



UPPSALA  
UNIVERSITET

# Genterapi

Martin Lindstedt Mandal

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2008  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

## Sammandrag

Genterapi är en metod som genom virala vektorer tillför celler gener som är av terapeutiskt värde för patienten. De vanligast använda vektorerna är retrovirus och adenovirus. Adenoassocierade- och herpes typ 1 virus används också. Konstruktion av genterapeutiska vektorer görs i packningsceller där de terapeutiska genkonstruktionerna med nödvändiga virala gener förs in separat från de virala gener som kodar för viruspartiklars strukturer. Endast de terapeutiskt relevanta generna förses med en packningssignal, vilket försäkrar att genterapeutiska virus blir inkapabla till reproduktion i patienten. Det stora genombrottet för genterapi anses vara en studie i Frankrike där man genom retrovirus inkorporerade genen *ILR2G* i patienter som led av X-bunden allvarlig kombinerad immunförsvarsbrist. Försöket sågs först som en stor succé då majoriteten av patienterna botades. Efter några år upptäcktes det att några av patienterna utvecklade leukemi på grund av att den retrovirala vektorn hade placerat *ILR2G*-genen i LIM-domän 2, vilket ledde till okontrollerad celledelning av vissa T-lymfocyter. Cancer är den sjukdom mest genterapi är fokuserad på och flera lovande försök har gjorts. Kina är det första land som har av en myndighet godkänd användning av genterapi på bred front. En adenoviral vektor kallad Gendicine godkändes 2004 och har använts för att behandla huvud- och nackcancer.

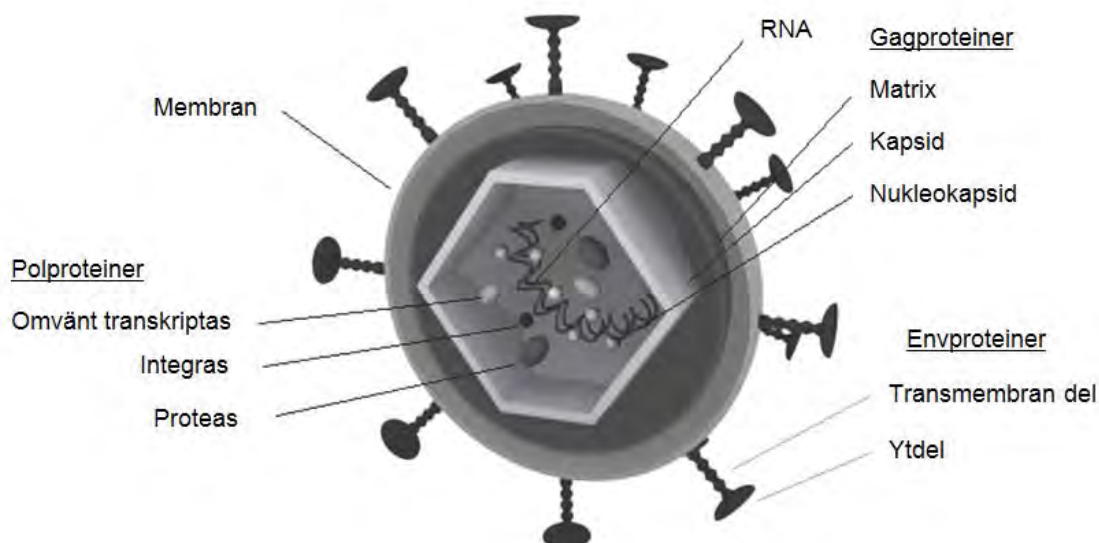
## Inledning

Genterapi är en relativt ny metod inom medicinen. Det går ut på att med hjälp av virus föra in nytt genetiskt material i människor. Denna metod öppnar nya möjligheter för hur vi kan bota sjukdomar. Jag ämnar med denna uppsats ge en översikt av de virus som ofta används som vektorer för genterapeutiskt material och hur de görs om till genterapeutiska vektorer. Jag tar också upp genterapeutisk behandling av X-SCID som är en milstolpe inom genterapin men påvisa också de problem genterapin kan orsaka. Vidare behandlar jag senare forskning rörande genterapi vid cancer, som är den sjukdom mest forskningsresurser satsas på.

## Vanliga virus inom genterapi

### Retrovirus

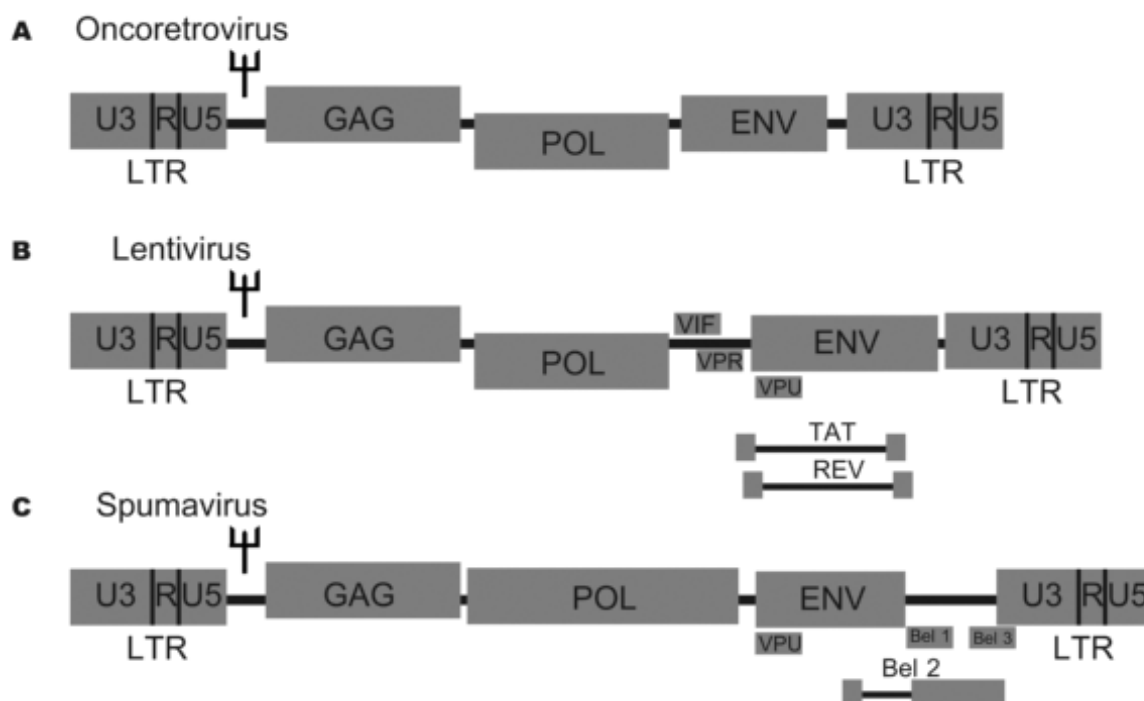
Retrovirus utmärkande egenskap är att de genom omvänd transkription kan inkorporera sitt genom i värdceller. De klassificeras i olika undergrupper som onkoretrovirus, lentivirus och spumavirus och infekterar alla vertebrater (Kootstra & Verma 2003). Strukturen utgörs av ett membran försett med transmembrana proteiner, innanför vilket kapsiden innehållande genomet bestående av två RNA-molekyler finns (Segura m.fl. 2006). Genomet har tre gener, *gag*, *pol* och *env* som är grundläggande för virusets funktion. Generna flankeras på båda sidor av långa terminella upprepningar (LTR) och på en sida finns en packningssignal ( $\Psi$ ) (Kootstra & Verma 2003). Genen *gag* kodar för proteinet Gag som under sin mognad delas i tre mindre protein och utgör virusets nödvändiga strukturella delar. Dessa tre är matrix-, kapsid- och nukleokapsidprotein. Matrixproteinet skapar ett yttre hölje som omsluter kapsiden. Kapsiden innehåller i sin tur genomet associerat med nukleokapsidproteinet. *pol* kodar för tre proteiner som är nödvändiga för integration i värdens genom och virusets livscykel. Dessa proteiner är proteas, integras och omvänt transkriptas. *env* kodar för de transmembrana protein som sitter på viruspartikelns utsida. Envproteinet klyvs i två separata delar, en transmembrandel och en ytdel, som hålls ihop av icke-kovalenta interaktioner och fäster viruset till en lämplig värdcell (figur 1). (Segura m.fl. 2006).



Figur 1. Översikt av retrovirus struktur och dess komponenter.

Retrovirus infekterar sin värd genom bindning via membranproteinet till en receptor på värdcellens yta. Därefter sammanfogas cell och virus genom membranfusion, vilket leder till att viruset får tillträde till cellens insida. Väl inne i cellen konverteras det virala RNA:t till DNA av omvänt transkriptas. Det nybildade DNA:t förflyttas sedan till cellkärnan där det med hjälp av virusintegrasen inkorporeras i värdens genom. Transkription av det i värdens integrerade virala DNA påbörjas från LTR-sekvensen och nya viruspartiklar kan skapas. De nya viruspartiklarna sätts samman vid cellmembranets yta där nybildade virus kan knoppa av från värdcellen. Envprotein inkorporeras i lipidmembranets yta, medan Gag och Pol går igenom en mognadsprocess, medierad av virusproteaset, inuti den nyformade viruspartikeln. (Verma & Weitzman 2005)

Onkoretrovirus är de som har den enklaste genetiska strukturen med LTR-sekvenser som flankerar de tre nödvändiga generna *gag*, *pol* och *env*. Lentivirus och spumavirus har en mer komplex genetisk struktur med fler gener (figur 2)(Verma & Weitzman 2005).

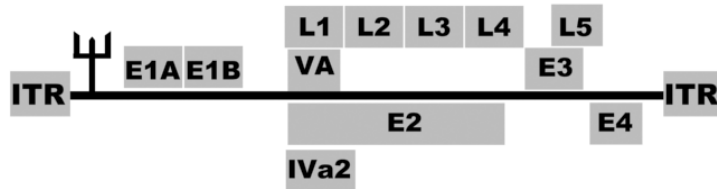


Figur 2. Genetisk överblick av exempel på onkoretrovirus (A), lentivirus (B), och spumavirus (C). Långa terminella upprepningar (LTR) omger genomen på båda sidor. Mellan LTR-sekvensen och *gag* finns packningssignalen ( $\Psi$ ). För vidare förklaringar, se texten.

## Adenovirus

Adenovirus är vanligt förekommande virus som existerar i en mängd olika serotyper. Till skillnad från retrovirus så integreras vanligtvis inte adenovirusets genom i värdens, utan existerar som en episom i cellkärnan. Det virala genomet består av dubbelsträngat DNA (dsDNA) med en storlek på ungefär 36 kb med överlappade transkriptionenheter. En omfattande splitsning ger upphov till över 50 olika protein, varav 11 utgör strukturprotein. Adenovirus har en livscykel som delas in i två faser, tidig och sen, skilda åt av initieringen av viral DNA-transkription. Olika gener uttrycks vid olika tidpunkter i virusets livscykel och de delas därför in i tre olika grupper beroende på vid vilken tidpunkt de uttrycks. Dessa grupper är tidiga gener E1A, E1B, E2, E3 och E4, försenade gener IX och IVa2 och en tredje grupp, sena gener, vilken ger upphov till fem mRNA-molekyler L1, L2, L3, L4 och L5. Genomet

flankeras på båda sidor av inverterade terminella upprepningar (ITR) som innehåller signaler för initiering av transkription på båda sidor. På en sida av genomet finns en packningssignal ( $\Psi$ ) (figur 3). (Verma & Weitzman 2005).



Figur 3. En schematisk överblick av ett adenovirusgenom. Genomet omges på båda sidor av inverterade terminella upprepningar (ITR). Packningssignal ( $\Psi$ ) finns på en sida mellan ITR och de tidiga generna. För vidare förklaringar, se texten.

Genprodukter från E1 försätter värdcellen i en fas med ökad transkription och syntes av viral DNA och proteiner. E2 kodar för protein involverade i DNA-replikation och för strukturella delar av nya viruspartiklar (Kootstra & Verma 2003). E4 kodar för genprodukter involverade i övergången mellan tidig och sen fas i den virala livscykeln. Genprodukterna från E3-regionen motverkar värdens immunförsvar genom att dämpa transporten av nysyntetiserade virala protein till värdcellens histokompatibilitetskomplex (MHC)<sup>1</sup>, där de annars skulle identifiera cellen som virusangripen för immunförsvaret. E3s genprodukter reducerar också effekterna av tumörnekrosfaktorn (TNF, tumor necrosis factor)<sup>2</sup> på infekterade celler. Genprodukter från den sena transkriptionsenheten möjliggör sammansättning av nya viruspartiklar. (Smith 1995)

Det finns mer än 50 serotyper av adenovirus som kan infektera en mängd olika organ. Infektion av en värdcell inleds med att proteiner förankrade i viruskapseln binder till värdcellens coxsackie-adenovirusreceptor (CAR). Därefter krävs också för effektiv endocytos av viruset att virala pentosbaser binder till integrinreceptorn  $\alpha_v$  (Young 2006). Väl inne i värdcellen tar sig viruspartikeln ut ur endosomen den inneslutits i under endocytosen och tar sig till cellkärnan. Under vägen dit bryts den virala kapsiden gradvis ned och viralt DNA kan ta sig in i cellkärnan genom nukleära porer. Väl inne i kärnan kan transkription och proteinsyntesen för nya viruspartiklar initieras. (Verma & Weitzman 2005) De nybildade virus tar sig ut från värdcellen genom att lysa den (Kootstra & Verma 2003).

### Adenoassocierade virus

Adenoassocierade virus (AAV) är små och har ett genom bestående av enkelsträngat DNA (ssDNA). Viruset anses vara ickepatogent. Genomet innehåller endast två gener, *rep* och *cap*, flankerade av ITR-sekvenser (figur 4). Genomet har en storlek på cirka 4,7 kb (Verma & Weitzman 2005). *rep* kodar för proteiner involverade i integration av virus-DNA i värdens genom och för replikation. *cap* kodar för tre proteiner som utgör viruspartikelns capsid (Smith

<sup>1</sup> MHC är en komponent av immunförsvaret som presenterar främmande ämnen för immunförsvarets T-celler och därmed stimulerar immunrespons (Abbas & Lichtman 2005).

<sup>2</sup> TNF är ett cytokin som rekryterar immunförsvarets celler till inflammatoriska områden och aktiverar dessa att bekämpa mikrober. TNF kan också inducera apoptos av målcellen (Abbas & Lichtman 2005).

1995) och för de strukturer som är avgörande för virusets tropism<sup>3</sup> (Verma & Weitzman 2005). Fem serotyper av AAV har hittills identifierats, varav serotyp 2 (AAV-2) är den vanligaste typen som används inom genterapi och har möjlighet att infektera en rad olika vävnader. AAV-2 och 3 har liknande *cap* sekvenser, medan AAV- 4 och 5 har något varierade *cap*-sekvenser, vilket ger dem en annan tropism jämfört med de förra. Alla AAV serotyper delar dock samma generella genetiska struktur (figur 4) (Verma & Weitzman 2005).



Figur 4. Schematisk översikt av AAV genom. *rep* och *cap* flankerade av ITR

Infektion av en cell inleds med att viruset binder till en receptor på värdcellen. Därefter följer endocytos av viruspartikeln. Det endocyterade viruset tar sig sedan ur den endosom det befinner sig i och tar sig in i cellkärnan där det virala DNA:t frigörs. Eftersom det virala genomet består av ssDNA så behöver det konverteras till dsDNA innan transkription av genomet kan påbörjas (Verma & Weitzman 2005). När det virala genomet är dubbelsträngat dirigeras det av proteiner från *rep* att integreras i kromosom 19 genom ickehomolog rekombination. Här förblir det virala genomet integrerat under värdcellens livstid. För att nya viruspartiklar ska produceras krävs infektion av så kallade hjälpvirus som kan vara adenovirus eller herpesvirus. Dessa initierar transkription av AAV genomet som packas som ssDNA i kapsider och undkommer värdcellen tillsammans med hjälpviruset. (Kootstra & Verma 2003).

### Herpes simplex-virus typ 1 (HSV-1)

Herpesviruset är ett vanligt förekommande virus kanske mest känt för att orsaka munsår. HSV-1 är uppbyggt av fyra komponenter, ett membran, tegument, kapsid och genom. Membranet består av fosfolipider och innehåller tolv glykoproteiner som är grundläggande för virusets intrång i en värdcell. Tegumentet ligger mellan det yttre lipidmembranet och kapsiden. Det består av minst tio virala proteiner med varierande funktioner viktiga för infektion av en cell. Kapsiden är uppbyggd av sju proteiner och kapslar in det virala genomet som består av dsDNA och har en storlek på 152 kb. Genomet indelas i två delar, unika långa ( $U_L$ ) och unika korta ( $U_S$ ) delar flankerade av terminella upprepningar (TR). Genomet kodar för mer än 80 olika proteiner.

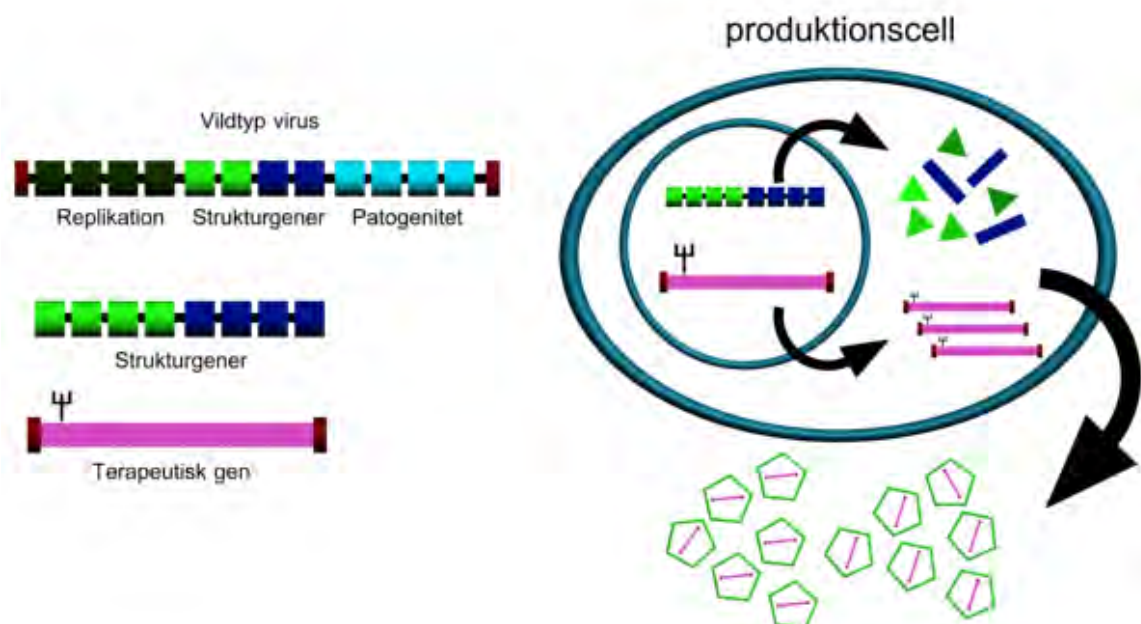
Infektion med HSV-1 virus kan ha olika resultat beroende på vilken celltyp som blir angripen. Infektion av slemhinnor och epitelceller leder till celllys, medan infektion av neuroner leder till ett latent tillstånd av viruset. HSV-1s bindning till och fusion med värdcellens membran möjliggörs av fyra glykoproteiner i virusets membran. Dessa binder till heparansulfat och receptorerna herpesvirusintrångsförmedlare A (HvE1A) och C (HvE1C) på värdcellen. Under en lytisk replikationsfas frigörs proteinet Vhs från virusets tegument. Det stänger av värdcellens proteinsyntes. Efter det frigör kapsiden viralt DNA i cellkärnan. Inom några timmar så

<sup>3</sup> Avgör vilka celler viruset kan infektera.

initieras syntes av virala proteiner. De delas in i tre kategorier:  $\alpha$  eller omedelbart tidiga gener,  $\beta$  eller tidiga gener och  $\gamma$  eller sena gener. Proteinsyntesen är väl reglerad och genprodukter skapas från gener i ordningen  $\alpha$ ,  $\beta$  och sist  $\gamma$ . När genprodukter från  $\beta$  har producerats påbörjas transkription av nytt viralt DNA som kan knoppa av från cellkärnan i nygjorda kapsider efter det att  $\gamma$ -genprodukterna är klara. På vägen till golgiapparaten får kapsiden sitt tegument och yttre hölje och kan sedan undkomma värdcellen genom att utsöndras i en vesikel. De nyproducerade viruspartiklarna kan istället för att infektera nya slemhinne-celler eller epitelceller infektera neuroner. Detta gör de genom att binda vid axoner och sedan låta kapsiden transporteras bakåt genom axonen till cellkärnan. Väl inne i cellkärnan kan viruset etablera sig latent. Exakt vilka virala gener som är ansvariga för att hålla viruset i ett latent tillstånd är inte helt känt, men uttryck av latensassocierade proteiner (LAT) som är under kontroll av en promotor med hög aktivitet i neuroner tros vara en stor bidragande faktor. (Verma & Weitzman 2005).

## Konstruktion av virus för genterapi

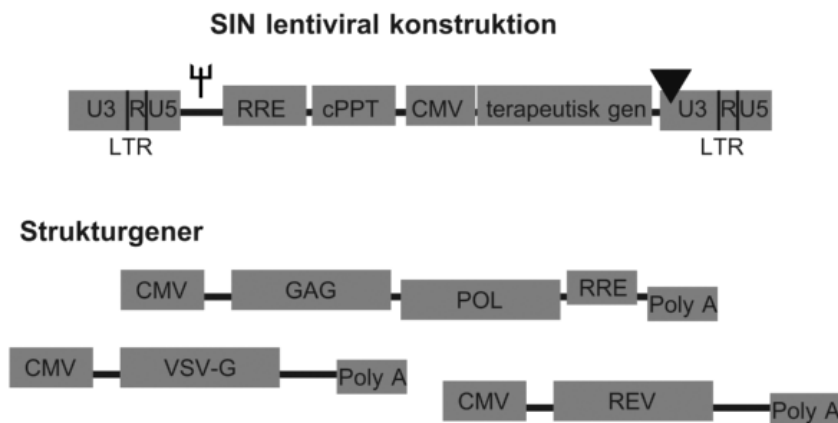
Målet med genterapi är att förändra genuttrycket i en cell genom att tillföra ny arvs massa. När detta görs med virus som vektorer krävs en omfattande manipulering av deras genom för att undvika de annars vanligt förekommande patogena effekter virus för med sig. Målet med konstruktioner av genterapeutiska virus är alltså att de ska kunna leverera nytt genetiskt material till värdceller utan att skada dem. Detta görs genom att byta ut delar av det genetiska materialet mellan de terminella upprepningarna (TR, LTR eller ITR) mot den gen eller de gener man vill tillföra målcellen eller värdcellen (figur 5). Att byta ut gener från vildtyps- (WT)-viruset är också av stor vikt för att undvika att viruset genom homolog rekombination med andra virus återgår till sin WT genotyp, något som inte får inträffa då genterapin då i stället kan bli sjukdomsalstrande istället för ett botemedel. (Verma & Weitzman 2005).



Figur 5. Förenklat schema för att skapa genterapeutiska vektorer. Strukturgener från vildtypsviruset förs in i en produktionscell separat från de gener man vill ha i genterapivektorn. Strukturgenerna saknar signal för packning i virus och förs endast den terapeutiska vektorn med själva virusstrukturen. Det genom man vill inkorporera i vektorn förses med packningssignal ( $\Psi$ ) och nödvändiga element för uttryck i infekterade celler. På så vis skapas terapeutiska vektorer som utnyttjar virus förmåga att infektera celler och uttrycka gener i dem, men saknar förmåga att själva kontrollera sin livscykel. Omarbetad från Verma & Weitzman 2005.

## Konstruktion av retrovirala vektorer

Retrovirala vektorer konstrueras oftast med utgångspunkt i murint leukemivirus (MLV) för onkoretrovirala, samt humant immunbristvirus typ 1 (HIV-1) för lentivirala vektorer. Alla gener utom de som är nödvändiga för integration i målcellens genom tas bort och ersätts med det genetiska material man vill tillföra målcellen. Den gen eller de gener som ska användas i vektorn sätts samman med virala LTR sekvenser, nödvändiga för integration i värdgenomet och en packningssignal, nödvändig för att kunna packa den eller de terapeutiska gener man avser använda, i en viruspartikel. Denna konstruktion sammanförs sedan i en produktionscell med en konstruktion innehållande de virala gener som kodar för virusets strukturella delar, men som saknar packningssignal och LTR sekvenser. Detta leder till att alla virala beståndsdelar finns på plats för att skapa nya viruspartiklar, men eftersom det bara är den terapeutiska konstruktionen som har en packningssignal så kapslas bara dess gener in i viruspartiklar, inte det potentiellt patogena virusets egna gener. På så sätt kan man framställa virus som saknar patogena effekter, men kan tillföra terapeutiska gener (figur 5,6). (Verma & Weitzman 2005). LTR-sekvensen innehåller en promotor, U3, som kan bytas ut mot en annan, kallad CMV. CMV-promotorn sätts in i 5' LTR sekvensen och ger en högre transkriptionsaktivitet och därmed ökar mängden producerade viruspartiklar. 3' LTR sekvensen som blir 5' U3 LTR sekvensen i det omvända transkriptivet lämnas intakt för att generna ska kunna integreras i värdgenomet. För att förvissa sig om att retrovirala sekvenser insatta i värdgenomet inte ska kunna mobiliseras genom homolog rekombination med defekta rester av retrovirus som är spridda i människans genom, har man skapat en typ av vektorer kallade självinaktiverande vektorer (SIN). I dessa har stora delar av 3' U3 regionen tagits bort, och transkription av de terapeutiska generna drivs helt av cellegna specifika promotorer. Detta leder till att genterapi blir mer specifik, då endast celler kapabla att initiera transkription från den specifika promotorn uttrycker de gener som är införda genom genterapi (figur 6). (Kootstra & Verma 2003, Alton 2007).



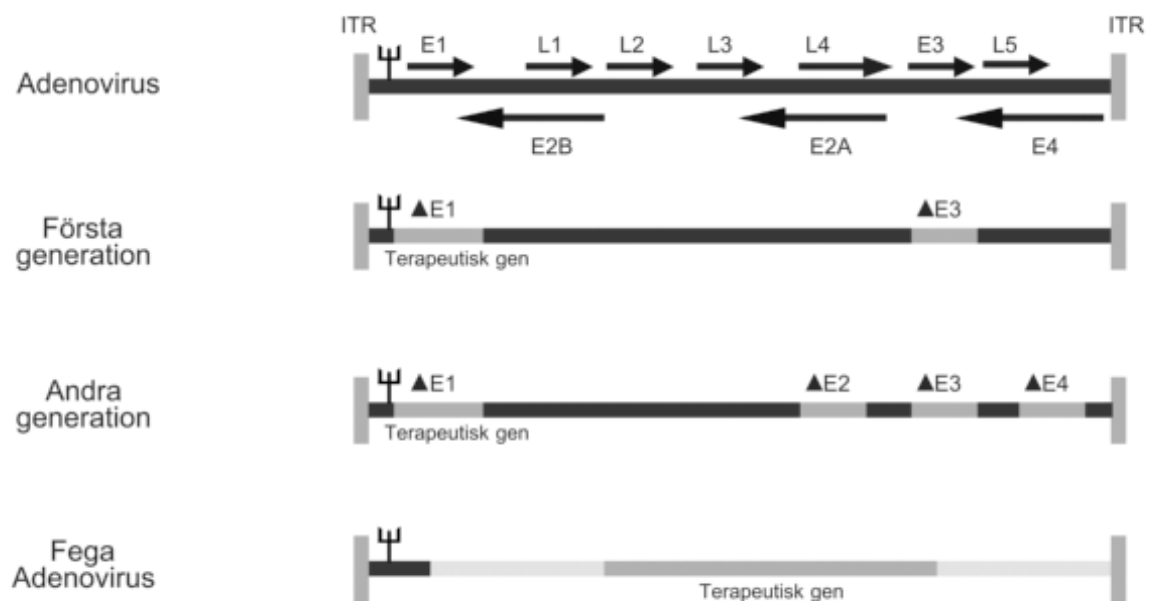
Figur 6. Översikt självinaktiverande (SIN) lentiviral vektor. *gag*, *pol* och *env* är utbytt mot en terapeutisk gen med CMV-promotorn, *rev* mottagliga element (RRE) och den centrala polypurinkanalen (cPPT) omgivna av långa terminella upprepningar (LTR) och på en sida en packningssignal ( $\Psi$ ). RRE och närvaro av *rev* behövs för export av osplitsat RNA från kärnan. cPPT förbättrar importen av proviralt-RNA till kärnan i en infekterad cell. 3' LTR regionen har delar av U3-regionen borttagen för att förhindra transkription från dess promotor. Strukturgenerna kodar för virusets struktur- och funktionsdelar. *gag* och *pol* följt av RRE möjliggör effektiv transport ut ur kärnan, VSV-G kodar för glykoproteiner och modifierar vektorns tropism och REV behövs för att facilitera funktionen av RRE (Kootstra & Verma 2003). För vidare förklaring, se texten.



## Konstruktion av adenovirala vektorer

Flera generationer av adenovirala vektorer har utvecklats genom åren. Ett av de stora problemen med utvecklingen av dessa vektorer för genterapi har varit att konstruera dem så att de inte initierar ett starkt immunsvaret i värdcellen. Detta problem beror på att adenovirus är vanligt förekommande patogener, och därför har de flesta människor ett väl utvecklat immunförsvar mot viruset (Kootstra & Verma 2003).

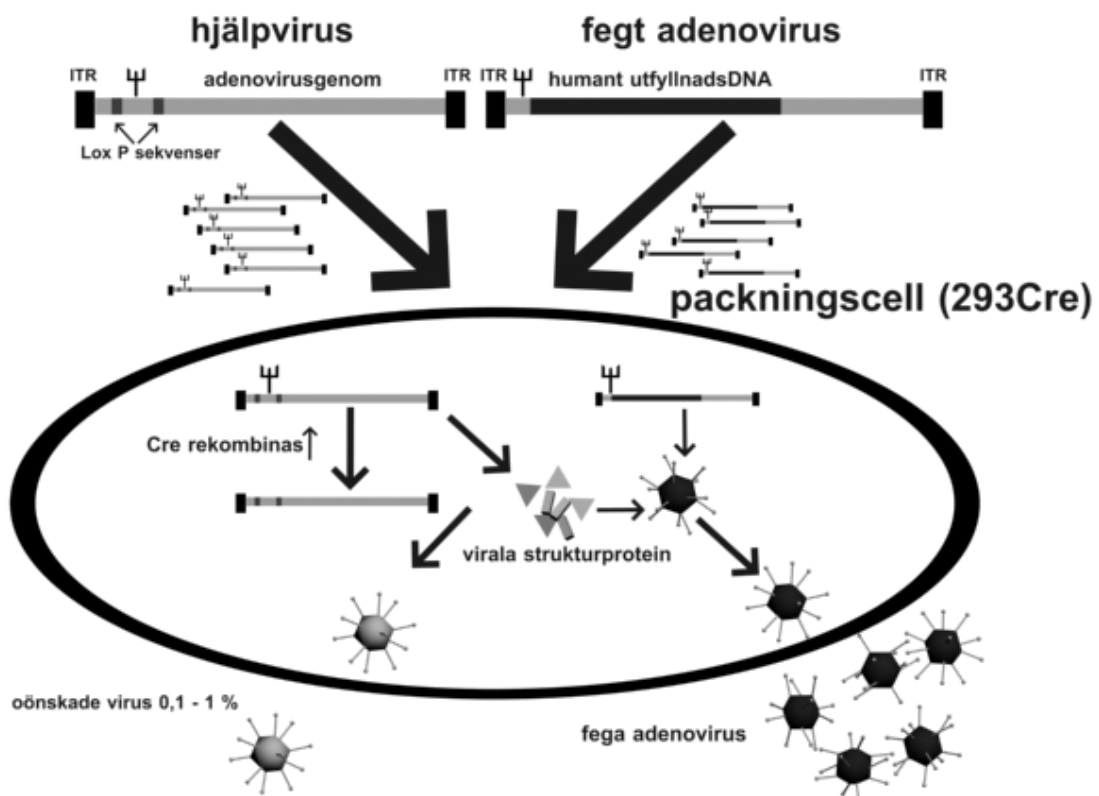
I den första generationen adenovirala vektorer nöjde man sig med att byta ut E1-genen mot den gen man ville tillföra patienten. Anledningen till att man valde att byta ut E1 var ett önskemål om att hämma replikation av viruset i värden, något som skulle kunna ge oönskade patogena effekter. Konstruktionen var till viss del framgångsrik. Man lyckades stoppa replikation av viruset, men genprodukter från de gener som fanns kvar i det virala genomet gav en stark immunrespons som i sin tur ledde till att de terapeutiska effekter viruset förmedlade eliminerades av immunförsvaret. Med den andra generationen av adenovirala vektorer gick man ett steg längre med modifieringen av genomet. E1 byttes ut mot en terapeutisk gen, och stora delar av generna E2, E3 och E4 togs bort, för att på så vis minska mängden virala genprodukter som kunde upptäckas av immunförsvaret. Den reducerade storleken av E2, E3 och E4 gav också möjlighet att packa större terapeutiska gener i viruset. För många av de virala generna fanns dock kvar och även denna metod utlöste en stark immunrespons (figur 7). (Alba m fl. 2005).



Figur 7. Olika generationer av adenoviruskonstruktioner. "Adenovirus" representerar vildtypsgenomet. "Första generationen" har delar av E1 utbytt mot en terapeutisk gen och delar av E3 borttagen. "Andra generation" har delar av E1 utbytt mot en terapeutisk gen och delar av E2, E3 och E4 borttagna. "Fega adenovirus" har hela genomet utbytt mot en terapeutisk gen med humant genom som utfyllnad för att nå optimal packningsstorlek. För vidare förklaringar, se texten. Modifierad från Alba m fl. 2005. (Alba m fl. 2005).

Tredje generationens adenovirala vektorer kallas fega (gutless) eller hjälpb beroende adenovirus. De har en minimalistisk design och innehåller enbart packningssignalen och den terapeutiska genen, omgiven av 5' och 3' ITR. För att fylla ut genomet till dess optimala packningsstorlek i den virala kapsiden, vilket är 75-105 % av genomets WT storlek (36 kb) har man infört utfyllnads-DNA. Som utfyllnads-DNA har introner från humant DNA använts.

Eftersom dessa fega vektorer saknar alla gener för att skapa nya viruspartiklar behöver de hjälp av andra adenovirus som kan koda för de strukturella delarna. Detta görs i en packningscell. De första terapeutiska konstruktionerna man gjorde på detta sätt hade delar av packningssignalen borttagna för att undvika att de virala strukturdelen integrerades i vektorer som var avsedda för genterapi. Detta gav dock inte helt tillfredställande resultat då för hög halt av icke terapeutiska vektorer kunde återfinnas i de skördade materialet. En alternativ metod har tagits fram där man istället för att modifiera packningssignalen omgett den med *loxP*-sekvenser, vilka fungerar som bindningsställen för Cre-rekombinas. Cre-rekombinas uttrycks sedan i packningscellen (293Cre) och rekombinerar ut packningssignalen. Detta leder till effektivare neutralisering av packningssignalen och färre oönskade viruspartiklar produceras. Mängden oönskade virus kan då sänkas till 0,1 –1 % av de producerade partiklarna. De oönskade virusen tros komma från otillräckliga mängder av uttryckt Cre rekombinas, eller dess för låga förmåga att effektivt genomföra rekombinationen. Liknande metoder har använt ett rekombinas, FLP, som kommer från jäst. Detta rekombinas möjliggör rekombination mellan *fRT*-sekvenser istället för *loxP*-sekvenser, men idén att rekombinera ut packningssignalen är densamma (figur 8). Problemen med att använda Cre och FLP för att rekombinera ut packningssekvensen är att de rekombinerar åt båda håll. De kan alltså återföra packningssignalen. En alternativ metod är att använda rekombinas  $\Phi 31$  som känner igen, och sätter in, olika rekombinations signaler och då undviker att rekombinera tillbaka packningssignalen. (Alba m fl. 2005).



Figur 8. Hjälpvirus och genom för fega adenovirus förs in i packningsceller (293Cre). Packningssekvensen ( $\Psi$ ) omgiven av *lox P*-sekvenser rekombinerar ut från hjälpviruset med Cre-rekombinas som känner igen *lox P*-sekvenser, vilket försäkrar att virala gener inte packas i terapeutiska vektorer utan bara förser det fega adenovirusgenomet med strukturell delar. Cre-rekombinas kan både rekombinera in och ut packningssignalen vilket leder till att de producerade terapeutiska virusen innehåller mellan 0,1 till 1 % virus med vildtypsgener. Modifierad från Alba m fl. 2005.

## Utvalda försök inom genterapi

### X-bunden allvarlig kombinerad immunförsvarsbrist (X-SCID)

Jag har valt att ta upp genterapeutisk behandling av denna sjukdom därför att den tydligt representerar de risker och fördelar genterapi bär med sig. X-SCID var också den första sjukdom som framgångsrikt behandlades med genterapi (Thomas m fl 2003).

#### *Bakgrund*

X-SCID beror på en x-bunden ärftlig mutation i den vanliga  $\gamma$ -kedjan ( $\gamma$ c, Common  $\gamma$  chain) och kodas av genen *IL2RG*.  $\gamma$ c är en del av cytokinreceptorkomplexet som binder och vidarebefordrar effekterna av interleukinerna IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 och IL-21 (Strauss & Costanzi-Strauss 2007, Pike-Overzet m fl. 2007). Dessa är nödvändiga för tillväxt, överlevnad och differentiering av lymfoida stamceller (Cavazzana-Calvo m fl. 2000). Utan den fungerade  $\gamma$ c-receptorn hämmas utvecklingen av T-lymfocyter (T-celler) och naturliga mördarceller (NK-celler), vilket i sin tur leder till att det blir omöjligt för individen att utveckla ett immunförsvar. Patienten blir därför högst mottaglig för infektioner (Cavazzana-Calvo m fl. 2000). De flesta drabbade dör inom sitt första levnadsår om de inte kan få stamceller transplanterade från en perfekt HLA<sup>4</sup>-matchad donator, i vilket fall överlevnadsfrekvensen går upp till 90 %. Om donatorn är delvis genetiskt kompatibel så är överlevnaden 70-78 % (Hacein-Bey-Abina m fl. 2002). Det finns alltså problem med att bota X-SCID genom transplantation av stamceller, varför man utvecklade ett sätt att behandla sjukdomen med genterapi.

#### *Genterapibehandling av X-SCID i Frankrike*

De första publicerade resultaten kom år 2000 (Cavazzana-Calvo m fl. 2000), där man redovisade framsteg med behandlingen av två patienter, 11 och 8 månader gamla. CD34<sup>5</sup> positiva (CD34<sup>+</sup>) celler extraherades från benmärg från de två patienterna och infekterades *ex vivo* med en retroviral vektor baserad på Moloney murint retrovirus (MLV, Moloney murine leukemia virus) bärande en fungerande  $\gamma$ c-gen med den retrovirala LTR-sekvensen som promotor. Vektorn inkuberades tillsammans med CD34<sup>+</sup>-cellerna i tre dagar, varpå man förde tillbaka cellerna i patienterna. Under inkuberingstiden hade 20-40 % av cellerna från patient 1 och 36 % från patient 2 infekterats med virus med den önskade  $\gamma$ c-genen. 15 dagar efter införseln av de genmodifierade cellerna kunde man genom PCR-analys se differentierade blodceller som uttryckte den införda  $\gamma$ c-genen. Vidare kunde man efter 30 dagar (patient 1) respektive 60 dagar (patient 2) se en markant ökning av T-celler. Efter 10 månader kunde man konstatera att X-SCID fenotypen inte längre existerade och att patienterna inte led av några bieffekter (Cavazzana-Calvo m fl. 2000). Två år senare publicerades en uppföljning av behandlingen av Hacein-Bey-Abina m fl (2002). Ytterligare tre patienter hade då behandlats uppföljning av de två första pågick. Man kunde konstatera att genterapin med tillförsel av  $\gamma$ c-genen var framgångsrik. Patienterna 1,2,4 och 5 utvecklade ett fungerande immunförsvar jämförbart med normala nivåer, medan patient 3 ej gagnades av behandlingen. Vid tiden för behandling var patient 3, 4 och 5 10, 1 respektive 3 månader gamla (Hacein-Bey-Abina m fl. 2002). Totalt behandlades 10 patienter under hela försökstiden (Pike-

<sup>4</sup> Molekyler på cellmembranet som identifierar en cell som kroppsegen eller främmande för immunförsvaret (Abbas & Lichtman 2005).

<sup>5</sup> CD34 kan fungera som markör för icke-differentierade lymfocyter (Abbas & Lichtman 2005).

Overzet m fl. 2007). Genterapin var framgångsrik i att skapa genkorrigerade T och NK celler hos 9 av dessa patienter. Av dessa 9 patienter som utvecklade T-celler hade 7 fungerande immunförsvar 7,5 år senare. (Cavazzana-Calvo & Fischer 2007)

### *Försöken i Frankrike ledde till leukemi*

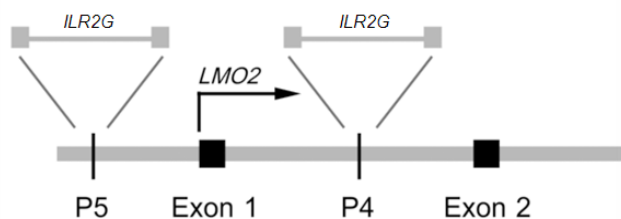
Skakande nyheter nådde världen 2002. En patient i den så framgångsrika franska genterapeutiska studien hade utvecklat leukemi. Något som först troddes vara en enskild incident inträffade igen kort därefter (Check 2002, Check 2003).

År 2003 publiceras en artikel i vilken man försökte förklara hur två<sup>6</sup> av patienterna i de franska försöken hade insjuknat i leukemi. Patienterna 4 och 5 hade under 30 respektive 34 månaders behandling inte lidit av några sidoeffekter. 30 månader efter påbörjad genterapi upptäcktes att patient 4 hade förhöjda värden av T-celler. Detta trodde man dock berodde på en infektion med vattkoppor. Under 3 månader fortsatte T-cell halten att fluktuera mellan 50.000 och 80.000 celler per mm<sup>3</sup>. 34 månader efter påbörjad genterapeutisk behandling steg värdet till 300.000 T-celler per mm<sup>3</sup>. Denna utveckling ansågs allvarlig och behandling mot akut lymfatisk leukemi (T-ALL) påbörjades. Ett liknande händelseförlopp upptäcktes hos patient 5, 34 månader efter påbörjad genterapi och behandling mot T-ALL initierades. 2 månader efter behandlingen för T-ALL ansågs patienterna vara i remission. (Hacein-Bey-Abina m fl. 2003). Man kunde konstatera att anledningen till att patienterna utvecklade leukemi var att den retrovirala vektor man använt sig av i ett fåtal T-celler hade inkorporerat sitt DNA nära LIM-domän 2 (*LMO2*, LIM domain only 2) (figur 9) (Hacein-Bey-Abina m fl. 2003), en gen som har grundläggande betydelse för utvecklingen av nya blodkroppar men ingen känd funktion i utvecklingen av T-celler (McCormack m fl. 2003). Möss som saknar genen dör som embryon efter 10,5 dagar, medan överuttryck av genen leder till leukemi (Strauss & Costanzi-Strauss 2007). Att dessa patienter drabbades av leukemi tros av Hacein-Bey-Abina m fl kunna bero på tillfälligheter. Då *LMO2* är en gen som bidrar till förökning av celler skulle aktivering av den ge en selektiv fördel mot andra celler, och därmed skulle den ta över och ge cancerfenotypen. Hacein-Bey-Abina m fl. spekulerar också i att anledningen till insättningen av den virala vektorn så nära *LMO2* genen kan vara att området är särskilt lämpligt för integration av viruset. (Hacein-Bey-Abina m fl. 2003). I ett experiment utfört av Wu m fl. visade man att MLV virus har en preferens för att integreras i humant DNA nära början av transkriptionenheter, och att de har en åtta gånger högre preferens för integration i CpG-öar<sup>7</sup> jämfört med i slumpmässiga sekvenser (Wu m fl. 2003). Det är därför möjligt att LTR-promotorn i den retrovirala vektorn influerade *LMO2*-genen och ledde till att den överuttrycktes och vilket i sin tur ledde till en okontrollerad förökning av vissa T-celler (Check 2002). Davé m fl. 2004 hävdar att retroviral integration nära *LMO2*-genen inte är tillräckligt för att orsaka leukemi. De menar istället att subtila förändringar i uttrycket av *ILR2G*-genen tillsammans med insättningen nära *LMO2*, behövs för att ge cancer.

---

<sup>6</sup> Ytterligare två patienter insjuknade under liknande former varav en till skillnad från de andra inte kunde räddas. En patient diagnostiserades 2007. (Cavazzana-Calvo & Fischer 2007)

<sup>7</sup> CpG öar är cytosin- och guaninrika delar av genomet ofta associerade med startsignaler för transkription av gener (Wu m fl. 2003).



Figur 9. Integrering av genterapeutisk vektor framför *LMO2* hos patient 5 (P5) och i *LMO2* hos patient 4 (P4) i den franska X-SCID studien.

## Cancer

En stor del av forskningen kring genterapi är riktad mot att finna nya sätt att behandla cancer (figur 12). En åldrande världspopulation och den ökande kunskapen om cancer på molekylär nivå understryker både angelägenheten av forskningen på området, och de allt större möjligheterna att hitta nya behandlingsmetoder (Young 2006). Kinesiska myndigheter gav den 16 oktober 2003 sitt officiella godkännande för genterapeutisk behandlingsmetod mot huvud- och nackcancer. Detta var den första genterapeutiska behandlingsmetoden för allmänt bruk som godkänts av en nationell myndighet (Peng 2005).

### *TRAIL för att bekämpa cancer*

#### Bakgrund

TRAIL (tumörnekrosrelaterad apoptosinducerande ligand, Tumor necrosis related apoptosis-inducing ligand) är ett protein relaterat till TNF som fungerar genom att starta en apoptossignalkaskad i celler, framförallt i tumörceller (Zhang m fl. 2008, Daniels m fl 2005). Flera försök har gjorts där man konstruerat en AAV- eller adenovirusvektor med TRAIL kontrollerad av en promotor för hTERT (humant telomer omvänt transkriptas). hTERT är den katalytiska delen av enzymet telomeras som elongerar telomerer<sup>8</sup>. För elongeringen krävs också en mall för DNA-sekvensen som ska läggas till. Denna kommer från den andra komponenten av telomeras, hTR (telomeras RNA-komponent) (Ulaner 1998). Dessa båda komponenter av telomeras är väl och individuellt reglerade i celler (Cairney 2007). För varje celldelning förkortas telomererna. Detta leder efter många celldelningar till att genomet blir instabilt, vilket kan ses som cellulärt åldrande och leder till apoptos. Om telomeras uttrycks motverkar det den förkortandet av telomererna vid celldelning, cellen åldras därför inte i detta avseende och får egenskaper som på sätt och vis gör den odödlig (Ulaner 1998). Denna egenskap hos telomeras har undersökts i cancerceller och visats sig vara en god indikator för cancerogen aktivitet (Wang 2008). Detta betyder att hTERT ofta är uppreglerad i cancerceller, medan aktiviteten i normala celler är låg. Promotorn för hTERT har därför visat sig vara användbar för att styra uttrycket av terapeutiska gener, avsedda att motverka cancerogena effekter.

#### Adenoassocierade virus uttrycker TRAIL

Under utvecklingen av cancerbehandling med TRAIL har man på senare tid valt att koncentrera sig på användandet av AAV som vektor. AAV har flera fördelar, men också nackdelar. En av fördelarna är att vektortropismen är bred och vektorn därför lämpar sig väl för behandling av cancer i många olika typer av vävnader. Denna egenskap medför också en nackdel, då den breda tropismen också leder till att vektorn kan infektera friska celler (Zhang

<sup>8</sup>Kromosomände.

2008). I och med att TRAIL har placerats under kontroll av hTERTpromotorn begränsar detta de toxiska effekterna till viss del, men det finns friska celler som uttrycker hTERT, t.ex. prekursorer till hematopoetiska-, epitel-, tarm- och hårsäcksceller. Uttrycket av hTERT i dessa celler anses dock vara transient och så torde de potentiellt toxiska effekterna av TRAIL också vara (Wang m fl. 2008).

För att utvärdera effekten av TRAIL på cancerceller har flera försöks gjorts. I två av dessa försök utförda av Zhang m fl. 2008 och Wang m fl. 2008 konstruerades en AAV (AAV-2) vektor innehållande av TRAIL under kontroll av hTERT flankerat av AVV-ITR. En identisk vektor med TRAIL utbytt mot EGFP<sup>9</sup> (förbättrat grönt fluorescerande protein) konstruerades också för att ha en kontroll i försöken, och föra att kunna visualisera fördelningen av vektorn och dess proteinuttryck (figur 10).



Figur 10. Genetisk struktur av AAV TRAIL vektorn och kontrollvektorn med EGFP insatt istället för TRAIL.

Båda grupperna valde att undersöka TRAILs effekt på flera olika typer av cancerceller. Gemensamma val var lungcancerceller och levercancerceller. Ytterligare celler som undersöktes var magcancerceller av Wang m fl. och livmoderhalscancerceller av Zhang m fl. Friska leverceller användes som kontroll (Wang m fl. 2008, Zhang m fl. 2008).

EGFP-varianten av vektorn gav tydliga skillnader i genuttryck i cancerceller jämfört med kontrollceller. Detta bekräftade att genuttrycket var väl kontrollerat av hTERT-promotorn (Wang m fl. 2008). Analys av celler infekterade med TRAIL-vektorn visade markant reduktion av antalet cancerceller korrelerat till tiden efter infektionen. I studien av Zhang m fl. hade efter tre dagar 57 % av levercancercellerna, 23 % av lungcancercellerna och 33 % av livmoderhalscancercellerna dött, jämfört med 5 % av de friska kontrollcellerna (Zhang m fl 2008). Försöket utfört av Wang m fl. visade på liknande resultat. Fem dagar efter infektion med vektorn hade 66 % av levercancerceller, 51 % av lungcancercellerna och 58 % av magcancercellerna dött. Även i detta försök visade kontrollcellerna låg dödlighetsfrekvens. (Wang m fl 2008). Det bekräftades i båda studierna att det var TRAIL som hade inducerad apoptos hos de döda cellerna (Wang 2008, Zhang 2008).

#### TRAIL in vivo

För att avgöra om TRAIL-vektorn skulle vara effektiv *in vivo* utfördes experiment på möss. Undersökningar av djur som fått humana cancerceller transplanterade bekräftade att AAV-TRAIL-vektorn även var effektiv *in vivo* (Wang 2008, Zhang 2008). Behandling med TRAIL-vektorn gav markant bättre resultat än EGFP-vektorn och reducerade tumörernas tillväxt med en tredjedel (Zhang 2008).

<sup>9</sup> Förbättrat grönt fluorescerande protein tillåter visuell uppskattning av proteinuttryck.

## Onkolytiska virus

Onkolytiska virus har förmågan att infektera och lysa cancerceller. G207 och dess efterträdare G47 $\Delta$  har visat sig mycket lovande inom detta fält. G207 är ett modifierat HSV-1 virus med delar av genomet borttaget. Herpesviruset har många fördelar som vektor då det kan infektera de flesta typer av tumörer. G207 har visat sig kunna infektera 60 typer av cancerceller *in vitro*, i princip alla man provat förutom benmärgstumörceller. Andra saker som talar för användandet av HSV-1 vid behandling av cancer är att det effektivt infekterar celler med låga koncentrationer av virus, och att säkerheten är hög då antivirala medel finns tillgängliga. (Todo 2008).

### *Konstruktion och funktion*

G207 har två gener borttagna jämfört med vildtypsviruset.  $\gamma$ 34,5 och ICP6.  $\gamma$ 34,5-proteinet blockerar normalt cellers förmåga att nedreglera proteinsyntesen som svar på virusangrepp genom att blockera dsRNA-beroende proteinkinaser (PKR)<sup>10</sup>. Då PKR-aktiviteten redan är låg i tumörceller behövs inte  $\gamma$ 34,5 för replikationen, men avsaknaden av genen skyddar friska celler. ICP6 är nödvändig för viral DNA-syntes i icke-delande celler men inte i celler i aktiv delning. Därför innebär borttagandet av denna gen också en skyddsmekanism. Både *in vivo*- och *in vitro*-försök har visat sig lovande då G207 har visat sig effektiv i att lysa cancerceller medan effekten på normala celler är minimal. G47 $\Delta$  är en vidareutveckling av G207 och har ytterligare en gen,  $\alpha$ 47 borttagen.  $\alpha$ 47s genprodukt ICP47 nedreglerar uttrycket av MHC klass 1<sup>11</sup>. Detta leder till att immunförsvaret inte mobiliseras mot cancerceller. Försök har visat att MHC klass 1-uttrycket ökar över normal nivå efter infektion av G47 $\Delta$ , vilket leder till att immunförsvaret effektivare bekämpar infekterade celler. *In vivo*-försök har visat att G47 $\Delta$  håller god säkerhet. (Todo 2008).

Ytterligare en version av denna vektor har konstruerats som man kallar beväpnad onkolytisk HSV-1. Grundstrukturen är den samma som för G47 $\Delta$ , men man har lagt till gener för IL-12, IL 18 och B7-1 (Todo 2008). IL-12 och 18 stimulerar T-celler att attackera infekterade celler och B7-1 är koreceptor för aktivering av T-celler (Abbas & Lichtman 2005). På så vis har man inte bara funnit ett sätt att selektivt döda cancerceller, man har också lyckats styra immunförsvaret till att attackera tumörer i högre grad. Försök har visat att denna metod är ett mycket effektivt sätt att angripa cancer (Todo 2008).

## Gendicine

Gendicine är namnet på den genterapeutiska vektor som godkänts för bruk mot huvud och nackcancer i Kina. Den är en adenoviral vektor med genen för p53 insatt i E1-regionen (Peng 2005). p53 är en transkriptionsfaktor som reglerar många olika cellfunktioner som cellcykeln, reparation av DNA, oxidativ stress och tillväxt av nya blodkärl (Foulkes 2007). Gendicine verkar på en rad olika sätt för att få cancerceller under kontroll. p53 utlöser apoptosmekanismer genom att verka som transkriptionsfaktor på DNA i kärnan, samtidigt som det utlöser apoptos genom icke-transkriptionsrelaterade mekanismer via interaktion med mitokondrier och golgiapparaten. Den aktiverar NK-celler och blockerar också överlevnadssignaler, glukosupptag och blodtillförsel till cancerceller. Intressant att notera är

---

<sup>10</sup> PKR katalyserar det första steget i nedregleringen och fosforilerar i sin tur eukaryot initieringsfaktor 2 (eIF-2 $\alpha$ ) som stänger av proteinsyntesen (Todo 2008).

<sup>11</sup> MHC klass 1 är ett membranprotein som visar peptidfragment från cellens insida. Det kan därför signalera till immunförsvaret att cellen är virusangripen.

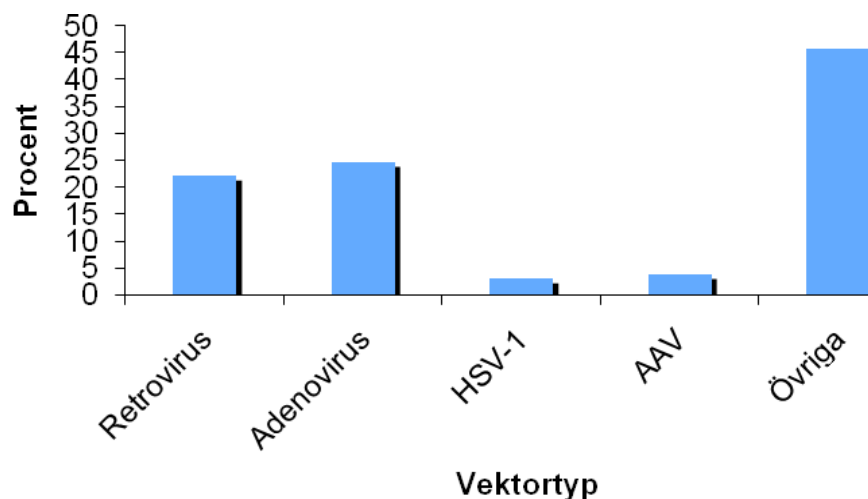
att det rapporterats om patienter som två dagar efter behandling med Gendicine fått minskade biffekter som illamående och minskad aptit från kemo- och radioterapi. Man vet ännu inte hur vektorn ger dessa effekter. (Peng 2005)

Säkerheten hos Gendicine anses vara hög. En vanligt förekommande bieffekt är feber. Den anses dock vara inom normala gränser för vad som kan förväntas vid införelse av ett främmande ämne i en patient och varar inte längre än 3 – 10 timmar. Vektorn har administrerats på ett flertal olika sätt, inklusive intravenöst och i lungartärer. Mer än 2500 patienter hade behandlats fram till mitten av 2005, och bara ett dödsfall har rapporterats. Det berodde på att patienten fick en ovanligt stark immunrespons mot vektorn.

Vektorn har tydligt positiva effekter på tillbakabildning av tumörer. Bäst resultat gavs då genterapin administrerades tillsammans med andra anti-cancerogena mediciner. (Peng 2005).

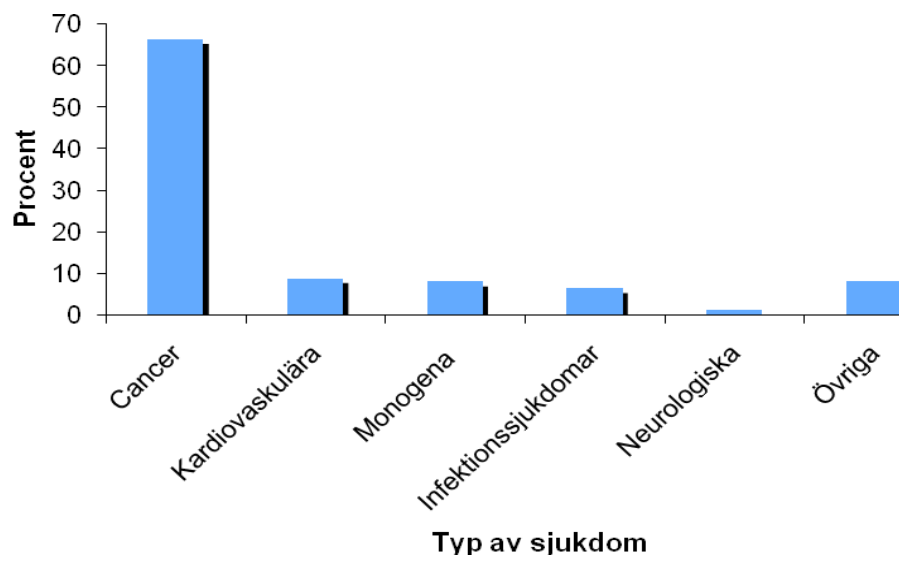
## Statistik

Av de genterapistudier som genomförts är en överväldigande majoritet riktade mot cancer. På andra plats kommer hjärt-kärlsjukdomar följt av monogena sjukdomar och infektionssjukdomar (Figur 12). De vektorer som använts flitigast är adenovirus och retrovirus. HSV-1 och AAV har hittills använts i mindre utsträckning (figur 11). De länder som har haft flest studier är USA med 889 (66 %) försök, följt av England 150 (11 %) och Tyskland 74 (6 %) (Edelstein 2008).



Figur 11. Fördelningen av virala vektorer inom genterapi världen över i procent.





Figur 12. Fördelningen av kliniska försök med genterapi inom olika medicinska områden.

## **Diskussion**

Genterapin har långt kvar tills den eventuellt blir den mirakelmedicin man hoppas på. Studierna med X-SCID visar hur oförutsägbar den genterapeutiska behandlingen är. Framtiden inom området borde dock kunna ses med optimism då stora framsteg har gjorts. Dessutom får man inte glömma att innan de tragiska leukemifallen i X-SCID studien så gjorde man stora framsteg. Att alla patienterna i studien drabbades av samma sjukdom är positivt i den bemärkelsen att området för felsökning kan begränsas.

Cancer är det ledande användningsområdet för genterapi. Ökande kunskap om sjukdomen och en åldrande population världen över gör det både intressant och angelägen att finna goda botemedel mot cancer. Framsteg inom cancerforskningen gagnar alla områden inom biomedicin då de bidrar med mycket kunskap kring genreglering, men man bör inte glömma bort de sjukdomar som härjar i länder där människor inte blir gamla nog att utveckla cancer. Genterapi skulle kunna öppna för nya vägar att bota till exempel HIV.

Genterapi är det naturliga nästa steget i sökandet efter nya och bättre mediciner. Det är fortfarande långt kvar innan den är en del av var mans och kvinnas vardag, men sällan har väl en sådan möjlighet att bota ett så stort spektrum av sjukdomar skådats.

## **Tack**

Till Gustava Påhlzon, Frida Dalin och Kübra Ucar för kreativa förslag och korrekturläsning.  
Till Elin Pettersson och Eva Mandal för hjälp med korrekturläsning

## Referenser

Abbas, A.K & Lichtman, A.H. 2005. Cellular and molecular immunology. 5:e uppl. Elsevier Inc. Kina.

Alba, R., Bosch, A. & Chillon, M. 2005. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy* 12: S18-S27.

Alton, E. 2007. Progress and prospects: Gene therapy clinical trials (part 1). *Gene therapy* 14: 1439-1447.

Cairney, C.J. & Keith, W.N., 2008. Telomerase redefined: Integrated regulation of hRT and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie* 90: 13-23.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Bouso, P., Le Deist, F. & Fischer, A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672.

Cavazzana-Calvo, M. & Fisher, A., 2007. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: Are we there yet? *The Journal of clinical investigation* 117: 1456-1465

Check, E. 2002. A tragick setback. *Nature* 420: 116-118.

Check, E. 2003 Second cancer case halts gene-therapy trials. *Nature* 421: 305.

Daniels, R.A., Turley, H., Kimberley, F.C., Liu, X.S., Mongkolsapaya, J., Ch'en, P., Xu, X.N., Jin, B., Pezzella, F. & Screaton, G.R., 2005. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell research* 15: 430-438.

Davé, U.P., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. Gene therapy insertional mutagenesis insight *Science* 303: 333.

Edelstein, M. Gene therapy clinicla trials world wide.  
<http://www.wiley.co.uk/genemed/clinical/> (Hämtad 2008-05-22)

Foulkes, W.D., p53 - Master and commander. *The New England journal of medicine* 357: 2539-2541.

Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J.P., Thrasher, A.J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo M. 2002. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *The New England journal of medicine* 346: 1186-1193.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I. de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fisher, A. & Cavazzana-Calvo, M. 2003. *LMO2*-Associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302: 415 -419.

- Kootstra, N.A. & Verma, I.M. 2003. Gene therapy with viral vectors. Annual review of pharmacology and toxicology 43: 413-439
- McCormack, M.P., Forster, A., Drynan, L., Pannell, R. & Rabbits, T.H. 2003. The *LMO2* T-cell oncogene is activated via chromosomal translocations or retroviral insertion during gene therapy but has no mandatory role in normal T-cell development. Molecular and cellular biology 23: 9003-9013.
- Peng, Z., 2005. Current status of Gendicine in China: Recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. Human gene therapy. 16: 1016-1027.
- Pike-Overzet, K., van der Burg, M., Wagemaker, G., van Dongen, J.J. & Staal, F.J. 2007. New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy. Molecular Therapy 15: 1910-1916.
- Segura, M.M., Kamen, A. & Garnier, A. 2006. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. Biotechnology advances 24: 321-337.
- Smith, A.E. 1995. Viral vectors in gene therapy. Annual review of microbiology 49: 807-838.
- Strauss, B.E., & Costanzi-Strauss. E., 2007. Combating oncogene activation associated with retrovirus-mediated gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 40: 601-613
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. & Kay M.A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nature reviews. Genetics 4: 346-358.
- Todo, T., 2008 Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. Frontiers in Bioscience 13: 2060-2064
- Verma, I.M & Weitzman, M.D. 2005. Gene therapy: Twenty-first century medicine. Annual review of biochemistry 74: 711-738
- Wang, Y., Huang, F., Cai, H., Zhong, S., Liu, X. & Tan, W.S., 2008. Potent antitumor effect of TRAIL mediated by a novel adeno-associated viral vector targeting to telomerase activity for human hepatocellular carcinoma. The journal of gene medicine 10: 518-526.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. & Burgess, S. M. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. Science 300 : 1749-1751.
- Ulander, G.A., Hu, J.F., Vu, T.H., Guidice L.C. & Hoffman, A.R., 1998. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and alternate splicing of hTERT transcripts. Cancer research 58: 4168-4172.
- Young, L.S., Searle P.F., Onion, D. & Mautner V. 2006. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. Journal of pathology 208: 299- 318.
- Zhang, Y., Ma, H., Zhang, J., Liu, S., Liu, Y. & Zheng, D. 2008. AAV-mediated TRAIL gene expression driven by hTERT promoter suppressed human hepatocellular carcinoma growth in mice. Life sciences. doi: 10.1016/j.lfs.2008.03.023