftat möjligheterna med genterapi.

En nyligen publicerad studie beskriver tre barn som strax efter födseln 1993 fick en serie injektioner med stamceller som bar på genen för ADA. Fyra år efter behandlingen produceras fortfarande enzymet och T-celler med ADA-genen har ökat med 1–10 procent.

Barnen behandlas dock parallellt med läkemedel för att få en tillräcklig mängd av enzymet. Ska genterapi få en god terapeutisk effekt vid ADA-SCID måste därför effektivare genöverföring och ökad genexpression uppnås, menar forskarna bakom studien [2].

Pionjären på området, French Anderson, tror att en tidigare lagd behandling av ADA-SCID kan inverka positivt på resultatet, och han har därför sökt

tillstånd för kliniska försök redan på fosterstadiet. Han har även ansökt om att få utföra kliniska försök med genterapi på foster med blodbristsjukdomen talassemi [3].

Optimismen finns kvar

Från 1991 och fram till och med 1998 har tillstånd beviljats för omkring 300 kliniska försök med genterapi runt om i världen. I stort sett samtliga handlingar om små fas I- och fas II-studier.

En fas III-studie har godkänts; behandling av hjärntumören »glioblastoma multiforme» genom att tillföra en gen som får cancercellerna att reagera på farmakologisk behandling och dö, medan de friska cellerna bevaras. 250 patienter i USA och Europa ska ingå i studien [4].

Trots att behandlingsmässiga »genombrott» ännu har uteblivit lever forskarnas optimism; inom en 25-årsperiod kommer genterapi med all säkerhet att revolutionera den medicinska praktiken, skriver French Anderson vid University of Southern California, i Nature [5].

Professor Stefan Karlsson, föreståndare för Centrum för genterapi i Lund, vill inte uttrycka sig riktigt så drastiskt ifråga om genterapis tänkbara betydelse. Centrum för genterapi är ett resurscentrum för olika forskarlag vid Lunds universitetssjukhus.

– Om man ser till hur genterapin har utvecklats kommer det till exempel att bli svårt att behandla människor utan att de läggs in på sjukhus. Det blir förmodligen ett begränsat behandlingsalternativ som främst används för allvarliga sjukdomar, tror Stefan Karlsson.

– Ska man summera de första årens kliniska försök kan man generellt säga att resultaten har varit sämre än de som uppnåddes vid försök med möss. Vid exempelvis benmärgsterapi kan man överföra gener till omkring 30–50 procent av stamcellerna till möss, medan resultaten på människor har varit mindre än en procent.

Stefan Karlsson kom till Lund för cirka två år sedan, efter 14 år vid National Institutes of Health i Washington, och ännu befinner sig hans egen forskning i uppbyggnadsfasen.

Halva forskargruppen, omkring tio personer, arbetar med att ta fram djurmodeller. De övriga är inriktade på genterapins idag största svårighet: att framställa effektiva vektorer (bärare av gen till värdcellen).

Krävs att celler delar sig

Virus är den idealiska vektorn, eftersom virus genom miljoner av år utvecklats till att kunna ta sig in i främmande cellers arvsmassa och inkorporera det egna DNAt.

En effektiv vektor ska inte bara ta sig igenom cellmembran och kärnans membran, den ska även hitta en plats på kromosomen. För att hitta rätt cell och få in vektorn genom cellmembranet används ett proteinhölje med förmåga att binda till membranreceptorer som släpper igenom vektorn.

Idag används främst fyra typer av vektorer: retrovirus, adenoassocierade virus (AAV), adenovirus samt lentivirus (t ex HIV-1). Vid omkring 60 procent av alla kliniska försök har retrovirus använts som vektor.

Retrovirusvektorer har dock visat sig vara förknippade med stora svårigheter, många av en art som inte uppstod under 1980-talets lyckade genterapiförsök på möss.

Bland annat krävs det att cellerna de-

”Om man ser till hur genterapin har utvecklats kommer det till exempel att bli svårt att behandla människor utan att de läggs in på sjukhus”

lar sig för att den nya genen ska inkorporeras i arvsmassan, en delning som sker betydligt oftare i t ex benmärgstamceller hos mus än hos människa.

Alternativ vektor

Ett alternativ som alltmer prövas är adenovirusvektorer. Dessa kan ta sig in i celler som inte delar sig och är även användbara för många olika celltyper.

Men adenovirusvektorn blir nästan aldrig en del av kromosomen och kan därför inte användas då det krävs en permanent genetisk förändring. Däremot finns det en mängd tillfällen, då det är medicinskt intressant med en genexpression under en begränsad tid. Adenovirusvektorn finns normalt kvar i cellen i några få veckor.

– Immunogenterapi, t ex vid cancer, är ett av områdena då adenovirusvektorn är intressant. Då behövs under en viss tid en expression av vissa cytokiner som får immunförsvaret att attackera cancercellerna, säger Stefan Karlsson.

En annan fördel är att adenovirus är större än retrovirus, och kan som vektor därför bära större DNA-sekvenser.

Den första generationen adenovirusvektorer som användes vid försök med genterapi mot cystisk fibros, gav i enstaka fall ganska svåra biverkningar.

Då man tillförde genen för det protein som saknas på cellmembranet, och som är orsaken till sjukdomen, uppstod

en kraftig inflammation i lungorna. Cellerna producerade vissa adeno-virala proteiner som immunförsvaret reagerade starkt mot.

Förlorar egenskaper

Ett annat DNA-virus som används som vektor vid kliniska försök är adenoassocierat virus (AAV). AAV är bland annat intressant för att det är det enda virus som alltid går till samma plats i arvsmassan (den korta armen på kromosom 19). Det har också en förmåga att integrera i arvsmassan i celler som inte delar sig.

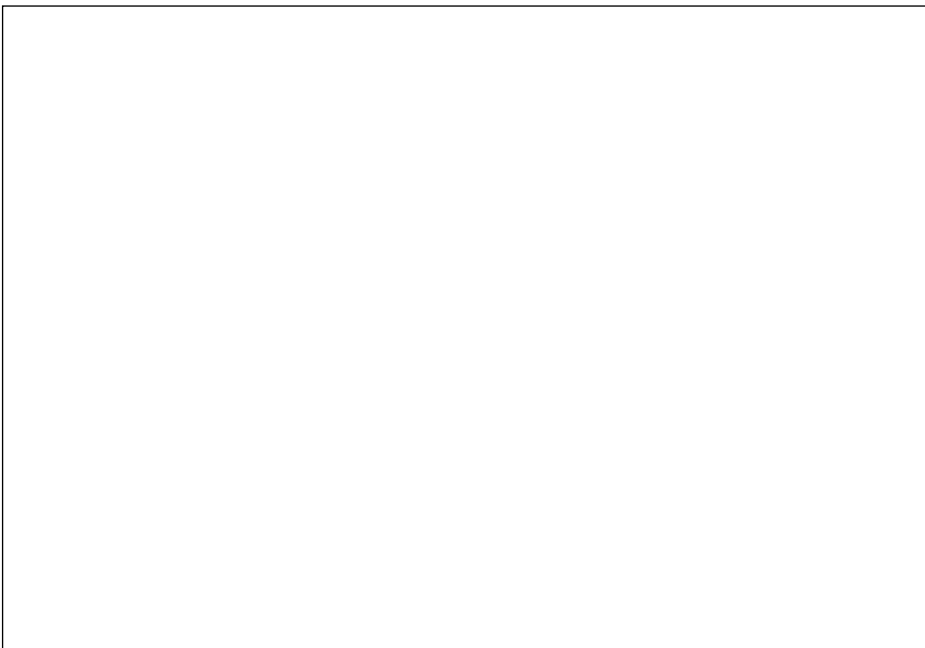
– Tyvärr har det visat sig att när AAV förändras, och vissa av virusets egna gener tas bort då det görs om till en vektor, så förlorar AAV förmågan att gå till samma plats i arvsmassan. Så det är fortfarande bara en dröm att i förväg kunna bestämma var en vektor ska sätta sig, säger Stefan Karlsson.

Det har även visat sig att när AAV görs om till vektorer, så kan de förvisso ta sig in i en cell utan att cellen behöver dela sig, men förblir utanför cellkärnan fram till celldelning.

Den idag kanske intressantaste vektorn är lentivirus, t ex HIV-1. Lentivirus har förmåga att både infektera celler som inte delar sig och att integrera sin arvsmassa i cellens kromosomer.

Dessa vektorer är dock förknippade med tänkbara risker, exempelvis att en rekombination av gener kan leda till att vektorn producerar ett patologiskt virus. Genom att använda ett proteinhölje minskar den risken och forskningen har nu lett fram till att drygt 20 procent av lentivirusets genom kan användas som retroviral vektor.

Biverkningar vid kliniska försök med genterapi är generellt sett sällsynta, oberoende av vilken vektortyp som använts.



Två principer för genterapi. Den vanligaste är genterapi ex vivo, då värdcellerna tas ur kroppen och återförs efter det att vektorer som bär på en terapeutisk gen integrerats i cellerna. Genterapi in vivo, då vektorer injiceras direkt i blodet och själva söker upp värdcellerna, är det långsiktiga målet inom vektorforskningen. Det finns ännu inga kliniska exempel på den här typen av genterapi, men på sikt är in vivo-distribution nödvändig för att kunna minska kostnaderna. Dessutom provas genterapi in situ, då vektorerna placeras direkt i den angripna vävnaden. Tekniken har bland annat använts vid kliniska försök på patienter med cystisk fibros, muskeldystrofi och cancer.

Den största svårigheten inom genterapiforskningen är att konstruera effektiva vektorer, dvs bärare av nya gener till värdcellerna. De nuvarande virusvektorerna har flera begränsningar, bland annat i förmågan att integrera i värdcellens arvsmassa och i bärarkapacitet av DNA-sekvenser. »Ett riktigt genombrott på området skulle förmodligen handla om att någon lyckades framställa en effektiv vektor, säger professor Stefan Karlsson.

I teorin är det tänkbart att en ny gen som placeras i en cell på något sätt skulle kunna skada genomet. Men några tecken på sådana skador finns ännu inte.

– Riskerna är minimala eftersom man bara använder en del av virusets eget genom. Viruset måste vara helt inakt för att trivas och kunna producera sina proteiner. Efter det att en virusvektor hittat sin värdcell produceras inga fler virus och det blir därför ingen spridning, säger Stefan Karlsson.

Ännu har kliniska försök med genterapi främst varit inriktade på relativt »enkla» genetiska defekter, dvs då det inte har handlat om stora och komplicerade gensekvenser.

Klarar korta sekvenser

Men i framtiden, då målsättningen förmodligen blir att försöka tillföra större gener, som exempelvis genen för koagulationsfaktor VIII vid den vanligaste blödarsjukan, hemofili A, eller

genterapi för att behandla muskeldystrofi, är de vektorer som idag finns för begränsade.

Den aktuella genen vid muskeldystrofi är på 14 000 baser (14 kb), och genen för faktor VIII är på 8 kb. Gränsen för AAV-vektorn är 4–5 kb och för retrovirala samt lentivirala vektorer 6–8 kb. De största vektorerna, de adenovirala, kan bära upp till 30 kb, men dessa kan å andra sidan inte integrera med värdcellens arvsmassa. ►

ANNONS

– En forskargrupp i USA har lyckats minska genen för faktor VIII från 8 kb till 6,4 kb, genom att ta bort vissa delar av molekylerna som inte bedömts vara nödvändiga för genens funktion. Det är möjligt att man på det sättet kanske kan använda modifierade gener i framtiden.

– Samtidigt kan det vara vanskligt att modifiera generna då de partier som tas bort kanske svarar för tillverkningen av viktiga proteiner, till exempel membranproteiner som måste ha en viss tredimensionell struktur, säger Stefan Karlsson.

Två andra faktorer som ofta nämns då genterapins hinder diskuteras, är styrningen av genexpressionen samt immunförsvarets reaktion mot de nya proteiner som tillförda gener kodar för.

Så länge forskningen handlat om enzymgener har det inte funnits något egentligt expressionsproblem, den har kunnat styras genom de promotorer som används.

Men det finns gener som måste regleras mycket noggrant, exempelvis globulingener, eller gener som måste producera stora mängder av något ämne, t ex kollagen.

– Det är ännu ingen som vet om expressionsproblemen egentligen går att lösa. Själv tror jag att det kan bli mycket svårt att reglera hur stor expression du vill ha, säger Stefan Karlsson.

– När det handlar om immunförsvarets reaktion mot främmande proteiner är det inte något större problem i de fall patienten redan har proteinet, men i en abnorm form som inte fungerar. Skillnaden mellan det och det nya proteinet är så liten. Men om patienten överhuvudtaget inte bär på genen för det aktuella proteinet kan vi förvänta oss problem.

Höga kostnader

Produktionskostnaden för att framställa vektorer till ett kliniskt försök (5–10 patienter) ligger på mellan en halv och en miljon kronor.

Den största kostnaden ligger i alla prov som måste utföras under produktionen. Efter odling av celler som producerar de virala proteinerna måste man, liksom vid läkemedelstillverkning, testa supernatanten för pyrogener, vanliga infektiösa organismer etc. Dessutom måste supernatanten noggrant testas för om det skett någon oväntad rekombination i cellerna, som gjort att det bildats virus i stället för vektorer.

– Allt detta görs i speciella laboratorier med extremt ren luft. Eftersom de kliniska studierna sedan är små, 3–10 patienter, blir kostnaderna för att framställa vektorer relativt sett höga, säger Stefan Karlsson.

– Men med en fungerande genterapi

ska tekniken inte blir dyrare än befintlig behandling. Ta exempelvis leukemipatienter som måste genomgå dyrbar benmargstransplantation. Skulle det i stället räcka med en, eller på sin höjd tre–fyra behandlingar med genterapi, blir kostnaderna inte högre. Dessutom har vi den etiska faktorn: finns en teknik för att bota sjukdom och lindra lidande så måste man använda den.

Genvaccin mot cancer

Allt fler forskargrupper intresserar sig för kliniska försök med genterapi mot cancer. Medan man för tio år sedan såg genterapi främst som ett tänkbart vapen mot klassiska genetiska sjukdomar, har intresset mer riktats mot sjukdomar med vissa genetiska komponenter. Dit hör cancer och även autoimmuna sjukdomar.

Ett problem är att de defekta generna vid dessa sjukdomar fortfarande är förhållandevis odefinierade och det kan vara svårt att få fram en rationell strategi för terapin.

– Det kanske inte är helt nödvändigt att alltid exakt känna till den molekylära patologin för att behandla en sjukdom. Det finns ju exempel på läkemedel som lindrar symtom utan att man specifikt vet vilka gendefekter som orsakar dessa, säger Stefan Karlsson.

– Genterapiförsöken vid cancer byggs på tre olika principer: att påverka celldelningen, att stärka kroppens immunförsvaret mot cancercellerna, eller att tillföra gener som bildar ett toxiskt ämne som dödar cancercellerna. Vid djurförsök har dessa principer fungerat bra och de har även prövats vid kliniska studier. Men såvitt jag känner till har man ännu inte fått fram några bra resultat på människa.

Det handlar om svårt sjuka patienter som inte svarar på traditionell cancerbehandling och det är därför relativt lätt att få tillstånd för kliniska genterapiförsök.

Ett flertal fas II-studier pågår med »genterapivaccinering», bland annat vid malignt melanom. Liknande försök görs på aidspatienter.

Men vaccinationsprincipen är förknippad med vissa risker, det har försök med djurmodeller visat efter det att tumörceller injicerats i djuret. Tillförs en gen som kodar för ett extra cytokin har det inträffat att immunförsvaret, efter det att tumören försvunnit, även gett sig på frisk vävnad. Immunförsvaret har blivit för kraftfullt och det uppstår en autoimmun reaktion.

Genmarkörstudier

Cancerforskning tillhör de områden där genterapitekniken även kan användas till annat än att försöka angripa sjukdomen. Ett stort område är det som kallas genmarkörstudier, då forskare

vill ha svar på vissa biologiska frågor som inte går att besvaras på annat sätt än med hjälp av genterapiteknik.

En patientgrupp som varit aktuell för dessa försök är leukemipatienter, som efter en benmargstransplantation återfått leukemin.

– Man vill veta om leukemin kommer från celler som funnits kvar i kroppen, eller från de celler som tagits ut och återförts efter kemoterapi, säger Stefan Karlsson.

– Genom att tillföra en markör i de celler som återförs avslöjas vilka celler som utvecklar cancer: de transplanterade eller de som funnits kvar i kroppen.

En begränsad teknik

Ett genombrott inom genterapiforskningen skulle förmodligen handla om att få fram effektiva vektorer, menar Stefan Karlsson. Men själv tror han att det som långsiktigt kommer att utveckla genterapin mest är en ökad kunskap om cellen och dess funktion, vilket bara en fortsatt biologisk grundforskning kan leda till.

– Resultaten efter de kliniska försök med genterapi som gjorts visar ju att vi behöver mer grundforskning. Men parallellt måste kliniska försök genomföras, om man kontinuerligt ska kunna utvärdera nya metoder, säger Stefan Karlsson.

I den pågående kartläggningen av människans arvs massa, en del av det s k HUGO-projektet, beskrivs inte bara proteinkodande gener utan samtliga nukleotider. Men att ökad kunskap om eventuella funktioner hos det som brukar kallas »skräpgener», och liknande nya kunskapsbidrag, i sig skulle hjälpa forskarna att uppnå bättre resultat med genterapi vid de sjukdomar som redan idag utgör målen, tror inte Stefan Karlsson.

– Det är inte kunskapsbristen rörande vår arvs massa som har begränsat genterapins möjligheter. De gener vi arbetar med är ju klonade och väl karakteriserade. HUGO är ett viktigt projekt för att få fram fler möjliga gener för genterapi.

– Men genterapi är en teknik med stora begränsningar. Det finns genetiska defekter som blir svåra att komma åt, ibland på grund av att det är svårt att överföra gener till den specifika vävnaden, ibland beroende på annat. Vissa sjukdomar kommer även i framtiden att vara lättare att bota med läkemedel som t ex binder till vissa transkriptionsfaktorer, vilka i sin tur reglerar genfunktionen, säger Stefan Karlsson.

Referenser

1. Science 1995; 270: 475-80.
2. Nature Medicine 1998; 4: 775-80).
3. New Scientist 1998; 2140: 12
4. Nature Medicine 1997; 3: 1354-61.