



Genterapi

Utvecklingen av genterapi har pågått under flera decennier, men först nu kan man se positiva kliniska resultat. Som behandling av Parkinsons sjukdom är forskningsområdet på stark framfarsch och tekniken öppnar väg för förbättrad behandling. I denna artikel ger **Carl Rosenblad**, med dr och specialistläkare i neurologi vid Skånes universitetssjukhus, Lund, en översikt om dagens kunskapsläge.

“Utvecklingen har pågått under tre decennier men det är först nu som de första positiva kliniska resultaten med genterapi börjar skönjas.”

vid Parkinsons sjukdom

Genterapi utgör ett samlingsbegrepp för ett flertal olika behandlingsmetoder där den gemensamma nämnaren är att introducera genetiskt material med en terapeutisk effekt i patienten. Det överförda genetiska materialet i sin tur kodar för proteiner eller RNA med olika effekter i kroppen. Det kan vara enzymer, proteiner med effekt på cellöverlevnad och regeneration (tillväxtfaktorer), transkriptionsfaktorer m.m. Vid monogenetiska sjukdomar kan det terapeutiska materialet till exempel vara en korrekt kopia av en defekt gen. Vid andra typer av sjukdomar där den genetiska bakgrunden är oklar, kan det genetiska materialet hjälpa till att motverka sjukdomsprocesser eller verka symptomlindrande. Utvecklingen har pågått under tre decennier men det är först nu som de första positiva kliniska resultaten med genterapi börjar skönjas. Till exempel har man kunnat återskapa en låg men kliniskt signifikant nivå av faktor IX vid hemofili, så att patienterna kunnat minska eller i vissa fall helt avsluta sin behandling med faktorkoncentrat.¹ Man har också förbättrat synen hos patienter med Lebers kongenitala amauros genom tillförsel av en icke-defekt kopia av RPE65-genen.² Genom att med genterapi modifiera T-celler så att de uttrycker en alternativ antigen-receptor har man lyckats uppnå långtidsremission hos patienter med behandlingsrefraktär akut lymfatisk leukemi.³

Också vid olika neurologiska sjukdomstillstånd sker utveckling av genterapibehandlingar. Vid Parkinsons sjukdom är forskningsområdet på stark frammarsch och till dags dato har över 200 patienter med Parkinsons sjukdom erhållit genterapibehandling inom ramen för olika kliniska studier. Vid dessa

har man tillfört gener kodande för tillväxtfaktorer^{4,5}, olika enzymer som deltar i bildandet av dopamin (den signalsubstans som är mest sänkt vid Parkinsons sjukdom)⁶⁻⁸ eller den inhibitoriska signalsubstansen GABA^{9,10}.

HUR GÅR BEHANDLINGEN VID GENTERAPI TILL?

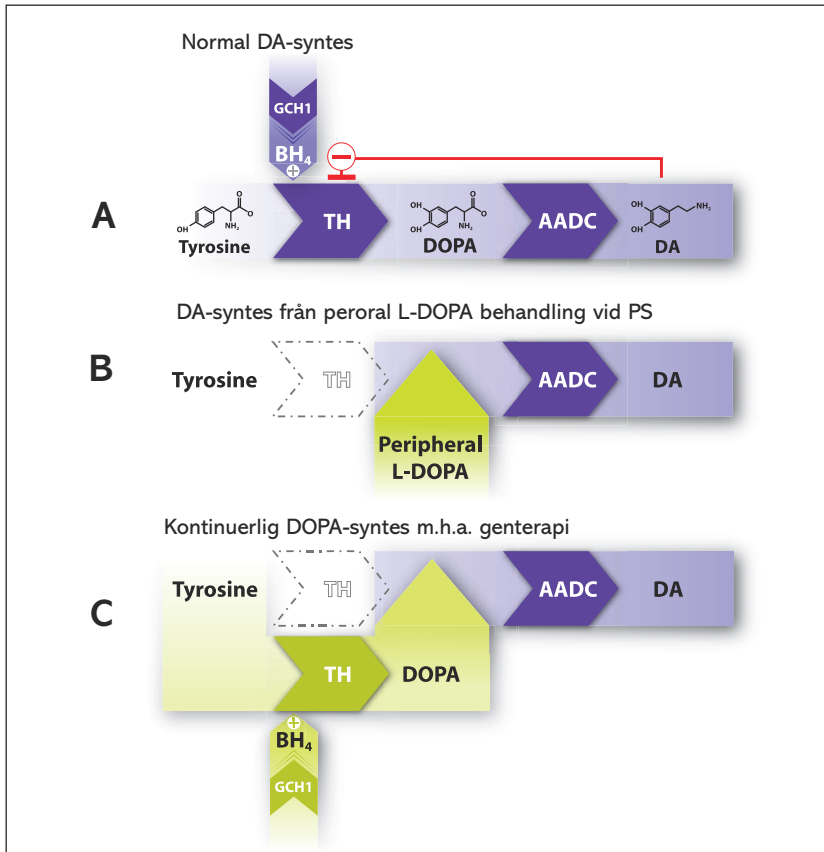
De flesta behandlingsmetoder använder sig av modifierade virus, s.k. rekombinanta virus, som bärare av de gener man vill leverera. Dessa kan sedan ges lokalt genom injektion eller systemiskt beroende på var man önskar sin effekt. Det rekombinanta viruset är förändrat i sina egenskaper så att de inte ska kunna föröka sig eller sprida sig och innehåller inte sina vanliga sjukdomsalstrande egenskaper utan har endast kvar sin förmåga att infektera en cell och där lämna "sitt" genetiska material, det vill säga de gener vars terapeutiska egenskaper man vill tillföra. Många olika typer av rekombinanta virus (s.k. vektorer) har utvecklats för experimentell användning i laboratorier, men den vektor som kommit längst när det gäller klinisk användning är rekombinant adeno-associerad virus (rAAV) som tillhör gruppen parvovirus. Man känner idag inte till några sjukdomar som den naturligt förekommande formen av denna virustyp ger upphov till hos människan. Den har visat sig ha flera goda egenskaper för användning i nervsystemet såsom förmåga att infektera nervceller och inte integrera i genomet, vilket bidrar till en god säkerhetsprofil då det minimerar risken för uppkomst av oönskade tumörer genom så kallad insertionsmutagenes. Men kanske viktigast av allt är att de har förmågan att bibehålla sitt genuttryck under lång tid. I studier på

primater där man injicerat rAAV-AADC (ett enzym som omvandlar dopa till dopamin; se Figur 1) har man sett att uttrycket av AADC varit aktivt och mätbart upp till 8 år efter injektion i putamen¹¹, och hos patienter med Parkinsons sjukdom har man på motsvarande sätt kunnat mäta uttrycket av AADC 4 år efter injektion av rAAV-AADC¹². Förmågan till långvarigt genuttryck bedöms vara kliniskt viktigt vid behandling av t.ex. neurodegenerativa tillstånd som sträcker sig över många år.

När det gäller genterapi i CNS injiceras vektorerna med sitt genetiska material lokalt i hjärnan. Injektionen görs med stereotaktisk operationsteknik, vilket är en vanlig neurokirurgisk teknik som används till exempel för att placera in elektroder vid behandling med DBS (deep brain stimulation). När vektorn deponerats i hjärnan där man önskar att de aktuella generna skall verka och utöva sin terapeutiska effekt, infekteras celler i närområdet (inom någon centimeter) från injektionsstället. Vid Parkinsons sjukdom har man använt putamen och substantia nigra som målområden då det är i dessa strukturer bristen på dopamin är som störst och som man bedömer är centrala för uppkomsten av framför allt många rörelsesymtom vid Parkinsons sjukdom.

ENZYMER VERKSAMMA I DOPAMIN-SYNTESEN

Ett område där mycket utveckling för närvarande sker, är de behandlingar som riktar in sig på genterapi av enzymer verksamma i ett eller flera steg av dopaminsyntesen. Med dessa hoppas man kunna återställa en basal nivå av dopamin i de områden av hjärnan där detta redu-



Figur 1. Schematisk teckning av de enzymer som behövs vid bildning av dopamin (A). Tyrosin hydroxylas (TH) är första steget i omvandlingen av aminosyran tyrosin, och för sin funktion behöver TH ko-faktorn tetrahydrobiopterin (BH₄) vilket bildas av GTP-cyklohydrodrolas 1 (GCH1). Aromatisk aminosyradekarboxylas (AADC) konverterar slutligen dopa till dopamin. Från klinisk erfarenhet vet man att eftersom L-dopa fungerar som medicin på människa så finns en resterande AADC-kapacitet i hjärnan även hos patienter med långt framskriden Parkinsons sjukdom. (B) Vid Parkinsons sjukdom kan bortfallet i dopamin ersättas genom peroral L-dopa som sedan av AADC i kvarvarande monoaminerga terminaler omvandlas till dopamin. (C) Genom att med genterapi tillföra TH och GCH1 kan man skapa en kontinuerlig tillförsel av dopa lokalt i hjärnan. Reproducerad efter Carlsson et al. Restoration of the striatal dopamine synthesis for Parkinson's disease: viral vector-mediated enzyme replacement strategy. *Curr Gene Ther* 2007; 7(2):109-20.

cerats som en konsekvens av den neurodegenerativa processen. Figur 1 illustrerar de enzymer som behövs i omvandlingen av aminosyran tyrosin till dopamin och baserat på denna modell har flera olika tänkbara terapier beforskats. I en nyligen publicerad klinisk studie har franska och brittiska forskare rapporterat att man behandlat 15 patienter med en vektor som bär på alla de tre gener som behövs för dopaminproduktion (TH, GCH1 och AADC; se Figur 1). Denna vektor (ProSavin®) har man injicerat i putamen hos patienter med fluktuerande behandlingssvar på sedvanlig peroral läkemedelsbehandling och dessa har sedan följts under 12 månader.⁸ När man mätt patienternas motoriska funktion med hjälp

av UPDRS (del III) så har denna varit signifikant förbättrad vid 6 och 12 månader efter behandlingen.

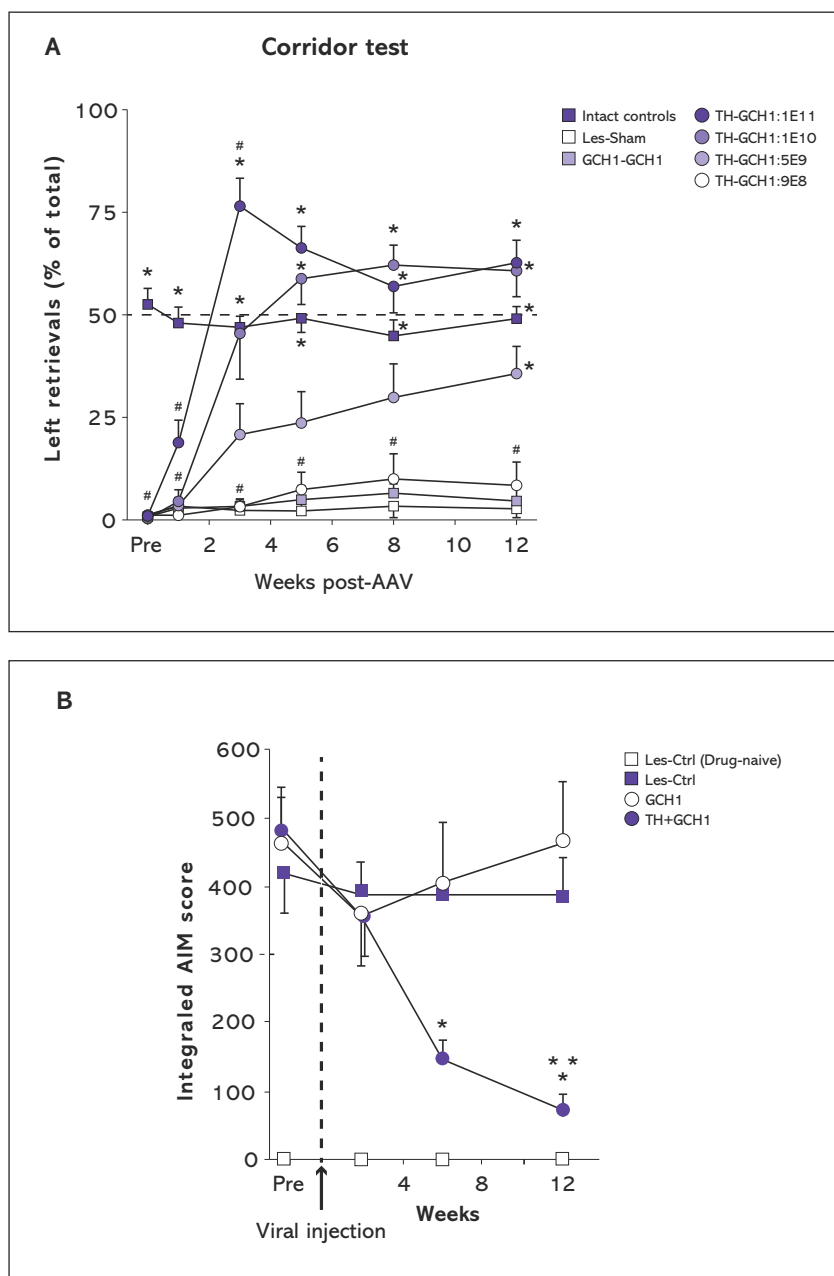
En liknande metod som till stor del forskats fram och nu är under utveckling i Lund syftar till att leverera två gener, tyrosin hydroxylas (TH) och GTP-cyklohydrodrolas 1 (GCH1).¹³ Dessa två gener kodar för enzymer som är nödvändiga för bildandet av DOPA, vilket motsvarar L-dopa i den vanliga farmakologiska behandlingen av Parkinsons sjukdom (Figur 1B och 1C).

BRISTER HOS DAGENS TABLETTBEHANDLING

Men varför då använda en komplicerad procedur som genterapi för att skapa

dopa som vi redan idag kan få i tablettform? De många årens erfarenhet av klinisk användning av peroral L-dopa gör att det idag finns välgrundad kunskap om såväl dess effekter som dess brister och tillkortakommanden, och vilka förbättringar i behandlingen man skulle vilja uppnå. Kliniskt är det framför allt två aspekter man hoppas kunna förbättra med hjälp av genterapi och som bedöms vara viktiga för hur bra behandlingseffekten med dopa under lång tid blir. Det ena är de fluktuationer i det kliniska behandlingssvaret, s.k. on-off-fluktuationer, som många patienter upplever besvärande. Här kan genterapi ge en jämn kontinuerlig tillförsel av dopa istället för de svängande blodkoncentrationer man får vid tablettbehandling. Det andra är de ofrivilliga rörelser, s.k. dyskinesier, som ofta utvecklas efter många års behandling med peroralt L-dopa. En tredje möjlig fördel med genterapi är att behandlingen blir anatomiskt begränsad till de områden av hjärnan där dopaminbristen är mest uttalad. Därigenom undgår man att behandla övriga kroppen och hjärnan med dopa vilket kan vara fördelaktigt ur en biverkningssynpunkt, något som dock är svårt att utvärdera mer systematiskt innan man genomför kliniska prövningar.

Experimentellt har forskarna i Lund genomfört en serie experiment där man studerat dessa aspekter. Hos djur med låga dopaminnivåer i striatum (motsvarande nc. caudatus och putamen hos människa) och åtföljande parkinsonliknande symtom, kan man återskapa en dopaminsyntes i basala ganglierna genom tillförsel av TH/GCH1. Detta leder i sin tur till effektiv lindring av dopaminavhängiga symtom. Ett av dessa experiment illustreras i Figur 2A där man ser en dosberoende normalisering av den motoriska förmågan under ett antal veckor efter tillförsel av TH/GCH1.¹⁴ Vidare har man på djur som utvecklat dyskinesier efter L-dopabehandling sett att om man behandlar djuren med TH/GCH1 så minskar mängden dyskinesier som uppkommer efter en ny peroral dos av L-dopa vilket illustreras i Figur 2B.¹⁵ Resultatet förefaller något paradoxalt eftersom man ger dubbla behandlingar (dopa genom genterapi OCH peroralt L-dopa) men förklaringen står sannolikt att finna i



Figur 2. (A) Vid genterapi med TH och GCH1 (rAAV-TH/GCH1) har man visat att motoriska symtom orsakade av dopaminbrist i putamen/nc. caudatus kan minskas eller helt normaliseras på ett dosberoende sätt under veckorna efter behandlingen. Med ökande mängd rAAV-TH/GCH1 (relativ dos 1x, 5x, 10x, 100x) sker normaliseringen av funktionen snabbare. Den streckade linjen (vid 50) representerar normalt värde och 0 utgör en total avsaknad av funktion i den "parkinsonistiska" sidan. (B) Samtidigt som symtomen lindras minskar mängden L-dopa inducerade dyskinesier, mätt som AIM score, efter genterapi med TH/GCH1. Hos försöksdjur med etablerad L-dopa-inducerad dyskinesi innan behandling med TH/GCH1 (pre) såg man en gradvis minskning av AIM score under veckorna efter behandling med TH/GCH1 (TH+GCH1), något som inte sågs i kontrolldjur (Les-ctrl resp. GCH1). Djur med dopaminbrist men utan tidigare exponering för L-dopa visade som förväntat heller ingen dyskinesi (Les-ctrl drug-naive). (*) Signifikant skiljt från icke-behandlade kontroller.

Grafen 2A är gjord efter Cederfjäll et al. Continuous DOPA synthesis from a single AAV: dosing and efficacy in models of Parkinson's disease, *Sci Rep* 2013; 3:2157; och 2B är gjord efter Carlsson et al. Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous l-dopa using AAV vectors, *Brain* 2005; 128:559-569.

den kontinuerliga tillförsel man uppnår med genterapi och att detta normaliserar mängden dopaminreceptorer. I studier där man med PET-teknik undersökt inbindningen till dopaminreceptorer har man sett en normalisering av den receptorsupersensitivitet som annars uppstår vid dopaminbrist.¹⁶ Den nya metoden är för närvarande under utveckling och förhoppningen är att snart framöver kunna pröva den även på patienter med Parkinsons sjukdom.

VILKEN PLATS KAN GENTERAPI FÖR-VÄNTAS FÅ I KLINIKEN?

Svaret på denna fråga beror givetvis, som för alla läkemedel som utvecklas, på en kombination av effektprofil och säkerhetsprofil. När det gäller säkerhetsprofilen så har det, från de drygt 200 parkinsonpatienter runt om i världen som inom ramen för olika kliniska studier erhållit genterapi, inte rapporterats några allvarliga biverkningar orsakade av vektorn (rAAV- och rEIAV-vektorer har testats). Man har heller inte sett några allvarliga oväntade biverkningar av de terapeutiska gener som man hittills testat. De biverkningar man som regel sett är relaterade till operationen och förefaller åtminstone översiktligt likartade det man ser vid DBS-operationer. Patienterna i de första studierna opererades för 7-8 år sedan, så det börjar nu också finnas långtidsinformation och fler patientår med genterapi än vad som hittills publicerats. På samma sätt som DBS, förväntas genterapi heller inte vara en första linjens behandling, åtminstone inte så

"Här kan genterapi ge en jämn kontinuerlig tillförsel av dopa istället för de svängande blodkoncentrationer man får vid tablettbehandling."

”När vektorn deponerats i hjärnan där man önskar att de aktuella generna skall verka och utöva sin terapeutiska effekt, infekteras celler i närområdet (inom någon centimeter) från injektionsstället.”

länge det är fråga om en symtomlindrande behandling på samma sätt som L-dopa och annan farmakologisk behandling idag. Skulle man framöver däremot finna gener vars genprodukter fungerar bromsande på själva sjukdomsprocessen kan det istället bli aktuellt med genterapi som första linjens behandling för att på så sätt bryta sjukdomsprocessen så tidigt som möjligt. Genterapi vid Parkinsons sjukdom är ur ett kliniskt perspektiv ännu i sin linda, men den tekniska utvecklingen för fältet öppnar för nya och förbättrade behandlingsmöjligheter. Genom en kontinuerlig och lokal tillförsel av ett terapeutiskt protein/enzym etc. finns möjligheten att påverka biologiska/patologiska processer på ett sätt man tidigare inte kunnat. I ett vidare perspektiv bör även genterapi, som har fördelen av att kunna leverera en terapeutisk faktor till ett litet begränsat område under lång tid, erbjuda många möjligheter när man utvecklar nya skraddarsydda biologiska läkemedel för behandling av olika neurologiska tillstånd där man endast vill nå små kärnor/regioner och skiftande funktioner intrakraniellt.

REFERENSER:

- Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011; 365(25):2357-2365. doi: 10.1056/NEJMoa1108046.
- Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009; 374(9701):1597-1605. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61836-5.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371(16):1507-1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
- Marks WJ Jr, Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 2010; 9(12):1164-1172. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70254-4.
- Marks WJ Jr, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, et al. Safety and tolerability of intraputamin delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* 2008; 7(5):400-408. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70065-6.
- Christine CW, Starr PA, Larson PS, Eberling JL, Jagust WJ, Hawkins RA, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 2009; 73(20):1662-1669. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c29356.
- Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, et al. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 2010; 18(9):1731-1735. doi: 10.1038/mt.2010.135.
- Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavisce S, Buttery PC, et al. 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. *Lancet* 2014; 383(9923):1138-1146. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61939-X.
- Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007; 369(9579):2097-2105. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60982-9.
- LeWitt PA, Rezaei AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* 2011; 10(4):309-319. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70039-4.
- Hadaczek P, Eberling JL, Pivrotto P, Bringas J, Forsayeth J and Bankiewicz KS. Eight years of clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV2-hAADC. *Mol Ther* 2010; 18(8):1458-1461. doi: 10.1038/mt.2010.106.
- Mittermeyer G, Christine CW, Rosenbluth KH, Baker SL, Starr P, Larson P, et al. Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 2012; 23(4):377-381. doi: 10.1089/hum.2011.220.
- Bjorklund A, Bjorklund T and Kirik D. Gene therapy for dopamine replacement in Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2009; 1(2):2ps2. doi: 10.1126/scitranslmed.3000350.
- Cederfjäll E, Nilsson N, Sahin G, Chu Y, Nikitidou E, Bjorklund T, et al. Continuous DOPA synthesis from a single AAV: dosing and efficacy in models of Parkinson's disease. *Sci Rep* 2013; 3:2157. doi: 10.1038/srep02157.
- Carlsson T, Winkler C, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Cenci A, et al. Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors. *Brain* 2005; 128(Pt 3):559-569. doi: 10.1093/brain/awh374.
- Lerich L, Bjorklund T, Breyse N, Besret L, Gregoire MC, Carlsson T, et al. Positron emission tomography imaging demonstrates correlation between behavioral recovery and correction of dopamine neurotransmission after gene therapy. *J Neurosci* 2009; 29(5):1544-1553. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4491-08.2009.



CARL ROSENBLAD

Med Dr och Specialistläkare i Neurologi, VO Neurologi och Rehabiliteringsmedicin, Skånes universitetssjukhus, Lund
carl.rosenblad@med.lu.se