



# Genoverføring – administrasjonsmåter, fordeler, mulige ulemper og farer

---

## TEMA

HANS KROKAN

Institutt for kreftforskning og molekylærbiologi  
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Medisinsk teknisk forskningscenter  
7489 Trondheim

HANS PRYDZ

Email: [hans.prydz@biotek.uio.no](mailto:hans.prydz@biotek.uio.no)  
Bioteknologisenteret i Oslo  
Universitetet i Oslo  
Postboks 1125 Blindern  
0317 Oslo

---

Etter mer enn ti års prøving og feiling er det nå beskrevet vellykkede forsøk på genterapi. For at DNA i gener og genfragmenter skal bli nyttige i behandling av sykdom, må man ha gode metoder for deres overføring til målceller.

Basert på egen forskning og litteraturgjennomgang gis det en kortfattet oversikt over ulike overføringssystemer.

I de fleste tilfeller benyttes en vektor (modifisert DNA/RNA eller plasmid-DNA) som en transportvogn. Retrovirus (RNA-virus) og adenovirus (DNA-virus) er mye brukt. Ikke-virale vektorer kan være plasmid-DNA, liposombundet DNA, protein-DNA-konjugater og kunstige kromosomer.

Retrovirus-vektorer har vært benyttet i ca. 60 % av samtlige genterapiprotokoller. Det er imidlertid vanskelig å produsere store mengder modifiserte retrovirus på en økonomisk måte, slik at denne transportmekanismen benyttes i særlig grad ved ex vivo genterapi. I slike situasjoner er antallet celler som vektoren skal overføres til, langt færre enn ved in vivo-genterapi.

Ved økende kunnskap om genomet er det blitt åpenbart at visse gener helt eller delvis kan vikariere for hverandre med hensyn til funksjon, men de uttrykkes ikke samtidig i pasientens liv eller på samme sted i kroppen. Dette gjør at man kanskje i fremtiden kan slippe å tilføre et nytt gen til pasienten, og i stedet endre regulering av et annet gen med noenlunde tilsvarende funksjon.

Defekt immunforsvar og økt blødningstendens er de to første genetisk betingede tilstander hvor forsøk på genterapi har gitt positive resultater (1). Grunnene til at det har tatt ti år for å komme dit, er å søke på flere problemområder:

- – Hvordan skal det nye genetiske materialet tilføres til celler (ex vivo) eller til hele individet (in vivo)?
- – Hvordan skal man sikre seg at det nye genetiske materialet kommer til uttrykk og ikke "forstummer" etter kortere eller lengre tid?
- – Hvilken strategi bør velges for terapiforsøkene?
- – Hvordan skal man unngå bieffekter?

Denne artikkelen dreier seg særlig om det første spørsmålet. For at DNA i gener eller genfragmenter skal kunne bli nyttig i behandling av sykdom, må man ha gode metoder for overføring til målceller der det nye DNA kan komme til uttrykk i form av RNA og protein. Sikre og effektive overføringssystemer er i dag det største hinderet når det gjelder å utnytte det store behandlingspotensialet som genterapi representerer. En detaljert innføring i overføringssystemer som brukes til genterapi, er utenfor rammen av denne artikkelen. En mer utførlig innføring kan finnes i flere nyere oversiktsartikler (2 – 4).

For enkelte hyppig brukte virusbaserte overføringssystemer har det vist seg å være vanskelig å fremstille tilstrekkelige mengder av genetisk endrede viruspartikler. De viktigste eksempler her er retrovirusderivater og adenoassosiert virus (AAV). Disse systemene har imidlertid hatt stor betydning ved å demonstrere genterapi som mulig terapeutisk prinsipp. Både terapeutisk effektivitet, sikkerhet og mulige problemer kan først belyses tilstrekkelig når effektive overføringssystemer er blitt utviklet.

Administrasjon av syntetiske, forholdsvis små, DNA-molekyler (syntetiske oligonukleotider) for målrettet påvirkning av genuttrykket, representerer en annen form for terapi som de fleste nå regner med til genterapi. Ved denne formen for behandling vil ikke det tilførte DNA kunne mangfoldiggjøres i cellene eller bygges inn i DNA. Det må tilføres forholdsvis store mengder oligonukleotid ved injeksjon. Oligonukleotidene vil så gradvis elimineres fra cellene ved ulike mekanismer. Denne formen for genterapi likner prinsipielt mye på konvensjonell behandling med legemidler, men kan ha mye større selektivitet og øker på en dramatisk måte antall mulige mål (targets) for terapi. Man kan inndele somatisk genterapi i tre kategorier:

- – Ex vivo, der man tar celler ut av kroppen, behandler dem med vektoren som bærer det terapeutiske DNA og setter de genetisk endrede cellene tilbake i organismen. Dette har foreløpig vært mest aktuelt for blodceller og hudceller
- – In situ, der man plasserer vektoren som bærer terapeutisk DNA, direkte inn i det vevet der det nye genet skal virke. Dette har vært utprøvd for luftveier/lunger ved cystisk fibrose og ved enkelte kreftformer
- – In vivo, der vektoren med terapeutisk DNA f.eks. kan injiseres i blodet for deretter å bli tatt opp i målceller.

Det er foreløpig få eksempler på sistnevnte form for genterapi. Dette antas imidlertid å ville bli en hovedform for genterapi når egnede overføringssystemer er blitt utviklet. Syntetiske oligonukleotider vil trolig bare være relevant for in vivo-behandling.

De sikkerhetsmessige problemene, slik man ser det i dag, er i hovedsak relatert til mulige sykdomsfremkallende virkninger av virusbaserte systemer, samt geninaktivering pga. innsetting av DNA på steder der det nye DNA kan inaktivere gener i kromosomet. I tillegg må man anta at uttrykk av et nytt gen i store mengder, eller i celler der det normalt ikke skal komme til uttrykk, i noen tilfeller kan medføre utilsiktede bivirkninger. Det har også vist seg at terapeutisk DNA som er tatt opp i celler i noen tilfeller bare virker i en periode for så å bli borte. Dette er et vanlig problem når nytt DNA ikke er integrert i kromosomalt DNA. For noen systemer er det et problem at vektoren bare tas opp og/eller kommer til uttrykk i noen av målcellene, f.eks. bare i celler som deler seg.

## Kort innføring i overføringssystemer

### VEKTORER BASERT PÅ VIRUS

Både RNA-virus og DNA-virus er benyttet som overføringssystemer ved genterapi. De mest benyttede virus er gitt i tabell 1. I tillegg har Sendaivirus (et kappekledd RNA-virus) vært brukt. Ideelt sett skal en virusbasert vektor gi regulert uttrykk av det terapeutiske DNA kun i målcellene, og ikke i andre celler, den skal gi en stabil og varig produksjon og være ufarlig for verten. Videre bør det være praktisk mulig å produsere overføringssystemet i tilstrekkelige mengder på en kostnadseffektiv måte og med minimal variasjon mellom produksjonsenhetene. I tabell 2 gis det en oversikt over egenskaper som tilstrebes hos tredjegerasjons virusvektorer.

<b>Tabell 1</b> Vektorer brukt i genterapi, modifisert etter (3)
<i>Virusbaserte vektorer</i>
Retrovirus (RNA-virus) herunder lentivirus
Adenovirus (DNA-virus)
Adenoassosiert virus (DNA-virus)
Herpes simplex-virus (DNA-virus)
Vacciniavirus (DNA-virus)
<i>Ikke-virale vektorer</i>
Plasmid-DNA
Liposombundet-DNA
Protein-DNA-konjugater
Kunstige kromosomer

<b>Tabell 2</b> Egenskaper hos den ideelle virusvektor
Ikke humanpatogen
Ikke immunogen
Ingen ekspresjon i antigenpresenterende celler
Lett å produsere i høyt titer
Evne til å "bære" et stort stykke DNA
Uttalt cellulær tropisme (virus går inn bare i en eller noen få celletyper)
Definert og ufarlig innsetningssted i genomet
Ingen fare for rekombinasjon med andre virusrester i genomet
Forsynt med cellespesifikke og regulerbare sekvenser for styring av uttrykket av det innsatte gen

Ingen systemer oppfyller disse kravene i dag. For å minimalisere risikoen for at viruset skal forårsake sykdom, benytter man virus som er endret på en slik måte at sykdomsfremkallende gener ikke er til stede, eller virus som ikke gir kjent sykdom hos mennesket. Viruset bør være replikasjonsdefekt for å redusere mulig risiko. Genet av interesse settes inn i virusgenomet i en region der det erstatter arvemateriale som ikke er nødvendig, verken for virusets formering inne i cellen, for integrering i vertscelle-DNA (for virus som har evne til integrering) eller for danning av proteiner som danner kapsid (viruskappen). Proteiner i viruskappen er nødvendige for opptak i målcellen. For å oppnå selektivt opptak av viruset i målcellene, kan man benytte virus som naturlig bare tas opp i målcellene. For eksempel vil mange adenovirus normalt bare tas opp av celler i luftveiene. Man kan også utstyre vektoren med nytt arvemateriale som danner modifiserte

kappeproteiner som medfører gjenkjenning og selektivt opptak i bestemte målceller. Det er også mulig å oppnå selektiv virkning i bestemte målceller ved å uttrykke det terapeutiske genet under kontroll av en promoter som bare er aktiv i målcellene.

## RNA-VIRUS

Det har vist seg vanskelig å produsere store mengder modifiserte retrovirus på en kostnadseffektiv måte. Det er vanskelig å se at dette problemet for "vanlig" retrovirus (for eksempel MuMLV) kan bli løst på kort sikt. Det er derfor sannsynlig at slike retrovirus i hovedsak vil bli brukt til genterapi ex vivo, der antall celler som vektoren må overføres til, er langt lavere enn in vivo. Vektoren kan bare produseres i levende celler. Fordi den i seg selv er replikasjonsdefekt, må den produseres i spesielle "pakkeceller" som kompenserer for defekten i vektoren. En potensiell fare er at det kan oppstå replikasjonskompetente virus ved rekombinasjonsprosesser under produksjonen. Pattedyrceller inneholder oftest endogene retrovirus, eller i det minste rester av retrovirussekvenser i kromosomet. Det er derfor mulig at patogene retrovirus kan dannes ved rekombinasjonsprosesser i cellene. Også i produksjonssammenheng og med hensyn til fare for uønsket rekombinasjon vil kanskje de nye "strippede" lentivirusbaserte vektorer vise seg å være enklere å håndtere.

*Retrovirus*. Retrovirusvektorer har vært benyttet i ca. 60 % av samtlige kliniske genterapiprotokoller (2). En rekke ulike genetisk modifiserte retrovirus har vært prøvd, blant disse er genetisk modifisert murint leukemivirus (MuLV) hyppigst brukt. Retroviruspartikler inneholder en polymerase (revers transkriptase, RT) som kan lage en DNA-kopi av RNA-arvematerialet ved "revers transkripsjon", derav navnet retrovirus. I tillegg inneholder viruspartikkelen en integrase som er nødvendig for integrering. Evnen til integrering gjør retrovirusvektorer prinsipielt vel egnet for genterapi. Det er en dobbeltrådet DNA-kopi av retrovirus-RNA som integreres i vertscellens kromosomer som såkalte provirus. Integreringen medfører at det nye DNA kopieres og arves av begge dattercellene ved deling og medfører dermed at DNA arves stabilt, i motsetning til DNA fra virusvektorer som ikke har evne til integrering. I modifiserte retrovirusvektorer kan man sette inn nytt DNA med størrelse opp til åtte kilobaser (kb). Retrovirus har vært mest brukt i ex vivo-sammenhenger, f.eks. til genterapi på blodceller tatt ut av pasienten. Begrenset opptak i de relevante celler via den naturlige MuLV-reseptoren er et av problemene med slike vektorer. Andre problemer er knyttet til lavt opptak i ikke-delende celler. I tillegg må man regne med problemer relatert til inaktivering av gener der retrovirus-DNA integreres. Problemet lavt opptak av vektor i ikke-delende celler kan kanskje løses ved bruk av nye retrovirusvektorer basert på lentivirus som er den typen retrovirus som bl.a. HIV-1 (5) tilhører. Lentivirusbaserte vektorer tas opp i delende og i ikke-delende celler. Som de øvrige retrovirus integreres disse vektorer i genomet i mål-

cellene. På grunn av at lentivirus i utgangspunktet har begrenset målcellerepertoar (til CD4-positive celler), har man laget hybridvektorer der "innmaten" er fra for eksempel HIV-1, mens innpakningen, som bestemmer hvilke celler som virus kan invadere, for eksempel har vært fra Vesicular stomatitis virus (VSV) eller fra MuLV. Ved å fjerne alt unødvendig (i vektorsammenheng) genetisk materiale fra lentivirusvektor-RNA har man gjort vektor så uskadelig som mulig uten å redusere overføringseffektiviteten til ikke-delende celler.

## DNA-VIRUS

*Adenovirus*. Adenovirus (AV) er dobbeltrådet DNA-virus som infiserer mange celletyper, men særlig celler i luftveier. De adenovirus man kjenner, gir milde luftveissymptomer eller er ikke sykdomsfremkallende. Det er de mest vanlig brukte virus (særlig serotype 2 og 5) for in situ overføring av terapeutisk DNA, for eksempel i forsøk på behandling av cystisk fibrose der luftveisproblemer ofte er dominerende. AV-vektorer har også den fordel at de kan ta opp større mengder terapeutisk DNA (opp til 35 kb) enn retrovirusvektorer.

AV integreres ikke i kromosomalt DNA, men replikerer i cellekjernen. AV har bl.a. den fordel at de infiserer både delende og ikke-delende celler, i motsetning til retrovirus.

Forsøk der AV-vektorer har vært brukt har vist at man kan oppnå betydelig uttrykk av markørgener, f.eks.  $\beta$ -galaktosidase, eller terapeutiske gener, f.eks. cystisk fibrose-transmembranalt protein (CFTR), men responsen er kortvarig. Dette medfører at det vil være behov for gjentatte overføringer. Dette kan kompliseres av immunologiske og inflammatoriske responser som beskrevet nedenfor.

Førstegenerasjonsvektorer med defekter i "early region" (E1) som gjør dem replikasjonsdefekte, og defekter i E3 (for å få plass til innsatt terapeutisk DNA), har vist seg å gi betydelige inflammatoriske responser og immunresponser. Dette vil begrense muligheten for gjentatte in situ-behandlinger. Det har vært arbeidet videre med genetiske modifikasjoner av AV-vektorer for å eliminere inflammasjons- og immunresponser, ved å fjerne så mange AV-gener som mulig, men problemet er foreløpig ikke entydig løst. Det første dødsfall i forbindelse med en genterapiprotokoll har skjedd etter intravenøs infusjon av en adenovirusbasert vektor med høyt titer ( $10^{13}$  partikler). Til tross for disse problemene er AV-vektorer lovende og gjenstand for intens forskning og utvikling.

*Adenoassosiert virus (AAV)*. AAV inneholder enkelttrådet DNA og er et ikke-patogent parvovirus som krever koinfeksjon med AV-hjelpevirus eller enkelte typer herpesvirus for å kunne replikere. De er vanlige i mennesket og infiserer om lag 80 % av den humane populasjonen. De replikerer som dobbeltrådet DNA. I fravær av hjelpevirus integrerer AAV-DNA i en bestemt region på den korte armen av kromosom 19. Det er bl.a. den tilnærmede setespesifikke integreringen som gjør AAV til attraktive kandidater som vektorer for genterapi. AAV er små virus (doppeltrådet replikasjonsintermediat er bare 4,7 – 4,8 kb), men over 95 % av virale sekvenser kan fjernes og således gi rom for ca. 4,7 kb terapeutisk DNA. Dette er likevel for lite for et stort antall gener, og størrelsen representerer et problem. Et annet problem er at integrert AAV kan reaktiveres ved senere infeksjon med AV som kan virke som hjelpevirus. AAV vil da skjæres ut fra kromosomet. Videre mangler mange deleterte AAV evne til spesifikk integrering. I tillegg har man ikke foreløpig velegnede pakkeceller for effektiv produksjon av vektor (3). Til tross for disse begrensninger er AAV gjenstand for intens forskning og utvikling. I dyremodeller (mus og hund) er det oppnådd frapperende resultater med langvarig delvis korreksjon (over åtte måneder for hund og over 17 måneder for mus) av hemofili B etter infusjon av rekombinante AAV-vektorer i portvenen eller halevenen (8).

## Andre overføringsmekanismer

En rekke andre innføringsmetoder for DNA er blitt forsøkt og mange av disse er under stadig forbedring. Det gjelder innføring av plasmider ("nakent" DNA), ved hjelp av injeksjoner og direkte umediert opptak, kationiske liposomer eller liposomer med antistoffer mot målcellens overflatekomponenter, elektriske utladninger, eller direkte ved at målcellene beskyttes med små, DNA-kledde partikler fra gassdrevne pistoler. Binding av plasmid til målcellenes overflate ved hjelp av reseptorbinding eller antistoffbinding kan gi stort bidrag til spesifisiteten.

Plasmider inkorporeres bare sjelden i genomet. Vel inne i målcellen vil de kunne uttrykke det gen de er utstyrt med, men er samtidig gjenstand for en langsom degradering forårsaket av cellens egne enzymer. Plasmider kan lett utstyres med vevsspesifikke kontrollelementer (promotere, positive og negative regulerende elementer) som begrenser uttrykket av det innførte gen til for eksempel en celletype.

Antallet slike vevsspesifikke promotersystemer øker stadig. Det finnes også en økende mengde systemer der uttrykket av det tilførte gen kan skrues av og på. Med stadig økende kjennskap til genregulering kan plasmidene etter hvert forventes å utvikles til høy grad av presisjon med hensyn til hvor de tas opp og når, hvor og hvor mye de gener de bærer, uttrykkes. De gener som har vært eller kan tenkes benyttet, kan være knyttet til en rekke mulige strategier (prodrug, økt stimulering av pasientens immunapparat, nedsatt cellegiftresistens i kreftceller/økt cellegift resistens i for eksempel beinmargceller). Et

annet nytt og prinsipielt annerledes redskap for innføring av gener i en celle er de såkalte "Human Artificial Chromosomes" (HACs). Dette er modellkromosomer, fremstilt ut fra den ervervede kunnskap om hvilke elementer i et kromosom som er nødvendige for dets funksjon (telomerer, centromer, armer hvori innsatt mer eller mindre komplette gensekvenser). I dyreforsøk med tilsvarende "Mouse Artificial Chromosomes" (MACs) har man fått slike kromosomer til å replikeres (det vil si at hvert kromosom kopieres) og til å segregere (det vil si at de kunstige kromosomene fordeler seg likt på de to datterceller og dermed nedarves). Det peker på muligheten til at man kan etablere kunstige humane kromosomer hvor de gener man ønsker innført, kan settes inn i disse på en vel kontrollert og regulert måte. Vel inne i cellekjernen vil genene i kunstige kromosomer kunne uttrykkes og reguleres så virkelighetsnært som mulig. Ved å benytte kunstige kromosomer unngår man problemer med å introdusere mutasjoner i genomet (det terapeutiske genet integreres i omr&ari

ng;det for et annet gen og kan ødelegge dette).

## Antisensoligonukleotider og ribozymmer

Korte sekvenser av DNA-byggesteinene A, C, G, T kan velges slik at de er motsvarende (komplementære og antiparallele) til rekkefølgen av byggesteinene i et bestemt område av et bestemt gen hvis uttrykk vi ønsker å påvirke (målgenet). Hvis disse bygges inn i en kjede av passende lengde (minst 18 – 20 byggesteiner), kan denne kjeden binde seg med høy grad av spesifisitet til det motsvarende området på målgenet eller på målgenets kopi i form av budbringer-RNA. Da forårsakes både en ødeleggelse av budbringer-RNA og en forsinkelse eller stopp i nydanningen av dette RNA (7). Enda mer effektivt kan uttrykket av et gen undertrykkes ved hjelp av ribozymmer, hvor antisenseeffekten kombineres med en enzymatisk kløvende effekt på budbringer-RNA (6). Ribozymmer er korte, 30 – 50, kjeder av modifiserte DNA- eller RNA-byggesteiner som har den egenskap at de kan binde seg til bestemte deler av RNA-tråden og kutte den over slik at den ikke lenger kan tjene som budbringer med instruksjoner fra arvestoffet i kjernen til cellens cytoplasma. Effekten av slike ribozymmer kan se ut til å være av et halvt til ett døgn varighet, og man kan derfor tenke seg for eksempel å undertrykke uttrykket av et gen med en daglig tilførsel av ribozym. Det er diskutabelt om strategier basert på antisens- og ribozymteknologi bør høre inn under begrepet "genterapi". Foreløpig gjør det det i norsk terminologi, og en rekke kliniske forsøk basert på disse prinsipper er i gang i andre land.

## Andre strategier

Etter hvert som kjennskapet til det humane genom øker, fremkommer stadig flere eksempler på gener som helt eller delvis kan vikariere for hverandre med hensyn til funksjon, men som ikke uttrykkes samtidig i pasientens liv eller på samme sted i pasientens kropp. Ved monogene sykdommer basert på bortfall av et gen, for eksempel  $\beta$ -talassemi, kan det motsvarende gen som uttrykkes under fosterlivet, vikariere hvis det får komme til uttrykk. Her kreves det altså ingen tilførsel av nytt gen, men en påvirkning eller endring av genets reguleringsmekanisme.

En annen type inngrep som vanligvis ikke regnes inn under begrepet genterapi, men som likevel frembyr muligheter for korreksjon av genfeil, er metoder bygd på kjernetransplantasjon. Ved feil i det mitokondriale genom, kan man overføre cellekjernen, som er uten genfeil, til en annen kjerneløs celle – en ubefruktet eggcelle med normalt mitokondriegenom hvor den opprinnelige kjerne er fjernet.

---

### LITTERATUR:

1. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288: 669 – 72.

2. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature* 1998; 392 (suppl 6679): 25 – 30.
3. Desnick RJ, Schuchman EH. Gene therapy for genetic diseases. *Acta Paediatr Jpn* 1998; 40: 191 – 203.
4. Cusack JJ, Tanabe KK. Cancer gene therapy. *Surg Oncol Clin North Am* 1998; 7: 421 – 69.
5. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 1998; 72: 9873 – 80.
6. Amarzguioui M, Prydz H. Hammerhead ribozyme design and application. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 1175 – 202.
7. Crooke ST. Advances in understanding the pharmacological properties of antisense oligonucleotides. *Adv Pharmacol* 1997; 40: 1 – 49.
8. Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF et al. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 1999; 5: 64 – 70.
9. Verma IM, Somia N. Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389: 239 – 42.

---

Publisert: 7. september 2016. Tidsskr Nor Legeforen. DOI:

© Tidsskrift for Den norske legeforening 2020. Lastet ned fra tidsskriftet.no