

Johan Richter, docent, överläkare, avdelningen för molekylärmedicin och genterapi samt verksamhetsområde hematologi (*Johan.Richter@molmed.lu.se*)

Thomas Relander, avdelningsläkare, doktorand, avdelningen för molekylärmedicin och genterapi samt verksamhetsområde onkologi (*Thomas.Relander@molmed.lu.se*); båda vid Universitetssjukhuset i Lund

Anders Fasth, professor i pediatrik immunologi, avdelningen för pediatrik, institutionen för kvinnors och barns hälsa, Göteborgs universitet, Drottning Silvias barn- och ungdomssjukhus, Göteborg (*Anders.Fasth@pediat.gu.se*)

Stefan Karlsson, professor i molekylärmedicin och genterapi, avdelningen för molekylärmedicin och genterapi, Lunds universitet (*Stefan.Karlsson@molmed.lu.se*)

Bakslag för genterapi:

Två fall av leukemi i fransk studie

|| Våren 2000 rapporterade barnläkarna och immunologerna Marina Cavazzana-Calvo och Alain Fischer från Paris i Science om två barn med svår kombinerad immunbrist (SCID) som framgångsrikt hade behandlats med genterapi [1]. Detta skedde ganska exakt ett decennium efter de första kliniska genterapiförsöken i USA, och efter många års högt ställda förväntningar var detta ett hett efterlängtat genombrott. Efter de första två patienterna inkluderade forskargruppen i Paris ytterligare barn i samma studie, med fortsatt framgång i nästan samtliga fall. Resultaten för de första fem patienterna rapporterades i detalj för knappt ett år sedan i New England Journal of Medicine [2]. Idag har sammanlagt tio barn med SCID behandlats i Paris, och liknande studier har påbörjats på andra ställen i världen.

Fram till början av sommaren 2002 hade man inte sett några önskade effekter av den givna behandlingen, men nu har man drabbats av en allvarlig biverkning som ställer denna nya behandlingsform inför svåra problem. Två patienter i den franska studien har utvecklat leukemi, med största sannolikhet som en följd av behandlingen, vilket har lett till att kliniska genterapiförsök i Europa och USA har stoppats tills vidare.

En hel grupp av ovanliga medfödda sjukdomar

Svår kombinerad immunbrist är egentligen en hel grupp av ovanliga medfödda sjukdomar med olika genetisk bakgrund. I Sverige föds ett till två barn per år med svår kombinerad immunbrist. Den vanligaste formen, och den som forskarna i Paris koncentrerat sig på, är X-bunden och drabbar således nästan undantagsvis pojkar. Vid X-bunden SCID saknas T-celler och NK-celler, medan B-lymfocyter finns i normal eller ökad mängd. Barnen utvecklar ofta infektioner kort efter födseln och dör före 1-årsdagen om de inte får behandling.

Allogen benmärgstransplantation är framgångsrik om dia-

SAMMANFATTAT

Två av de tio barn med svår kombinerad immunbrist (SCID) som hittills framgångsrikt behandlats med genterapi i ett franskt försök har utvecklat leukemi, sannolikt som en följd av behandlingen. Kliniska genterapiförsök i Europa och USA har stoppats tills vidare.

Det faktum att LMO2-genen tycks vara inblandad i bägge de aktuella leukemifallen är anmärkningsvärt. Man spekulerar nu kring möjligheten av interaktion mellan gammakedjan och LMO2 som en möjlig mekanism bakom leukemiutvecklingen.

Uppenbart är att genterapiforskningen, som länge haft bristande effektivitet i genöverföringen som huvudproblem, nu måste sätta säkerhetsfrågorna överst på dagordningen.

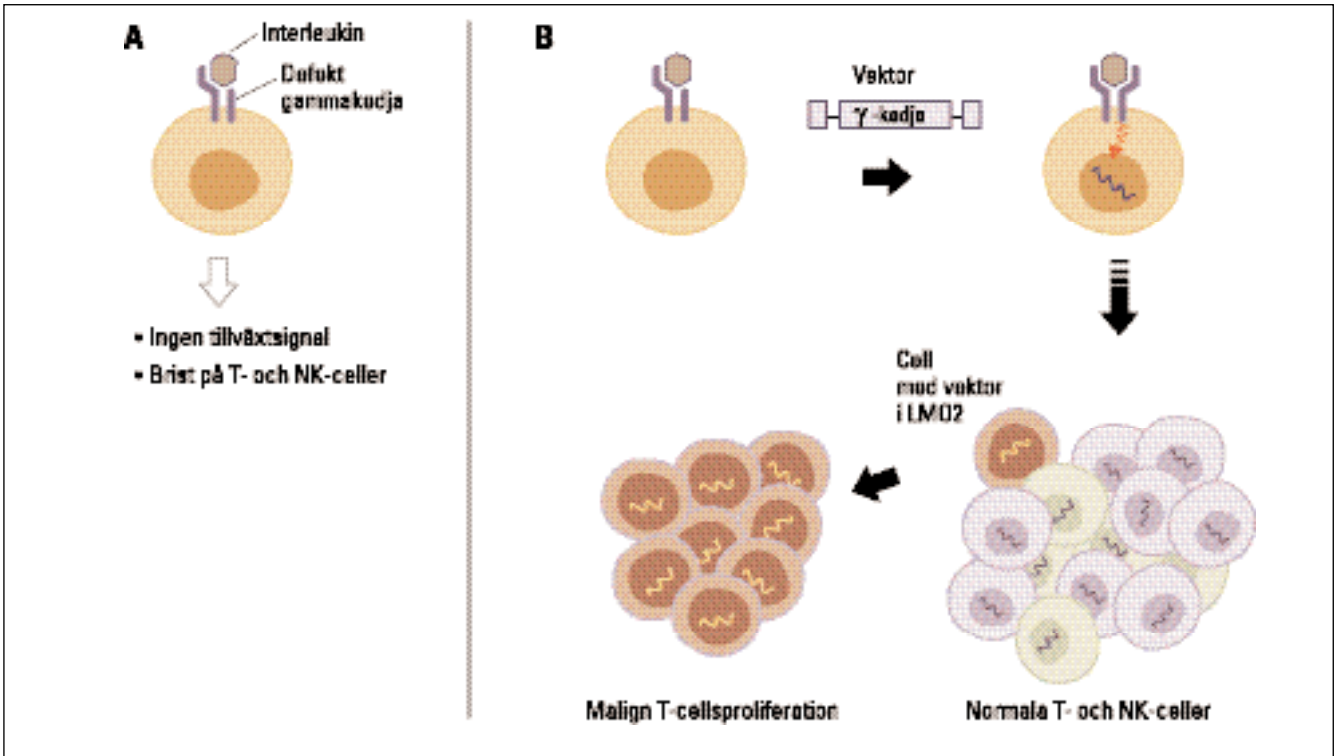
|| Fakta

Retroviral vektor: deaktiverat retrovirus som används för att permanent föra in en gen (cDNA) i målceller.

X-SCID: könsbunden svår kombinerad immunbrist.

Gammakedja: gemensam komponent i receptorerna för interleukin-2, -4, -7, -9, -15 och -21, muterad vid X-SCID.

LMO2: gen på kromosom 11, involverad i akuta leukemier av T-cellstyp.



A. Vid X-SCID föreligger en mutation i gammakedjan, en gemensam komponent i receptorerna för IL-2, -4, -7, -9, -15 och 21, vilket leder till defekt T- och NK-cellsutveckling.

B. Vid genterapi av X-SCID förs en korrekt version av genen för gammakedjan in i celler med en retroviral vektor, vilket normaliserar NK- och T-cellsutvecklingen. Slumpmässig integration av vektorn i eller nära LMO2-genen har dock lett till malign T-cellsproliferation i två fall.

gnosen ställs tidigt och om det finns en lämplig stamcellsdonator (HLA-identiskt syskon) till patienten. Vid sen diagnos och avsaknad av lämplig donator är dödligheten i svåra infektioner hög.

Den genetiska defekt som orsakar X-bunden SCID är en mutation i den gen som kodar för ett protein som utgör en gemensam komponent (gammakedjan) i receptorerna för ett antal interleukiner (IL-2, -4, -7, -9, -15 och -21). Interleukin-7 är nödvändigt för T-lymfocyternas utveckling, interleukin-15 för NK-cellernas. Denna defekt förklarar således bristen på dessa celler hos patienterna. Den gen som kodar för denna gammakedja sitter på X-kromosomens långa arm. Andra former av svår kombinerad immunbrist beror på andra genetiska defekter, varav de flesta är väl karakteriserade vid det här laget.

Vid genterapi av genetiska sjukdomar är målet att föra in en intakt kopia av den muterade genen i de celler där den uttrycks och har en viktig funktion. Vid sjukdomar som påverkar det hematopoetiska systemet utgör ofta de blodbildande stamcellerna målet för genterapin. Bakgrunden är att om den nya genen kan fås att integrera i stamcellernas kromosomer kan den i bästa fall uttryckas i olika blodceller under mycket lång tid, kanske hela individens livstid. Detta beror på stamcellernas förmåga till både självförnyelse och differentiering till alla former av mogna blodceller.

För att föra in den nya genen i celler använder man sig av ett deaktiverat retrovirus (en retroviral vektor). Denna vektor kan binda till celler, internaliseras och få den terapeutiska genen att integrera i målcellernas genom. Ett problem är dock att man med denna metod inte kan styra var i genomet integrationen sker.

Alain Fischer och hans medarbetare skördade benmärgs-celler från de sjuka barnen, selekterade CD34-positiva stam-

celler, odlade dessa i laboratoriet och exponerade dem för en retroviral vektor med cDNA för gammakedjan. Därefter gav man tillbaka de behandlade cellerna till patienterna som en intravenös infusion utan någon annan form av förbehandling. Efter några veckor till månader svarade de flesta av patienterna genom att uppvisa stigande antal T-lymfocyter samt NK-celler. Man kunde också senare med olika analyser påvisa en normalisering av immunförsvaret hos patienterna, som kunde lämna isoleringen på sjukhus och leva ett normalt liv.

En av orsakerna till det goda resultatet var att forskarna fick hjälp på vägen av naturen. Vid denna sjukdom har de genkorrigerade cellerna en överlevnadsfördel framför icke-korrigerade celler. Även om bara en minoritet av cellerna korrigeras in vitro expanderar de kraftfullt in vivo.

Stigande antal lymfocyter i perifert blod noteras

Fram till sommaren 2002 såg allt bra ut, men därefter noterade man hos en av patienterna (nr 4 i serien) successivt stigande antal lymfocyter i det perifera blodet [3]. Detta var cirka två och ett halvt år efter den givna behandlingen. Senare utvecklade patienten även hepatosplenomegali och fortsatt stigande antal vita blodkroppar till $300 \times 10^9/l$. Immunfenotypning visade att det rörde sig om en proliferation av gamma-delta-T-celler. Behandling som vid akut leukemi inleddes under mitten av hösten.

Med hjälp av avancerad polymeraskedjereaktionsteknik (PCR) kunde Christoph von Kalle och medarbetare i Freiburg, Tyskland, påvisa att alla celler i den maligna klonen hade ett gemensamt integrationsställe för vektorn. Detta visade sig vara i en gen på kromosom 11, LMO2. Denna gen är sedan tidigare känd för att vara inblandad i translokationer som leder till akut lymfatisk leukemi av T-cellstyp, och genen

är då ofta överuttryckt [4]. Om LMO2 överuttrycks i möss leder det till T-cells maligniteter.

Omedelbart före jul noterade forskarna i Paris att ytterligare en patient i studien (nr 5) uppvisade stigande lymfocytantal i det perifer blodet. Man kunde även hos denna patient diagnostisera ett snabbt förlöpande lymfoproliferativt tillstånd [5]. Remarkabelt är att man också i detta fall kunde påvisa att vektorn integrerat i närheten av LMO2-genen i de maligna T-cellerna [6].

Tillfälligt stopp för försöken

När myndigheterna i USA och i de flesta europeiska länder fick kännedom om det första leukemifallet beslutade man om ett åtminstone tillfälligt stopp för genterapiförsök av samma karaktär som den franska studien. I Sverige stoppades tre kliniska protokoll i avvaktan på vidare analys. När det andra leukemifallet blev känt stoppade Food and Drug Administration (FDA) i USA alla kliniska försök där retrovirala vektorer används för att föra in gener i hematopoetiska stamceller.

Redan när de första kliniska genterapiförsöken med retrovirala vektorer utfördes för mer än tio år sedan insåg man på teoretiska och experimentella grunder att det fanns en risk för att vektorer skulle kunna integrera på olämpliga ställen och i värsta fall bidra till malignitetsutveckling. I de kliniska studier som utfördes under 1990-talet runt om i världen såg man dock aldrig detta hända i praktiken. Inte heller i musförsök blev detta ett reellt problem förrän nyligen, då Baum och medarbetare i ett musförsök noterade utveckling av akut myeloisk leukemi hos sekundära mottagare av genetiskt modifierad benmärg [7].

Det faktum att LMO2-genen tycks vara inblandad i bägge de aktuella leukemifallen är anmärkningsvärt. Man spekulerar nu kring möjligheten av interaktion mellan gammakedjan och LMO2 som en möjlig mekanism bakom leukemikutvecklingen. von Kalle och medarbetare avser att analysera prov från samtliga patienter i världen (cirka 15 fall) som genomgått genterapi för X-SCID med avseende på vektorintegration i eller i närheten av LMO2. Den kraftiga proliferationen av de genmodifierade cellerna vid X-SCID har troligen också bidragit till det inträffade.

Det är vidare värt att notera att det är de två yngsta barnen i den franska studien som drabbats. En fråga är om den låga åldern vid behandling har haft betydelse för det inträffade.

Frågor om framtiden

Hur skall man då ställa sig till fortsatta genterapistudier? Den huvudfråga som forskare och myndigheter måste försöka besvara är huruvida det inträffade är specifikt för den franska studien, dvs beroende på X-SCID, signalering via gammakedjan och/eller det använda vektorsystemet, eller om problemet gäller alla former av genterapi där vektorer med förmåga att integrera används för att manipulera stamceller. Preliminärt ser problemet ut att vara relaterat till det aktuella protokollet.

Det definitiva svaret på denna fråga blir dock mycket viktigt för hur man skall se på framtida genterapistudier. Därför har ett intensivt arbete initierats för att i detalj studera de molekylära mekanismerna i de aktuella leukemifallen. Troligen är det dock bara fortsatt noggrann långtidsuppföljning av patienterna i denna och andra liknande studier som kommer att kunna ge oss en klar bild av hur stor risken för allvarliga biverkningar är. I de aktuella fallen har det tagit mer än två år innan biverkningarna visat sig. Vi vet inte om ytterligare fall dyker upp med ännu längre latenstid. Ett problem med biverkningar som uppträder efter så lång tid är att de sällan kan av-

slöjas i de prekliniska experiment och djurförsök som måste utföras innan patientstudier inleds.

Säkerhetsfrågorna överst

Vad gäller fortsatta kliniska studier måste patienternas säkerhet självfallet alltid komma i första hand. Det som hänt kräver noggrann analys och värdering av riskerna. Vid sjukdomar där alternativ behandling existerar är det för närvarande inte rimligt att fortsätta pågående studier eller initiera nya protokoll där integrerande vektorer används för att genmodifiera stamceller. Vid allvarliga livshotande tillstånd, där alternativ behandling saknas eller behandlingen är förenad med hög mortalitet, anser vi dock att fortsatta kliniska försök efter en noggrann värdering av risk kontra nytta för den enskilde patienten kan vara berättigade. Vad vi känner till finns dock för närvarande inte några definitiva planer på kliniska genterapiförsök vid SCID eller annan genetisk sjukdom i Sverige.

Uppenbart är att genterapiforskningen, som länge haft bristande effektivitet i genöverföringen som sitt huvudproblem, nu måste sätta säkerhetsfrågorna överst på dagordningen. Vi kan förutse ett intensivt arbete med att utveckla nya, säkrare vektorsystem samt intensifierad grundforskning, med målet att ge oss ökad förståelse för stamcellers funktion. Förhoppningsvis kan dessa insatser lägga grunden för framtida effektiv och säker genterapi.

*

Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

Referenser

1. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum, P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669-72.
2. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002;346:1185-93.
3. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003;348:255-6.
4. Rabbitts TH. Chromosomal translocation master genes, mouse models and experimental therapeutics. *Oncogene* 2001;20:5763-77.
5. Marshall E. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 2003;299:320.
6. Check E. Second cancer case halts gene-therapy trials. *Nature* 2003;421:305.
7. Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002;296:497.