

# Genterapi af svær kombineret immundefekt

Stud.med. Line Barrett Petersen & professor Thomas G. Jensen

## STATUSARTIKEL

Aarhus Universitet,  
Institut for Human  
Genetik

Mangel på enzymet adenosin-deaminase (ADA) forårsager en arvelig form af svær kombineret immundefekt (*severe combined immunodeficiency* (SCID)). Normalt nedbryder enzymet purinstofskiftets metabolitter adenosin og deoxyadenosin, som ophobes ved ADA-mangel. Metabolitterne er i høje koncentrationer toksiske for lymfocytter, hvilket giver anledning til immundefekten [1].

Den nuværende førstevalgsbehandling af sygdommen er knoglemarvstransplantation fra en *human leucocyte antigens* (HLA)-matchende donor, men en egnet donor er kun tilgængelig for 20-33% af patienterne [1, 2]. Hvis der ikke kan findes en sådan donor, kan der gives substitutionsbehandling med modificeret bovint ADA (PEG-ADA). Dette bedrer ofte patienternes tilstand initialt, men immunfunktionen kan sjældent opretholdes gennem længere tid, da patienterne kan udvikle antistoffer imod det bovine enzym. Der kan også forsøges med knoglemarvstransplantation fra ikkebeslægtede eller haploidentiske donorer (forældre), men i de tilfælde er mortaliteten høj (henholdsvis 37% og 70%) [3].

Allerede i 1980'erne var der interesse for ADA-SCID som en mulig kandidat for behandling med genterapi. Dette skyldtes bl.a., at resultater tydede på, at få transplanterede celler kunne give fuld immunrestitution.

I 1990'erne publicerede flere grupper kliniske forsøg med genterapi ved brug af genmodificerede T-celler [4] og hæmatopoietiske stamceller [5, 6]. Efter behandlingen kunne der måles ekspresion af ADA i de genmodificerede celler, men ingen af patienterne kunne klare sig uden PEG-ADA [4].

## LOVENDE RESULTATER MED ADA-SCID

*Aiuti et al* publicerede i 2002 de første positive resultater med genterapi uden samtidig behandling med PEG-ADA [7]. To patienter blev behandlet med autolog transplantation af hæmatopoietiske stamceller, der *ex vivo* fik ADA-genet overført med murine retrovirale vektorer (**Figur 1**). Desuden fik patienterne konditionerende behandling med en lav dosis busulfan, der hindrer celledelingen og ser ud til at gøre knoglemarven bedre til at modtage de genmodificerede celler.

I 2009 publicerede *Aiuti et al* [8] nye resultater, nu med i alt ti patienter. To af disse patienter var de samme, som blev beskrevet i 2002, og nu var yderli-

gere otte patienter medtaget i opgørelsen. Det blev rapporteret, at otte af de ti patienter havde fået varig bedring af immunforsvaret og ikke behøvede behandling med enzymsubstitution.

Et år efter behandlingen kunne man finde de nye ADA-gener i henholdsvis 52%, 59% og 88% af B-, *natural killer* (NK)- og T-cellerne i blodet. ADA-aktiviteten i erythrocytter, T-celler og mononukleære celler var betydeligt højere end ved forsøgets start, og koncentrationen af adenosin-metabolitter i erythrocytter var reduceret og holdt sig lav i resten af observationsperioden. Samtidig steg det samlede antal af henholdsvis T-, B- og NK-celler i blodet, og var efter tre år signifikant højere end før behandlingen. Hos fem patienter var antallet af T-celler over den normale nedre grænseværdi. T-cellerne udviste proliferativt respons mod mitogener og hos de fleste patienter ligeledes mod candida, tetanustoksin og alloantigener. Desuden kunne der påvises reaktivering af thymus' aktivitet, idet der blev målt en stigning i antallet af cirkulerende naive T-celler.

Alle patienter er i dag i live. De ni patienter, der kunne evalueres, har fået det bedre, de kan omgås andre mennesker og har færre infektioner. To af patienterne har brug for behandling med PEG-ADA. Den ene af disse fik den laveste dosis genmodificerede stamceller, den anden havde inden forsøgets start autoimmun hæmolytisk anæmi og fik efter behandlingen autoimmun trombocytopeni. Denne patient fik efter få måneder genoptaget PEG-ADA-behandlingen og blev ikke yderligere evalueret.

De observerede bivirkninger var neutropeni, som hos to patienter varede over 30 dage, trombocytopeni, hypertension (en patient), centralt venekateter (CVK)-infektion (to patienter), Epstein-Barr-virus-reaktivering (en patient) og autoimmun hepatitis (en patient). Der sås ingen tilfælde af leukæmi eller anden klonal ekspansion af de genmodificerede celler.

Hvorfor det denne gang er lykket at opnå bedret immunfunktion og vedvarende lav koncentration af metabolitter hos otte ud af ti patienter, så de ikke har behov for enzymsubstitution, kan have flere årsager. En årsag kan være, at der i dette forsøg ikke blev givet PEG-ADA samtidig. Den deraf følgende højere koncentration af toksiske metabolitter giver en vækstfordel for de genmodificerede celler [6, 9]. Andre mulig-

heder er brugen af mild konditionering, samt mere effektiv genoverførsel [8].

### GENTERAPI AF X-BUNDEN FORM FOR SVÆR KOMBINERET IMMUNDEFEKT

I 2000 troede man, at man succesfuldt kunne behandle en anden form for arvelig immundefekt med genterapi, da *Cavazzana-Calvo et al* [10] i et forsøg, der blev udført i Paris, beskrev fuld immunrestitution hos børn med den X-bundne form for SCID. Imidlertid udviklede fire af de ti behandlede patienter senere T-celle-leukæmi. Analyse af de klonale celler tydede på, at en mulig årsag var vektorintegration i nærheden af LMO2-genet, der kan klassificeres som et protoonkogen. Hos en patient var integrationen i nærheden af et andet protoonkogen, CCND2. En af patienterne døde som følge af leukæmien [11]. Lignende resultater er beskrevet i et forsøg, der blev udført i London [12]. I det forsøg udviklede en ud af ti patienter leukæmi, og også her sås integration nær LMO2-genet [13].

### VEKTORINTEGRATION

I forsøget med genterapi af ADA-SCID har *Aiuti et al* [14] analyseret den retrovirale vektors integration i både de hæmatopoietiske stamceller og cellerne i det perifere blod. Herved kunne man undersøge risikoen for, at der senere vil opstå lignende alvorlige bivirkninger som i forsøget med X-bunden SCID. Man fandt, at integrationen i genomet ikke er tilfældig. Foretrukne steder er især gættede områder, promotorer og højt udtrykte gener. Der er, ligesom ved X-bunden SCID, fundet integration nær protoonkogenet LMO2 og gener, der styrer cellevæksten, men det har ikke resulteret i klonal ekspansion hos disse patienter.

Dette kunne tyde på, at integration nær LMO2 ikke er tilstrækkelig til at medføre leukæmi, men at yderligere mutationer eller andre påvirkninger er nødvendige [11, 13].

### ÅRSAGER TIL LEUKÆMIUDVIKLING VED X-BUNDEN SERVEE COMBINED IMMUNODEFICIENCY

Hvorfor udvikling af leukæmi ses ved den X-bundne form og ikke hos patienter med ADA-SCID er ikke endeligt fastlagt, men der kan være flere forklaringer.

En årsag kan være forskellen på de indsatte gener [8]. ADA er et husholdningsgen, hvis genprodukt indgår i purinmetabolismen [1]. Genet, der overføres ved X-bunden SCID er IL2RG, som koder for IL-2-receptorens  $\gamma$ -kæde [10]. Proteinets overreguleres ved T-celleaktivering og inducerer T-celleproliferation, når  $\gamma$ -kæden interagerer med receptoren for forskellige cytokiner, dvs. at proteinet i sig selv kan give anled-

ning til hastig vækst af T-celler [8]. *Dave et al* [15] har beskrevet, at de ændringer i ekspansionen af IL2RG, der ses, når dette udtrykkes af en vektor, der er baseret på retrovirus, kan have en sådan effekt på differentiering og vækst af cellerne, at IL2RG-genet bliver onkogent. Hvis en celle får genet integreret nær et protoonkogen, som f.eks. LMO2, kan der være basis for, at IL2RG og LMO2 kan samarbejde om udviklingen af leukæmi.

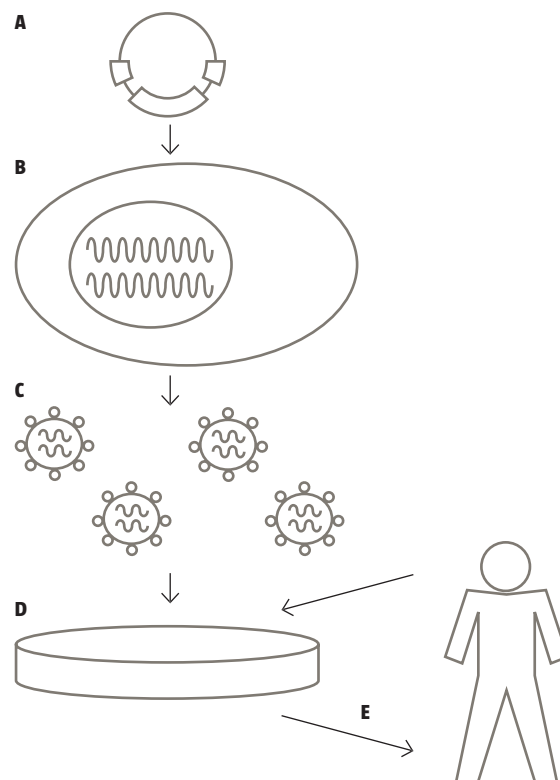
Ifølge en anden mulig forklaring, der er baseret på en række dyreforsøg, er det sygdommen X-bunden SCID i sig selv, der giver øget risiko for udvikling af leukæmi efter genterapi. Det kan skyldes, at den hurtige ufysiologiske prolifération af genmodificerede celler, der ses efter genterapien, kan give øget risiko for ophobning af mutationer og klonal selektion. Kombineres dette med integration nær et protoonkogen, øges risikoen yderligere [16].

### KLONAL UDVIKLING VED KRONISK GRANULOMATØS SYGDOM

Endnu en immundefekt, der er blevet forsøgt behandlet med genterapi, er kronisk granulomatøs sygdom (CGD). Denne sygdom skyldes mutation i et af de gener, der koder for et af de fire *subunits* i NADPH-komplekset, hvilket resulterer i nedsat antimikrobiel akti-

FIGUR 1

**A.** Plasmid med genet for enzymet adenosindeaminase (ADA) og *long terminal repeat*-sekvenser. **B.** Pakkecelle med gener, der er nødvendige for replikation. **C.** Retrovirale vektorer med ADA-gener produceret i pakkecellen. **D.** Genoverførsel til patientens egen hæmatopoietiske stamceller *ex vivo*. **E.** De genmodificerede celler infunderes.





## FAKTABOKS

Det er i et italiensk forsøg lykkedes at behandle patienter med den arvelige immundefekt adenosin-deaminase (ADA)-svær kombineret immundefekt (SCID) med genterapi. Ud af de ti behandlede patienter klarer otte sig uden enzymsubstitution.

I et tilsvarende behandlingsforsøg med en anden arvelig immundefekt, X-bunden SCID, udviklede fem ud af 20 patienter leukæmi – sandsynligvis pga. utilsigtet aktivering af gener omkring integrationsstedet.

Ingen af ADA-SCID-patienterne viser tegn på malign udvikling, men også ved disse patienter er der fundet integration nær protoonkogenet. Genterapimetoderne kan således stadig forbedres.

vitet i fagocytter pga. manglende produktion af superoxider. En stor del af CGD udgøres af den X-bundne form, hvor genet, der koder for gp91<sup>phox</sup>-subunit'en er defekt [17].

Ott *et al* [18] beskrev i 2006 behandling af to patienter med CGD med konditionering med busulfan og genterapi med murine retrovirale vektorer, der indeholdt genet for gp91<sup>phox</sup>. Hos begge patienter sås genmodificerede celler i blodet med funktion af NADPH, samt klinisk bedring. Dog sås ikke fuld immunrestitution, og den ene patient døde efter 2,5 år af sepsis. Der var på dette tidspunkt stort set ingen gp31<sup>phox</sup>-ekspression [17]. Hos begge patienterne fandt man klonal ekspansion af myeloide celler efter vektormedieret aktivering af vækstfremmende gener. Dette var ikke forventeligt, da man i forsøg med mus ikke havde fundet lignende klonal ekspansion.

Hvorfor en sådan ekspansion kunne ses, er ikke klarlagt, men det kan skyldes selve sygdommens og/eller transgenets natur eller brugen af mobiliserede CD34+ -celler i stedet for celler, der er isoleret direkte fra knoglemarven [8]. Det, der er mest mistænkt, er dog brugen af en promotor, der virker meget effektivt i hæmatopoietiske stamceller, og som derfor kan være ansvarlig for aktivering af gener i nærheden af integrationsstedet [18].

## KONKLUSION

Genterapi af arvelig svær kombineret immundefekt har været længe undervejs, og nyligt opnåede resultater med genterapi af en af formerne, ADA-SCID, er lovende. På baggrund af tidligere forsøg med behandling af X-bunden SCID, hvor der er set udvikling af leukæmi pga. aktivering af gener omkring integrationsstedet [11], er der lavet en grundig analyse af vektorintegrationen hos ADA-patienterne. Ligesom ved genterapi af X-bunden SCID blev der fundet integration nær protoonkogenet, men dette har ikke givet anledning til klonal ekspansion [14]. Det kan ikke på

nuværende tidspunkt afvises, at der vil komme lignende alvorlige bivirkninger hos ADA-patienterne [8]. En mulig forbedring, der kan øge sikkerheden, er brug af forbedrede vektorer. Noget tyder på, at vektorer, der er baseret på lentivirus, er mere sikre end de hidtige benyttede vektorer, der er baseret på murine retrovirus, idet lentivirale vektorer integrerer mindre selektivt omkring vigtige gener og dermed giver lavere risiko for utilsigtet genaktivering [19]. Sammenlignet med de øvrige behandlingsmuligheder for patienter med denne form for SCID, hvor der ikke kan findes en HLA-matchende donor, er genterapi et alternativ, der fortjener yderligere undersøgelse og udvikling [2, 8]. Behandlingen blev af det europæiske lægemiddelagentur, *European Medicines Agency*, i 2005 tildelt *orphan drug*-status.

**KORRESPONDANCE:** Line Barrett Petersen, Paludan Müllersvej 37, 1. th., 8210 Århus V. E-mail: line.barrett@studmed.au.dk

**ANTAGET:** 11. august 2009

**FØRST PÅ NETTET:** 4. januar 2010

**INTERESSEKONFLIKTER:** Ingen

En fuldstændig litteraturliste kan fås ved henvendelse til forfatterne.

## LITTERATUR

- Hirschhorn R. Overview of biochemical abnormalities and molecular genetics of adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Res* 1993;33:S35-41.
- Kohn DB, Candotti F. Gene therapy fulfilling its promise. *N Engl J Med* 2009;360:518-21.
- Antoine C, Muller S, Cant A *et al*. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet* 2003;361:553-60.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD *et al*. 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 *et al*. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 1995;270:470-5.
- Kohn DB, Hershfield MS, Carbonaro D *et al*. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 1998;4:775-80.
- Aiuti A, Slavin S, Aker M *et al*. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002;296:2410-3.
- Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S *et al*. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 2009;360:447-58.
- Aiuti A, Vai S, Mortellaro A *et al*. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* 2002;8:423-5.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G *et al*. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669-72.
- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP *et al*. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008;118:3132-42.
- Gaspar HB, Parsley KL, Howe S *et al*. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004;364:2181-7.
- Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K *et al*. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008;118:3143-50.
- Aiuti A, Cassani B, Andolfi G *et al*. Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J Clin Invest* 2007;117:2233-40.
- Dave UP, Jenkins NA, Copeland NG. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science* 2004;303:333.
- Shou Y, Ma Z, Lu T *et al*. Unique risk factors for insertional mutagenesis in a mouse model of XSCID gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11730-5.
- Alexander BL, Ali RR, Alton EW *et al*. Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 1). *Gene Ther* 2007;14:1439-47.
- Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K *et al*. 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.
- Montini E, Cesana D, Schmidt M *et al*. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 2006;24:687-96.