

Geenihoito

Geeniterapia on potentiaalinen apu vaikeisiin sairauksiin, joihin ei ole olemassa vakiintunutta tehokasta hoitoa. Geenejä voidaan käyttää sekä yhden geenin virheestä johtuvien perinnöllisten sairauksien että monitekijäisten hankinnaisten sairauksien hoitoon. Ensin mainitussa tapauksessa viallinen geeni pyritään korvaamaan uudella toimivalla geenillä ja jälkimmäisessä pyritään korvaamaan elimistössä terapeuttista geenituotetta. Geeniterapia voidaanakin määritellä geneettisen materiaalin siirtämiseksi yksilön somaattisiin soluihin siten, että saadaan aikaan hoitovaikutus. Vaikutus kestää yhden antokerran jälkeen geenisiirtotekniikan mukaan muutamasta viikosta kuukausiin tai jopa vuosiin. Ensimmäisiin sovelluksiin on liittynyt paljon pettymyksiä, mutta parin viime vuoden aikana on saatu lupaavat näytöt geenihoitojen tehosta mm. vaikeisiin perinnöllisiin immuunipuutoksiin ja pahanlaatuisiin aivokasvaimiin. Geenihoidot kehittynevät 5–10 vuoden kuluessa varteenotettaviksi vaihtoehtoiksi ainakin joihinkin vaikeisiin sairauksiin.

Geenien rakenteen ja toiminnan tarkempi ymmärtäminen sekä geeninsiirtomenetelmien kehittyminen ovat mahdollistaneet geenien ja niiden tuotteiden käytön sairauksien hoitoon (Ylä-Herttuala ja Martin 2000). Koska geenit ohjaavat RNA-molekyylien ja proteiinien muodostumista, on periaatteessa mahdollista sekä korjata perinnöllisistä geenivirheistä johtuvia sairauksia että hoitaa hankinnaisia sairauksia käyttäen siirtogeeninä taudin patogeenin kannalta hyödyllistä proteiinia tuottavaa geeniä tai ilmentymisen säätelyyn

vaikuttavaa nukleiinihappoa (Ylä-Herttuala ja Salo 2006, Hukkanen ym. 2009).

Koska nukleiinihapot tuhoutuvat elimistösämme nopeasti erilaisten nukleaaasien vaikutuksesta, siirtomenetelmät edellyttävät yleensä geeninkuljetinten käyttöä. Yleisimmin käytetään virusperäisiä kuljettimia, koska ne ovat toistaiseksi teholtaan selvästi parempia kuin muut kuljettimet. Ei-viraalisina kuljettimina on käytetty mm. erilaisia liposomikomplekseja. Kuljettimen mukaan geeninsiirron vaikutus voi kestää yhden antokerran jälkeen muutamasta viikosta kuukausiin tai jopa vuosiin.

Geeninsiirtojen historiaa

Oswald Avery osoitti jo v. 1943, että perinnöllisiä ominaisuuksia voidaan siirtää mikrobeissa nukleiinihappofraktion avulla. Kun Watson ja Crick selvittivät DNA:n kaksoiskierteen rakenteen ja geenien olemus alkoi tarkemmin selvitä seuraavina vuosikymmeninä, oli ilmeistä, että geenejä voitaisiin joskus käyttää sairauksien hoitoon (Friedmann 1994). 1970-luvun alussa opittiin siirtämään toimivia geenirakenteita soluviljelmissä kalsiumfosfaattisaostuksen avulla. Vuonna 1970 keksitty käänteiskopioijaentsyymi ja retrovirusten tarkempi karakterisointi avasivat tien retroviruksiin perustuvien geeninkuljettimien käyttöön. Vuonna 1981 HPRT-entsyymiin (hypoksantiini-guaaniini-fosforibosyyli transferaasi) puute (Lesch–Nyhanin tauti) onnistuttiin korjaamaan soluviljelmässä geeninsiirron avulla.

Ensimmäiset geenihoitokokeet ihmisillä tehtiin myös yllättävän varhain. Martin Cline yritti korjata talassemiaa vuonna 1980 luuytimen kantasoluihin tehdyllä B-globiinin

MATTI ÄYRÄPÄÄN LUENTO

geeninsiirrolla. Kokeet epäonnistuivat, koska tietämys geenien toiminnasta ja geeninsiirtojen periaatteista oli tuolloin vielä hyvin puutteellista (Friedmann 1994). Kokeisiin liittyi myös suuria tutkimuseettisiä ongelmia, ja osittain niiden vuoksi perustettiin Yhdysvaltojen kansallisen terveystieteiden instituutin alaiseen Recombinant DNA Advisory Committeeen geenihoidon käsittelevä alakomitea. Samoin luotiin ensimmäiset toimintaohjeet ja säännöt DNA-tekniikan käyttöön ja valvontaan sairauksien hoidossa.

Geeninkuljetinten ja menetelmien kehittämisen myötä suoritettiin ensimmäinen vakavasti otettava geeninsiirto ihmiselle vuonna 1989. Steven Rosenberg työryhmineen siirsi neomyysiiniresistenssigeenin potilailta eristettyihin, tuumoriin hakeutuviin lymfosyytteihin

retrovirusvektoria käyttäen tarkoituksenaan tutkia geeninsiirron toimivuutta ihmisissä (Rosenberg ym. 1990). Vuonna 1990 Michael Blaese ja French Anderson tekivät ensimmäisen hoidollisen geeninsiirron. Adenoosiinidea-minaasin (ADA) puutetta sairastavan potilaan verestä eristettyihin valkosoluihin siirrettiin retrovirusvektoria käyttäen ADA-geeni (Blaese ym. 1995). Ensimmäinen geeninsiirtopotilas elää edelleen, mutta siirron tehosta sairauden hoidossa ei saatu luotettavaa kuvaa, koska ensimmäisiä potilaita hoidettiin samanaikaisesti myös entsyymikorvauksella (Blaese ym. 1995, Bordignon ym. 1995).

Pohjoismaiden ensimmäisen geeninsiirron tekivät Kuopiossa vuonna 1995 Matti Vapalahti, Anu Sandmair ja Seppo Ylä-Herttuala pahanlaatuista aivokasvainta sairastavalle

TAULUKKO 1. Geeninsiirtoon käytettyjen vektorien edut ja haitat.

Geeninkuljetin	Edut	Haitat
Retrovirus	Pitkäkestoinen ekspressio, koska siirretty geeni integroituu kohdesolun genomiin	Heikko tehokkuus in vivo Insertiomutageneesin riski
Adenovirus	Tehokas, transfektoi myös jakautumattomia soluja	Aiheuttaa vain lyhytaikaisen geeniekspression Immunogeeninen
AAV (adeno-associated virus)	Pitkäkestoinen ekspressio Villityypin virus integroituu vain tiettyyn kohtaan genomia	Siirtogeenin koko asettaa rajoituksia Immunogeeninen Vaikea valmistaa
Lentivirus	Pitkäkestoinen ekspressio Integroituu genomiin ja transfektoi myös jakautumattomia soluja	Vaikea valmistaa Insertio-mutageneesin riski
Bakulovirus	Ei-toksinen hyönteisvirus Suuri kloonaukaskapasiteetti Helppo valmistaa	Aiheuttaa vain lyhytaikaisen geeniekspression Immunogeeninen
Herpes simplex -virus	Keskushermostohakuinen Episomaalinen geeniekspressio Suuri kloonaukaskapasiteetti	Toksinen joillekin solutyypeille Voi aktivoida latentin villityypin herpesvirusinfektion Vaikea valmistaa
Alfavirus, Semliki Forest virus	Geeniekspression nopea aloitus Hermostohakuinen	Aiheuttaa vain hyvin lyhytaikaisen geeniekspression Toksinen joillekin solutyypeille
Vaccinia-virus	Suuri kloonaukaskapasiteetti	Aiheuttaa lyhytaikaisen geeniekspression Immunogeeninen Vaikea valmistaa
Transposonit	Ei-viraalinen vektori, joka integroituu isäntäsolun genomiin Helppo valmistaa	Insertiomutageneesin riski Voi aktivoida latentin transposonin
Liposomi-poly-meeri-plasmidi-kompleksit	Helppo tuottaa ja käyttää	Heikko tehokkuus Toksinen joillekin solutyypeille
Paljas plasmidi	Turvallinen Helppo tuottaa ja käyttää	Hyvin heikko teho

potilaille (Ylä-Herttua ym. 1996, Puumalainen ym. 1998). Samoin Kuopiossa suoritettiin maailman ensimmäinen adenovirusvälitteinen geeninsiirto ihmisen verisuoniin, tekijöinä Hannu Manninen, Kimmo Mäkinen, Marja Hedman ja Seppo Ylä-Herttua (Laitinen ym. 1998). Tähän mennessä maailmassa on suoritettu noin 1 500 kliinistä geeninsiirtotutkimusta, joista valtaosa on ollut vaiheen I tutkimuksia (www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical).

Geeninkuljettimet

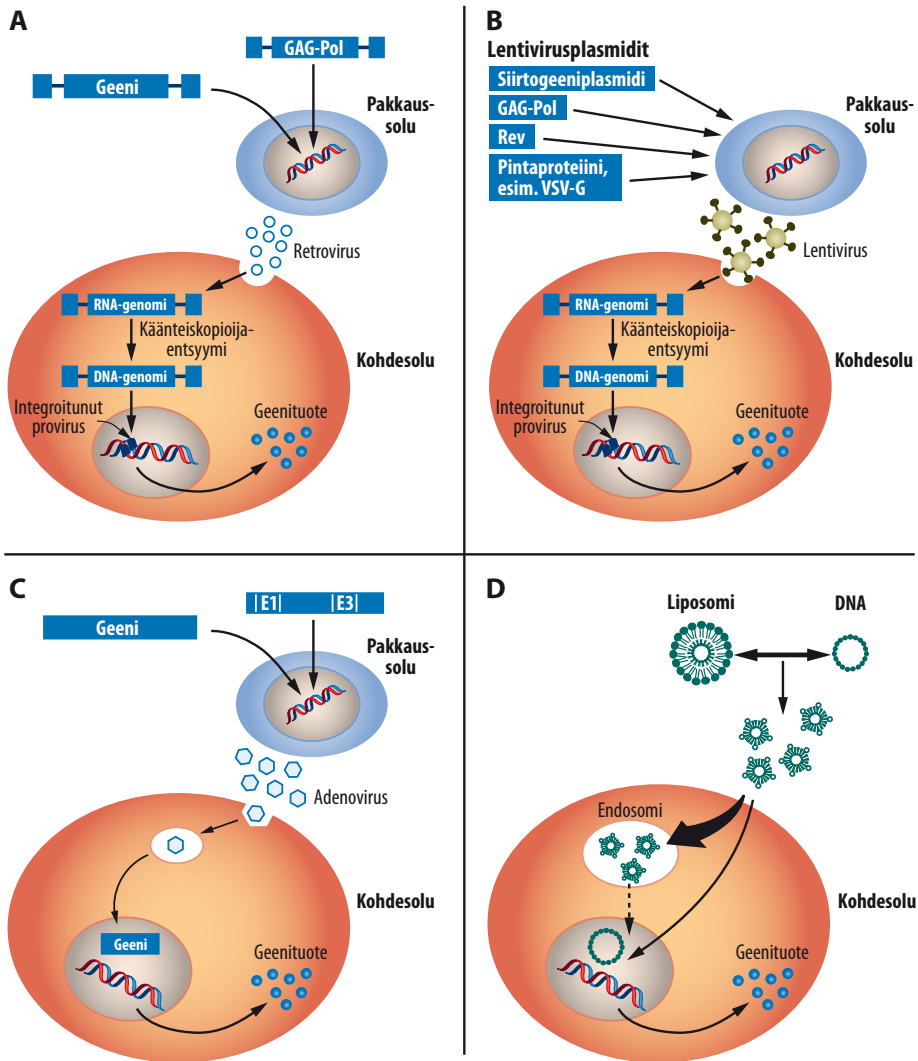
Pitkäaikaisen geeniekspression aiheuttavat kuljettimet. Geeninsiirtotarkoituksiin on käytetty useita erityyppisiä viruksia, jotka on lueteltu **TAULUKOSSA 1**. Käytetyistä viruskuljettimista yleisimpiä ovat jyräjän leukemavirusten Moloneyn kanta, AAV (adeno-associated virus) ja lentivirus (HIV-1) (Templeton 2009). Peruseriaatteena on, että geeninsiirtovektorit tuotetaan ns. pakkaussoluissa joko pelkästään plasmiditransfektioita avulla, jolloin viruksen eri komponentit on kloonattu erilaisiin yksinkertaisempiin rengasmaisiin DNA-plasmideihin tai niin, että pakkaussolut tuottavat omasta genomistaan viruksen rakennekomponentit ja vain osa geeninkuljettimesta (esim. siirtogeeni) tuodaan viljelysystemiin plasmidimuodossa (**KUVAT 1A ja B**).

Esimerkiksi nykyään käytettävien HIV-1-pohjaisten lentivirusvektorien genomista on poistettu noin 90 % luonnollisesta genomista ja jäljelle on jätetty ainoastaan viruksen toiminnan kannalta kaikkein tärkeimmät geenit. Retro- ja lentivirukset kykenevät aikaansaamaan pitkäkestoisen geeninsiirtovaikutuksen, koska ne integroivat siirtogeenin isäntäsolun genomiin. AAV-vektorit ovat viime aikoina olleet kiinnostuksen kohteena (Tammela ym. 2007), koska villityypin AAV integroituu ihmisessä kromosomi 19:n tiettyyn kohtaan. Geeninsiirtotarkoituksiin muokattu AAV ilmeisesti kuitenkin pysyy pääosin ekstrakromosomaalisena eikä integroidu spesifisesti kromosomiin 19. AAV kuitenkin kykenee aiheuttamaan pitkäkestoisen geeninsiirtovaikutuksen kohdesoluissa.

Lyhytaikaisen geeniekspression aiheuttavat kuljettimet. Adenovirus on toistaiseksi tehokkain geeninkuljetin. Se aiheuttaa siirtogeenin 1–2 viikkoa kestävästi voimakkaan ilmentymisen. Adenovirusvektorista on myös poistettu viruksen lisääntymisen kannalta keskeiset alueet, joilta vapautuneeseen tilaan haluttu hoitogeeni voidaan kloonata. Adenovirukset tuotetaan pakkaussoluissa yleensä homologiseen rekombinaatioon perustuvan menetelmän avulla (**KUVA 1C**) (Langford ym. 2009). Toisin kuin esimerkiksi lentivirusten ja AAV:n tuotantoon adenoviruksen tuotantoon voidaan käyttää viruksella tehtävää pakkaussolujen suoraa transfektioita, joka johtaa halutun, lisääntymiskyvyttömän adenoviruksen muodostumiseen ilman plasmiditransfektioita. Tästä syystä adenovirusvektorien tuotanto on ollut helpompi kehittää lääkkeen valmistuksen edellyttämään laajuuteen ja puhautusluokkaan kuin muiden viruskuljettimien valmistus (Langford ym. 2009).

Herpes simplex -viruksesta kehitetyt vektorit ovat osoittautuneet tehokkaiksi erityisesti keskushermoston geeninsiirroissa, sillä näillä vektoreilla on luontainen kyky aiheuttaa latentti infektio hermosoluissa. Semliki Forest -viruksista johdetut vektorit aiheuttavat voimakkaan, nopeasti ohimenevän geeninsiirtovaikutuksen, sillä näiden virusten genomi on suoraan RNA-muodossa ja valmiina nopeaan translaatioon päästyään solulimaan (Vähäkoscä ym. 2007). Vektorilla voi olla käyttöä mm. keskushermoston alueen geenihoidossa, sillä virus on luonnostaan hermostohakuinen. Myös vaccinia-viruksesta on johdettu geeninsiirtoon sopivia kuljettimia. Niiden etuna on suuri siirtogeeninkuljetuskyky (Templeton 2009).

Bakulovirus kykenee aiheuttamaan 1–2 viikkoa kestävästi siirtogeenin ilmentymisen useimmissa solutyypeissä. Koska bakulovirus on hyönteisten virus, se ei missään olosuhteissa kykene replikoitumaan ihmiseläimissä. Virukseen voidaan myös kloonata hyvin suuria siirtogeenikasetteja, toisin kuin useimpiin muihin käytössä oleviin geeninkuljettimiin. Bakuloviruksia voidaan niin ikään valmistaa runsaasti tuottajasolulinjoissa (Airenne ym. 2007).



KUVA 1. Geeninsiirtovektorien valmistus ja toimintaperiaatteet. **A)** Retrovirusvektori tuotetaan pakkaussolussa, jonka genomiin on erikseen siirretty viruksen toiminnan kannalta tärkeiden proteiinien (rakennekomponentit SAG-Pol) geenit. Kun pakkaussoluun tuodaan sopivan promoottorin ohjaama siirtogeeni, pakkaussolu tuottaa geeninsiirtoon soveltuvia lisääntymiskyvyttömiä retroviruksia. Kohdesolussa viruksen RNA-genomi muuttuu käänteiskopioijaentsyymien avulla DNA-genomiksi, joka inkorporoituu pysyvästi isäntäsolun genomiin. Siirtogeenin luenta tapahtuu samaan tapaan kuin solun omien geenien, jolloin lääkkeenä toimiva geenituote muodostuu soluissa normaaliin tapaan. **B)** Lentivirusvektori tuotetaan pakkaussoluissa yleensä siten, että kaikki viruksen tärkeät komponentit (siirtogeeni, rakennekomponentit GAG-POL, REV ja pinta-proteiinit) transfektoidaan erikseen pakkaussoluun plasmidin avulla. Pakkaussolu tuottaa tämän jälkeen lisääntymiskyvyttömiä lentiviruksia. Solulimassa lentiviruksen RNA-genomi muuttuu käänteiskopioijaentsyymien vaikutuksesta DNA-genomiksi, joka inkorporoituu isäntäsolun genomiin ja tuottaa solussa lääkkeenä käytettävän geenituotteen. **C)** Adenovirusvektori tuotetaan pakkaussoluissa siten, että solun genomiin siirretään erikseen geeninsiirtoviruksen genomista poistetut alueet (E1, E3). Pakkaussolu tuottaa lisääntymiskyvyttömiä adenoviruksia, joita voidaan käyttää geeninsiirtoihin. Solussa adenovirus vapautuu endosomista ja sen DNA-genomi kulkeutuu tumaan. Adenovirus ei inkorporoidu isäntäsolun genomiin vaan toimii kromosomiston ulkopuolella yleensä 1–2 viikon ajan tuottaen hyvin tehokkaasti lääkkeenä käytettävää geenituotetta. **D)** Esimerkki nonviraalisesta geeninkuljettimesta, jossa rengasrakenteinen plasmidi-DNA ja kolesteroli-fosfolipidiliposomi saatetaan yhteen pieniksi miselleiksi joko sonikoimalla tai haihduttamalla. Liposomit päätyvät pääasiassa endosomi-lysosomitielelle, jossa suurin osa geeninkuljettimesta tuhoutuu. Yleensä vain noin 1–2 % liposomin sisältämästä DNA:sta siirtyy tumaan. Siellä plasmidi ei inkorporoidu isäntäsolun genomiin vaan jää kromosomiston ulkopuolelle yleensä 1–2 viikoksi tuottamaan lääkkeenä käytettävää geenituotetta.

Koska *in vivo* -geeniinsiirrot eivät koskaan saavuta kaikkia kohdekudoksen soluja, on esitetty ajatus käyttää geenihoidoihin replikoituvia viruksia. Tällöin virukset voisivat lisääntyä sairaassa kudoksessa, mutta pysähtyisivät kohdatessaan normaalin kudoksen (Hakkarainen ym. 2005). Joidenkin virusten onkolyttisiä ominaisuuksia on testattu pahanlaatuisten kasvainten hoidossa (Hakkarainen ym. 2005). Ongelmaksi näiden geeninkuljettimien kehityksessä on osoittautunut tehokkaiden replikaatiota rajoittavien mekanismien identifiointi ja virusten laajamittainen valmistus.

Nonviraalisten plasmidipohjaisten geeninkuljettimien tuotannossa perusajatuksena on yhdistää rengasrakenteinen yksinkertainen geeninsiirtoplasmi liposomi- tai esimerkiksi polyetyleeni-imiinimiseleeniin, jolloin geeniaines yleensä siirtyy endosytoosilla kohdesoluihin (Ruponen ym. 2005). Plasmideja on helppo valmistaa suuressa mittakaavassa (KUVA 1D), mutta nonviraalisten geeninkuljettimien teho elimistössä on toistaiseksi ollut heikko verrattuna viraalisiin kuljettimiin. Uutena tulokkaana geeninsiirtotutkimuksessa ovat transposonit (Ivics ja Izsvak 2006), jotka kykenevät integroimaan siirtogeenisä isäntäsolun genomiin. Transposonien geeninsiirtotehosta elimistössä ei vielä ole selvää kuvaa, mutta ne voivat periaatteessa tarjota vaihtoehdon integroituvien viruskuljetinten käytölle.

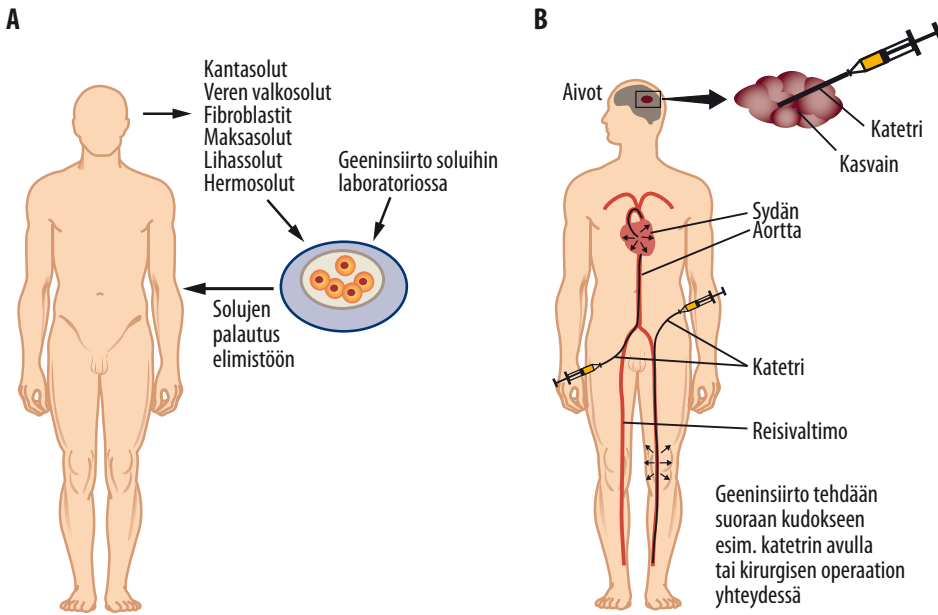
Ex vivo- ja in vivo -geeniinsiirrot. Geeninsiirrot voidaan suorittaa elimistöstä eristettyihin soluihin (esim. luuydinsoluihin ja erilaisiin kantasoluihin) laboratorio-olosuhteissa, jolloin geeninkuljettimia ei anneta suoraan elimistöön ja onnistuneen geeninsiirron läpikäyneet solut voidaan periaatteessa eristää soluviljelmistä ennen niiden palauttamista takaisin elimistöön (KUVA 2A). Tämä ns. *ex vivo* -geeniinsiirtomenetelmä tarjoaa selkeitä turvallisuusetuja ja tulee kysymykseen etenkin vaikeiden perinnöllisten sairauksien hoidossa. *In vivo* -menetelmissä geeninkuljettimet viedään suoraan elimistöön haluttuun hoitokohteeseen (KUVA 2B). Tällöin vältetään monimutkaiselta ja vaativalta solujen eristys- ja viljelyprosessilta kehon ulkopuolella sekä saavutetaan sellaisia kohteita, joista kohdesolujen

eristäminen on mahdotonta. Haittana on geeninkuljetinten mahdollinen kulkeutuminen muualle elimistöön halutun geeninsiirtokohteen ulkopuolelle. *In vivo* -geeniinsiirtometodeja on käytetty varsinkin hankittujen sairauksien, kuten esim. erilaisten syöpien ja verisuonitautien hoidossa.

Perinnöllisten sairauksien geenihoito

Geenivirheistä johtuvat perinnölliset taudit ovat olleet geenihoidon kehitystyön keskeinen kohde, sillä ainoa tehokas hoito näihin tauteihin olisi luonnollisesti toimivan geenin siirtäminen elimistöön korjaamaan esimerkiksi aineenvaihduntahäiriön tai immuunipuolustuksen vajavuuden. Perinnölliset taudit vaativat tietysti pitkäkestoista geeninsiirtotehoa, ja tällöin kyseeseen tulevat lähinnä integroituvat geeninkuljettimet. Perinnöllisistä taudeista paljon tutkittuja geenihoidon kohteita ovat mm. vaikeat immuunipuutostilat (ADA- ja SCID-XI-oireyhtymät), erilaiset hemoglobiнопатiat, kystinen fibroosi, Duchennen lihasdystrofia, Parkinsonin tauti, eräät muut keskushermoston degeneratiiviset tilat, vaikeat sokeuteen johtavat silmätaudit ja erilaiset lipoproteiiniaineenvaihdunnan häiriöt, kuten LDL-reseptorin puute ja lipoproteiinilipaa-sin puute (Templeton 2009). Perinnöllisten sairauksien hoitona voidaan käyttää sekä *ex vivo*- että *in vivo* -geeniterapiaa. Parhaiten geenihoidon soveltuvat taudit, joissa riittää, että geenivirhe korjataan vain esimerkiksi luuytimestä eristetyissä soluissa, maksassa tai silmänpohjassa. TAULUKOSSA 2 luetellaan sairauksia, joihin on kehitteillä geenihoidoa.

Lupaavimmat tulokset on toistaiseksi saatu ADA- ja SCID-XI-immuunipuutospotilaiden geenihoidoista. ADA-oireyhtymässä on hiltain raportoitu saadun positiivisia tuloksia retrovirusvälitteisen geeninsiirron avulla: kahdeksan kymmenestä geenihoidosta saaneesta potilaasta on objektiivisesti hyötynyt tästä hoidosta (Aiuti ym. 2009). Niin ikään kahdeksan kymmenestä hoidetusta SCID-XI-potilaasta on saanut selvän objektiivisen hyödyn inter-leukiinien yhteisen gamma-C2-reseptorin



KUVA 2. Ex vivo- ja in vivo -geeniinsiirron periaatteet (Ylä-Herttuala ym. 2006). **A)** Ex vivo -geeniinsiirrossa voidaan kohdekudoksesta eristää viljeltäviä soluja, joihin laboratorio-olosuhteissa siirretään haluttu geeni. Onnistuneen geeniinsiirron jälkeen solut palautetaan elimistöön. **B)** In vivo -geeniinsiirrossa geeninkuljetin injektoidaan suoraan hoitoa tarvitsevaan kudokseen (esim. kasvaimeen tai sydänlihakseen) avokirurgian yhteydessä tai esimerkiksi katetrivälitteisillä läpivalaisussa ohjattavilla tekniikoilla.

geeniinsiirrosta (Hacein-Bey-Abina ym. 2002). Valitettavasti haittavaikutuksena neljälle potilaalle on kehittynyt leukemian kaltainen tila, ja yksi on menehtynyt tähän haittavaikutukseen, joka ainakin osassa tapauksista on johtunut siirtogeenin integroitumisesta *LMO2*-geenin alueelle (Hacein-Bey-Abina ym. 2003). Myös kroonisessa granulomatoosissa (Ott ym. 2006) ja sokeuteen johtavassa Leberin synnyntäissessä amauroosissa (Bainbridge ym. 2008) on saavutettu yksittäisiä positiivisia tuloksia, mutta hoitojen turvallisuudesta ei vielä ole näissä sairauksissa selvää käsitystä. Muita kehitteillä olevia perinnöllisten sairauksien hoitoja ovat mm. LDL-reseptorin ja lipoproteiinilipaasin puutteen, Parkinsonin taudin sekä eräiden hemoglobiнопатиoiden hoidot.

Hankinnaisten sairauksien geenihoito

Hankinnaisissa sairauksissa geenihoitoa sovelletaan siten, että elimistöön siirretään taudin patogeneesin kannalta hyödyllinen geeni,

vaikkei kyseisellä geenillä välttämättä olekaan yhteyttä taudin syntymekanismiin. Eniten sovelluksia on kehitetty pahanlaatuisten kasvainten hoitoon, jossa on pyritty käyttämään hyväksi kasvurajoitegeenejä, apoptoosia stimuloivia geenejä ja itsemurhageenejä, jotka aktivoivat aihiolääkkeen aktiiviseksi sytotoksisiksi yhdisteeksi (Pulkkanen ja Ylä-Herttuala 2005). Kasvurajoitegeeneistä on eniten käytetty *p53*-tuumorisuppressorigeeniä, joka on mutatoitunut noin 50 %:ssa erityyppisistä syövästä. Erilaisia immuunivastetta stimuloivia ja T-soluja aktivoivia geenejä, sytokiineja ja interleukiineja on niin ikään yritetty käyttää elimistön puolustuskyvyn lisäämiseksi pahanlaatuisia kasvaimia vastaan.

Muun muassa kaulan alueen syöpiin, metastasoituneeseen melanoomaan ja munasarjakarsinomaan on ollut kehitteillä edellä mainittuihin mekanismeihin perustuvia geenihoitoja (Templeton 2009, Hakkarainen ym. 2005). Vaiheen III kliinisiin tutkimuksiin on toistaiseksi edennyt vain pahanlaatuisen gliooman geenihoito, jossa adenoviruksella

TAULUKKO 2. Eräitä tauteja, joiden geenihoitoa on tutkittu.

Perinnölliset sairaudet
Adenosiinideaminaasin puute (ADA-oireyhtymä)
X-kromosomiin liittyvä vaikea immuunipuutos (SCID-XI)
Kystinen fibroosi
Alfa1-antitrypsiinin puute
Familiaalinen hyperkolesterolemia
Lipoproteiinilipaasin puute
Talassemiot
Sokeuteen johtavat silmäsairaudet
Krooninen granulomatoosi
Lihasrappeumasairaudet
”Inborn errors of metabolism” (esim. Gaucherin tauti, mukopolysakkaridoosit, Tay–Sachsian tauti, Lesch–Nyhanin tauti, ornitiinitranskרבamylaasin puute, aspartyyli-glukosaminuria)
Hankinnaiset sairaudet
Erlaiset syövät (mm. glioblastooma, melanooma, munasarja-, rinta-, keuhko- ja eturauhassyöpä)
Sydän- ja verisuonitaudit (vaikea angina pectoris, perifeeriset valtimosairaudet, stentinsäinen restenoosi, laskimosiirteiden ja endoproteesianastomoosien ahtaumat)
Lymfedeema
Tulehdustaudit (mm. nivelreuma)
HIV-infektio
Parkinsonin tauti
Hermovauriot (esim. traumaattiset ja lääkkeiden toksiset seuraukset, krooninen kipu)
Rokotteet (esim. malaria, Ebola-virus)
Vaikeat krooniset ihohaavat

siirretään leikkausontelon seinämiin herpes simplex -viruksen tymidiinikinaasigeeni. Kyseisellä geenillä ei ole substraattia ihmiselimestössä, mutta geeninsiirron jälkeen annettava aihiolääke gansikloviiri fosforyloituu tymidiinikinaasin vaikutuksesta sytotoksiseksi yhdisteeksi, joka pysäyttää DNA:n synteessin ja vaikuttaa näin ollen pääasiassa vain jakautuviin kasvainsoluihin. Hoidolla on onnistuttu pidentämään merkittävästi potilaiden elossaoloaika (Sandmair ym. 2000, Immonen ym. 2004).

Sydänlihaksen ja perifeeristen lihasten iskemiamia tarjoaa luontevan mahdollisuuden geenihoidoille. Näiden sairauksien hoitoon on käytetty verisuonikasvutekijöitä, jotka kykenevät kasvattamaan uusia kollateralisuonia ja kapillaareja hapenpuutteesta kärsivään lihakseen (Ylä-Herttua ja Alitalo 2003). Geeninkul-

jettimena on kliinisissä tutkimuksissa käytetty lähinnä adenovirusia ja plasmidiliposomeja, sillä verisuonikasvutekijöiden lyhytaikainen – muutamasta päivästä muutama viikkoon kestävä – ilmentyminen riittää prekliinisten kokeiden perusteella aikaansaamaan perfuusion merkittävän lisääntymisen hoitokohteissa. Vaiheen II kliinisissä kokeissa adenovirusilla on saavutettu rohkaisevia tuloksia mm. sydänlihaksen perfuusion lisäämisessä (Hedman ym. 2003), eikä hoitojen turvallisuudessa ole havaittu ongelmia. Uusien sydänlihasruiskeisiin soveltuvien tarkkuuskatetriin käyttö parantane vielä hoitojen soveltuvuutta kliiniseen käyttöön. Perifeerisen valtimonkoveutumistaudin ja vaikean alaraajaiskemian hoidossa lihakseen tehtävät geeninsiirrot ovat parhaillaan kliinisissä tutkimuksissa. Vaiheen II tutkimuksissa on geeninsiirroilla kyetty li-

säämään iskeemisen alaraajan verisuonitusta ja vähentämään kriittisen iskemia takia suoritettuja amputaatioita (Mäkinen ym. 2002, Nikol ym. 2008). Myös haavan paraneminen on ollut geenihoidojen kehitystyön kohteena iskeemisissä ja diabeteksesta johtuvissa tiloissa ja ihonsiirtojen yhteydessä, jolloin hoitogeeneiksi soveltuvat samat kasvutekijät kuin lihasiskemian hoidossa.

Tulehdustautien osalta pisimmälle on edetty vaikean nivelreuman geenihoidossa, jossa nivelonteloon on siirretty tuumorinekroositekijää sitovan valereseptorin geeni. Vaiheen II kokeista on raportoitu jossain määrin rohkaisevia tuloksia. Vaikeiden infektioiden kuten HIV-infektion, malarian, tuberkuloosin ja Ebola-virusinfektion hoitoon on kehitetty geeninsiirtopohjaisia rokotteita. Tällöin välttään hankalien mikrobien viljelyltä rokotteen valmistuksen yhteydessä, sillä geenirokotteet perustuvat antigeenien ilmentämiseen elimistössä. Geeninsiirtorokote aiheuttaa tärkeimpien antigeeniproteiinien ilmentymisen esimerkiksi ihossa ja immuunivasteen taudinaiheuttajaa kohtaan. HIV-infektion hoitoon on myös kehitteillä geeninsiirto infektoituneisiin T-soluihin. Erilaisia antisense-rakenteita hyväksi käyttäen pyritään estämään varsinaisen villittyypin HIV-infektion leviäminen.

Erilaisten kantasoluhoitojen yhteydessä on laajalti nähty tarvetta siirrettävien ja erilais-tettävien solufraktioiden geenihoidoon siten, että solujen eloon jäämistä siirtokohteessa tehostetaan esimerkiksi lyhytaikaisella antiapoptoottisten geenien ilmentämisellä (Koponen ja Ylä-Herttua 2005). Lisäksi geeninsiirrolla voidaan ehkä vähentää erilaistumattomien kantasolujen siirtoon mahdollisesti liittyvää syöpä- ja teratoomariskiä siten, että hoidossa käytettäviin kantasoluihin siirretään tymidiinikinaasigeeni, jonka avulla kantasolut voidaan myöhemmin tuhota elimistöstä gansikloviirilla.

Turvallisuus

Varsinkin integroituvien geeninsiirtovektorien käyttöön liittyy mahdollisia turvallisuusongelmia, joiden vuoksi pitkäaikaista geeninsiirto-

efektiä edellyttävälle hoidolle on perusteita ainoastaan erittäin vaikeissa sairauksissa, joihin ei ole olemassa mitään muuta tehokasta hoitoa. SCID-XI-oireyhtymän geenihoidon yhteydessä havaitut leukemiatapaukset ovat esimerkki siitä, että sattumanvaraisesti perimään integroituvat geeninkuljettimet voivat olla potilaille vaarallisia varsinkin silloin, kun itse siirtogeeni antaa geeninsiirron kohteena oleville soluille merkittävän valintaedun (Hacein-Bey-Albina ym. 2003). Näin onkin ilmeisesti tapahtunut gamma-C2-reseptorin geeninsiirron yhteydessä SCID-XI-potilailla. Toisaalta ADA-oireyhtymässä saavutetut positiiviset tulokset ovat vahva näyttö geenihoidojen mahdollisuuksista ainakin sellaisissa tapauksissa, joissa siirtogeeni ei koodaa kasvutekijäreseptoria tai muunlaista erittäin voimakasta fysiologisesti vaikuttavaa tekijää. Integroituvia geeninkuljettimia käytettäessä on kuitenkin selvää, että potilaiden seurantaan tulee kiinnittää erityistä huomiota.

Nivelreuman hoitoa koskevassa vaiheen II kokeessa yksi potilas menehtyi systeemiseen histoplasmooseen, mutta tapauksen huolellisissa jatkoselvittelyissä on todettu komplikaation liittyneen potilaan saamaan pitkäaikaiseen TNF-antagonistihoidon, eikä geenihoidolla katsottu olleen osuutta kuolemantapaukseen. Adenovirusvälitteiseen geenihoidon on liittynyt yksi kuolemantapaus, jossa perinnöllistä ornitiinitranskרבamylaasin puutetta hoidettiin lyhytaikaisella adenovirusgeeninsiirrolla. Potilas menehtyi keuhkojen vaikeaan toimintahäiriöön ja DIC-tyyppiseen syndroomaan. Kyseiseen kuolemantapaukseen liittyi kuitenkin geenihoidojen periaatteiden ja virusten annoksiin liittyvien ohjeiden huomattavaa laiminlyöntiä, koska prekliinisissä kokeissa oli vastaavilla annoksilla havaittu vakavia toksisia vaikutuksia koe-eläimissä. Jostain syystä tutkijat kuitenkin käyttivät ylisuuria virusannoksia potilaan hoitoon, vaikka jo teoreettisesti oli selvää, että adenovirusvälitteisellä geenihoidolla ei kyetä korjaamaan perinnöllisiä aineenvaihduntasairauksia.

Lyhytaikaiseen plasmidi- ja adenovirusvälitteiseen geeninsiirtoon syöpä-, sydän- ja verisuonitautien hoidoissa ei vaiheiden II ja

III tutkimusten mukaan näytä liittyvän merkittäviä turvallisuusriskejä. Hoidot ovat olleet jopa yllättävän hyvin siedettyjä varsinkin silloin, kun prekliinisten ja alustavien kliinisten kokeiden perusteella hoitoannokset on mitoitettu normaalien farmakologisten periaatteiden mukaan. Yleisimpinä haittavaikutuksina on havaittu ohimenevää kuumeilua ja adenovirusvasta-aineiden muodostumista. Hiljattain julkaisemassamme kahdeksan vuoden seurantatutkimuksessa emme havainneet mitään haittavaikutuksia sydänpotilailla, jotka olivat saaneet adenovirusvälitteisen geeninsiirron sepelvaltimotaudin hoitoon (Hedman ym. 2009). Kuumereaktioita on liittynyt myös plasmidivalmisteiden käyttöön, ja ne johtunevat plasmidi-DNA:n eroista ihmisen genomiin nähden, jotka elimistö kykenee tunnistamaan. On kuitenkin selvää, että myös lyhytaikaisen ilmentymisen aiheuttavien geeninkantajien yhteydessä potilaiden seurantaan tulee kiinnittää erityistä huomiota mahdollisten vielä tuntemattomien haittavaikutusten havaitsemiseksi.

Lainsäädäntö

Geenihoitoja ja niiden kehittelyä säätelevät useat EU:n direktiivit ja kansalliset määräykset. Geneettisesti muunnettujen organismien käyttöä valvotaan Suomessa geenitekniikkalain perusteella. Geeninkuljettimista, toiminnasta ja toimitiloista on tehtävä asianmukaiset ilmoitukset, turvallisuusselvitykset ja riskinarviot (Geenitekniikkalaki 1995). Prekliinistä vaihetta valvotaan mm. koe-eläintoimikuntien lupamenettelyn kautta. Kliinisiä hoitokokeita säätelee lääkelaki (Läkelaki 1987), jossa annetaan useita määräyksiä geenilääkkeiden valmistuksesta ja testauksesta ja kokeellisten biologisten lääkkeiden käyttöön liittyvistä erityispiirteistä. Iturataan liittyvät geenihoidot ovat kiellettyjä.

Geenihoitojen kehittäminen on siis erittäin moninaisesti säänneltyä toimintaa, jossa pyritään varmistamaan ennen kaikkea hoidon turvallisuus ja vaarattomuus sekä potilaan että ympäristön kannalta. Joissain tapauksissa tosin ensimmäisen vaiheen kliinisiin kokeisiin

pääseminen edellyttää jopa jossain määrin liiallisia vaatimuksia, jotka ovat haitanneet varsinkin akateemisten tutkimusryhmien ja pienempien lääkekehitysyriyten mahdollisuuksia tuoda omia geenipohjaisia valmisteitaan vaiheen I kliinisiin hoitokokeisiin.

Eettiset kysymykset

Geenihoitotutkimuksiin voidaan toistaiseksi ryhtyä vain niissä tapauksissa, joissa vakavaan sairauteen ei ole olemassa vakiintunutta tehokasta hoitoa (Vapalahti ym. 1997). Vastasyntyneille tai pienille lapsille annettavat geeninsiirrot ovat mahdollisia ainoastaan silloin, kun kyseessä on ilman hoitoa nopeasti kuolemaan johtava sairaus. Iturataan ja sukusoluihin geeninsiirtoja ei saa suorittaa, sillä siirtogeenin integroitumiseen ja ilmentymiseen vaikuttavien tekijöiden tuntemus on vielä aivan liian puutteellista.

Geenilääkkeisiin saattaa myös liittyä vielä tuntemattomia, vasta pitkän ajan kuluessa ilmaantuvia haittavaikutuksia, joten geenihoidot tulee keskittää vain tiettyihin yksiköihin, joissa on riittävät mahdollisuudet geeninkuljettimien turvallisuuden testaamiseen ja potilaiden pitkäaikaiseurantaan.

Tulevaisuudennäkymiä

Nykyiset vaiheisiin II ja III edenneet kliiniset hoitokokeilut perustuvat geeninkuljettimiin, jotka kehitettiin jo 1990-luvulla (Ylä-Herttua 1997). Onkin selvää, että näiden ensimmäisen polven vektorien teho ja monet ominaisuudet eivät suinkaan vielä ole optimaalisia. Lääkekehitystyön luonteen vuoksi valmistusmenetelmät ja kuljettimien ominaisuudet on kuitenkin ollut pakko säilyttää vakiona koko pitkän prekliinisen ja kliinisen testauksen ajan. Muussa tapauksessa kehitystyö jouduttaisiin aloittamaan aivan alusta, koska lääkevalvontaviranomaisten kannalta katsottuna vähänkin muunneltu geeninkuljetin olisi tällöin uusi valmiste. Onkin odotettavissa, että viimeisten kymmenen vuoden aikana kehitetyt tehokkaammat ja vähemmän immunologisia vasteita aiheuttavat vektorit tulevat syrjäyttämään

nykyisin kliinisessä testauksessa olevat kuljetimet.

Siirtogeenin ilmentymisen rajaaminen vain haluttuun kudokseen esimerkiksi kudosspesifisten tai säädeltävien promoottorien avulla tulee parantamaan geenihoidojen spesifisyyttä. Lisäksi geenituotteen määrän säätely esimerkiksi suun kautta annettavan yhdisteen avulla olisi toivottava ominaisuus varsinkin niissä tapauksissa, joissa pyritään siirtogeenin pitkäaikaiseen ilmentymiseen kohde-elimissä. Geenivalmisteiden kehitystyö edellyttää myös viruskuljetinten valmistusmenetelmien jatkokehittelyä. Adenovirus- ja plasmidikuljettimia voidaan nykyään valmistaa farmaseuttiset kriteerit täyttävillä menetelmillä runsaasti niin, että geenihoidoja voidaan antaa kymmenille-tuhansille potilaille. Sen sijaan integroituvien vektorien valmistusmenetelmät ovat vielä hankalia hallita, ja laajamittaiset hoidot ovat toistaiseksi olleet vaikeita toteuttaa. Integroituvien vektorien käytössä on myös suuri tarve kyetä kohdennettuun geeninsiirtoon vain tietyille ennakolta turvallisiksi tiedetyille genomialueille. Ex vivo -geeninsiirroissa ja kantasolujen geeninsiirroissa olisi lisäksi päästävä menetelmiin, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa halutun geeninsiirron läpikäyneet solut ennen niiden palauttamista takaisin eli-

mistöön. RNA-interferenssiin perustuvien geenihoidojen ja onkolyyttisten virusten kehitystyö tulee niin ikään antamaan uusia mahdollisuuksia geenihoidojen tehon, turvallisuuden ja kohdennettavuuden parantamiseen. ■

Tutkimusta ovat tukeneet mm. Suomen Akatemian huippuyksikköohjelma, TEKES, EU Clinigene Network, EU Lymphangiogenomics Network, Leducq Foundation Transatlantic Network, Sigrid Juséliuksen Säätiö, Sydäntutkimussäätiö ja Kuopion yliopistollinen sairaala.

Verkkosivuja

www.fsgt.info (Suomen Geeniterapiaseura)

www.esgct.eu (European Society of Gene and Cell Therapy)

www.asgt.org/ (American Society for Gene and Cell Therapy)

www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/ (Kliinisten tutkimusten rekisteri)

www.uku.fi/bck/virusvector_home.shtml (Biocenter Kuopio, Virus Vector Laboratory)

SEPPO YLÄ-HERTTUALA, LT, akatemiaprofessori

A.I.Virtanen -instituutti

Kuopion yliopisto

PL 1627, 70211 Kuopio

KIRJALLISUUTTA

- Airene KJ, Laitinen OH, Mähönen AJ, Ylä-Herttua S. Safe, simple and high-capacity gene-delivery into insect and vertebrate cells by recombinant baculoviruses. Kirjassa: Friedmann T, Rossi J, toim. Gene transfer. Delivery and expression of DNA and RNA. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2007, s. 313–25.
- Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, ym. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 2009;360:447–58.
- Aula P, Kääriäinen H, Palotie A, toim. Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Duodecim 2006.
- Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS, ym. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358: 2231–9.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, ym. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 1995;270:475–80.
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, ym. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 1995;270:470–5.
- Friedmann T. Gene therapy. Fact and fiction in biology's new approaches to disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994.
- Geenitiekiiikalaki 377/1995 ja vastaavat asetukset.
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, ym. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002;346:1185–93.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, ym. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302:415–9.
- Hakkarainen T, Kanerva A, Hemminki A. Adenovirukset syövän hoidossa. *Duodecim* 2005;121:2195–203.
- Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, ym. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2003;107:2677–83.
- Hedman M, Muona K, Hedman A, ym. Eight-year safety follow-up of coronary artery disease patients after local intracoronary VEGF gene transfer. *Gene Ther* 2009;16; 629–34.
- Hukkanen V, Hemminki A, Ylä-Herttua S. Geenihoito ja molekyyliirologian muut sovellukset. Kirjassa: Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim 2009 (painossa).
- Immonen A, Vapalahti M, Tyynelä K, ym. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther* 2004;10:967–72.
- Ivics Z, Izsvak Z. Transposons for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2006;6:593–607.
- Koponen J, Ylä-Herttua S. Miten saada sydänlihasarpi sykkimään? *Duodecim* 2005;121:1199–201.
- Laitinen M, Mäkinen K, Manninen H, ym. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischaemia. *Hum Gene Ther* 1998;9:1481–6.
- Langford G, Dayan A, Ylä-Herttua S, Eckland D. A preclinical assessment of the safety and biodistribution of an adenoviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene (Cerepro®) after intracerebral administration. *J Gene Med* 2009;11:468–76.
- Lääkelaki (395/1987) ja vastaavat asetukset.
- Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, ym. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery. A randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002;6:127–33.
- Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E, ym. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol Ther* 2008;16:972–8.
- Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, ym. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 2006;12:401–9.
- Pulkkanen KJ, Ylä-Herttua S. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Mol Ther* 2005;12:585–98.
- Puumalainen AM, Vapalahti M, Agrawal R, ym. Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo, using replication-deficient retroviruses and adenoviruses. *Hum Gene Ther* 1998;9:1769–74.
- Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, ym. Gene transfer into humans – immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *New Engl J Med* 1990;323:570–8.
- Ruponen M, Hyvönen Z, Urtti A, Ylä-Herttua S. Nonviral gene delivery methods in cardiovascular diseases. Kirjassa: Fennell JP, Baker AH, toim. Methods in molecular medicine. Vol. 108: methods and protocols. New Jersey: Humana Press Inc 2005, s. 315–28.
- Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, ym. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther* 2000;11:2197–205.
- Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, ym. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med* 2007;13:1458–66.
- Templeton NS, toim. Gene and cell therapy: therapeutic mechanisms and strategies. Yhdysvallat: CRC Press, Taylor & Francis Group 2009.
- Vapalahti M, Puumalainen AM, Ylä-Herttua S. Geenihoidon lainsäädännölliset ja eettiset ongelmat. *Suom Lääkäril* 1997;52:2546–9.
- Vähäkoscala MJ, Heikkilä JE, Hinkkanen AE. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett* 2007;254:178–216.
- Ylä-Herttua S. Geenitekniologia tulevaisuuden lääketieteessä. *Suom Lääkäril* 1997;52:2109–16.
- Ylä-Herttua S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003;9:694–701.
- Ylä-Herttua S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000;355:213–22.
- Ylä-Herttua S, Ollikainen A, Vapalahti M. Ihmisen geeniterapia. *Duodecim* 1996;112:77–9.
- Ylä-Herttua S, Salo M. Periytyvien tautien hoito. Kirjassa: Aula P, Kääriäinen H, Palotie A, toim. Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Duodecim 2006, s. 317–28.