

GEENITERAPIAN KLIINISET KOKEET KIRJALLISUUDESSA JA  
KOKEELLINEN GEENINSIIRTO SOLUMALLISSA

Teija Hannila  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja toksikologian  
osasto

Helmikuu 2013

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Farmasian tiedekunta		Osasto – Sektion – Department Farmakologia ja toksikologia	
Tekijä – Författare – Author Teija Hannila			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Geeniterapian kliiniset kokeet kirjallisuudessa ja kokeellinen geeninsiirto solumallissa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Farmakologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year Helmikuu 2013	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 95
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Geeniterapia on kokeellinen hoitomenetelmä, jossa sairauksien hoitamiseksi potilaiden kohdesoluihin siirretään terapeuttisia genejä. Geeninsiirto suoritetaan joko <i>ex vivo</i> - tai <i>in vivo</i> -menetelmällä. <i>Ex vivo</i> -menetelmässä elimistöstä eristettyihin soluihin siirretään terapeuttinen geeni laboratoriossa, jonka jälkeen solut palautetaan elimistöön. <i>In vivo</i> -menetelmässä geeninsiirto suoritetaan suoraan elimistöön kohdekudokseen. Geeniterapia on edennyt kliinisiin kokeisiin lukuisten sairauksien kohdalla. Lukumääräisesti eniten kliinisiä kokeita on suoritettu syöpäsairauksien hoidoissa. Parhaita hoitotuloksia on kuitenkin toistaiseksi saatu monogeenisten, yhden geenivirheen aiheuttamien sairauksien, kuten esimerkiksi hemofilian ja vaikeiden perinnöllisten immuunipuutos sairauksien, hoidoissa. Ongelmia kliinisissä geeniterapiakokeissa ovat aiheuttaneet mm. nykyisten geenivektoreiden rajallinen geeninsiirtoteho, siirtogeenin ilmentymisen lyhytkestoisuus ja virusvälitteisissä geenihoidoissa ilmenneet haittavaikutukset.</p> <p>Nonviraaliset geenivektorit ovat toistaiseksi olleet virusvektoreita tehottomampia <i>in vivo</i> -geeninsiirroissa. Tämä johtuu muun muassa nonviraalisten geeni-vektorikompleksien interaktioista seerumin komponenttien kanssa. Työssä tutkittiin seerumin vaikutusta lineaarisen polyetylenei-imiini PEI22K:n sekä PEI22K:n ja kationisen lipidivektorin, Dosperin, yhdistelmän geeninsiirtotehoon <i>in vitro</i> SMC-soluissa. Lisäksi selvitettiin PEI22K:n ja Dosperin yhdistelmän mahdollista synergististä yhteisvaikutusta geeninsiirtotehoon. Tavoitteena työssä oli lisäksi kehittää <i>in vitro</i> -mallia, jonka avulla voisi ennustaa geeninsiirtovektoreiden <i>in vivo</i> -geeninsiirtotehoa. PEI22K:lla ja Dosperilla havaittiin synergistinen yhteisvaikutus geeninsiirtotehoon seerumittomissa transfektio-olosuhteissa. Seerumipitoisessa transfektiossa PEI22K osoittautui geeninsiirtoteholtaan PEI22K/Dosper-yhdistelmää paremmaksi. Seerumilla ei ollut suurta vaikutusta PEI22K:n geeninsiirtotehoon seerumipitoisuuksilla 1–10 %, mutta PEI22K/Dosper-yhdistelmän geeninsiirtoteho heikkeni huomattavasti seerumipitoisissa transfektio-olosuhteissa. Tulosten perusteella PEI22K soveltuu PEI22K/Dosper-yhdistelmää paremmin <i>in vivo</i> -geeninsiirtoon.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords geeniterapia, geeninsiirto, PEI22K, Dosper, transfektio			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmakologian ja toksikologian osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaajat: FT, Dos. Atso Raasmaja, Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian osasto, Helsingin yliopisto; proviisori Martina Hanzlíková, Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian osasto, Helsingin yliopisto			

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Pharmacy		Osasto – Sektion – Department Division of Pharmacology and Toxicology	
Tekijä – Författare – Author Teija Hannila			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Gene therapy clinical trials in the literature and experimental gene transfer in a cell model			
Oppiaine – Läroämne – Subject Pharmacology			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's Thesis		Aika – Datum – Month and year February 2013	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 95
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Gene therapy is an experimental technique that involves inserting therapeutic genes into the target cells to treat diseases. Gene transfer can be performed by <i>ex vivo</i> or <i>in vivo</i> method. <i>Ex vivo</i> method means transferring the therapeutic gene in laboratory to the cells that are removed from the patient, after which the cells are returned to the patient. In the <i>in vivo</i> method the gene transfer is performed directly to the target tissue inside the patient's body. Gene therapy clinical trials have been carried out to treat many diseases. The majority of the clinical trials have so far been cancer trials. Nevertheless, the most promising results have been established in treating diseases that arise from mutations in a single gene, i.e. monogenic diseases. Monogenic diseases include e.g. hemophilia and heritable immunodeficiencies. The biggest challenges in the clinical trials so far have been the limited gene transfer efficiency of the currently used gene vectors, the short duration of the transgene expression and the side-effects in viral-mediated gene transfer.</p> <p>Nonviral gene transfer agents have so far been less efficient <i>in vivo</i> than the viral vectors. This is partly due to the interaction between serum components and nonviral vectors. The main purpose of this study was to investigate the effect of serum to the gene transfer efficiency of a nonviral vector polyethyleneimine PEI22K and the combination of PEI22K and cationic liposome Dosper <i>in vitro</i> in the SMC-cells. The potential synergistic increase in the transfection efficiency of PEI22K/Dosper combination was also studied. The secondary goal in this study was to develop an <i>in vitro</i> model which could be used to predict the gene transfer efficiency of gene vectors <i>in vivo</i>. The combination of PEI22K and Dosper resulted in a synergistic increase in the transfection efficiency in serum-free transfection. In the presence of serum the efficiency of PEI22K was higher than the efficiency of PEI22K/Dosper combination. 1-10% serum concentrations did not significantly affect PEI22K's transfection efficiency, but dramatically decreased the efficiency of PEI22K/Dosper combination. The results suggest that PEI22K is more suitable than PEI22K/Dosper combination for <i>in vivo</i> gene transfer.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords gene therapy, gene transfer, PEI22K, Dosper, transfection			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Division of Pharmacology and Toxicology			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: FT, Dos. Atso Raasmaja, Faculty of Pharmacy, Division of Pharmacology and Toxicology, University of Helsinki; M.Sc. Martina Hanzlíková, Faculty of Pharmacy, Division of Pharmacology and Toxicology, University of Helsinki			

## SISÄLLYSLUETTELO

1	KIRJALLISUUSKATSAUS .....	1
	1.1 Johdanto .....	1
	1.2 Geeninsiirto .....	2
	1.3 Geenivektorit .....	3
	1.4 Kliiniset kokeet geeniterapiassa .....	5
	1.5 Syöpäsairauksien geeniterapia.....	6
	1.5.1 Immunogeeniterapia .....	7
	1.5.2 Syöpäsolujen geeniterapia .....	8
	1.5.3 Onkolyttiset virukset .....	8
	1.5.4 Itsemurhageeniterapia.....	9
	1.6 Monogeenisten sairauksien geeniterapia.....	10
	1.6.1 Adenosiinideaminaasin puutos .....	11
	1.6.2 X-kromosomissa periytyvä vaikea immuunipuutos.....	12
	1.6.3 Hemofilia .....	14
	1.6.4 Kystinen fibroosi.....	15
	1.6.5 Alfa <sub>1</sub> -antitrypsiinin puutos.....	16
	1.6.6 Lysosomaaliset kertymätaudit .....	17
	1.6.7 Krooninen granulomatoosi .....	18
	1.6.8 Lihasrappeumataudit .....	19
	1.7 Sydän- ja verisuonisairauksien geeniterapia .....	20
	1.7.1 Sydämen vajaatoiminta .....	20
	1.7.2 Sepelvaltimotauti ja sydänlihaksen iskemia .....	21
	1.7.3 Perifeerinen valtimonkovettumatauti ja perifeeristen lihasten iskemia.....	22
	1.8 Infektiosairauksien geeniterapia .....	22
	1.9 Neurologisten sairauksien geeniterapia.....	23
	1.9.1 Parkinsonin tauti.....	24
	1.9.1.1 GAD-geeniterapia .....	24
	1.9.1.2 AADC-geeniterapia .....	26
	1.9.1.3 ProSavin <sup>®</sup> .....	27

1.9.1.4	Hermokasvutekijät .....	29
1.9.2	Alzheimerin tauti.....	31
1.9.3	Huntingtonin tauti .....	33
1.9.4	Amyotrofinen lateraaliskleroosi.....	34
1.9.5	MS-tauti.....	35
1.10	Silmäsairauksien geeniterapia .....	36
1.10.1	Silmänpohjan ikärappeuma.....	36
1.10.2	Leberin synnyttäminen amauroosi.....	37
1.11	Tulehdussairauksien geeniterapia .....	38
1.12	Geeniterapian haasteita .....	39
2	<b>KOKEELLINEN OSA.....</b>	<b>41</b>
2.1	Tutkimuksen tavoitteet.....	41
2.2	Materiaalit ja menetelmät .....	42
2.2.1	Kemikaalit .....	42
2.2.2	Solulinja .....	43
2.2.3	Ekspressioplasmidi .....	43
2.2.4	Transfektio kompleksien muodostus ja transfektio.....	44
2.2.5	X-gal-värjäys.....	45
2.2.6	ONPG-määritys.....	45
2.2.7	Proteiinipitoisuuden määritys .....	46
2.3	Tulokset.....	46
2.3.1	Preliminäärikokeet .....	46
2.3.1.1	Menetelmän validointi.....	46
2.3.1.2	Synergia .....	47
2.3.1.3	Seerumin vaikutus transfektio tehoon .....	48
2.3.1.4	Transfektio tehoon suhde transfektioituneiden solujen lukumäärään .....	49
2.3.2	Seerumipitoisuuden vaikutus transfektio tehoon.....	52
2.3.2.1	PEI22K .....	52
2.3.2.2	PEI22K+Dosper10 .....	53
2.3.2.3	PEI22K/2,5+Dosper .....	54
2.3.3	Yhdisteiden toksisuus .....	56

	2.4 Tulosten tarkastelu .....	57
	2.4.1 PEI22K/Dosper-yhdistelmän synergia seerumittomissa transfektio-olosuhteissa .....	57
	2.4.2 Seerumin vaikutus transfektiootehoon.....	58
	2.4.2.1 PEI22K .....	60
	2.4.2.2 Dosper.....	61
	2.4.2.3 PEI22K/Dosper .....	62
	2.4.3 Yhdisteiden toksisuus .....	63
	2.5 Pohdinta.....	64
3	YHTEENVETO .....	67
4	KIRJALLISUUSLUETTELO.....	68

## 1. KIRJALLISUUSKATSAUS

### 1.1. Johdanto

Geeniterapia on kokeellinen hoitomenetelmä, jossa sairauksien hoitamiseksi pyritään kumoamaan geenivirheiden aiheuttamia muutoksia solujen toiminnassa. Geeniterapiassa henkilölle, jonka sairauden aiheuttaa virheellisesti toimiva geeni, tehdään geeninsiirto eli siirretään kohdesoluihin toimiva kopio kyseisestä geenistä (Ylä-Herttua ym. 1996; Gene Therapy Net 2012). Henkilön oman geenin proteiinituote pyritään siten korvaamaan siirretyn geenin ohjaamana valmistetun proteiinin avulla. Vaihtoehtoisesti uuden proteiinin tuotannolla pyritään saamaan aikaan terapeuttinen vaikutus sairauksissa, joita aiheuttavia geenivirheitä ei tunneta tai pystytä korjaamaan.

Geeninsiirtojen lisäksi geenien toimintaan ja niistä aiheutuviin sairauksiin voidaan vaikuttaa myös terapeuttisella endogeenisten, eli henkilön omien, geenien ja niiden tuotteiden (RNA tai proteiini) muokkaamisella. Kokeellisia menetelmiä on useita, muun muassa mutatoituneen geenin korjaaminen, mutatoituneen geenin toiminnan estäminen (transkription estäminen mutatoituneeseen geeniin sitoutuvilla oligonukleotideilla), mutatoituneen geenin tuottamien viallisten lähetti-RNA (mRNA) -molekyylien korjaaminen, sekä mutatoituneen geenin koodaaman proteiinin valmistumisen estäminen antisense-menetelmällä (soluun siirretään yksijuosteinen RNA-molekyyli, joka sitoutuu mRNA:han estäen mRNA:n translaation) tai RNA-interferenssin (soluun siirretään kaksijuosteinen RNA-molekyyli, joka laukaisee mRNA:n hajoamisen) avulla (Brantl 2002; Uil ym. 2003; Yang ja Walsh 2005).

Tässä pro gradu -tutkielmassa luodaan katsaus geeniterapian klinisiin tutkimuksiin. Kliinisessä käytössä olevalla geeniterapialla muokataan somaattisia soluja, jolloin solujen genomien muutokset kohdistuvat vain hoidettuun yksilöön itseensä (Ylä-Herttua 2009; Gene Therapy Net 2012). Sukusolujen ja alkioiden geeninsiirroissa muutokset periytyvät jälkeläisille. Ituradan ja sukusolujen geeniterapia on kiellettyä (Vapalahti ym. 1997).

Geeniterapiaa on kehitetty lukuisiin sairauksiin. Ominaisuuksia, jotka tekevät sairauden erityisen soveltuvaksi geenihoidon kehittämiseksi, ovat esimerkiksi sairauden vakavuus ja puutteelliset olemassa olevat hoitomenetelmät (tarve kehittää uusia hoitoja), tunnettu geenivirhe ja yksinkertainen terapeuttinen strategia (viallisen geenin korvaaminen toimivalla), riittävän pieni hoitogeeni geenivektoreiden kuljetettavaksi, helposti saavutettava hoidon kohde (esimerkiksi verenkierron solut) sekä lisäksi se, että geenihoidon ei tarvitse korjata kaikkia kohdesoluja tai geeniekspression ei tarvitse olla tiukasti säädeltyä (Edelstein ym. 2004; Sands ja Davidson 2006; Nienhuis 2008; Pindolia ja Wolf 2008). Muun muassa näiden vaatimusten vuoksi monogeeniset, yhden geenivirheen aiheuttamat sairaudet olivat ensimmäisiä sairauksia, joihin geeniterapiaa kehitettiin.

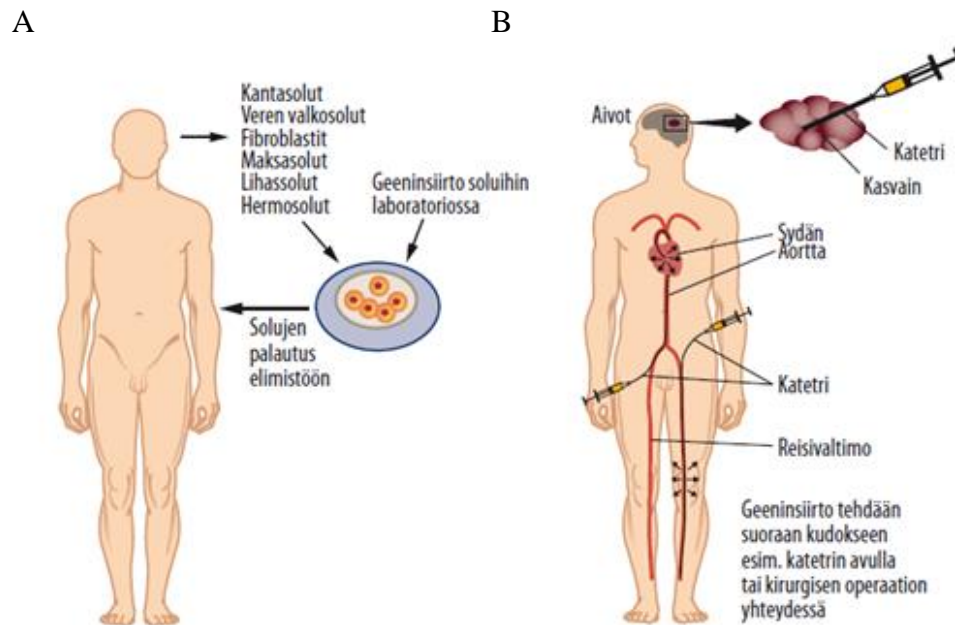
Ensimmäiset ihmiseen kohdistetut geeninsiirrot suoritti Martin Cline vuonna 1980 (Kalifornian yliopisto, Los Angeles), jolloin kahden  $\beta$ -talassemiaa sairastavan henkilön luuytimeistä eristettyihin soluihin siirrettiin  $\beta$ -globiinigeeniä, minkä jälkeen solut palautettiin takaisin potilaiden elimistöön (Friedmann 1992; Wolff ja Lederberg 1994). Kokeella ei kuitenkaan ollut asianmukaista lupaa yliopistolta ja se lopetettiin suuren kritiikin saattelemana. Ensimmäiset hyväksytyt terapeuttiset kliiniset geeninsiirtokokeet tehtiin vuonna 1990 adenosinideaminaasin puutosta sairastavilla henkilöillä (Blaese ym. 1995). Tämän jälkeen geeniterapian käyttöä on tutkittu lukuisten sairauksien hoitamiseksi, mutta valtaosa geeniterapian kliinisistä tutkimuksista on kuitenkin suoritettu syöpäsairauksien parissa (Journal of Gene Medicine 2012).

## 1.2 Geeninsiirto

Geeni viedään soluihin geeninkuljettimen eli vektorin avulla. Geeninsiirrossa käytetään joko *in vivo* - tai *ex vivo* -lähestymistapaa (Kuva 1). *In vivo* -menetelmässä geeninsiirto suoritetaan suoraan elimistöön kohdekudokseen (Ylä-Herttuala ja Salo 2006). *Ex vivo* -menetelmässä elimistöstä eristetään soluja (esim. luuydinsolut tai valkosolut), joihin siirretään laboratoriossa toimiva geeni, minkä jälkeen solut palautetaan elimistöön. *Ex vivo* -geeninsiirto voidaan määritellä osaksi laajempaa ”somaattinen soluterapia” -käsitettä. Somaattisella soluterapialla tarkoitetaan autologisten (henkilön omien),



allogeenisten (toisen henkilön) tai ksenogeenisten (toiselta lajilta peräisin olevien) solujen geneettistä käsittelyä ja siirtoa ihmiselimistöön (FDA 1998). Mikäli siirtogeeni integroituu käsiteltyjen solujen kromosomistoon, saadaan aikaan pitkäkestoinen proteiinin tuotto soluissa (Ylä-Herttuala 2009). Jos siirtogeeni ei integroidu genomiin, tehoaa hoito niin kauan kuin geeni säilyy soluissa tai hoidetut solut säilyvät elimistössä.



Kuva 1. *Ex vivo* - ja *in vivo* -geeninsiirtojen periaatteet (Ylä-Herttuala ja Salo 2006). A) *Ex vivo* -geeninsiirrossa elimistöstä eristetään soluja, joihin siirretään haluttu geeni laboratoriossa. Tämän jälkeen solut palautetaan elimistöön. B) *In vivo* -geeninsiirrossa geeninkuljetin annostellaan suoraan kohdekudokseen (esim. kasvaimeen tai sydämeen).

### 1.3 Geenivektorit

Paljas DNA ei integroidu soluihin riittävän tehokkaasti suuren kokonsa ja negatiivisten fosfaattiryhmiensä aiheuttaman hydrofiilisyyden vuoksi (Al-Dosari ja Gao 2009). Lisäksi vapaa DNA on altis hajoamiselle nukleasien vaikutuksesta. Tämän vuoksi DNA viedään soluihin geeninkuljettimien, vektoreiden, avulla. Geenivektorin tulee kuljettaa geeni selektiivisesti kohdesoluihin (ja kohdepaikkaansa solujen genomissa) aiheuttamatta soluille toksisia vaikutuksia (Li ym. 1999; Somia ja Verma 2000; Moret ym. 2001). Vektorin tulee mahdollistaa sisältämänsä geenin ekspressio tietyn aikaa, tai ekspressiota tulisi voida säädellä hoidetun sairauden vaatimalla tavalla. Lisäksi vektorin

ei tulisi käynnistää immuunivastetta ja geenin ekspresion tulisi rajoittua kohdekudokseen (Somia ja Verma 2000). Hyvän geenivektorin ominaisuuksiksi luetaan myös kyky kuljettaa geeni tarpeen mukaan sekä jakautuviin että jakautumattomiin soluihin, ja vektorin valmistamisen ja riittävän määrän tuottamisen helppous.

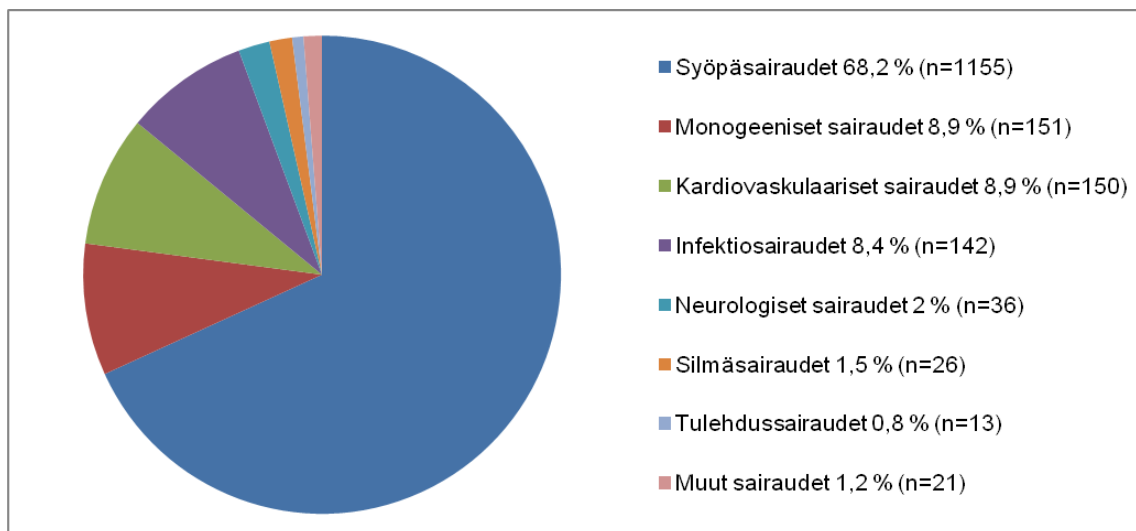
Vektorit jaetaan viraalisiin ja nonviraalisiin. Virusvälitteistä geeninsiirtoa kutsutaan transduktioksi ja nonviraalista transfektioksi (Bonetta 2005, Promega 2012). Tällä hetkellä yleisimmin kliinisissä kokeissa käytetyt vektorit ovat virusvektoreita (Journal of Gene Medicine 2011b). Virusvektoreissa virusten sairauksia aiheuttavat geenit on korvattu terapeuttisilla geneilla (Oak Ridge National Laboratory 2012). Virukset kuljettavat geenin ihmissoluihin infektoimalla (Mitrović 2003). Eniten käytettyjä virusvektoreita ovat retrovirukset, adenovirukset, adenoassosioidut virukset (AAV) ja lentivirukset (eräs retrovirusten alalaji). Näistä adenovirusvektoreilla saadaan lyhytaikainen geeniekspressio, muilla pitkäaikainen, johtuen niiden integroitumisesta isäntäsolun genomiin (Kay ym. 2001; Ylä-Herttuala ja Salo 2006). Tehokkain virusvektoreista on adenovirus, joka AAV- ja lentivirusten tavoin transduoi sekä aktiivisesti jakautuvia että jakautumattomia soluja, mutta sen käyttöä rajoittaa väliaikaisen geeniekspresion ohella immuunipuolustusta aktivoiva ominaisuus (Kay ym. 2001). Retrovirus on eniten kliinisissä kokeissa käytetty virusvektori, mutta sen käyttöä puolestaan rajoittavat kyvyttömyys transduoida jakautumattomia soluja ja mahdollinen insertiomutageneesin (siirretty geeni aktivoi syöpää aiheuttavan onkogeenin tai inaktivoi tuumorin kasvua rajoittavan geenin) riski (Ylä-Herttuala ym. 1996; Kay ym. 2001; Ylä-Herttuala ja Salo 2006; Hacein-Bey-Abina ym. 2008).

Nonviraalisia vektoreita pidetään viraalisia vektoreita turvallisempina ja vähemmän immuunipuolustusta aktivoivina (Ledley 1995; Li ja Huang 2000). Ne ovat myös virusvektoreita halvempia ja yksinkertaisempia valmistaa (Ledley 1995). Nonviraaliset vektorit eivät integroidu isäntägenomiin, joten niillä saatavan geeniekspresion kesto on lyhyt, eikä nonviraalisella vektorilla transfektoitavalle geenille ole myöskään kokorajoituksia (Ledley 1995; Li ja Huang 2000, Kay 2011). Yksinkertaisin nonviraalinen vektori on DNA-plasmidi. Transfektioitehon lisäämiseksi DNA-plasmidi voidaan kompleksoida esimerkiksi kationisten lipidien, polymeerien tai näiden

molempien kanssa, jolloin muodostuvat geeninsiirtokompleksit ovat vastaavasti lipopleksi, polypleksi ja lipopolypleksi (Lechardeur ja Lukacs 2002; Pelisek ym. 2006). Eniten kliinisissä kokeissa käytetty nonviraalinen geeninsiirtomenetelmä on kompleksoimaton DNA-plasmiditransfektio (Journal of Gene Medicine 2011b). DNA-plasmi tuhoutuu nopeasti verenkierrossa, joten se annostellaan injektiona suoraan kohdekudokseen (Mitrović 2003). DNA-plasmidin lisäksi kliinisissä kokeissa on käytetty paljon myös lipidivektoreita (Journal of Gene Medicine 2011b). Nonviraalisten vektoreiden käyttöä rajoittaa kuitenkin suuresti niiden virusvektoreita heikompi transfektioteho (Lungwitz ym. 2005; Ylä-Herttuala 2009).

#### 1.4 Kliiniset kokeet geeniterapiassa

Maailmanlaajuisesti vuoteen 2012 mennessä on suoritettu tai aloitettu yhteensä noin 1700 geeniterapian kliinistä koetta (Journal of Gene Medicine 2012). Kliinisten kokeiden lukumäärät jakautuvat tärkeimpien tautikategorioiden välillä Kuvan 2 esittämällä tavalla.



Kuva 2. Geeniterapian kliiniset kokeet tärkeimpien indikaatioiden mukaan. (Journal of Gene Medicine 2012)

Kokeet jaetaan tutkimuksen tavoitteesta riippuen faaseihin (faasi I–IV). Valtaosa jo suoritetuista ja käynnissä olevista kliinisistä geeniterapiakokeista on faasi I:n kokeita. Faasi I:n kliinisissä kokeissa testataan uutta lääkeainetta tai hoitomenetelmää pienellä

koehenkilöryhmällä (korkeintaan kymmeniä henkilöitä), tavoitteena arvioida aineen käyttäytymistä elimistössä, turvallisuutta ja sivuvaikutuksia, sekä määrittää turvallista annosta. Faasi II:n kokeissa tutkittavaa lääkeainetta (tai hoitomenetelmää) annetaan suuremmalle koehenkilöjoukolla (yleensä muutamasta kymmenestä muutama sataan henkilöä), jotta nähdään onko hoito tehokas. Lisäksi edelleen arvioidaan hoidon turvallisuutta ja määritetään optimaalista annosta. Faasi III:n kokeissa tutkittavaa lääkeainetta (tai hoitomenetelmää) annetaan suurelle koehenkilöjoukolla (muutamasta sadasta muutama tuhat). Sitä verrataan yleisesti käytettyihin hoitoihin tai plaseboon ja lisäksi kerätään turvallisen käytön kannalta tarvittavaa informaatiota. Kokeissa pyritään varmistamaan menetelmän toimivuus myös pitkäaikaisessa käytössä. Faasi IV:n tutkimuksissa arvioidaan lääkkeen markkinoille tulon tai uuden hoitomenetelmän käyttöönoton jälkeen saatua jatkoinformaatiota mm. riskeistä, hyödyistä ja haittavaikutuksista. (Turku Clinical Research Centre 2011; Orion 2012)

### 1.5 Syöpäsairauksien geeniterapia

Syöpäsairaudet ovat ylivoimaisesti eniten tutkittuja geeniterapian kohteita; suurin osa vuoteen 2012 mennessä raportoiduista kliinisistä tutkimuksista on syövän geeniterapiakokeita (Journal of Gene Medicine 2012). Toistaiseksi ainoat markkinoilla olevat geeniterapialääkkeet (molemmat Kiinassa) ovat syövän hoitoon kehitetyt Oncorine (H101) ja Gendicine (Räty ym. 2008). Suomessa ensimmäinen kliininen geeniterapiakoe tehtiin vuonna 1995 pahanlaatuisen gliooman hoidossa (Ylä-Herttuala ym. 1996).

Syövän geeniterapiassa tavoitteena on syöpäkudoksen tuhoaminen välttämättä haittavaikutuksia terveeseen kudokseen (Palmer ym. 2006). Kliininen tutkimus on toistaiseksi perustunut lähinnä immunogeeniterapiaan, onkolyyttisten virusten käyttöön ja itsemurhageeniterapiaan (Aiuti ym. 2007). Lisäksi on käytetty mutatoituneen p53-tuumorisuppressorigeenin korvaamista toimivalla p53-geenillä (Palmer ym. 2006). Ongelmana kliinisissä kokeissa on ollut hoitotehon riittämättömyys, mihin tärkeimpinä syinä on pidetty puutteellista geeninsiirtotehoa sekä hoidon annostelun vaikeutta systeemisen verenkierron kautta. Rajoittava tekijä geeniterapian tehon arvioinnin

kannalta on myös se, että useimmiten kliinisissä kokeissa tehoa on tutkittu pitkälle edenneen taudin hoidossa. Tätä voidaan pitää ongelmana etenkin immunogeeniterapiassa, jossa hoidon teho olisi todennäköisesti parempi jos potilaiden immuunipuolustus toimisi normaalisti.

### 1.5.1 Immunogeeniterapia

Syövän immunogeeniterapialla tarkoitetaan menetelmää, jossa syöpäsolut pyritään tuhoamaan niihin kohdistetun immuunivasteen avulla (Gattinoni ym. 2006; Aiuti ym. 2007). Immunogeeniterapissa joko syöpäsoluja muokataan siten, että ne alkavat ilmentää immuunipuolustusta aktivoivia komponentteja, tai potilaan T-soluja muokataan *ex vivo* tai *in vivo* siten, että ne tunnistavat syöpäsolut (Palmer ym. 2006; Aiuti ym. 2007). Immunogeeniterapiassa voidaan käyttää apuna myös antigeenejä esitteleviä soluja, joihin siirretään haluttu geeni *ex vivo*. Tämän jälkeen ne palautetaan elimistöön autologisena rokotteenä, tavoitteena T-solujen aktivoitumisen lisääntyminen.

T-solujen geeniterapiaa on käytetty mm. melanooman ja leukemian kliinisissä kokeissa (Morgan ym. 2006; Kalos ym. 2011). Melanoomaa sairastavien potilaiden verestä eristettyjä T-soluja transdukoitiin retroviraalisesti *in vitro* tuumorisoluja tunnistavaa T-solureseptoria koodaavalla geenillä, minkä jälkeen solut palautettiin potilaiden verenkiertoon (Morgan ym. 2006). Seitsemästätoista koehenkilöstä kahdella hoito sai aikaan metastaattisten melanoomalesioiden pienenemistä ja häviämistä. Vaikkakin myös muilla potilailla havaittiin transdukoituneita soluja ainakin kahden kuukauden ajan toimenpiteen jälkeen, eivät heidän syöpänsä reagoineet hoitoon.

Kalos ym. (2011) tutkivat kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavilla potilailla (n=3) autologisten T-solujen geeniterapiaa. Menetelmässä T-solut transdukoitiin *ex vivo* lentiviraalisesti geenillä, joka koodasi B-solujen ekspressoiman CD19-antigeenin tunnistavaa reseptoria, minkä jälkeen T-solut palautettiin koehenkilöiden verenkiertoon (Kalos ym. 2011; Porter ym. 2011). CD19-antigeenireseptoreita ekspressoivia T-soluja havaittiin potilaiden veressä kuukausien ajan (6 kuukauden seuranta) toimenpiteen jälkeen. Kaikilla koehenkilöillä havaittiin CD19-spesifinen immuunivaste veressä ja

luuytimessä (antituumoriefekti: B-solujen väheneminen), ja kahdella kolmesta potilaasta saavutettiin oireiden häviäminen (remissio).

### 1.5.2 Syöpäsolujen geeniterapia

Syöpä aiheutuu solujen kasvunrajoitegeneeissä tai syöpägeneeissä tapahtuneista muutoksista (Hakkarainen ym. 2005). Näiden geenien korvaamista toimivilla geneeillä rajoittaa mm. vektoreiden riittämätön geeninsiirtoteho (Palmer ym. 2006). Toisaalta syöpä on usein monien tekijöiden summa, jolloin yhden geenivirheen korjaaminen ei välttämättä ole riittävä hoito. Monissa syöpäsoluissa p53-kasvunrajoitegeeni on mutatoitunut. p53 välittää DNA:ssa tapahtuvien vaurioiden korjaantumista ja, vaurion ollessa peruuttamaton, ohjattua solukuolemaa, apoptoosia. Kliinisissä p53-geeniterapiatutkimuksissa (esim. munasarjasyöpä, aivosyöpä) on geeninsiirroilla saatu aikaan syöpäsoluissa p53-ekspressiota, mutta hoitojen kliininen teho on jäänyt puutteelliseksi. Kun p53-geeninsiirtomenetelmä on yhdistetty sädehoitoon, on joissakin tapauksissa saatu parempia hoitotuloksia kuin sädehoidolla yksinään (Swisher ym. 2003; Peng 2005). Kiinassa myyntiluvan saanut Gendicine on adenovirusvälitteinen p53-geeniterapiavalmiste, jota käytetään yhdessä sädehoidon kanssa (Peng 2005).

### 1.5.3 Onkolyttiset virukset

Onkolyttisten virusten käyttö syövän hoidossa perustuu virusten luontaiseen kykyyn tunkeutua soluihin, lisääntyä niissä ja aiheuttaa niiden tuhoutuminen (Hakkarainen ym. 2005; Aiuti ym. 2007). Viruksia voidaan muokata geneettisesti siten, että ne infektoivat vain tietyntyypisiä soluja tai lisääntyvät vain tietyntyypisissä soluissa, kuten soluissa, joissa on viallinen p53-geeni tai jokin syöpäsolulle tyypillinen antigeeni (Palmer ym. 2006). Onkolyttisiä viruksia käytettäessä varsinaista hoitogeeniä ei välttämättä tarvita, mutta viruksia voidaan käyttää myös kuljettamaan genejä syöpäsoluihin (Hakkarainen ym. 2005; Senzer ym. 2009).

Onkolyttistä virushoitoa on testattu kliinisissä kokeissa muun muassa eturauhassyövän, melanooman sekä pään ja kaulan alueen syöpien hoidoissa (Small ym. 2006; Forsyth ym. 2007; Senzer ym. 2009). Lupaavia tuloksia on saatu lähinnä kokeissa, joissa

virushoito on yhdistetty muihin hoitomuotoihin (Palmer ym. 2006; Prestwich ym. 2008). Toinen Kiinassa markkinoilla olevista geeniterapialääkkeistä, Oncorine (H101), on onkolyttinen adenovirus, jonka replikaatio tapahtuu ainoastaan soluissa, joissa p53-geeni ei toimi normaalisti (Yu ja Fang 2007; Rätty ym. 2008). Valmistetta käytetään kemoterapiaan yhdistettynä tiettyjen pään ja kaulan alueen syöpien hoidoissa.

Melanooman kliinisissä kokeissa immunoterapiaa ja onkolyttistä geeniterapiaa yhdistävä OncoVex on edennyt faasi III:n kliiniseen vaiheeseen (Russell ym. 2012). OncoVex on onkolyttinen herpes simplex -virus, johon on liitetty granulosyyttimakrofaagikasvutekijää (GM-CSF) koodaava geeni (Senzer ym. 2009). Hoidon tarkoituksena on lisätä immuunivastetta tuumoriantigeeneille, jotka vapautuvat viruksen replikaation seurauksena infektoituneista tuumorisoluista. Faasi II:n kokeessa OncoVex -hoitoa annettiin metastoitunutta melanoomaa sairastaville koehenkilöille (n=50), joiden sairaus ei reagoanut muihin hoitomuotoihin. Hoito todettiin hyvin siedetyksi ja koehenkilöistä 26 %:lla hoito pienensi niitä syöpäkasvaimia joihin se annosteltiin. Tämän lisäksi hoidon havaittiin vaikuttavan myös muualla elimistössä sijaitseviin syöpäsoluihin (systeminen immuunivaste).

#### 1.5.4 Itsemurhageeniterapia

Itsemurhageeniterapialla tarkoitetaan aihiolääkemenetelmää, jossa syöpäsoluihin siirretyn ns. itsemurhageenin tuottama entsyymi aktivoi potilaille systeemisesti annetun inaktiivisen lääkeaineen soluille toksiseksi yhdisteeksi (Kirn ym. 2002). Menetelmällä saadaan aikaan suuri paikallinen ja pieni systeminen lääkeainepitoisuus, mikä lisää hoidon tehoa ja vähentää haittavaikutuksia. Tutkituin aihiolääke-itsemurhageeniyhdistelmä on gansikloviirin (GCV) ja herpes simplex -viruksen tymidiinikinaasia (HSV-TK) koodaavan geenin yhdistelmä (Palmer ym. 2006). Kasvainsolujen tuottama tymidiinikinaasi muuttaa systeemisesti annostellun gansikloviirin toksiseksi kasvainsoluille (Rainov 2000; Sandmair ym. 2000).

Kliinisissä kokeissa hoitotehosta on saatu vaihtelevia tuloksia. Chévez-Barrios ym. (2005) tutkivat faasi I:n kliinisellä kokeella itsemurhageeniterapian käyttökelpoisuutta

ja turvallisuutta kahdeksalla verkkokalvon varhaissolusyöpää, retinoblastoomaa, sairastavalla koehenkilöllä. Kokeessa potilaille annosteltiin HSV-TK:a koodaavaa geeniä lasiaisensisäisellä injektioilla adenovirusvälitteisesti, minkä jälkeen he saivat systeemisesti gansikloviiria. Kaikkien koehenkilöiden lasiaisensisäiset kasvainpesäkkeet pienenivät hoidon vaikutuksesta, eikä merkittäviä haittavaikutuksia paikallista tulehdusreaktiota lukuun ottamatta havaittu.

Aivokasvainpotilailla (n=248) suoritetussa faasi III:n kokeessa ei havaittu kliinistä hyötyä, kun verrattiin leikkaus- ja sädehoitoon yhdistettyä retrovirusvälitteistä HSV-TK/GCV-hoitoa pelkkään leikkaus- ja sädehoitoon (Rainov 2000). Vastaavanlaisessa adenovirusvälitteisessä faasi II:n satunnaistetussa kokeessa (36 koehenkilöä) kuitenkin havaittiin kliininen hyöty; leikkauksen ja adenoviraalisen HSV-TK/GCV-geeniterapian yhdistelmällä aivokasvainpotilaiden keskimääräinen elinaika hoidon jälkeen oli miltei kaksinkertainen pelkkään kirurgiseen hoitoon verrattuna (Immonen ym. 2004). Ark Therapeutics Oy -yhtiön Suomessa kehittämän aivokasvainhoitoon tarkoitetun adenoviraalisen HSV-TK/GCV-geeniterapiavalmisteen (Cerepro<sup>®</sup>) kehitys pysähtyi ainakin toistaiseksi faasi III:n kliiniseen vaiheeseen, jossa hoidon tehoa ei Euroopan lääkevirasto EMEA:n mukaan onnistuttu todistamaan tilastollisesti merkitsevällä tavalla (Mitchell 2010).

## 1.6 Monogeenisten sairauksien geeniterapia

Monogeeniset sairaudet ovat yhden geenin virheellisen toiminnan aiheuttamia tiloja. Niitä pidetään potentiaalisina kohteina geenihoidolle selkeän syntymekanismin lisäksi siksi, että joissakin tapauksissa pienelläkin terapeuttisen siirtogeenin ekspressiolla (1–10 % normaalista) voidaan saada aikaan sairauden oireiden lievittyminen (Sands ja Davidson 2006; Nienhuis 2008). Monogeenisissä sairauksissa vaaditaan pitkäkestoista siirtogeenin ekspressiota, joten geeninkuljettimina on käytetty integroituvia virusvektoreita.



### 1.6.1 Adenosiinideaminaasin puutos

Adenosiinideaminaasin (ADA) puutos, ADA-tauti, on perinnöllinen vaikeaa immuunipuutosta aiheuttava sairaus. Sairaus johtuu ADA-puriinikataboliaentsyymin toimimattomuudesta, minkä aiheuttaa mutaatio ADA-geenissä (Muul ym. 2003). ADA:n puutos saa aikaan toksisten puriiniaineenvaihduntatuotteiden kertymistä elimistöön sekä immuunipuolustuksen heikkenemistä T-, B- ja luonnollisten tappajasolujen (NK, natural killer) toiminnan heikentymisen kautta (Blaese ym. 1995; Gaspar ym. 2006; Aiuti ym. 2007). ADA-taudin geeniterapiassa on siirretty toimiva ADA-geeni retrovirusvälitteisesti *ex vivo* joko potilaalta eristettyihin T-lymfosyytteihin (autologisten perifeeristen verilymfosyyttien, PBL, geeniterapia) tai hematopoeettisiin kantasoluihin (hematopoeettisten kantasolujen, HSC, geeniterapia). Tämän jälkeen solut on palautettu takaisin potilaan elimistöön.

Ensimmäinen kliininen koe alkoi vuonna 1990 (Blaese ym. 1995). Tuolloin kaksi ADA-tautia sairastavaa koehenkilöä saivat PBL-menetelmällä retroviraalisesti ADA-geenillä transdusoituja autologisia T-soluja. Koehenkilöt saivat geeniterapian ohella entsyymikorvaushoitoa (PEG-ADA), joten geeniterapian vaikutusta potilaiden tilaan ei voitu täysin arvioida. Koehenkilöillä havaittiin kuitenkin pitkäaikaisseurannassa korjaantuneiden (transgeeniä ekspressoivien) T-solujen läsnäolo yli 12 vuotta geeniterapian jälkeen, mutta johtuen muun muassa B- ja NK-solujen puutteesta, terapian kliininen hyöty oli riittämätön (Muul ym. 2003). Haittavaikutuksia tai toksisuutta ei kokeessa esiintynyt. Samanlaista lähestymistapaa käyttivät myös Onodera ym. (1998). Koehenkilöllä (n=1) havaittiin 12 kuukauden ajan geeniterapian jälkeen transgeenin läsnäolo (10–20 % perifeerisistä lymfosyyteistä) ja ADA-aktiivisuuden lisääntyminen. Myös potilaan immuunitoiminta parani lähtötilanteeseen verrattuna.

Hematopoeettisten kantasolujen geeniterapia on osoittautunut T-soluihin tehtyä geeninsiirtoa toimivammaksi hoitovaihtoehdoksi ADA-taudin hoidossa (Aiuti ym. 2002; Ylä-Herttua ja Salo 2006). Etuna PBL-geeniterapiaan verrattuna on se, että kantasolut pystyvät erilaistumaan useiksi solulinjoiksi, muun muassa B-soluiksi, NK-soluiksi ja T-soluiksi (Aiuti ym. 2002). Vaikka PBL-tekniikalla on saavutettu

immuunivasteen kannalta riittävä ja pitkäaikainen T-solutoiminta, ei tämä ole riittänyt täysin korjaamaan kliinisen hyödyn kannalta tärkeitä metabolisia puutteita (Aiuti ym. 2002).

Pysyvien transduoitujen kantasolujen lukumäärän ja pitkäaikaisen geeniekspression määrän vaihtelevuus johti kliinisen tehon vähäisyyteen varhaisimmissa kantasolugeeninsiirtokokeissa (Bordignon ym. 1995; Kohn ym. 1995; Aiuti ym. 2002). Tätä on myöhemmin pyritty korjaamaan esihoitamalla koehenkilöitä luuydintä lamaavilla lääkeaineilla, jolloin hävittämällä hematopoieettista solukkoa on "tehty tilaa" geenimanipuloituille soluille (Aiuti ym. 2002). Menetelmällä on saavutettu pitkäaikainen ADA-aktiivisuus sekä T-, NK- ja B-solujen määrän lisääntyminen, immuunivasteen paraneminen ja toksisten metaboliittien määrien lasku (Aiuti ym. 2002, Gaspar ym. 2006). Geeninsiirrosta aiheutuvia haittavaikutuksia ei ole havaittu. Kokeissa aikaansaatu immuunipuolustuksen korjaantuminen on ollut parempi kuin PEG-ADA-korvaushoidolla keskimäärin saavutettu (Gaspar ym. 2006).

Aiuti ym. (2009) tutkivat 10 koehenkilöllä HSC-geenihoidon pitkäaikaisvaikutuksia (turvallisuus, teho, HSC-solujen aktiivisuus, immunologiset ja puriiniaineenvaihdunnan toiminnot) faasi I/II:n kliinisessä kokeessa. Pitkäaikaisseurannassa (1,8–8 vuotta, mediaani 4 vuotta) yhdeksällä koehenkilöllä havaittiin immuunitoiminnan palautumista ja T-solujen toiminnan normalisoitumista. Kahdeksalla koehenkilöllä tapahtui tilan paranemista seuranta-aikana siinä määrin, että he eivät enää tarvitse entsyymikorvaushoitoa. Faasi II:n kliininen koe HSC-menetelmällä on aloitettu vuonna 2008 (ClinicalTrials.gov: NCT00794508). Kokeessa seurataan potilaiden immuunivasteen kehittymistä pitkällä aikavälillä ja yritetään määrittää annosvaikutussuhdetta vertaamalla koehenkilöille infusoitujen geenimanipuloitujen solujen lukumäärää aikaan saatavaan immuunipuolustuksen uudelleenrakentumiseen.

### 1.6.2 X-kromosomissa periytyvä vaikea immuunipuutos

X-kromosomissa periytyvä vaikea immuunipuutos, SCID-X1, on sairaus, jossa sytokiinireseptorien  $\gamma_c$ -alayksikköä koodaavassa geenissä tapahtuvan mutaation vuoksi

aiheutuu pysähdys immuunipuolustuksen T- ja NK-solujen kehityksessä (Cavazzana-Calvo ym. 2000; Hacein-Bey-Abina ym. 2002). SCID-X1:n geeniterapia perustuu toimivaa sytokiinireseptorien  $\gamma_c$ -alayksikköä koodaavan geenin siirtämiseen retrovirusvälitteisesti *ex vivo* potilaiden hematopoeettisiin kantasoluihin.

Kliinisten geeniterapiakokeiden tulokset ovat olleet lupaavia. Faasi I:n kokeissa suurimmalla osalla koehenkilöistä on havaittu immuunipuolustuksen uudelleenrakentumista (toimivia T- ja NK-soluja) ja taudin kliininen kuva on parantunut (Cavazzana-Calvo ym. 2000; Hacein-Bey-Abina ym. 2002; Gaspar ym. 2004). Positiivisten hoitovaikutusten säilyminen on havaittu myös useita vuosia kestäneissä pitkäaikaisseurannoissa (Hacein-Bey-Abina ym. 2010; Gaspar ym. 2011). Kuitenkin, joillakin hoidetuista potilaista on ilmennyt T-soluleukemiaa (31–68 kuukautta geeniterapian jälkeen), minkä on arveltu johtuvan  $\gamma_c$ -alayksikön onkogeenisista eli kasvaimia aiheuttavista ominaisuuksista, etenkin jos siirtogeeni on integroitunut genomiin onkogeneesia suosivalle alueelle (Ylä-Herttua ja Salo 2006; Cavazzana-Calvo ja Fischer 2007; Hacein-Bey-Abina ym. 2008). Vastikään aloitetuissa faasi I/II:n kliinisissä kokeissa (ClinicalTrials.gov: NCT01410019, NCT01175239, NCT01129544) käytetään retroviraalista itsensä inaktivoivaa SIN (self-inactivating) -vektoria. Tällä pyritään vähentämään insertionaalisen mutageneesin riskiä, sillä SIN-vektorit eivät aktivoi genomiin integroituneen transgeenin viereisiä genejä (Yu ym. 1986; Thornhill ym. 2008).

Saavutetun terapeuttisen hyödyn kannalta ratkaisevaksi tekijäksi SCID-X1:n geeniterapiassa on osoittautunut potilaille palautettujen geenikorjattujen kantasolujen lukumäärä (Cavazzana-Calvo ja Fischer 2007). Palautettujen solujen lukumäärää on kuitenkin toistaiseksi rajoittanut mahdollinen onkogeneesin riski. Myös potilaiden iän on havaittu vaikuttavan geenihoidon onnistumiseen, sillä vanhemmilla potilailla (potilaiden ikä 10–20 vuotta) on hoitovaste ollut huonompi (Thrasher ym. 2005; Cavazzana-Calvo ja Fischer 2007; Chinen ym. 2007). Tämän on epäilty johtuvan jatkuvien infektioiden aikaansaamista palautumattomista muutoksista kateenkorvan toiminnassa (Chinen ym. 2007).

### 1.6.3 Hemofilia

Hemofilia on perinnöllinen verenvuototauti, jonka aiheuttaa mutaatio hyytymistekijä VIII:a (hemofilia A) tai hyytymistekijä IX:ä (hemofilia B) koodaavassa geenissä (Aiuti ym. 2007). Hemofilian kliinisessä geeniterapiassa geeninsiirto hyytymistekijöitä (FVIII = hyytymistekijä VIII, FIX = hyytymistekijä IX) koodaavilla geeneillä on suoritettu sekä *ex vivo* -, että *in vivo* -menetelmillä (Viiala ym. 2009; High 2011). Kokeissa on käytetty retrovirus-, adenovirus-, AAV- ja plasmidivektoreita (High 2011).

Roth ym. (2001) transfektoivat faasi I:n kliinisessä kokeessa hemofilia A -potilaiden ihon fibroblasteja *ex vivo* FVIII-geeniä sisältävällä plasmidivektorilla, minkä jälkeen transgeeniä ilmentäviä soluja palautettiin potilaiden elimistöön. Kuudesta koehenkilöstä neljällä hyytymistekijän plasmapitoisuus kasvoi yli lähtötason ja vuototaipumus vastaavasti pieneni. Vaikka menetelmä todettiin turvalliseksi ja hyvin siedetyksi, ei kokeessa kuitenkaan havaittu merkittävää kliinisen oireiston paranemista (Roth ym. 2001; Viiala ym. 2009). Powell ym. (2003) käyttivät laskimonsisäistä infuusiota FVIII-geenin annostelemiseen *in vivo* retrovirusvälitteisesti hemofilia A -potilaille (n=13) faasi I:n kokeessa. Menetelmällä transduoitiin perifeerisen veren mononukleaarisia soluja. Vaikka osalla potilaista havaittiin geeniterapian seurauksena muutos vuototaipumuksessa parempaan suuntaan, jäi terapeuttinen teho silti vähäiseksi. Menetelmä todettiin kuitenkin hyvin siedetyksi.

Ensimmäinen hemofilia B:n geeniterapiakoe tehtiin Kiinassa *ex vivo* -menetelmällä (Qiu ym. 1996). Siinä kahdelle hemofiliapotilaalle siirrettiin FIX-geenillä retroviraalisesti transduoituja autologisia fibroblasteja. Potilaiden FIX-tuotannon raportoitiin kaksinkertaistuneen hoidon myötä ja kliinisen tilan paranemisen kestäneen yli vuoden ajan. Pitkäaikaisseurannan tuloksia ei ole saatavilla (Viiala ym. 2009).

Manno ym. (2003) tutkivat AAV-välitteistä lihaksensisäistä *in vivo* FIX-geeninsiirtoa faasi I:n kokeessa kahdeksalla koehenkilöllä. Vaikkakin injektio kohdissa havaittiin transduoituneita soluja ja geenin ekspressiota, ei kokeessa saavutettu terapeuttisia FIX-tasoja. Faasi I/II:n kliinisessä kokeessa seitsemälle hemofilia B -potilaalle injektioitiin

AAV2-FIX-vektoria kahdella eri annoskoolla maksavaltimoon (Manno ym. 2006). Suurempaa annosta saaneilla koehenkilöillä saatiin aikaiseksi terapeuttiset FIX-tasot, mutta vain väliaikaisesti (4–10 viikkoa). Vasteen katoamisen todettiin johtuvan AAV-vektorin laukaisemasta T-soluvälitteisestä transduoituneiden hepatosyyttien tuhoutumisesta.

Pidempikestoisen geeniekspression mahdollistamiseksi Nathwani ym. (2011) käyttivät faasi I/II:n kliinisestä hemofilia B:n kokeessa vektoria (scAAV2/8-LP1-hFIXco), jota oli kehitetty edellisten kokeiden vektoreihin verrattuna siten, että sen immuunipuolustusta aktivoiva vaikutus oli vähäisempi ja geeninsiirtoteho parempi. Vektori annosteltiin *in vivo* perifeeriseen laskimoon kuudelle potilaalle. Koehenkilöillä saatiin aikaan terapeuttiset FIX-arvot (2–11 % normaaleihin verrattuna) ja neljällä koehenkilöllä FIX-korvaushoito voitiin keskeyttää (seuranta-aika 6–16 kuukautta).

#### 1.6.4 Kystinen fibroosi

Kystinen fibroosi on perinnöllinen sairaus, joka aiheutuu epiteelisolujen pinnalla olevaa kloridi-ionikanavaa koodaavan CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) -geenin mutaatiosta (Riordan ym. 1989; Gill ym. 1997). Kloridi-ionikanava säätelee suolan ja veden kulkeutumista epiteelin läpi useissa kudoksissa, joista merkittävin sairauden kannalta on keuhkokudos. Kanavan puutteellinen toiminta aiheuttaa keuhkoissa limanmuodostusta ja kroonisia bakteeri-infektioita.

Kystinen fibroosi on toistaiseksi ollut yksi tärkeimmistä sairauksista, joihin geeniterapiaa on kehitetty. Useimmissa kokeissa geeninsiirtotoimenpide on suoritettu keuhkojen sijasta nenän epiteelille mm. näytteenoton ja annostelun helpottamiseksi, sekä turvallisuuden varmistamiseksi (Alexander ym. 2007). Hengitysteiden epiteelisoluihin kohdistetulla CFTR-geeninsiirrolla on saatu aikaan CFTR-proteiinin ekspressio ja osittainen kloridi-ionikanavan toiminnan korjaantuminen monissa kliinisissä kokeissa sekä virus- (AV, AAV), että kationisilla liposomivektoreilla (Caplen ym. 1995; Harvey ym. 1999; Hyde ym. 2000; Moss ym. 2004). Ongelmaksi tehon

kannalta on kuitenkin muodostunut suhteellisen pieni geeniekspression määrä sekä ekspresion väliaikaisuus (Griesenbach ja Alton 2011).

#### 1.6.5 Alfa<sub>1</sub>-antitrypsiinin puutos

Alfa<sub>1</sub>-antitrypsiini (AAT) on verenkierrossa kiertävä hepatosyyttien erittämä anti-inflammatorinen ja antiapoptoottinen glykoproteiini (Alexander ym. 2007). AAT-geenimutaation seurauksena muodostuu virheellinen, toimimaton AAT-proteiini, joka kertyy hepatosyytteihin (Flotte ja Mueller 2011). Vaikea AAT-puutos aiheuttaa aikuisiällä keuhkosairauden, joka johtuu viallisen AAT:n kyvyttömyydestä estää tulehdusta aiheuttavien entsyymien toimintaa keuhkoissa. Osalle potilaista kehittyy myös maksasairaus AAT:n kertymisen seurauksena. AAT-puutoksen geeniterapiassa on toistaiseksi keskitytty AAT:n tuotannon aikaansaamiseen (ja siten keuhkosairauden ehkäisyyn) joko suoraan keuhkokudoksessa tai vaihtoehtoisesti lihaskudoksessa, josta AAT:a erittyisi verenkiertoon.

Ensimmäisessä kliinisessä kokeessa tutkittiin AAT-geeninsiirron toimivuutta annostelemalla geeniä kationisella lipidivektorilla nenän limakalvolle viiden koehenkilön sieraimen (Brigham ym. 2000). Tutkimuksessa havaittiin AAT-tason tilapäinen nousu hoidetussa sieraimessa. Hoidon seurauksena havaittiin myös tulehdusta edistävän sytokiinin, interleukiini-8:n, pitoisuuden pieneneminen paikallisesti hoitokohdassa. Koska kationisen lipidivektorin käyttäminen vaatisi tasaisen ja pitkäaikaisen AAT-ekspresion saavuttamiseksi toistuvaa annostelua, on myöhemmissä kliinisissä kokeissa käytetty lihaksensisäisesti annosteltuja virusvektoreita (Brantly ym. 2006; Brantly ym. 2009; Flotte ja Mueller 2011). Brantly ym. (2006) käyttivät AAT-geenin kuljettamiseen AAV2 (serotyypin 2 AAV) -vektoria lihaksensisäisesti annosteltuna. Menetelmä todettiin turvalliseksi huolimatta vasta-ainetuotannosta virusvektoria kohtaan. Hoidon tehoa ei voitu kuitenkaan arvioida luotettavasti, koska koehenkilöiden (n=12) käyttämän entsyymikorvaushoidon lopettamisesta kulunut aika oli riittämätön eliminoimaan kaikkea korvaushoidolla saatua AAT:a.

Brantly ym. (2009) tekivät faasi I:n jatkotutkimuksen käyttäen AAV1-virusvektoria, jonka on todettu olevan AAV2-vektoria tehokkaampi lihaskudoksen transduktiossa (Flotte ja Mueller 2011). Yhdeksän koehenkilöä jaettiin kolmeen ryhmään, jotka saivat kukin eri annoksen AAV1-AAT-vektoria (Brantly ym. 2009). Tuloksissa nähtiin annoksesta riippuva lisäys AAT-arvoissa ja AAT-tuotannon havaittiin jatkuvan vuoden seurannan ajan. Tavoitetasoon verrattuna proteiinin pitoisuudet olivat kuitenkin riittämättömiä (200-kertainen pitoisuus saavutettuihin verrattuna oli minimitavoite). AAV1-AAT-menetelmällä on aloitettu faasi I/II:n kliininen koe, jossa annoskoko on ylimmillään 7-kertainen edellisen kokeen maksimiannokseen verrattuna (Flotte ja Mueller 2011).

#### 1.6.6 Lysosomaaliset kertymätaudit

Lysosomaaliset kertymätaudit ovat perinnöllisiä metabolisia sairauksia, jotka aiheutuvat lysosomaalisten entsyymien (yhden tai useamman) täydellisestä tai merkittävästä (alle 10 % normaalista) vajauksesta (Sands ja Davidson 2006). Suurin osa lysosomaalisista entsyymeistä esiintyy kaikkialla elimistössä ja niiden puute voi ilmetä sekä systeemisinä että keskushermostollisina oireina (Beck 2010). Veriaivoesteen vuoksi eksogeeniset lysosomaaliset entsyymit eivät pääse aivoihin, joten hoito tulisi voida kohdistaa myös keskushermostoon.

Kliininen tutkimus *ex vivo* -menetelmällä rajoittuu toistaiseksi varhaisiin tutkimuksiin, joissa hoitoa ei kohdistettu keskushermostoon (Dunbar ym. 1998; Beck 2010). Gaucherin tauti on lysosomaalinen kertymänsairaus, jonka aiheuttaa mutaatio glykolipidejä hajottavaa entsyymiä, glukoserebrosidaasia, koodaavassa geenissä (Timonen ym. 2005). Dunbar ym. (1998) siirsivät ei-neuropaattista Gaucherin tautia sairastaville koehenkilöille retrovirusvälitteisesti glukoserebrosidaasia koodaavalla DNA:lla *ex vivo* manipuloituja autologisia hematopoieettisia kantasoluja. Kokeessa havaittiin potilailla siirtogeenin ekspressiota, mutta aikaansaatujen lysosomaalisten entsyymien määrät olivat kliinisen vasteen kannalta liian pieniä.

Worgall ym. (2008) suorittivat *in vivo* -menetelmällä klinisen kokeen kymmenellä myöhäistä infantiaalista neuroonista seroidilipofuskinosia (LINCL) sairastavalla lapsella. Sairauden aiheuttaa mutaatio tripeptidyyli-peptidaasientsyymiä koodaavassa CLN2-geenissä. Koehenkilöille siirrettiin AAV-välitteisesti CLN2-geeniä koodaavaa geeniä keskushermostoon kallonsisäisesti annosteltuna. 18 kuukauden kuluttua toimenpiteestä koehenkilöille suoritettua neurologisessa arvioinnissa havaittiin, että geenihoidon saaneiden henkilöiden neurologisten oireiden eteneminen oli hidastunut merkittävästi kontrolliryhmään verrattuna. Myös magneettikuvissa nähtiin viitteitä hoidon tehosta. Vastaavanlaisia faasi I:n ja faasi I/II:n LINCL-kokeita, joissa käytetään uudemman sukupolven AAV-vektoria, ollaan parhaillaan aloittamassa (ClinicalTrials.gov: NCT01161576; ClinicalTrials.gov: NCT01414985).

#### 1.6.7 Krooninen granulomatoosi

Krooninen granulomatoosi (CGD) on perinnöllinen sairaus, joka aiheuttaa toistuvia bakteeri- ja sieni-infektioita (Segal 1996; Helminen ym. 2008; Grez ym. 2011). CGD johtuu NADPH (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti) -oksidiaasin puutteellisesta toiminnasta NADPH:a koodaavien geenien mutaatioiden johdosta. Tämä aiheuttaa fagosyyttien toiminnan heikentymistä. CGD:n geeniterapia perustuu autologisten hematopoieettisten kantasolujen geeninsiirtoon *ex vivo* NADPH:n alayksiköitä (esim. p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup>) koodaavilla geeneillä (Grez ym. 2011).

Ensimmäisessä faasi I:n kliinisessä kokeessa siirrettiin *ex vivo* retroviraalisesti p47<sup>phox</sup>-alayksikköä koodaavaa geeniä kantasoluihin, minkä jälkeen solut palautettiin potilaiden (n=5) verenkiertoon (Malech ym. 1997). Korjaantuneiden solujen osuus elimistössä jäi kuitenkin kliinisen tehon kannalta liian pieneksi. Myöhemmissä kokeissa gp91<sup>phox</sup>-geeniterapiassa teho-ongelmaa on pyritty korjaamaan luuydintä lamaavan esihoidon avulla, jolloin korjaantuneiden solujen määrää verenkierrossa on saatu nostettua huomattavasti (Ott ym. 2006; Kang ym. 2010). Korjaantumisaste on ollut riittävä myös kliinisen hyödyn kannalta (infektiot ovat vähentyneet), mutta hoidon teho on kuitenkin heikentynyt nopeasti (Ott ym. 2006; Kang ym. 2010; Grez ym. 2011).



### 1.6.8 Lihasrappeumataudit

Lihasrappeumataudeilla (lihasdystrofiat) tarkoitetaan perinnöllisiä sairauksia, joissa lihaskudos heikkenee ja surkastuu (Goyenvalle ym. 2011). Näistä yleisin ja samalla vakavin muoto on Duchennen lihasdystrofia (DMD), jonka aiheuttaa geenimutaatiosta johtuva toimivan dystrofiini-proteiinin puuttuminen lihassoluista (Goyenvalle ym. 2011; Pichavant ym. 2011). Duchennen lihasdystrofian geeniterapian tavoitteena on siirtää soluihin toimiva dystrofiini-geeni (Goyenvalle ym. 2011). Geeniterapiaa vaikeuttaa sairauden kokonaisvaltaisuus; vaikutuksen tulisi ulottua lihaskudokseen joka puolelle kehoa, myös sydämeen (Alexander ym. 2007; Goyenvalle ym. 2011).

Suurin ongelma kliinisissä kokeissa on toistaiseksi ollut tehokkaan vektorin löytäminen; plasmidivektori ei ole osoittautunut riittävän tehokkaaksi ja virusvektorit (AAV) ovat aktivoineet immuunipuolustusta (Goyenvalle ym. 2011). Romero ym. (2004) injektoivat faasi I:n kokeessa yhdeksälle dystrofiapotilaalle dystrofiiniplasmidia lihaksensisäisesti. Kuudella koehenkilöistä havaittiin kolmen viikon kuluttua lihasnäytteissä dystrofiinin ekspressio, mutta ekspression määrä jäi kliinisen hyödyn kannalta liian pieneksi. Mendell ym. (2010a) käyttivät dystrofiinigeenin sijasta ”kutistettua” dystrofiinigeeniä (dystrofiinin teho säilyy osittain), jollainen on havaittavissa taudin lievempää muotoa sairastavilla potilailla (Beckerin dystrofia, BMD, osittainen lihasvoima tallella). Kokeessa kuudelle DMD:a sairastavalle potilaalle injektoitiin AAV-vektorin kuljettamaa mini-dystrofiinigeeniä hauislihakseen (plasebokontrolli toiseen hauikseen). Geeninsiirron jälkeen mini-dystrofiiniproteiinia tuottavia lihassoluja havaittiin kahdella henkilöllä. Kokeessa kuitenkin epäonnistuttiin saamaan aikaiseksi pitkäaikainen transgeenin ekspressio ja lisäksi immuunipuolustuksen T-solujen havaittiin tunnistavan mini-dystrofiinin. Tuloksista pääteltiin, että dystrofiini saattaa olla immunogeeninen dystrofiinipuutosta sairastaville henkilöille.

Alfa-sarkoglykaanin ( $\alpha$ -SG) puutoksen aiheuttaman hartia-lantiotyypin lihasdystrofian (LGMD2D) kliinisessä plasebokontrolloidussa geeniterapiakokeessa kuudelle potilaalle siirrettiin  $\alpha$ -SG-geeniä AAV-vektorilla varpaiden lyhyeen ojentajalihakseen (Mendell ym. 2009; Mendell ym. 2010b). Koehenkilöistä viidellä havaittiin geenikäsitellyssä

lihaksessa voimakas geeniekspressio ja sen seurauksena sairauden kliiniset oireet aikaansaavan,  $\alpha$ -SG-puutoksen aiheuttaman, viallisen sarkoglykaanikompleksin eheytyminen. Kuudennella koehenkilöllä immuunipuolustuksen aktivoituminen virusvektoria kohtaan johti geenihoidon epäonnistumiseen.

### 1.7 Sydän- ja verisuonisairauksien geeniterapia

Sydän- ja verisuonisairauksien geeniterapia perustuu sairauksien kehittymisen kannalta hyödyllisten geenien käyttöön, vaikka kyseiset geenit eivät liittyisikään itse sairauden syntymekanismiin (Ylä-Herttuala 2009). Geenihoidoissa on käytetty muiden muassa verisuonikasvutekijöitä, jotka lisäävät uudissuonten kasvua hapenpuutteen vaurioittamille lihasalueille. Faasi I:n kokeissa on saatu lupaavia tuloksia geenihoidojen tehosta, mutta plasebokontrolloiduissa faasi II:n ja faasi III:n kokeissa kliinisesti merkitsevien positiivisten tulosten saavuttaminen on osoittautunut vaikeaksi (Hedman ym. 2011). Ongelmia ovat aiheuttaneet alhainen geeninsiirtoteho ja geeniekspression määrä, virusvektorien aikaansaamat tulehdusreaktiot, sekä myös hoidoissa havaittu vahva plasebovaikutus (Fishbein ym. 2010; Hedman ym. 2011). Turvallisuusprofiililtaan geenihoidot ovat kuitenkin osoittautuneet lupaaviksi.

#### 1.7.1 Sydämen vajaatoiminta

Sydämen vajaatoiminnalla tarkoitetaan sydämen heikentyntä kykyä pumpata verta. Tämä johtuu sydämen kammioiden vajaasta täyttymisestä tai heikentyneestä supistumisesta (Vinge ym. 2008). Geeniterapialla pyritään korjaamaan sydänlihaksen toimintaa vaikuttamalla solutason mekanismeihin. Kliinisiä kokeita on toistaiseksi valmistunut vain menetelmällä, joka perustuu sydänlihassolun kalsiumpitoisuuden säätelemiseen SERCA2a-kalsiumATPaasin avulla (Vinge ym. 2008; Jaski ym. 2009; Jessup ym. 2011). Menetelmässä SERCA2a:n määrää lisäämällä pyritään tehostamaan sytosolin kalsiumin siirtymistä sarkoplasmakalvostoon sydämen lepovaiheen, diastolen, aikana. Sydänlihaksen relaksaation aikaansaava kalsiumin siirtyminen sarkoplasmakalvostoon on heikentynyt sydämen vajaatoiminnassa.

Ensimmäisessä faasi I/II:n kliinisessä kokeessa annosteltiin SERCA2a:ta koodaavaa geeniä AAV1-välitteisesti sepelvaltimoinfuusiolla sydämen vajaatoimintaa sairastaville potilaille (Jaski ym. 2009). Koe oli kaksiosainen: faasi I:n vaihe tehtiin kolmella eri annoskoolla, faasi II:n vaihe oli satunnaistettu, kaksoissokkoutettu ja plasebokontrolloitu tutkimus myös kolmella annoskoolla. Faasi I:n kokeessa menetelmä todettiin turvalliseksi ja useissa sairauden astetta kuvaavissa parametreissa havaittiin parantumista potilailla, joilla ei ollut ennestään veressään neutraloivia vasta-aineita virusvektoria kohtaan. Faasi II:n vaiheessa AAV1/SERCA2a annosteltiin yhteensä 39 potilaalle (Jessup ym. 2011). Potilaiden taudinkuvaa selvittäviä muuttujia seurattiin 12 kuukauden ajan ja koehenkilöiden havaittiin hyötyvän geenihoidosta etenkin suurimmalla annoksella.

Sydämen vajaatoiminnan hoidossa on alkamassa kaksi faasi I/II:n kliinistä geeniterapiakoetta (ClinicalTrials.gov: NCT00534703; ClinicalTrials.gov: NCT00787059). Toisessa kokeessa käytetään AAV6-vektoria kuljettamaan SERCA2a-geeniä (ClinicalTrials.gov: NCT00534703). Toisessa kokeessa koehenkilöille annostellaan adenovirusvälitteisesti tyypin 6 adenylaattisyklaasia (AC6) koodaavaa geeniä (ClinicalTrials.gov: NCT00787059). AC6 katalysoi syklisen AMP:n muodostumista tehostaen siten sydämen pumppaustoimintaa (Vinge ym. 2008).

### 1.7.2 Sepelvaltimotauti ja sydänlihaksen iskemia

Valtimoita ahtaavien sairauksien geeniterapia on toistaiseksi keskittynyt syntyneiden vaurioiden hoitoon (Luoma ja Ylä-Herttuala 1999; Hedman ym. 2011). Sydänlihaksen valtimonkovettumatauti vähentää sydänlihaksen verenkiertoa ja aiheuttaa sydänlihaksen hapenpuutetta (iskemia), ja geeniterapialla on pyritty stimuloimaan uusien verisuonten kasvua hapenpuutteesta kärsivällä alueella. Hoidoissa on käytetty verisuonten kasvutekijöitä (VEGF), fibroblastikasvutekijöitä (FGF) ja hepatosyyttikasvutekijää (HGF) koodaavia genejä adenovirus-, liposomi- tai plasmidivälitteisesti annosteltuna (Alexander ym. 2007; Gupta ym. 2009; Yang ym. 2009). VEGF:t indusoivat verisuonten uudismuodostumista ja verisuonten endoteelin korjautumista (Luoma ja Ylä-Herttuala 1999). Myös FGF lisää uudissuonten muodostusta. HGF toimii

angiogeenisenä, antiapoptoottisena ja antifibroottisena proteiininä soluissa (Gupta ym. 2009).

Tulokset faasi II:n ja III:n kliinisistä kokeista eivät suurelta osin ole olleet toivotun kaltaisia (Alexander ym. 2007; Stewart ym. 2009; Hedman ym. 2011). Vaikkakin faasi I:n kokeissa on saatu lupaavia hoitotuloksia, ei satunnaistetuissa kaksoissokkokeikeissa toistaiseksi aikaansaatu verisuonten uudismuodostus ole parantanut iskeemisen sydämen toimintaa kliinisen tehon kannalta riittävästi (Hedman ym. 2003; Alexander ym. 2007; Stewart ym. 2009; Hedman ym. 2011).

### 1.7.3 Perifeerinen valtimonkovettumatauti ja perifeeristen lihasten iskemia

Perifeerisen valtimonkovettumataudin ja iskemian geeniterapia on sydänlihaksen vastaavien sairauksien tavoin keskittynyt uudissuonten muodostumisen tukemiseen. Terapeuttisina geeneinä on käytetty verisuonten endoteelien kasvutekijöitä (VEGF), fibroblastikasvutekijöitä (FGF), hepatosyyttikasvutekijää (HGF) ja hapenpuutteessa ilmentyvää hypoksia-indusoituva tekijä  $1\alpha$ :a (HIF- $1\alpha$ ) adenovirus-, liposomi- tai plasmidivälitteisesti annosteltuna (Gupta ym. 2009; Creager ym. 2011; Hedman ym. 2011). HIF- $1\alpha$  stimuloi angiogeneesiä ja tukee iskeemisen kudoksen selviytymistä uudissuonten muodostumisen aikana (Semenza 1998).

Kliinisissä kokeissa geenihoidojen hyödyt ovat olleet kyseenalaisia. Faasi II:n ja III:n kokeissa ei ole saatu aikaan kliinisesti merkitseviä eroja plaseboon verrattuna vaikkakin monissa, etenkin faasi I:n, kokeissa on geenihoidoilla saavutettu joitakin positiivisia hoitotuloksia (Mäkinen ym. 2002; Alexander ym. 2007; Gupta ym. 2009; Creager ym. 2011; Hedman ym. 2011; Henry ym. 2011). Kokeissa on kuitenkin osoitettu geenihoidon turvallisuus.

### 1.8 Infektiosairauksien geeniterapia

Infektiosairauksien geeniterapia on keskittynyt pääasiassa HIV-infektion hoitoon (Journal of Gene Medicine 2011a). HIV/AIDS-geeniterapiassa muokataan *ex vivo* joko

hematopoieettisia kantasoluja tai T-soluja siten, että solujen infektoituminen tai viruksen lisääntyminen infektoituneissa soluissa estyy (Aiuti ym. 2007; Rossi ym. 2007). Meneillään on useita kliinisiä kokeita (Rossi ym. 2007; Journal of Gene Medicine 2011a). Yksi pisimmällä kehityksessä olevista HIV:n geenihoidoista on yhdysvaltalaisen VIRxSYS-yhtiön kehittämä Lexgenleucel-T (VRX496™), jossa antisense-menetelmällä pyritään estämään HI-viruksen kapsidia muodostavan proteiinin syntyminen (Levine ym. 2006; VIRxSYS 2012). Menetelmässä potilaiden T-soluihin siirretään *ex vivo* lentiviraalisella vektorilla geeni, joka aktivoituu HIV:n infektoimissa soluissa johtaen HI-viruksen replikaation estymiseen. Menetelmää testataan faasi II:n kliinisissä kokeissa (VIRxSYS 2012).

Muita infektioitauteja, joiden geeniterapia on edennyt kehityksessä kliiniseen vaiheeseen, ovat muun muassa jäykkäkouristus (faasi I/II), influenssa (faasi I), tuberkuloosi (faasi I), malaria (faasi I/II), C-hepatiitti (faasi II) ja B-hepatiitti (faasi II). (Journal of Gene Medicine 2011a)

### 1.9 Neurologisten sairauksien geeniterapia

Geenihoidoilla on pyritty lievittämään neurologisten sairauksien oireita vaikuttamalla välittäjäaineiden muodostumiseen ja vapautumiseen hermosoluissa, tai hidastamalla sairauksien etenemistä hermokasvutekijöiden muodostumista lisäämällä (Bowers ym. 2011). Keskushermoston sairauksien kliinisissä geeniterapiakokeissa toistaiseksi käytetyt vektorit eivät läpäise veri-aivoestettä, minkä vuoksi geenivektoreiden annostelu on suoritettu kirurgisen operaation avulla suoraan kohdekudokseen. Tämä on osoittautunut suurimmaksi geeninsiirtojen turvallisuutta heikentäväksi tekijäksi kliinisissä kokeissa. Toisaalta, sivuvaikutusten minimoinnin kannalta pienelle alueelle kohdistettua geeniterapiaa on pidetty myös etuna, sillä aikaansaadun geeniekspression voidaan olettaa olevan paikallinen antokohtaan tai sen läheisyyteen rajoittuva (Kaplitt ym. 2007).

### 1.9.1 Parkinsonin tauti

Parkinsonin tauti aiheutuu substantia nigran dopaminergisten hermosolujen tuhoutumisesta, mikä johtaa dopamiinin puutokseen striatumissa (Alexander 2004). Tämä saa aikaan muutoksia liikettä kontrolloivissa aivojen osissa johtaen sairaudelle tyypillisiin liikehäiriöihin (Kaplitt ym. 2007). Sairauden nykyinen hoito perustuu pääasiassa dopamiinin määrän lisäämiseen aivoissa systeemisesti annostellun dopamiinin esiasteen, levodopan (L-dopa), avulla. Taudin edetessä lääkityksen teho kuitenkin heikkenee. Pitkälle edennyt Parkinsonin tauti on lääkityksen kannalta ongelmallinen, sillä dopaminerginen lääkitys saattaa aiheuttaa potilaille vaikeita haittavaikutuksia.

Parkinsonin taudin kliiniseen vaiheeseen edennyt geeniterapiatutkimus perustuu joko oireita lievittävään tai sairauden etenemistä rajoittavaan vaikutukseen (Mochizuki ym. 2008). Tutkimuksessa kliinisen vaiheen on tällä hetkellä saavuttanut neljä erilaista menetelmää: (1) inhibitorisen neurotransmitteri gamma-aminovoihapon (GABA) synteesiä katalysoivan glutamaattidekarboksylaasi (GAD) -entsyymin määrän lisääminen subtalaamisessa tumakkeessa, (2) levodopaa dopamiiniksi muuttavan aromaattisen L-aminohappodekarboksylaasientsyymin (AADC) määrän lisääminen striatumissa, (3) kolmea dopamiinin synteesiin osallistuvaa entsyymiä koodaavien geenien yhdistelmän (ProSavin<sup>®</sup>) siirto striatumiin ja (4) hermosolujen tuhoutumista estävää hermokasvutekijä neurturiinia koodaavan geenin siirto striatumiin (Eberling ym. 2008; Mochizuki ym. 2008; Björklund ym. 2009).

#### 1.9.1.1 GAD-geeniterapia

Monet Parkinsonin taudin motorisista oireista johtuvat aivojen inhibitoristen GABAergisten hermosolujen toiminnan heikkenemisestä ja siitä aiheutuvasta subtalaamisen tumakkeen yliaktiivisuudesta (Mochizuki ym. 2008). Parkinsonin taudin liikehäiriöiden hoitamiseksi Kaplitt ym. (2007) tutkivat GABA:n muodostumista katalysoivan GAD:n pitoisuuden lisäämistä subtalaamisessa tumakkeessa.

Menetelmässä pyritään estämään neuronituhon aiheuttamia liikehaittoja palauttamalla hermosolujen normaali aktiivisuus motoriikkaa säätelevillä aivoalueilla.

Faasi I:n kliinisessä kokeessa GAD-geeninsiirto suoritettiin kahdelletoista pitkälle edennyttä Parkinsonin tautia sairastavalle koehenkilölle (Kaplitt ym. 2007). GAD-geeni annosteltiin AAV-välitteisesti infusoimalla unilateraalisesti (toiselle aivopuoliskolle) subtalaamiseen tumakkeeseen. Kokeessa tutkittiin ensisijaisesti menetelmän mahdollisia haittavaikutuksia ja vasta-ainemuodostusta virusvektoria kohtaan, sekä toissijaisesti hoidon tehoa UPDRS-asteikon (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) pisteytysten avulla, PET-kuvauksella (positroniemissiotomografia) selvitettyillä muutoksilla aivoalueiden metabolisessa aktiivisuudessa sekä neuropsykologisilla testeillä. Toimenpiteestä tai geenihoidosta johtuvia vakavia haittavaikutuksia tai toksisia muutoksia ei havaittu vuoden tarkastelujaksolla. Sekä lääkevaikutuksen on-vaiheessa (levodopälääkitys vaikuttaa) että off-vaiheessa (lääkevaikutus puuttuu) tehdyissä UPDRS-pisteytyksissä havaittiin lähtötilanteeseen verrattuna tilastollisesti merkitsevä paraneminen kolme kuukautta toimenpiteen jälkeen alkaen. PET-tutkimuksissa havaittiin hoidetun puolen aivoalueiden metaboliassa muutoksia, jotka korreloivat UPDRS-asteikon motorisen osion pisteiden kanssa (Feigin ym. 2007; Kaplitt ym. 2007). Tuloksia tulkittaessa on kuitenkin otettava huomioon, että koetta ei ollut suunniteltu mittaamaan geeniterapian tehoa (ei plasebokontrollia).

Faasi II:n kliinisessä kokeessa (satunnaistettu, plasebokontrolloitu kaksoissokkokeo) toimenpide suoritettiin bilateraalaisesti (molemmille aivopuoliskoille) 22 koehenkilölle ja plasebokontrollina toiminut valeoperaatio 23 koehenkilölle (LeWitt ym. 2011). Kokeessa tarkasteltiin ensisijaisesti muutosta lähtötasoon UPDRS-asteikon motorisen osion pisteissä lääkityksen off-vaiheessa kuuden kuukauden kohdalla, minkä lisäksi seurattiin useita toissijaisia lopputulosmuuttujia. AAV-GAD-ryhmällä havaittiin kuuden kuukauden kohdalla tilastollisesti merkitsevä paraneminen UPDRS-pisteissä (keskiarvo 23,1 %) kontrolliryhmään (12,7 %) verrattuna. Koehenkilöillä, joilla geenihoidon annostelu oikeaan kohtaan aivoissa epäonnistui (katetrit eivät saavuttaneet annostelukohtaa), ei havaittu tulosten parantumista, mikä puolsi olettamusta, että AAV-GAD-hoito sai aikaan kokeessa havaitut hyödyt. Vaikkakin subtalaamisen tumakkeen

vaurioitumisen tiedetään voivan parantaa Parkinsonin taudin oireita, todettiin kokeessa geeninsiirtotoimenpiteessä katetrin aiheuttaman tumakkeen vaurioitumisen kuitenkin olevan väliaikaista ja suhteellisen pientä, eikä sen arveltu vaikuttavan tuloksiin. Tuloksiltaan ja turvallisuusprofiililtaan koe oli linjassa aiemman faasi I:n kokeen kanssa (Kaplitt ym. 2007; LeWitt ym. 2011). Kaiken kaikkiaan kokeen tulokset todettiin lupaaviksi, ja menetelmän tehon ja käyttökelpoisuuden arviointia suuremmassa kliinisessä kokeessa pidettiin suositeltavana (LeWitt ym. 2011).

#### 1.9.1.2 AADC-geeniterapia

AADC-entsyymi katalysoi levodopan muuttumista dopamiiniksi. Parkinsonin tautia sairastavilla henkilöillä taudin vaurioittamilla aivoalueilla entsyymien pitoisuus on pienentynyt, mikä johtaa levodopahoidon tehon laskuun (Björklund ym. 2009). AADC-geeniterapialla pyritään tehostamaan suun kautta annostellun levodopan synteesiä dopamiiniksi ja siten vähentämään tarvittavaa levodopa-annosta sekä levodopasta aiheutuvia haittavaikutuksia (Mochizuki ym. 2008). Menetelmässä AADC-entsyymien aktiivisuuden määrää voidaan säädellä levodopan annosta muuttamalla (Kuva 3). Putameniin (osa striatumia) infusoitua bilateraalista AAV-välitteistä AADC-geeninsiirtoa on tutkittu toistaiseksi kahdessa kliinisessä faasi I:n kokeessa yhteensä kuudellatoista Parkinsonin tautia sairastavalla koehenkilöllä (Eberling ym. 2008; Christine ym. 2009; Muramatsu ym. 2010).

Ensimmäisessä kliinisessä kokeessa määritettiin menetelmän turvallisuutta ja tehoa yhteensä kymmenellä koehenkilöllä kahdella eri annoksella (Eberling ym. 2008; Christine ym. 2009). Transgeenin ekspression määrää tutkittiin PET-kuvauksilla ja lisäksi koehenkilöt pitivät päiväkirjaa kliinisistä oireista. Geenihoito todettiin turvalliseksi ja hyvin siedetyksi, mutta kirurgiseen toimenpiteeseen liittyi haittavaikutuksia (kolme kallonsisäistä verenvuototapausta). UPDRS-pisteet paranivat sekä lääkevaikutuksen on- (keskimäärin 32 %) että off- (31 %) vaiheissa kuuden kuukauden kohdalla lähtötasoon verrattuna kaikilla koehenkilöillä. Motorisissa UPDRS-pisteytyksissä keskimääräiset parannukset olivat 28 % on-vaiheessa ja 36 % off-vaiheessa. Koehenkilöillä, joilta oli saatavissa pidemmän aikavälin seurannan



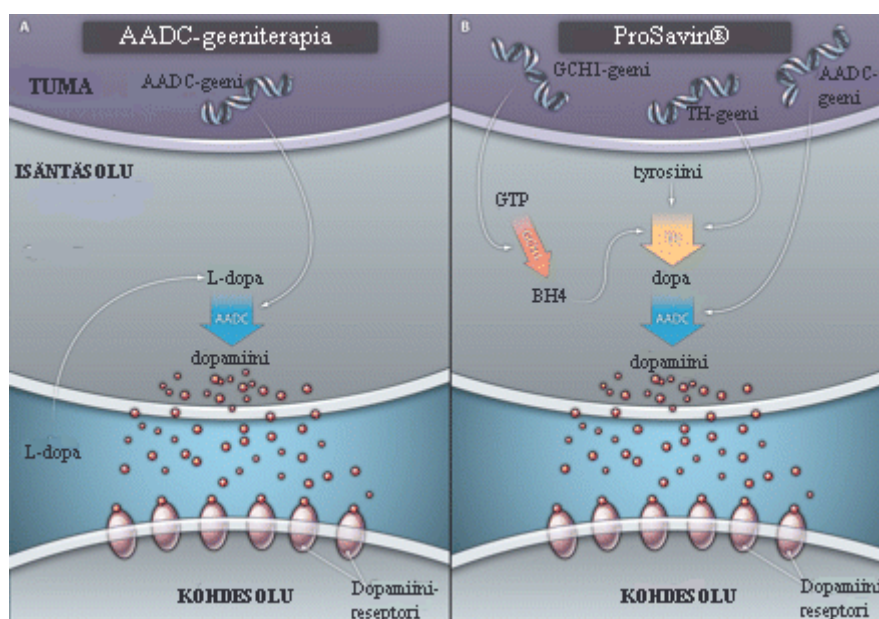
tulokset (yksi ja kaksi vuotta), oli muutos pisteytyksissä lähtötasoon verrattuna edelleen havaittavissa (Christine ym. 2009). Dopaminergistä lääkitystä voitiin vähentää kahdeksalla kymmenestä koehenkilöstä. Geenihoidon aikaansaamaan levodopan tehostuneeseen muuttumiseen dopamiiniksi viittasi myös PET-tutkimuksissa kuuden kuukauden kohdalla lähtötasoon verrattuna havaittu keskimääräinen 30 %:n nousu AADC:n merkkiaineen FMT:n (6-[<sup>18</sup>F]fluoro-L-m-tyrosiini) soluunotossa (kuvaa geeniekspression määrää ja siten geeninsiirron onnistumista) pienemmän annoksen ryhmässä ja 75 %:n nousu isomman annoksen ryhmässä. PET-kuvausten ja UPDRS-pisteytysten välillä ei kuitenkaan havaittu selkeää korrelaatiota ja plasebovaikutuksen mahdollisuutta ei voitu sulkea pois kontrolliryhmän puuttuessa.

Toisen AADC-menetelmän kliinisistä faasi I:n kokeista suorittivat Muramatsu ym. (2010) kuudella Parkinsonin tautia sairastavalla koehenkilöllä samalla AADC-annoksella kuin Christine ym. (2009) suuremman annoksen ryhmässä. Turvallisuuden lisäksi kokeessa seurattiin hoidon tehoa UPDRS-asteikon, PET-kuvausten ja koehenkilöiden pitämien päiväkirjojen avulla. Menetelmä todettiin turvalliseksi ja hyvin siedetyksi; haittavaikutukset aiheutuivat pääosin kirurgisesta toimenpiteestä. Levodopälääkityksen määrää voitiin vähentää kolmella koehenkilöllä seurantajakson aikana. PET-kuvauksissa havaittiin keskimääräinen 56 %:n nousu FTM:n soluunotossa kuuden kuukauden kohdalla. Lääkityksen off-vaiheen motoriset UPDRS-pisteet paranivat kuuden kuukauden kohdalla keskimäärin 46 %, mutta on-vaiheen pisteiden muutos ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Off-vaiheen UPDRS-pisteiden paraneminen selitettiin levodopan pitkäaikaisvaikutuksen tehostumisella, minkä puolestaan arveltiin johtuvan geeniterapian myötä lisääntyneestä putamenin dopamiinimäärästä.

### 1.9.1.3 ProSavin<sup>®</sup>

ProSavin<sup>®</sup> on Oxford Biomedica -yhtiön kehittämä lentiviraalinen vektori, joka kuljettaa kolmen dopamiinin synteesissä tarvittavan entsyymin DNA:ta (Oxford Biomedica 2012a). Nämä entsyymit ovat tyrosiinihydroksylaasi (TH, kutistettu muoto), aromaattinen L-aminohappodekarboksylaasi (AADC) ja GTP-syklohydrolaasi-1 (GCH1) (Björklund ym. 2009). Tyrosiinihydroksylaasi muuttaa tyrosiinin L-dopaksi,

AADC muuttaa L-dopan dopamiiniksi ja GCH1 osallistuu guanosiinitrifosfaatin (GTP) muuttumiseen tyrosiinihydroksylaasin tarvitsemaksi kofaktoriksi, tetrahydrobiopteriiniksi (BH4). Geenihoidon tavoitteena on aikaansaada striatumiin paikallinen dopamiinin tuotanto transduoituneissa soluissa näiden kolmen entsyymin avulla (Kuva 3). Menetelmä on edennyt kliiniseen faasi I/II:n kokeeseen, jossa viidelletoista koehenkilöille on annosteltu vektoria striatumiin bilateraalisesti stereotaktisella injektioilla kolmea eri annosta käyttäen (ClinicalTrials.gov: NCT00627588; Oxford Biomedica 2012a). Tavoitteena kokeessa on selvittää menetelmän turvallisuuden ja sopivan annoskoon ohella geenihoidon vaikutusta koehenkilöiden tarvitsemaan levodopan määrään sekä taudin kliinisiin oireisiin UPDRS-asteikkoa hyväksikäyttäen.



Kuva 3. Dopamiinin korvaushoitogeeniterapian kaksi vaihtoehtoista menetelmää (Björklund ym. 2009). (A) Yhden geenin siirtoon perustuva menetelmä, jossa striatumin neuroneihin siirretty AADC muuttaa suun kautta annosteltua levodopaa dopamiiniksi. Entsyymien oletetaan toimivan ainoastaan eksogeenisesti annostellun levodopan läsnäollessa. (B) Kolmen entsyymin yhdistelmään perustuva menetelmä, jossa striatumin neuroneihin siirretään kaikki kolme dopamiinin synteesissä tarvittavaa entsyymiä (TH, AADC ja GCH1). Tällöin on mahdollista aikaansaada jatkuva dopamiinin tuotanto. Kuvissa punaiset pallot kuvaavat syntyneitä dopamiinia.

ProSavin<sup>®</sup>-geeniinsiirtomenetelmän kliinisestä tutkimuksesta (ClinicalTrials.gov: NCT00627588) on toistaiseksi saatavilla ainoastaan alustavia Oxford Biomedican internetsivuilla julkaistuja tuloksia, joiden mukaan menetelmä vaikuttaa lupaavalta ja koehenkilöt olisivat hyötynneet hoidosta. Geenihoito on todettu turvalliseksi ja hyvin siedetyksi, mutta itse toimenpiteen turvallisuudesta ei ole mainintaa. Kaikilla hoidetuilla koehenkilöillä on havaittu lähtötasoon verrattuna UPDRS-pisteiden paranemista lääkevaikutuksen off-vaiheessa kuuden kuukauden seuranta-aikana toimenpiteen jälkeen. Osalla koehenkilöistä on voitu myös vähentää levodopälääkitystä. Faasi II:n satunnaistettu kliininen koe menetelmällä on suunnitteilla. (Oxford Biomedica 2012a; Oxford Biomedica 2012b; Oxford Biomedica 2012c)

ProSavin<sup>®</sup>-geeniinsiirtomenetelmän heikkoutena on pidetty sitä, että transdusoituvat solut ovat pääasiassa GABAergisia striataalisia neuroneita, jotka eivät normaalisti tuota dopamiinia (Björklund ym. 2009). Näiltä soluilta puuttuvat dopaminergisille neuroneille ominaiset dopamiinin vesikulaariset varastoitumis- ja vapautumismekanismit. Tämä rajoittaa sytosolissa vapaana olevan dopamiinin vapautumista soluista, ja sytosolin dopamiini voi edelleen rajoittaa dopamiinin synteesiä. Lisäksi mahdollinen dopamiinin kertyminen transdusoitujen solujen sytosoliin voisi altistaa soluja toksisille muutoksille.

#### 1.9.1.4 Hermokasvutekijät

Hermokasvutekijöillä pyritään hidastamaan Parkinsonin taudin etenemistä ja lievittämään sairauden kliinisiä oireita parantamalla tuhoutuvien hermosolujen toimintaa ja estämällä solutuhon etenemistä. Marks ym. (2008) siirsivät faasi I:n kliinisessä kokeessa AAV-välitteisesti hermokasvutekijä neurturiinia koodaavaa geeniä (valmiste nimeltä CERE-120 = AAV2-neurturiini) bilateraalaisesti putameniiniin pitkälle edennyttä Parkinsonin tautia sairastaville koehenkilöille (n=12). Kokeessa tutkittiin geenihoidon turvallisuutta ja siedettävyyttä kahdella eri annoksella, ja vaikka koetta ei ollut suunniteltu tutkimaan hoidon tehoa, tarkasteltiin koehenkilöiden tilaa myös muun muassa UPDRS-asteikoiden avulla. CERE-120-geenihoito todettiin hyvin siedetyksi ja turvalliseksi, ja suurin osa havaituista haittavaikutuksista johtui kirurgisesta toimenpiteestä. UPDRS-asteikon motorisen osion pisteissä lääkevaikutuksen off-

vaiheessa havaittiin lähtötasoihin verrattuna paranemista kuukausi toimenpiteen jälkeen alkaen. Tutkimuksessa ei kuitenkaan pystytty havaitsemaan neuroprotektiivisia vaikutuksia ja mahdollista plasebovaikutusta ei voitu poissulkea tuloksista.

CERE-120-geenihoidon turvallisuutta ja tehoa määrittävässä kliinisessä faasi II:n jatkotutkimuksessa (kaksoissokkoutettu, satunnaistettu, plasebokontrolloitu) CERE-120 annosteltiin bilateraalaisesti putameniiniin (Marks ym. 2010). Plaseboryhmälle tehtiin valeoperaatio, jossa kallonsisäisiä injektioita ei suoritettu lainkaan. Koehenkilöitä tutkimuksessa oli 58 (kaikilla pitkälle edennyt Parkinsonin tauti), joista 38:lle suoritettiin geeninsiirtotoimenpide ja 20:lle valeoperaatio. Kokeessa tarkasteltiin ensisijaisesti 12 kuukautta operaation jälkeen havaittavaa muutosta lähtötasoon UPDRS-asteikon motorisen osion pisteissä lääkityksen off-vaiheessa. Lisäksi hoidon tehoa seurattiin toissijaisista muuttujien, kuten esimerkiksi lääkityksen on-vaiheen UPDRS-asteikon motorisen osion pisteiden, fyysistä tilaa ja elämänlaatua määrittävien testien sekä koehenkilöiden pitämien päiväkirjojen avulla. Useiden toissijaisista muuttujien tuloksissa havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä neurturiinihoitoa suosien, mutta off-vaiheen UPDRS-asteikon motorisen osion pisteissä (ensisijainen lopputulosmuuttuja) ei havaittu ryhmien välillä merkitsevää eroa 12 kuukauden kohdalla. Kuitenkin, kolmekymmentä koehenkilöä (19 neurturiiniryhmästä, 11 plaseboryhmästä) seurattiin 18 kuukauden ajan, ja näillä henkilöillä havaittiin ryhmien välillä merkitsevä ero tuloksissa 18 kuukauden kohdalla lähtötasoon verrattuna. Myös toissijaisissa muuttujissa nähtiin tässä ryhmässä merkitseviä eroja neurturiinia suosien. Haittavaikutuksia (mm. päänsärky, pahoinvointi, hoitotoimenpiteen jälkeiset kivut) havaittiin enemmän neurturiiniryhmällä, mutta suurin osa haitoista johtui kirurgisesta toimenpiteestä eikä geenihoidosta.

Seurantajakson aikana kaksi neurturiiniryhmän koehenkilöä kuoli, toinen sydäninfarktiin 47 päivää ja toinen keuhkoveritulppaan 91 päivää toimenpiteen jälkeen (Marks ym. 2010). Kuolemien ei todettu liittyneen geenihoidotoimenpiteeseen. Näiden henkilöiden aivojen histologisissa tutkimuksissa todettiin, että neurturiinia oli löydettävissä 15 %:n alueella putamenin tilavuudesta, mutta vain harvoja, eristäytyneitä neurturiinin esiintymiä havaittiin substantia nigrossa. Tämän ei todettu olevan riittävä

määrä hoitovasteen aikaansaamiseksi, sillä neurturiinin vaikutus perustuu sen (tai sitä koodaavan DNA:n) aksonaaliseen kulkeutumiseen striatumista substantia nigraan solujen soomaosiin, joissa se aktivoi solujen korjaamisvasteen aikaansaavia geenejä. Verrattaessa eroja prekliinisessä vaiheessa apinoilla saatuihin huomattiin, että putamenissa aikaansaatu transduktio oli vastaavalla tasolla (15 %), mutta hoidon teho (neuroprotektiivinen ja neurorestoratiivinen vaikutus) oli eläinkokeissa huomattavasti parempi (Bartus ym. 2011). Substantia nigraan dopaminergisten solujen solukeskuksissa nähtiin huomattavasti enemmän neurturiinia apinoilla kuin ihmisillä. Tuloksista pääteltiin, että neurturiinin pääsyllä substantia nigraan on ratkaiseva merkitys hoidon tehon kannalta, ja että tämä saattaa olla vaikeutunut Parkinsonin taudissa mahdollisesti heikentyneen aksonaalisen kuljetuksen vuoksi.

CERE-120-menetelmällä on aloitettu uusi faasi I/II:n kliininen koe (Marks ym. 2010; Bartus ym. 2012). Kokeessa geeninsiirto on tehty putamenin (minne dopaminergiset solut projisoituvat) ohella substantia nigraan (missä dopaminergisten solujen solukeskukset sijaitsevat). Lisäksi faasi II:n vaiheessa putameniin kohdistettua CERE-120-annosta kasvatettiin nelinkertaiseksi edeltäviin kliinisiin kokeisiin verrattuna ja koehenkilöiden (n=51) tilaa seurataan pidemmän aikaa (15–24 kuukautta) mahdollisen vaikutuksen myöhäisemmän ilmenemisen havaitsemiseksi (Bartus ym. 2012). Kokeen tulosten odotetaan valmistuvan vuoden 2013 aikana.

### 1.9.2 Alzheimerin tauti

Alzheimerin taudissa aivojen muistijärjestelmän kolinergisten neuronien tuhoutuminen johtaa muistihäiriöihin ja kognitiivisen suorituskyvyn heikkenemiseen (Tuszynski ym. 2005). Hermokasvutekijä NGF (nerve growth factor) vaikuttaa keskushermoston kolinergisiin neuroneihin estäen niiden tuhoutumista ja stimuloiden niiden toimintaa (Tuszynski ym. 2005; Aiuti ym. 2007). Tuszynski ym. (2005) tutkivat NGF-geeniterapiaa faasi I:n kliinisessä kokeessa kahdeksalla Alzheimerin tautia sairastavalla koehenkilöllä. Henkilöiden ihosta eristettyihin fibroblasteihin siirrettiin *ex vivo* retroviraalisesti NGF:ä koodaava geeni. Tämän jälkeen NGF:ä ekspressoivat solut siirrettiin kirurgisesti henkilöiden etuaivoihin alueelle (nucleus basalis), jossa sijaitsevat

tuhoutuvien solujen solukeskukset. NGF:n vaikutusalueen odotettiin yltävän myös isoaiukuorelle, jonne solujen aksonit ulottuvat.

Kirurginen toimenpide suoritettiin kahdelle ensimmäiselle koehenkilölle sedaatiossa hereillä, mutta he liikahtivat neulan ollessa aivoissa, mikä johti aivokuorenlaiseen verenvuotoon (Tuszynski ym. 2005). Toinen näistä henkilöistä kuoli viisi viikkoa toimenpiteen jälkeen keuhkoveritulppaan. Muille koehenkilölle toimenpide tehtiin yleisanestesiassa, jolloin ongelmia annostelussa ei esiintynyt. Koehenkilöiden kognitiivista suorituskykyä seurattiin säännöllisin väliajoin MMSE (Mini-Mental State Examination) - ja ADAS (Alzheimer's Disease Assessment Scale) -testeillä. Lisäksi aivojen metaboliaa tutkittiin PET-kuvauksilla. Menehtyneen koehenkilön aivokudosnäytteissä havaittiin runsas kasvutekijän erityys ja kolinergisten aksoneiden versominen alueella, jonne solut oli siirretty. Koehenkilöiden PET-kuvauksissa oli nähtävissä kortikaalisten neuronien metabolisen aktiivisuuden lisääntymistä geeniterapian jälkeen, mistä voitiin päätellä, että kolinergiset projektiot aivokuorelle aktivoituivat kasvutekijöiden vaikutuksesta. Kognitiivisissa testeissä havaittiin taudin etenemisnopeuden hidastuvan lähes kahden vuoden seurantajakson ajan. Geeninsiirrosta tai vektorista aiheutuvia haittavaikutuksia ei havaittu. Tuloksista ei voitu poissulkea mahdollista plasebovaikutusta, mutta geenihoidon todettiin kuitenkin olevan hyvin siedetty sekä saattavan parantaa taudin oireita ja hidastaa taudin etenemistä.

Toinen faasi I:n koe tehtiin käyttämällä AAV-vektoria NGF:ä koodaavan geenin (valmiste nimeltä CERE-110 = AAV2-NGF) kuljetukseen *in vivo* (ClinicalTrials.gov: NCT00087789; Arvanitakis ym. 2007). Kokeessa tutkittiin menetelmän turvallisuutta, siedettävyyttä ja tehoa kuudella Alzheimerin tautia sairastavalla koehenkilöllä. CERE-110 annosteltiin infusoimalla bilateraalisesti nucleus basalikseen (Arvanitakis ym. 2007; Ceregene 2012a). 12 kuukauden seuranta-aikana hoito osoittautui hyvin siedetyksi. Hoidon tehoa arvioitiin kognitiivisilla testeillä ja PET-kuvauksilla. Kuusi kuukautta toimenpiteen jälkeen tehdyissä PET-kuvauksissa havaittiin useilla isoaiukuoren alueilla glukoosimetabolian lisääntymistä. Lisäksi 12 kuukautta toimenpiteen jälkeen tehdyissä kognitiivisissa testeissä havaittiin viitteitä testitulosten heikkenemisen hidastumista. Turvallisuutta ja tehoa määrittävä faasi II:n satunnaistettu,

plasebokontrolloitu (valeoperaatio) kaksoissokkokeo CERE-110-menetelmällä on käynnissä (Ceregene 2012b; ClinicalTrials.gov: NCT00876863). Koehenkilöistä (n=50) puolet saa CERE-110-käsittelyn ja toinen puolisko läpikäy plasebokontrolliopeeraation.

Meneillään on myös faasi I:n kliininen koe, jossa käytetään hermokasvutekijää (NGF) erittävää NGC-0295-solulinjaa (Fjord-Larsen ym. 2010; ClinicalTrials.gov: NCT01163825). Solulinja on kehitetty ihmisen verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluista, jotka on transfektoitu hermokasvutekijää ekspressoivalla DNA:lla (Fjord-Larsen ym. 2010). Solut on pakattu puoliläpäisevän kalvon muodostamaan polymeerikapseliin, josta huokosten kautta vapautuu hermokasvutekijää. Kliinisessä kokeessa kapselit viedään Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden nucleus basalikseen, ja tarkoituksena kokeessa on määrittää menetelmän turvallisuutta ja siedettävyyttä, sekä toissijaisesti myös tehoa sairauden etenemisen hidastamisessa (ClinicalTrials.gov: NCT01163825).

### 1.9.3 Huntingtonin tauti

Huntingtonin tauti on periytyvä monogeeninen sairaus, jonka aiheuttaa mutaatio huntingtiinigeenissä (Sari 2011). Muodostuva viallinen huntingtiiniproteiini saa aikaan striatumin ja aivokuoren hermosolujen tuhoutumista muuttamalla solujen sisäistä  $Ca^{2+}$ -tasapainoa ja häiritsemällä siten solunsisäistä kuljetusta ja geenien transkriptiota. Tuhoutuvat hermosolut ovat pääasiassa inhibitorisia GABAergisia neuroneita.

Huntingtonin taudin geeniterapiassa potentiaalisia lähestymistapoja ovat mm. RNA-interferenssi tai hermokasvutekijöitä koodaavien geenien siirto neuroneihin (Mochizuki ym. 2008; Sah ja Aronin 2011; Sari 2011). RNA-interferenssissä viallisen proteiinin muodostumista pyritään estämään hiljentämällä mutatoitunutta geeniä viemällä soluihin lähetti-RNA:han sitoutuvia oligonukleotideja (Sah ja Aronin 2011). Hermokasvutekijöiden määrää lisäämällä pyritään puolestaan suojaamaan neuroneita tuhoutumiselta, sillä mutatoitunut huntingtiinigeeni aiheuttaa kasvutekijöiden muodostumisen vähenemistä (Mochizuki ym. 2008). Ihmisillä Huntingtonin taudin geeniterapiaa on testattu toistaiseksi ainoastaan yhdessä faasi I:n kliinisessä kokeessa (Bloch ym. 2004). Kuuden Huntingtonin tautia sairastavan koehenkilön toisen

aivopuoliskon lateraalikammioon siirrettiin siliaarista hermokasvutekijää (CNTF) ekspressoivia BHK (baby hamster kidney) -soluja. Solut oli pakattu polymeerikapseliin, joka vapautti CNTF:ä huokosten kautta. Kapseli poistettiin ja korvattiin uudella kuuden kuukauden välein kahden vuoden ajan. Menetelmä osoittautui turvalliseksi ja hyvin siedetyksi, mutta kliinistä hyötyä koehenkilöille ei hoidosta ilmennyt. Tämän arveltiin johtuvan muun muassa siitä, että kapselit eivät vapauttaneet CNTF:ä riittävästi kliinisen hyödyn aikaansaamiseksi.

#### 1.9.4 Amyotrofinen lateraaliskleroosi

Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) on neurodegeneratiivinen, kuolemaan johtava sairaus, jolle on ominaista keskushermoston liikehermosolujen tuhoutuminen ja etenevä tahdonalaisten lihasten heikkous (Aebischer ym. 1996; Bowers ym. 2011). Sairauden syntyyn vaikuttavia geenimutaatioita on tunnistettu useita (Bowers ym. 2011). ALS:n kliinisessä geeniterapiassa on toistaiseksi käytetty neuroprotektiivista hermokasvutekijää ja antisense-menetelmää (Aebischer ym. 1996; Federici ja Boulis 2012).

Faasi I:n kliinisessä kokeessa kuudelle ALS-potilaalle asetettiin siliaarista hermokasvutekijää (CNTF) ekspressoivia BHK-soluja sisältävä polymeerikapseli selkäydinkanavaan (Aebischer ym. 1996). CNTF:n vapautumista seurattiin aivo-selkäydinnesteestä ja potilaiden tilaa arvioitiin erilaisilla sairaudenkuvaa määrittävillä testeillä. Menetelmä osoittautui hyvin siedetyksi ja toimivaksi (CNTF:ä havaittiin aivo-selkäydinnesteessä), mutta kolmen kuukauden seurantajakson aikana potilaiden ei havaittu hyötynen hoidosta.

Osa ALS-tapauksista aiheutuu superoksididismutaasi 1 (SOD1) -geenimutaatiosta (Bowers ym. 2011). Mutatoituneen geenin koodaama virheellinen SOD1-proteiini on toksinen soluille. Antisense-menetelmää pidetään mahdollisena hoitomuotona SOD1-mutaation aiheuttamassa ALS:ssa (Federici ja Boulis 2012). Menetelmällä on aloitettu faasi I:n kliininen koe ALS-potilailla vuonna 2009 (ClinicalTrials.gov: NCT01041222). Tässä plasebokontrolloidussa kokeessa ISIS SOD1Rx -valmistetta annostellaan



koehenkilöille infuusiona selkäydinkanavaan neljää eri annostasoa käyttäen. ISIS SOD1Rx on antisense-oligonukleotidivalmiste, jonka toiminta perustuu viallisen SOD1-proteiinin muodostumisen estämiseen soluissa (Federici ja Boulis 2012).

#### 1.9.5 MS-tauti

MS-tauti (muitupeli skleroosi, pesäkekovettumatauti) on neurodegeneratiivinen autoimmuunisairaus, jolle on ominaista keskushermoston hermosolujen aksonien myeliinikato aivoissa ja selkäytimessä (Leung ym. 2010). MS-taudin geeniterapiassa on käytetty immuunivastetta muuntelevaa lähestymistapaa. Myeliinin emäksinen proteiini (MBP, myelin basic protein) on havaittu immuunipuolustusta eniten aktivoivaksi autoantigeeniksi MS-taudissa. Immuunivastetta muuntelevan hoidon tarkoituksena on lisätä immuunipuolustuksen toleranssia myeliiniproteiinia kohtaan.

BHT-3009 on DNA-plasmidirokote, joka sisältää MBP:a koodaavaa geeniä (Bar-Or ym. 2007). Rokotteessa geeniä on muunneltu siten, että sen koodaaman proteiinin immuunipuolustusta aktivoivia osia on korvattu immuunipuolustusta inhiboivilla osilla. BHT-3009:n turvallisuutta ja immuunivastetta muokkaavaa vaikutusta on tutkittu faasi I/II:n satunnaistetussa, plasebokontrolloidussa, kaksoissokkokeeessä MS-tautia sairastavilla koehenkilöillä. BHT-3009 annosteltiin koehenkilöille (n=30) lihaksensisäisesti kolmella eri annoksella. Menetelmä todettiin hyvin siedetyksi ja koehenkilöillä havaittiin antigeenispesifistä immuunitoleranssin kehittymistä (autoimmuuniaktiivisuuden väheneminen), sekä tulehduspesäkkeiden vähenemistä aivoissa.

Faasi II:n kokeessa tutkittiin BHT-3009:n tehoa suuremmalla potilasjoukolla (n=289) kahdella eri annoksella (0,5 mg ja 1,5 mg) plasebokontrolloidusti (Garren ym. 2008). Kokeessa seurattiin koehenkilöiden vasta-ainepitoisuuksia MBP:a kohtaan sekä pesäkkeiden ilmaantumista aivoihin magneettikuvauksen avulla. BHT-3009:n 1,5 mg:n annoskoko osoittautui kokeessa tehottomaksi. Tämän arveltiin johtuvan plasmidin sisältämistä immuunipuolustusta aktivoivista osista, jotka suurina pitoisuuksina häiritsevät immuunitoleranssin kehittymistä saaden aikaan hoidon tehon laskun.

Pienemmällä annoksella havaittiin uusien pesäkkeiden muodostumisessa hidastumista ja vähenemistä plaseboon verrattuna sekä antigeenispesifisen immuunitoleranssin kehittymistä. Rokote on toistaiseksi osoittautunut kliinisten kokeiden perusteella turvalliseksi, hyvin siedetyksi ja toimivaksi (Bar-Or ym. 2007; Garren ym. 2008).

## 1.10 Silmäsairauksien geeniterapia

Silmä soveltuu hyvin geeniterapian kohteeksi anatomiansa ja sijaintinsa ansiosta. Eristäytyneen rakenteen ja pienen koon vuoksi silmään annosteltavan geenivektorin määrä voidaan pitää pienenä esimerkiksi lihaksensisäiseen tai suonensisäiseen annosteluun verrattuna (Campochiaro ym. 2006; den Hollander ym. 2008). Silmän suojaavat rakenteet estävät vektorikompleksien pääsyä muualle elimistöön estäen mahdollisia systeemisiä haittavaikutuksia (Bainbridge ym. 2006). Lisäksi annosteltaessa hoito vain toiseen silmään, voidaan toista silmää käyttää kokeissa kontrollielimenä.

### 1.10.1 Silmänpohjan ikärappeuma

Silmänpohjan ikärappeuma (AMD, age-related macular degeneration) on sairaus, jossa silmänpohjan suonikalvon verisuonet kasvavat hallitsemattomasti (patologinen angiogeneesi) (Campochiaro ym. 2006). Verisuonet tihkuvat ja repeilevät aiheuttaen turvotusta ja arpeutumista, mikä johtaa lopulta näön menetykseen. AMD:n geeniterapia perustuu uudissuonten muodostumisen estämiseen joko lisäämällä pigmenttiepiteelikasvutekijän (PEDF) tuotantoa tai vähentämällä vaskulaarisen endoteelikasvutekijän (VEGF) muodostumista (Campochiaro ym. 2006; Pechan ym. 2009).

Prekliinisissä kokeissa on havaittu, että PEDF aiheuttaa apoptoosia soluissa jotka osallistuvat uudissuonten muodostumiseen (Mori ym. 2001). Faasi I:n kliinisessä kokeessa annosteltiin lasiaisensisäisellä injektioilla adenovirusvälitteisesti PEDF:ä koodaavaa geeniä (AdPEDF.11) kahdeksalla eri annoksella yhteensä 28 AMD-potilaalle (Campochiaro ym. 2006). Menetelmä todettiin turvalliseksi ja hyvin siedetyksi. Kokeessa ei ollut plasebokontrolliryhmää, joten tehoa ei voitu arvioida luotettavasti.

Kuitenkin, isommat annokset antoivat paremmat tulokset kontrollitesteissä, viitaten AdPEDF.11:n antiangiogeeniseen vaikutukseen suuremmilla annoksilla.

Faasi I:n kliininen koe VEGF:n toiminnan estämisen periaatteella on aloitettu vuonna 2009 (ClinicalTrials.gov: NCT01024998). Kokeessa koehenkilöille annostellaan silmään injeksiolla VEGF:ä sitovaa sFLT01-molekyyliä koodaavaa geeniä AAV-välitteisesti (AAV2-sFLT01), tavoitteena estää VEGF:n toimintaa ja siten verisuonten liiallista kasvua (Pechan ym. 2009; ClinicalTrials.gov: NCT01024998).

### 1.10.2 Leberin synnynnäinen amauroosi

Leberin synnynnäinen amauroosi (LCA, Leber's congenital amaurosis) on perinnöllinen verkkokalvon rappeumaa aiheuttava sairaus (Alexander ym. 2007). Tämä sairaus on yhdistetty ainakin 14 eri geenin virheelliseen toimintaan (Liu ym. 2011). Näistä RPE65-geeniä on tutkittu kliinisissä geeniterapiakokeissa (Bainbridge ym. 2008; Cideciyan ym. 2008; Maguire ym. 2008). RPE65-geeni koodaa verkkokalvon aistinsolujen tarvitsemää RPE65-entsyymiä, joka on välttämätön verkkokalvon A-vitamiinikierron kannalta (Alexander ym. 2007). RPE65-mutaatiot johtavat rodopsiinin puutteeseen ja fotoreseptorien toiminnan häiriintymiseen (den Hollander ym. 2008).

Kliinisissä faasi I:n kokeissa LCA-potilaille on annosteltu verkkokalvonlaisella injeksiolla AAV-välitteisesti RPE65-geeniä (Bainbridge ym. 2008, Cideciyan ym. 2008, Maguire ym. 2008). RPE65-geeninsiirto on todettu kokeissa turvalliseksi ja hyvin siedetyksi ja koehenkilöillä on havaittu testitulosten paranemista verkkokalvon toimintaa määrittävässä kokeissa. Cideciyan ym. (2009) raportoivat hoidon tulosten säilyneen muuttumattomina 12 kuukauden ajan toimenpiteen jälkeen, ja Maguiren ryhmä (Simonelli ym. 2010) 18 kuukauden seurantajakson ajan. Menetelmää testataan edelleen faasi I:n ja II:n kokeissa (ClinicalTrials.gov NCT01496040, ClinicalTrials.gov NCT00643747). Faasi III:n kliininen koe on myös alkamassa (ClinicalTrials.gov NCT00999609).

### 1.11 Tulehdussairauksien geeniterapia

Tulehdussairauksissa geeniterapia on edennyt kliiniseen vaiheeseen nivelreuman kohdalla. Nivelreumassa geeniterapian avulla pyritään saamaan aikaan kohdeniveliin pitkäaikainen, paikallinen tulehdusoireita lievittävä vaikutus annostelemalla terapeuttisia proteiineja koodaavia geenejä nivelensisäisesti (Evans ym. 2011).

Faasi I:n vaiheessa on saatu lupaavia tuloksia retroviraalisesta *ex vivo* -geenihoidosta, jossa tulehdusreaktiota välittävän interleukiini-1:n reseptoriantagonistia (IL.1Ra) koodaavaa geeniä on siirretty retroviraalisesti nivelreumapotilaista eristettyihin nivelkalvon fibroblasteihin, jotka on sitten palautettu hoidettaviin niveliin (Evans ym. 2005; Wehling ym. 2009). Potilailla on havaittu kipujen helpottumista ja turvotuksen vähenemistä hoidetuissa nivelissä (Wehling ym. 2009). Menetelmän testaamista ei ole kuitenkaan toistaiseksi jatkettu, muun muassa retrovirusvektoriin liittyvän syöpäriskin vuoksi (Evans ym. 2011).

Faasi II:n kliiniseen vaiheeseen on edennyt AAV2-välitteinen TNFR:Fc (tumor necrosis factor receptor–immunoglobulin Fc fusion protein) -geeniterapia, jossa geeninsiirto on suoritettu nivelensisäisenä injektiona *in vivo* (Mease ym. 2010). Menetelmässä transduoituvat lähinnä solut nivelkalvoilla ja ligamenteissa (Evans ym. 2011). Geenihoidon tarkoituksena on tuottaa nivelen sisään tuumorinekroositekijää (TNF) sitovaa proteiinia (TNFR:Fc) ja siten estää TNF:n vaikutusta ja vähentää tulehdusoireita. Vaikkakin faasi II:n kokeessa havaittiin oireiden lievittymistä nivelreumaa sairastavilla koehenkilöillä, eivät tulokset olleet tilastollisesti merkitseviä plaseboon verrattuna (Mease ym. 2010). Yksi koehenkilöistä menehtyi kokeen aikana systeemiseen histoplasmoosiin, mutta tämän todettiin aiheutuneen henkilön pitkäaikaisesta TNF-antagonistihoidosta eikä liittyvän henkilön saamaan geenihoidon (Frank ym. 2009; Ylä-Herttuala 2009; Mease ym. 2010 ).

## 1.12 Geeniterapian haasteita

Valtaosa geeniterapian kliinisistä kokeista on suoritettu syöpäsairauksien parissa. Syöpäsairaudet muodostavat loogisen kohderyhmän geenihoitojen kehittämiseksi (optimaalinen hyöty–haitta-suhde) ja puutteellisten nykyhoitovaihtojensa vuoksi (Lee ja Davidson 2011). Tästä huolimatta yksittäisen geenivirheen aiheuttamat sairaudet ovat potentiaalisimpia geeniterapian kohteita. Suurin menestys kliinisissä kokeissa onkin toistaiseksi saavutettu perinnöllisten immuunipuutossairauksien, Leberin amauroosin ja hemofilian hoidoissa (Aiuti ja Roncarolo 2009; Herzog ym. 2010; Simonelli ym. 2010; Nathwani ym. 2011).

Geenihoidon kehittäminen multigeenisiin sairauksiin, joissa oireet johtuvat useamman geenin vaikutusten summautumisesta (esimerkiksi sydän- ja verisuonisairaudet, Alzheimerin tauti, nivelreuma), on osoittautunut haastavammaksi (Oak Ridge National Laboratory 2012). Näissä sairauksissa geenihoidoilla on yleensä pyritty pikemminkin oireenmukaiseen hoitoon kuin sairautta aiheuttavien geenivirheiden korjaamiseen (Ylä-Herttuala 2009). Hoitotulokset ovat olleet toistaiseksi vaihtelevia. Faasi I:n kokeissa koehenkilöiden on usein havaittu hyötyvän hoidoista, mutta plasebokontrolloiduissa tutkimuksissa hoitojen tehoa ei ole aina onnistuttu osoittamaan (Marks ym. 2010; Hedman ym. 2011).

Geeniterapian laajempaa kliinistä toimivuutta rajoittavia tekijöitä on useita. Geeninsiirtotehon riittämättömyys ja geeniekspression tilapäisyys ovat toistaiseksi olleet suurimmat ongelmat kliinisissä kokeissa. Kroonisissa sairauksissa vaadittavan tehokkaan ja pitkäaikaisen geeniekspression saavuttamiseksi soluihin siirretyn DNA:n tulee pysyä toimivana ja toisaalta kohdesolujen on oltava pitkäikäisiä ja stabiileja (Oak Ridge National Laboratory 2012). Nykyisillä geeninsiirtomenetelmillä saavutetaan harvoin pitkäkestoinen geeniekspressio ja geenihoito tulisikin toistaa tehon heiketessä. Immuunipuolustus saattaa reagoida geeninsiirtokompleksien läsnäoloon elimistössä ja tuhota niitä (Plank ym. 1996). Lisäksi geenihoidon teho usein heikkenee annostelukertojen lisääntyessä immuunipuolustuksen aktivoituessa uusinta-altistuksessa entistä nopeammin (Sinn ym. 2009; Oak Ridge National Laboratory 2012).

Geeninsiirroissa sattumanvaraisesti perimään integroituvilla virusvektoreilla (retrovirus) ongelmia ovat aiheuttaneet myös siirrettävien geenien kohdentuminen haittavaikutusten kannalta ongelmalliselle alueelle genomiin (Herzog ym. 2010). Tästä esimerkkinä ovat SCID-X1-sairauden geenihoidoissa ilmenneet leukemiatapaukset, joissa retroviruksen kuljettama geeni on integroitunut genomissa onkogeneesiä aiheuttavalle alueelle (Hacein-Bey-Abina ym. 2008). Lisäksi virusvektoreiden kohdalla ei voida täysin poissulkea sitä mahdollisuutta, että inaktivoituneet virukset voisivat saada taudinaiheuttamiskykensä takaisin (Oak Ridge National Laboratory 2012). Virusvektoreita turvallisemmilla nonviraalisilla geeninsiirtomenetelmillä ei puolestaan ole saatu riittävää geeninsiirtotehoa, jotta niiden käytöllä voitaisiin korvata tehokkaampia virusvektoreita (Ylä-Herttua ja Salo 2006).

Yhtenä tehon arviointia vaikeuttavana tekijänä geeninsiirtojen kliinisissä kokeissa on ollut myös se, että suurimmalla osalla koehenkilöistä hoidettava sairaus on ollut pitkälle edennyt, jolloin hoitovasteen saavuttaminen tai sen havaitseminen on vaikeutunut. Tämä on ollut nähtävissä erityisesti syöpäsairauksien geenihoidoissa, joissa koehenkilöt ovat usein olleet terminaalivaiheessa olevia vakavasti sairaita henkilöitä (Verma ja Weitzman 2005). Lisäksi yhtäaikaiset lääkehoidot ovat vaikeuttaneet hoitojen tehon arviointia. Sairauksille, joihin geeniterapiaa kehitetään, ovat nykyiset hoitomenetelmät riittämättömät tai aiheuttavat vaikeita haittavaikutuksia (Porteus ym. 2006; Lee ja Davidson 2011). Geeniterapiakokeiden riskien ja saavutettujen hoitotulosten arviointi tulisikin suorittaa olemassa olevien hoitovaihtoehtojen hyödyt ja haitat huomioiden.

Kaiken kaikkiaan, eläinkokeissa prekliinisessä vaiheessa saatujen positiivisten tulosten toistaminen kliinisissä kokeissa on osoittautunut ennalta odotettua vaikeammaksi (Lee ja Davidson 2011). Kliinisten kokeiden raportoimat tiedot esimerkiksi isäntävektorivuorovaikutuksista, haittavaikutuksista, hoitotuloksista ja kokeiden suunnittelusta ovat kuitenkin osaltaan olleet vaikuttamassa muun muassa vektorikehityksen jatkumiseen ja kliinisten kokeiden suunnittelun optimoimiseen siten, että niillä voitaisiin mitata haluttuja asioita (teho, kliininen hyöty) mahdollisimman vähäisin haittavaikutuksin (Herzog ym. 2010; Lee ja Davidson 2011).

## 2. KOKEELLINEN OSA

### 2.1 Tutkimuksen tavoitteet

Kirjallisuuskatsauksessa selvitettiin geeniterapian kliinisten kokeiden tämänhetkistä tilannetta. Geeniterapian käyttöä rajoittavat toistaiseksi useat tekijät, joista kenties merkittävin on sopivien ja riittävän tehokkaiden geenivektoreiden puute. Vaikkakin geeninsiirron teho *in vitro* -kokeissa on usein hyvä, ei tehoa *in vivo* voida ennustaa varmasti. *In vivo* -geeniterapian onnistuminen riippuu muun muassa käytetystä antoreitistä, sillä vektorin kohtaama biologinen ympäristö on eri antoreiteillä erilainen (Haberland ym. 2000). Geenihoidon kliinistä toteuttamista esimerkiksi keskushermoston sairauksissa helpottaisi huomattavasti annostelu systeemisen verenkierron kautta. Vektoreiden herkkyys seerumille on yksi tekijöistä, jotka ovat toistaiseksi estäneet tämän, sillä monet DNA-vektorikompleksit inaktivoituvat seerumin komponenttien vaikutuksesta (Plank ym. 1996; Haberland ym. 2000; Kuo 2003).

Kokeellisessa osassa tutkittiin seerumin vaikutusta lineaarisen polyetyleni-imiinin PEI22K (molekyylipaino 22 kDa) transfektiotehoon, sekä PEI22K:n ja kationisen lipidin, Dosperin, yhdistelmän transfektiotehoon *in vitro* -soluviljelmissä. Polyetyleni-imiinit (PEI) ovat polymeereja, joilla on korkea kationinen varaustiheyspotentialiaali sekundaaristen aminotyyppimolekyylinsä ansiosta (Ferrari ym. 1997; Ohashi ym. 2001). Fysiologisessa pH:ssa tyypet ovat positiivisesti varautuneita ja sitoutuvat elektrostaattisesti DNA-molekyylin negatiivisesti varautuneihin fosfaatteihin, jolloin muodostuu polypleksi (Godbey ym. 1999). Kun PEI:ä ja DNA:ta sekoitetaan sellaisessa suhteessa, että tyypiatomeja on enemmän kuin fosfaatteja, on polypleksin pinta positiivisesti varautunut. Polypleksit reagoivat solun pinnan negatiivisesti varautuneiden molekyylin kanssa, mikä johtaa niiden endosytoitumiseen soluun. Solun sisällä PEI/DNA-kompleksit kulkeutuvat endosomeissa lysosomeihin hajotettaviksi. PEI kykenee vastaanottamaan endolysosomeissa (endosomi ja lysosomi fuusioituneet) protoneja ja nostaa siten endolysosomaalista pH:ta. Tämä johtaa hajottavien entsyymien inaktivoitumiseen ja muuttaa endolysosomien osmolaarisuutta johtaen niiden hajoamiseen (Boussif ym. 1995; Godbey ym. 1999; Lechardeur ja Lukacs 2002).

Syttoplasmassa PEI toimii puskurina suojaen DNA-plasmidia hajottavilta entsyymeiltä (Boussif ym. 1995; Lungwitz ym. 2005). PEI:n kuljettamat plasmidit päätyvät tumaan transkriptoitaviksi diffundoitumalla tai sytoskeletaalista reittiä vesikkeleissä (Godbey ym. 1999). DNA:n ei tarvitse vapautua kompleksista ennen transkriptiota, sillä PEI:n läsnäolo ei häiritse geeniekspressiota (Pollard ym. 1998).

Dosper on kationinen lipidi, joka muodostaa DNA:n kanssa lipoplekseja elektrostaattisten vuorovaikutusten avulla (Dodds ym. 1998). Lipopleksin ja solukalvon interaktio on elektrostaattinen, kuten polyplekseilläkin, ja soluunottomekanismi on endosytoosi. Kationiset lipidit epästabiloivat endolysosomien membraania muodostamalla ionipareja membraanin lipidien kanssa, mikä johtaa DNA:n irtoamiseen lipoplekseistä ja vapautumiseen sytoplasmaan (Xu ja Szoka 1996). DNA:n vapautuminen lipopleksista on edellytys DNA:n pääsylle tumaan (Zabner ym. 1995).

PEI ja Dosper muodostavat yhdessä DNA:n kanssa kompleksin, lipopolypleksin, jossa DNA kondensoidaan PEI:llä ja muodostunut polypleksi päällystetään lipidikuorella (MacLahlan ym. 1999). Tutkimuksissa on havaittu haaroittuneiden polyetyleenimiiniin (PEI700, PEI2K, PEI25K) ja Dosperin välillä synergistinen yhteisvaikutus transfektiotehoon *in vitro* seerumittomissa transfektio-olosuhteissa (Lampela ym. 2002; Lampela ym. 2003). Kokeellisessa osassa tarkoituksena oli selvittää havaitaanko myös PEI22K:lla ja Dosperilla vastaavanlainen synergia ja kuinka seerumi vaikuttaa kompleksien transfektiotehoon. Tavoitteena oli lisäksi kehittää menetelmää, jossa seerumipitoisuuden vaikutuksella transfektiotehoon *in vitro* voitaisiin ennakoida transfektion onnistumista ja vektoreiden toimintaa *in vivo*.

## 2.2 Materiaalit ja menetelmät

### 2.2.1 Kemikaalit

#### Elatusneste

(Dulbecco´s modified eagle medium, DMEM)

Sigma (Saksa),

Naudan seerumi (Foetal bovine serum, FBS)

Hyclone (Belgia),



Penicillin-streptomycin	GIBCO (Iso-Britannia),
ExGen500 (PEI22K)	Fermentas (EU),
Dosper	Roche (Saksa),
X-gal	Sigma-Aldrich (Saksa),
ONPG	Sigma (USA),
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories (USA),
$\beta$ -gal Reporter Gene Assay –hajotuspuskuri	Roche (Saksa),
Hepes	Sigma (Saksa),
Paraformaldehydi	Sigma-Aldrich (Saksa),
Magnesiumkloridi, MgCl <sub>2</sub>	Merck (Saksa),
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich (Saksa),
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ·x3H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich (Saksa),
Natriumdeoksikolaatti	Sigma-Aldrich (Saksa),
Nonidet P-40	AppliChem (Saksa),
$\beta$ -merkaptoetanol	Sigma-Aldrich (Saksa),
Natriumfosfaatti	Fluka (Saksa),
Natriumkloridi	Merck (Saksa),
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck (Saksa).

### 2.2.2 Solulinja

Kokeissa käytettiin kaniinin sileälihassolulinjaa (SMC, rabbit aortic smooth muscle cell line). Soluja kasvatettiin inkubaattorissa (HeraCell, Kendro, Saksa), jonka lämpötila oli +37 °C ja ilman hiilidioksidipitoisuus 5 %. Kasvatusliuos koostui elatusnesteestä (DMEM), johon oli lisätty 9 % (V/V) lämpöinaktivoitua seerumia (FBS) sekä 90 U/ml penisilliiniä ja 90 µg/ml streptomysiiniä.

### 2.2.3 Ekspressioplasmidi

Geeniinsiirtokompleksien transfektio- ja soluunotto määritettiin käyttämällä naudan papilloomavirusplasmidia (TKBPVlacZ), joka sisältää reportterigeeninä  $\beta$ -galaktosidaasientsyymiä koodaavan lacZ-geenin. BPVTKlacZ-plasmidi saatiin

professori Mart Ustavilta Tarton yliopistosta (Viro) ja sitä tuotettiin *Escherichia coli* -bakteereissa.

#### 2.2.4 Transfektio kompleksien muodostus ja transfektio

Solut siirrostettiin 24-kuoppalevyille (n. 55000 solua/kuoppa) transfektiota edeltävänä päivänä. Soluja viljeltiin 20 tuntia +37 °C:ssa, kunnes ne olivat kasvullaan täyttäneet 70 % kasvualustasta. Tämän jälkeen kuhunkin kuoppaan annosteltiin 1 µg plasmidia joko yksinään tai kompleksoituna tutkittavien yhdisteiden kanssa.

Transfektio liuokset valmistettiin erikseen PEI:lle, Dosperille ja PEI/Dosper-yhdistelmille. PEI/DNA-suhde on ilmoitettu PEI:n amiinityppi / DNA:n fosfaatti -suhteena (N/P-ekvivalenssi) ja Dosper/DNA-suhde Dosper (µg) / DNA (µg) -suhteena (Dosper/DNA-varaussuhde).

PEI/DNA-transfektio kompleksit valmistettiin sekoittamalla DNA (DNA-plasmidikantaliuos: 1 µg DNA / 30 µl 0,9 % NaCl – 20 mM HEPES) ja PEI (ekvivalenssin mukaan) samassa tilavuudessa (30 µl + 30 µl), ja muodostettua liuosta inkuboitii huoneenlämmössä 10 minuuttia. Tämän jälkeen PEI/DNA-kompleksit pipetoitiin soluille. PEI/Dosper/DNA-transfektiossa PEI/DNA-komplekseihin lisättiin Dosper (laimennettuna 1:5 puskuriin) varaussuhteen mukaan, minkä jälkeen komplekseja inkuboitii vielä 15 minuuttia huoneenlämmössä ennen transfektiota. Dosper/DNA-transfektiossa DNA sekoitettiin Dosper-laimennoksen kanssa varaussuhteen mukaan ja komplekseja inkuboitii huoneenlämmössä 15 minuuttia ennen transfektiota.

Transfektio kompleksit pipetoitiin tipoitain soluviljelmiin 24-kuoppalevyille. Ennen transfektiota solujen kasvatusliuos korvattiin 1 millilitralla joko pelkkää elatusnestettä (ilman seerumia) tai seerumipitoisella (1 %, 3 %, 9 %, 10 % tai 30 % lämpöinaktivoitu FBS) elatusnesteellä. Soluja inkuboitii 4 tai 6 tuntia +37 °C:ssa, minkä jälkeen transfektio komplekseja sisältävät elatusnesteet korvattiin kasvatusliuoksella. Tämän jälkeen soluja inkuboitii kokeiden alkuun asti +37 °C:ssa.

### 2.2.5 X-gal-värjäys

Värjäyksen tarkoituksena oli määrittää  $\beta$ -galaktosidaasientsyymiaktiivisuutta transfektoituneissa soluissa ja transfektoituneiden solujen osuutta kaikista soluista. 24 tuntia transfektion jälkeen solut kiinnitettiin kuoppalevyille inkuboimalla 4 % paraformaldehydiliuoksessa (1 ml/kuoppa) 15 minuutin ajan huoneenlämmössä. Tämän jälkeen soluihin lisättiin 0,5 ml X-gal-värjäysliuosta (1 mg/ml X-gal, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 % natriumdeoksikolaatti, 0,02 % Nonidet P-40). Soluja inkuboitiin värjäysliuoksessa 3 tuntia  $+37^\circ\text{C}$ :ssa.  $\beta$ -galaktosidaasia sisältävät solut värjäytyivät sinisiksi ( $\beta$ -galaktosidaasi halkaisee X-gal-substraatin, jolloin muodostuu sinisen värin aiheuttava 3,5-dikromo-4,4-dikloori-indigomolekyylä). Värjäytyneiden solujen prosentuaalinen osuus kaikista soluista laskettiin mikroskoopin avulla (Nikon Eclipse TS100, Japani).

### 2.2.6 ONPG-määritys

48 tuntia transfektion jälkeen soluista valmistettiin näytteet ONPG-määritystä ja proteiinipitoisuuden määrittämistä varten. Solut huuhdeltiin 0,1 M fosfaattipuskurilla ja hajotettiin 150  $\mu\text{l}$ :lla hajotuspuskuria. Solujen ja hajotuspuskurin seosta sentrifugoitettiin (13000 rpm) 5 minuuttia (Eppendorf Centrifuge 5810R, Saksa). Tämän jälkeen näytteet olivat valmiit määrittämiä varten.

ONPG-tutkimuksella määritettiin kunkin näytteen  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus. Kutakin näytettä pipetoitiin 1  $\mu\text{l}$  96-kuoppalevyille (2 rinnakkaisnäytettä) ja kuoppiin lisättiin 199  $\mu\text{l}$  liuosta, joka sisälsi kuoppaa kohti 99  $\mu\text{l}$  vettä ja 100  $\mu\text{l}$  ONPG-liuosta (2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 M  $\beta$ -merkaptotetanoli ja 1,33 mg/ml ONPG 0,2 M natriumfosfaattipuskurissa). Tämän jälkeen kuoppalevyjä inkuboitiin tunti huoneenlämmössä, minkä jälkeen ONPG-reaktio pysäytettiin 90 ml:lla 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :a.

$\beta$ -galaktosidaasientsyymi hajottaa ONPG (o-nitrofenoli- $\beta$ -D-galaktopyranosidi) –molekyylistä  $\beta$ -sidoksen, minkä seurauksena muodostuu keltainen o-nitrofenolimolekyylä.  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus määritettiin standardisuoran avulla

värin intensiteetin perusteella spektrofotometrisesti mittaamalla absorbanssi 405 nm aallonpituudella (Victor Wallac plate reader, Perkin Elmer, USA). ONPG-tutkimuksen tulokset suhteutettiin kussakin näytteessä olevaan proteiinipitoisuuteen, jolloin saatiin näytteen  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus (mU/mg).

### 2.2.7 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin Bio-Rad-proteiinitutkimuksella. Kutakin näytettä pipetoitiin 2  $\mu$ l 96-kuoppalevyille (2 rinnakkaisnäytettä) ja sekaan lisättiin 198  $\mu$ l värireagenssiliuosta (1xBio-Rad + 4xH<sub>2</sub>O). Välittömästi tämän jälkeen näytteistä mitattiin absorbanssi 595 nm aallonpituudella ja näytteiden proteiinipitoisuus laskettiin standardisuoran avulla (Bio-Rad Microplate Reader, USA).

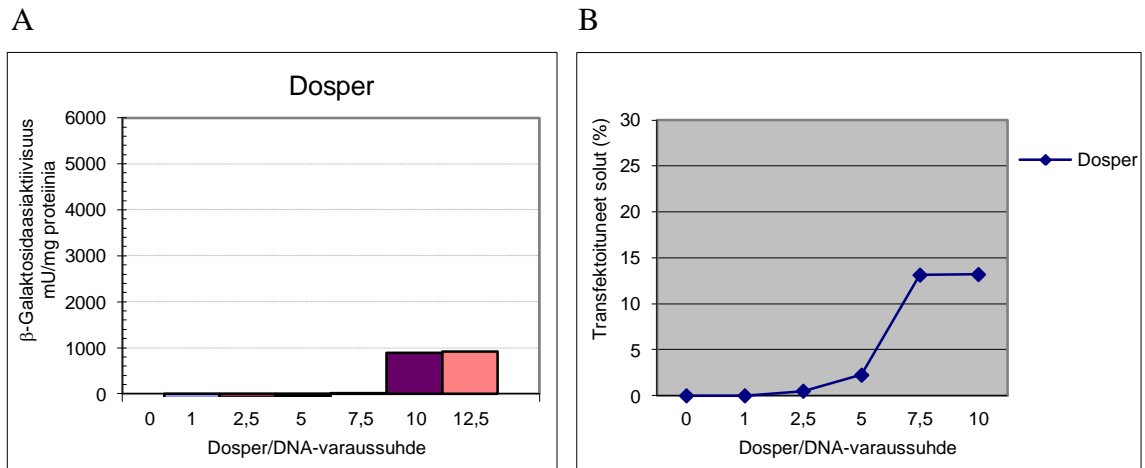
## 2.3 Tulokset

### 2.3.1 Preliminäärikokeet

Preliminäärikokeiden avulla suunniteltiin varsinaista koeasetelmaa, jota käytettiin tutkittaessa seerumin vaikutusta transfektiotehoon.

#### 2.3.1.1 Menetelmän validointi

Menetelmän toimivuus varmistettiin toistamalla aiempia tutkimuksia (Lampela ym. 2002) vastaavilla transfektiokombinaatioilla (Kuva 4). Dosperilla saatiin vaste samoilla varaussuhteilla (7,5 ja 10) kuin aiemmissa tutkimuksissa (Lampela ym. 2002), mutta  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuudet olivat aiempiin tuloksiin verrattuna selvästi pienempiä. X-gal-värjäys (Kuva 4B) osoitti, että ero aiempiin tuloksiin johtui transfektoituneiden solujen lukumäärästä, joka oli samassa suhteessa ONPG-tulosten kanssa pienempi kuin aiempien julkaistujen kokeiden vastaavat tulokset. Syy tähän saattoi olla esimerkiksi soluissa, tai osa käytetystä DNA-plasmidista oli mahdollisesti inaktiivista.

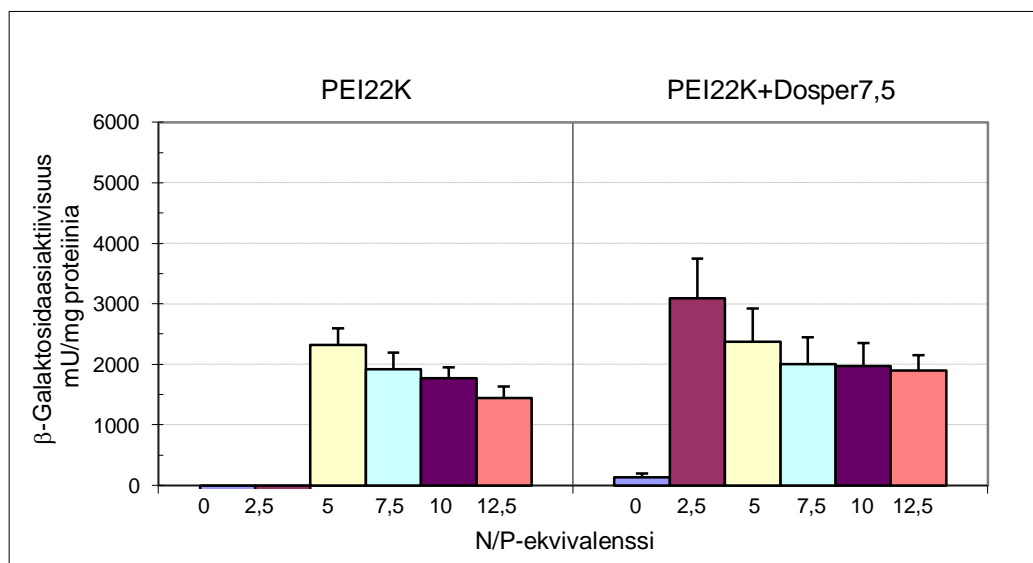


Kuva 4. Dosper/DNA-varaussuhteen vaikutus transfektioitehoon (A) ja transfektioituneiden solujen lukumäärään (B) SMC-soluissa. Solut transfektioitiin 1  $\mu$ g:lla BPVTKlacZ-plasmidia. DNA kondensoitiin Dosperin kanssa Dosper/DNA-varaussuhteilla 0–10 ennen transfektiota. Soluja inkuboitiin transfektiooliuoksessa 6 tuntia ja tämän jälkeen kasvatusmediumissa 18 (B) tai 42 (A) tuntia.  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus mitattiin ONPG-tutkimuksella (A). Transfektioituneiden solujen osuus määritettiin X-gal-värjäyksellä (B). Kuvissa on nähtävissä saatu  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus / mg proteiinia (A) ja värjäytyneiden solujen prosentuaalinen osuus (B), n=2.

### 2.3.1.2 Synergia

PEI22K:n ja Dosperin mahdollista synergististä yhteisvaikutusta transfektioitehoon seerumittomissa transfektio-olosuhteissa tutkittiin vertaamalla PEI22K:lla saatavia  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuuksia PEI22K:n ja Dosperin kombinaatiolla Dosper/DNA-varaussuhteella 7,5 saataviin aktiivisuuksiin (Kuva 5).

PEI22K/Dosper-yhdistelmällä saadut  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuudet olivat jokaisella N/P-ekvivalenssilla suuremmat kuin PEI22K:lla saadut aktiivisuudet (Kuva 5). Synergia oli suurin ekvivalenssilla 2,5, jolla ei saatu lainkaan vastetta ilman Dosperia. Ekvivalenssia 2,5 lukuun ottamatta Dosperilla ei näyttänyt olevan vaikutusta kuvaajan muotoon. Dosperilla yksinään saatu tulos oli myös huomattavasti pienempi kuin yhdistelmällä, eli yhdistelmä nosti vastetta sekä PEI22K:een että Dosperiin verrattuna. Tässä oli nähtävissä PEI22K:n ja Dosperin synergistinen vaikutus.

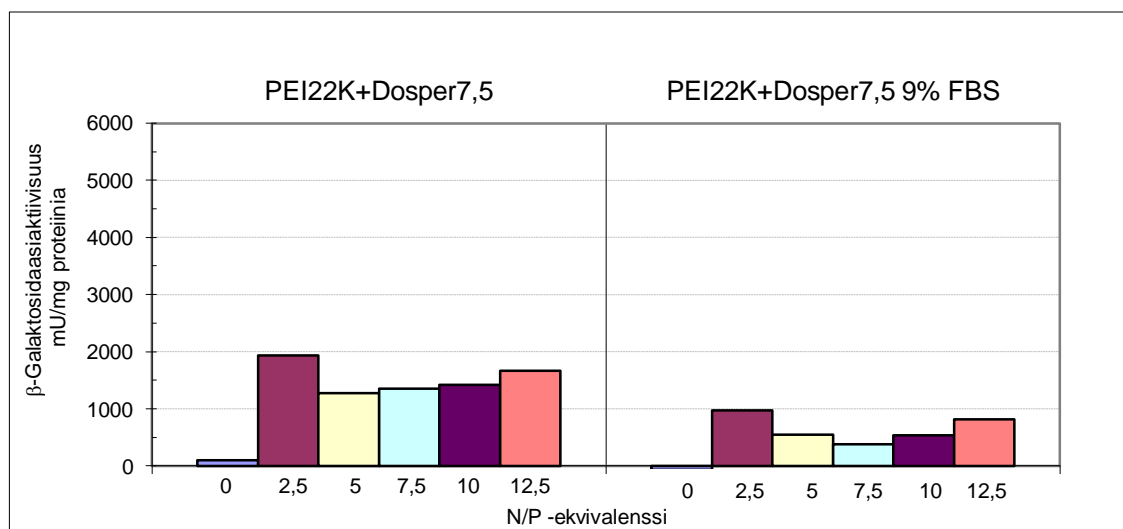


Kuva 5. Dosperin vaikutus PEI22K:n transfektiotehoon SMC-soluissa. Soluihin transfektoitiin 1  $\mu$ g BPVTKlacZ-plasmidia. DNA kondensoitiin PEI22K:n kanssa ennen transfektiota N/P-ekvivalensseilla 0, 2,5, 5, 7,5, 10 ja 12,5. Dosperia sisältävissä näytteissä DNA kondensoitiin PEI22K:n kanssa N/P-ekvivalensseilla 0–12,5 ennen Dosperin lisäystä (Dosper/DNA-varaussuhde 7,5). Soluja inkuboitiin transfektioliuoksessa 4 tuntia ja tämän jälkeen kasvatusmediumissa 44 tuntia.  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus määritettiin ONPG-tutkimuksella. Kuvassa on nähtävissä saatu  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus / mg proteiinia  $\pm$  keskivirhe, n=4.

Koska PEI22K:lla ja Dosperilla Dosper/DNA-varaussuhteella 7,5 näytti tulosten perusteella olevan synergistinen yhteisvaikutus transfektiotehoon (Kuva 5), tutkittiin onko synergia nähtävissä myös pienemmillä Dosper/DNA-varaussuhteilla ja riippuuko yhteisvaikutuksen suuruus Dosperin määrästä. Dosper/DNA-varaussuhteita 2,5 ja 5 käytettäessä synergia oli havaittavissa ainoastaan N/P-ekvivalenssilla 2,5. Muilla N/P-ekvivalensseilla PEI22K yksinään antoi suuremman vasteen kuin PEI22K/Dosper-yhdistelmä.

### 2.3.1.3 Seerumin vaikutus transfektiotehoon

Toinen tutkimuksen tavoitteista oli selvittää seerumin vaikutuksia PEI22K/Dosper-yhdistelmän transfektiotehoon (Kuva 6). Dosper/DNA-varaussuhteeksi valittiin 7,5, koska edeltävissä kokeissa tällä varaussuhteella PEI22K:n ja Dosperin synergia oli suurin. Seerumipitoisuudeksi valittiin solujen kasvatusliuoksen pitoisuus eli 9 %.



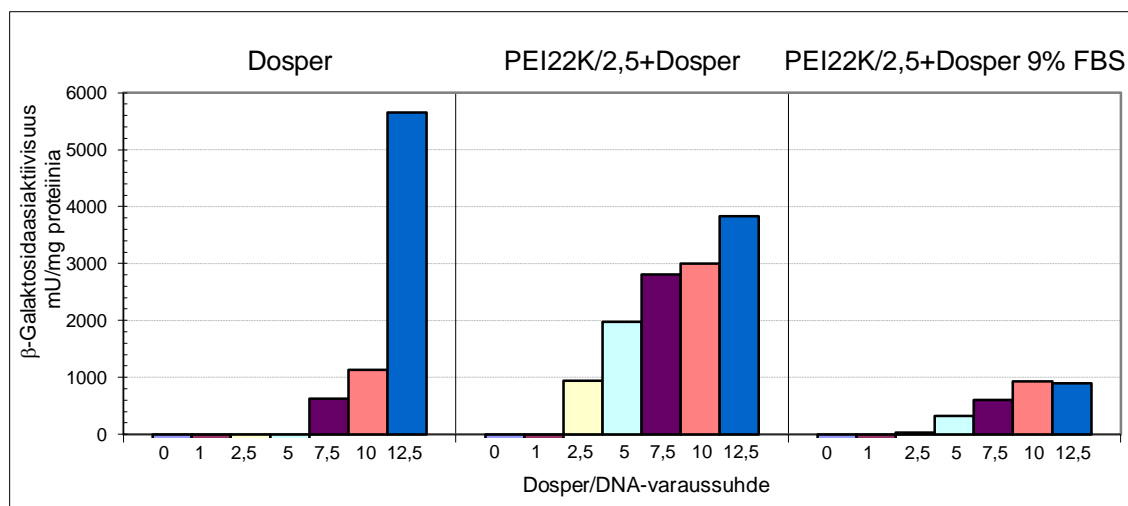
Kuva 6. Seerumin vaikutus PEI22K:n ja Dosperin yhdistelmän transfektiotehoon SMC-soluissa. Soluihin transfektoitiin 1  $\mu$ g BPVTKlacZ-plasmidia ilman seerumia tai seerumin (9 % lämpöinaktivoitu FBS) läsnäollessa. DNA kondensoitiin PEI22K:n kanssa N/P-ekvivalensseilla 0–12,5 ennen Dosperin lisäystä (Dosper/DNA-varausuhde 7,5). Soluja inkuboitiin transfektioliuoksessa 4 tuntia ja tämän jälkeen kasvatusmediumissa 44 tuntia.  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus määritettiin ONPG – tutkimuksella. Kuvassa on nähtävissä saatu  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus / mg proteiinia, n=2.

Seerumin läsnäololla oli vaikutusta transfektiokomplekseilla saadun geeninsiirtotehon suuruuteen; seerumi pudotti vastetta vähimmilläänkin noin puoleen ilman seerumia saatuun vasteeseen verrattuna (Kuva 6). Kuvaajan muotoon seerumilla ei juuri ollut vaikutusta, suurin transfektioteho molemmissa tilanteissa saatiin N/P-ekvivalensseilla 2,5 ja 12,5. Huomattavaa oli, että ilman seerumia pelkällä Dosperilla (N/P=0) saatiin vaste, mutta seerumin läsnäollessa ei saatu havaittavaa vastetta.

#### 2.3.1.4 Transfektiotehon suhde transfektoituneiden solujen lukumäärään

Seerumin läsnäolo pudotti PEI22K/Dosper-kombinaatioiden transfektiotehoa (Kuva 6). Syytä tähän tutkittiin tekemällä komplekseilla  $\beta$ -galaktosidaasientsyymiaktiivisuustestin lisäksi myös X-gal-värijäys ja tarkastelemalla korreloiko komplekseilla saatava transfektioteho transfektoituneiden solujen lukumäärän kanssa (Kuva 7 ja Kuva 8).

Tutkimus tehtiin PEI22K/Dosper-yhdistelmällä vaihtelemalla Dosper/DNA-varaussuhdetta. N/P-ekvivalenssiksi valittiin 2,5, koska edeltävissä kokeissa tällä ekvivalenssilla PEI22K:n ja Dosperin synergia oli suurin. Samalla tutkittiin myös miten seerumin läsnäolo vaikuttaa vasteeseen ja millä Dosper/DNA-varaussuhteella vasteen pieneneminen seerumin vaikutuksesta olisi vähäisintä. Kuvassa 7 on lisäksi nähtävissä vastaavilla Dosper-komplekseilla saadut aktiivisuudet.



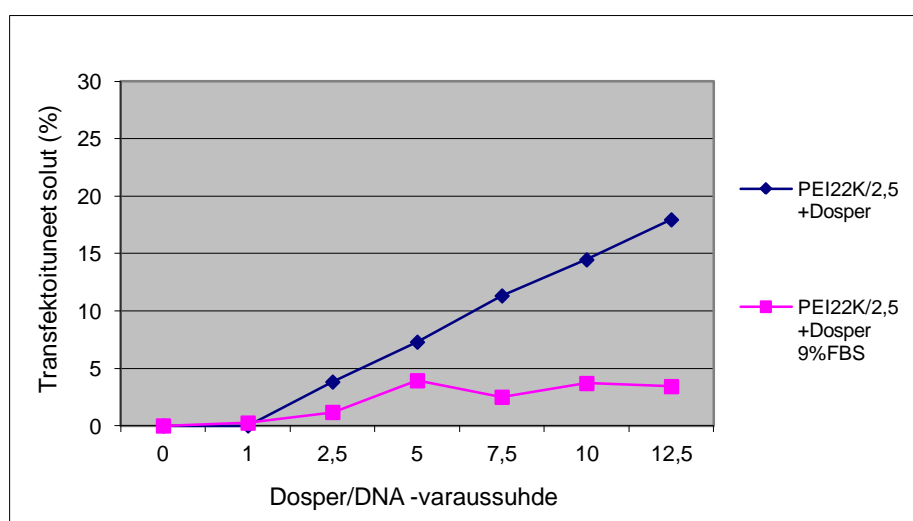
Kuva 7. Dosper/DNA-varaussuhteen vaikutus Dosperin ja PEI22K/Dosper-yhdistelmän transfektiotehoon SMC-soluissa. Soluihin transfektoitiin 1  $\mu$ g BPVTKlacZ-plasmidia ilman seerumia tai seerumin (9 % lämpöinaktivoitu FBS) läsnäollessa. DNA kondensoitiin Dosperilla (Dosper/DNA-varaussuhteilla 0–12,5), tai DNA kondensoitiin PEI:n kanssa N/P-ekvivalenssilla 2,5 ennen Dosperin lisäystä (Dosper/DNA-varaussuhteilla 0–12,5). Soluja inkuboitiin transfektioliuoksessa 4 tuntia ja tämän jälkeen kasvatusmediumissa 44 tuntia.  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus määritettiin ONPG-tutkimuksella. Kuvassa on nähtävissä saatu  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus / mg proteiinia, n=4 (Dosper 0, 2,5, 5, 7,5 ja 10) tai n=2 (Dosper 1 ja 12,5 ja PEI22K/2,5+Dosper 0–12,5  $\pm$  seerumi).

Kuvan 7 tuloksissa on havaittavissa PEI22K/Dosper-yhdistelmän synergia Dosperiin verrattuna varaussuhteilla 2,5–10, mutta varaussuhteella 12,5 saatiin Dosperilla yhdistelmää suurempi aktiivisuus. PEI22K/Dosper-yhdistelmällä sekä seerumittomassa että seerumipitoisessa transfektiossa vaste kasvoi varaussuhteen kasvaessa. Seerumin kanssa suurin vaste saatiin varaussuhteella 10 eikä Dosperin määrän lisäys enää kasvattanut yhdistelmän tehoa. Seerumilla oli selvästi vaikutusta saatuihin  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuuksiin; vaste putosi kullakin kombinaatiolla vähintään



kolmasosaan verrattuna ilman seerumia saatuun vasteeseen. Aktiivisuuden pieneneminen seerumin vaikutuksesta oli suhteessa vähäisintä Dosper/DNA-varaussuhteella 10, jolla saatiin seerumin läsnäollessa myös suurin vaste. Tämän perusteella Dosper/DNA-varaussuhde 10 valittiin varsinaisissa seerumitutkimuksissa käytettäväksi varaussuhteeksi.

Vastaavilla PEI22K/Dosper-kombinaatioilla tehdyn X-gal-värjäyksen tulokset ovat nähtävissä kuvassa 8.



Kuva 8. Seerumin vaikutus PEI22K/Dosper-yhdistelmällä transfektoituneiden SMC-solujen lukumäärään. Solut transfektoitiin 1  $\mu$ g:lla BPVTKlacZ-plasmidia ilman seerumia tai seerumin (9 % lämpöinaktivoitu FBS) läsnäollessa. DNA kondensoitiin PEI22K:n kanssa N/P-ekvivalenssilla 2,5 ennen Dosperin lisäystä (Dosper/DNA-varaussuhteilla 0–12,5). Soluja inkuboitiin transfektioliuoksessa 4 tuntia ja tämän jälkeen kasvatusmediumissa 18 tuntia. Transfektoituneiden solujen osuus määritettiin X-gal-värjäyksellä. Kuvassa on nähtävissä värjäytyneiden solujen prosentuaalinen osuus, n=2.

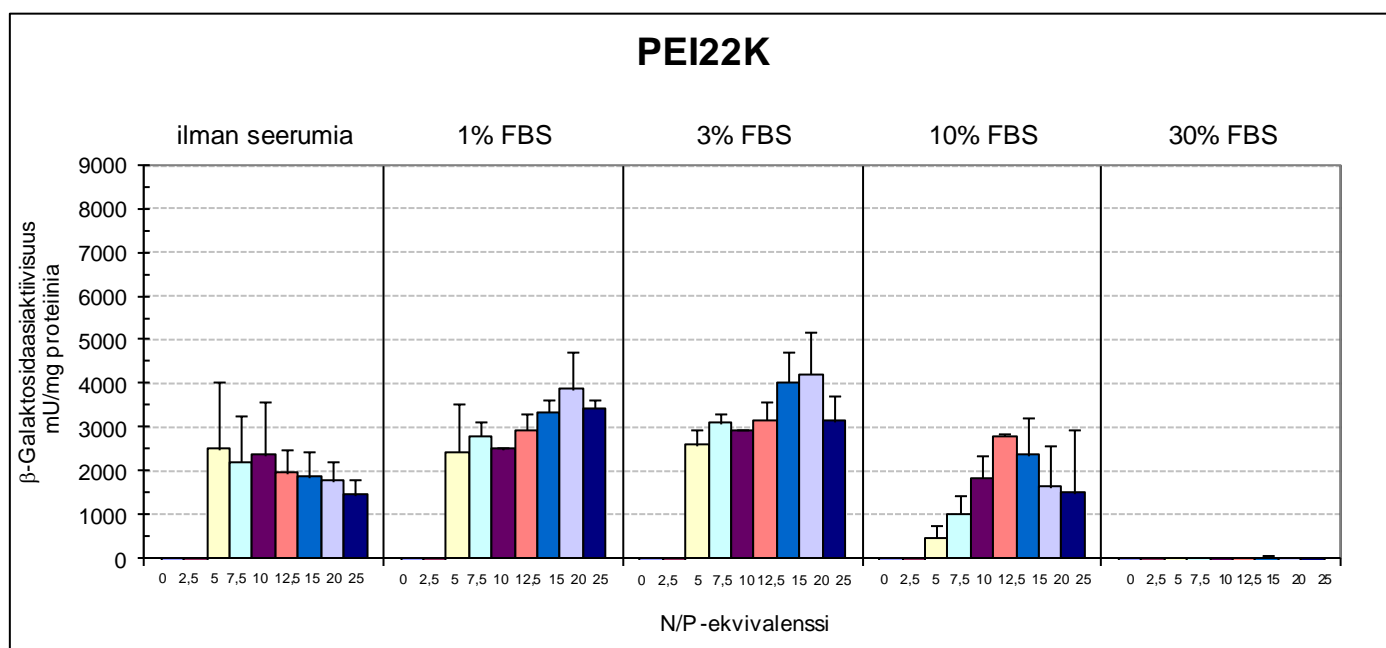
Kuvista 7 ja 8 nähdään, että aktiivisuuden lisääntyminen varaussuhteen kasvaessa oli verrannollinen transfektoituneiden solujen lukumäärän kanssa. Seerumi pudotti  $\beta$ -galaktosidaasientsyymiä tuottavien solujen lukumäärää, joten transfektiotehon pudotus johtui todennäköisimmin nimenomaan transfektoituneiden solujen lukumäärän pienenemisestä eikä siitä, että transfektoituneet solut olisivat tuottaneet vähemmän  $\beta$ -galaktosidaasientsyymiä seerumin vaikutuksesta.

### 2.3.2 Seerumipitoisuuden vaikutus transfektiotehoon

Edeltävien kokeiden perusteella päädyttiin seuraavanlaiseen seerumin vaikutusta transfektiotehoon määrittävään koeasetelmaan: PEI22K N/P-ekvivalensseilla 0–25, PEI22K+Dosper10 N/P-ekvivalensseilla 0–25 ja PEI22K/2,5+Dosper Dosper/DNA-varaussuhteilla 0–15 ilman seerumia sekä seerumin kanssa. Seerumipitoisuuksiksi valittiin 1 %, 3 %, 10 % ja 30 %.

#### 2.3.2.1 PEI22K

Kuvassa 9 on nähtävissä seerumin vaikutus PEI22K:lla N/P-ekvivalensseilla 0–25 saatuun transfektiotehoon.



Kuva 9. Seerumin vaikutus PEI22K:n transfektiotehoon SMC-soluissa. Soluihin transfektoitiin  $1\mu\text{g}$  BPVTKlacZ-plasmidia ilman seerumia tai seerumin (1–30 % lämpöinaktivoitu FBS) läsnäollessa. DNA kondensoitiin PEI22K:n kanssa ennen transfektiota N/P-ekvivalensseilla 0–25. Soluja inkuboitiin transfektioliuoksessa 4 tuntia ja tämän jälkeen kasvatusmediumissa 44 tuntia.  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus määritettiin ONPG-tutkimuksella. Kuvassa on nähtävissä saatu  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus / mg proteiinia  $\pm$  keskivirhe,  $n=4$ .

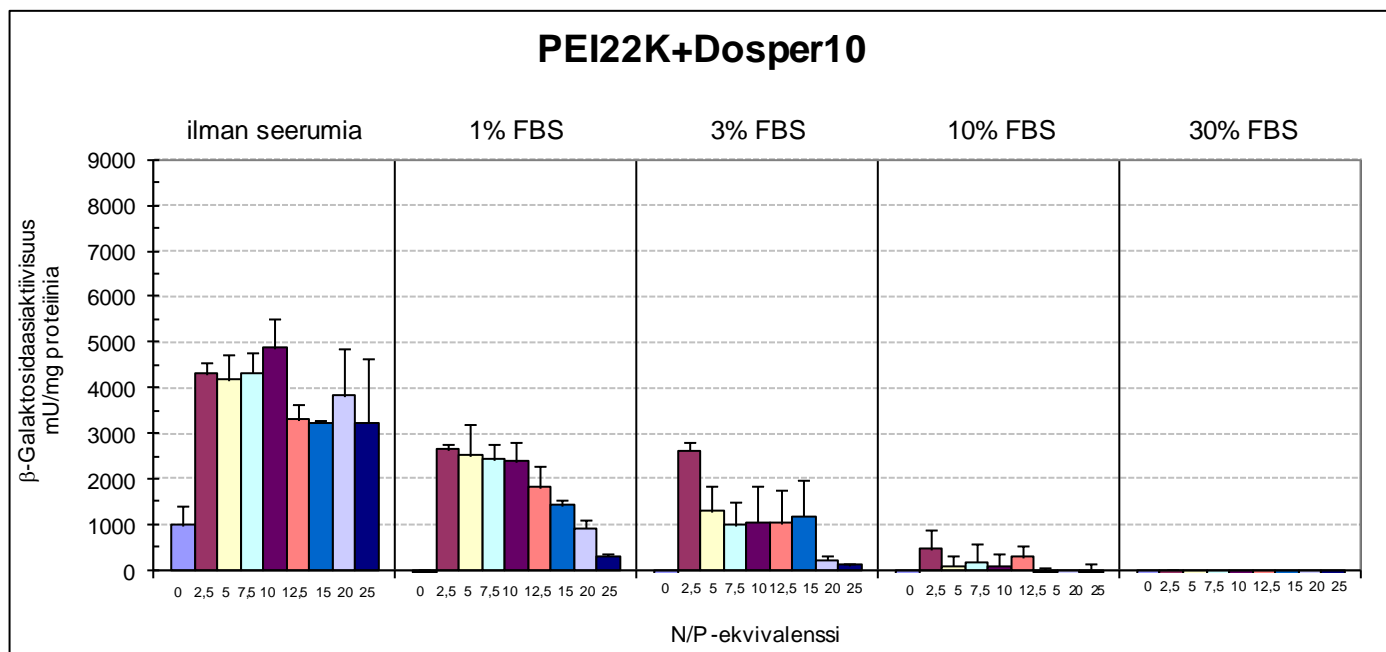
Seerumin läsnäololla oli jonkin verran vaikutusta saatujen  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuuksien suuruuksiin, mutta myös kuvaajan muotoon (Kuva 9). Pelkällä DNA:lla ja N/P-ekvivalenssilla 2,5 ei saatu vastetta lainkaan. Seerumittomassa transfektiossa suurin aktiivisuus saatiin N/P-ekvivalessilla 5 ja aktiivisuus laski ekvivalenssin kasvaessa. 1 %:n ja 3 %:n seerumipitoisuuksilla ekvivalenssilla 5 saatu  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus oli samansuuruinen kuin ilman seerumia, mutta toisin kuin ilman seerumia, ekvivalenssin kasvaessa myös aktiivisuus kasvoi. Maksimivaste saavutettiin 1 %:n ja 3 %:n seerumipitoisuuksilla ekvivalenssilla 20 ja se oli jonkin verran suurempi kuin ilman seerumia saatu maksimivaste. 10 %:n seerumipitoisuudella pienten ekvivalenssien aktiivisuus laski, mutta ekvivalenssin kasvaessa aktiivisuus säilyi lähes samana kuin seerumittomassa transfektiossa. Ekvivalenssi 12,5 säilytti tehonsa parhaiten seerumin läsnäollessa; aktiivisuus näytti jopa kasvavan seerumipitoisuuksilla 1–10 %. 30 %:n seerumipitoisuudella vasteet katosivat.

#### 2.3.2.2 PEI22K+Dosper10

Kuvassa 10 on esitetty PEI22K/Dosper-yhdistelmällä Dosper/DNA-varaussuhteella 10 (PEI-ekvivalenssi 0-25) saadut tulokset. Tarkoituksena oli tutkia seerumipitoisuuden vaikutusta PEI22K/Dosper-yhdistelmän transfektio-oloihin, sekä verrata yhdistelmän tehoa PEI22K:n tehoon vastaavanlaisessa koeasetelmassa.

Toisin kuin pelkällä PEI22K:lla, PEI22K/Dosper10-yhdistelmällä vaste saatiin jo ekvivalenssilla 2,5 (Kuva 9 ja Kuva 10). Seerumittomissa transfektio-olosuhteissa PEI22K/Dosper10-yhdistelmän transfektio-oloihin oli parempi kuin PEI22K:lla. Kuitenkin, toisin kuin PEI22K:n kohdalla seerumipitoisuuksilla 1–10 %, seerumin läsnäolo pudotti PEI22K/Dosper10-yhdistelmällä saatuja  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuuksia. Huomattavaa on, että ilman seerumia Dosperilla (N/P-ekvivalenssi 0) saatiin selkeä vaste, mutta vaste hävisi kokonaan jo 1 %:n seerumipitoisuudella (Kuva 10). Kombinaatioista parhaiten tehonsa seerumipitoisessa transfektiossa säilytti PEI22K/2,5+Dosper10. Tämä oli myös ainoa PEI22K/Dosper10-kombinaatio, jolla oli havaittavissa huomattava synergia pelkkään PEI22K:een verrattuna seerumin läsnäollessa (Kuva 9 ja Kuva 10). Muilla

PEI22K/Dosper10-kombinaatioilla saatiin lähes poikkeuksetta huomattavasti huonompi transfektioteho kuin PEI22K:lla.



Kuva 10. Seerumin vaikutus PEI22K/Dosper-yhdistelmän transfektiotehoon SMC-soluissa. Soluihin transfektoitiin 1  $\mu$ g BPVTKlacZ-plasmidia ilman seerumia tai seerumin (1–30% lämpöinaktivoitu FBS) läsnäollessa. DNA kondensoitiin PEI22K:n kanssa N/P-ekvivalensseilla 0–25 ennen Dosperin lisäystä (Dosper/DNA-varaussuhde 10). Soluja inkuboitii transfektioliuoksessa 4 tuntia ja tämän jälkeen kasvatusmediumissa 44 tuntia.  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus määritettiin ONPG-tutkimuksella. Kuvassa on nähtävissä saatu  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus / mg proteiinia  $\pm$  keskivirhe, n=4.

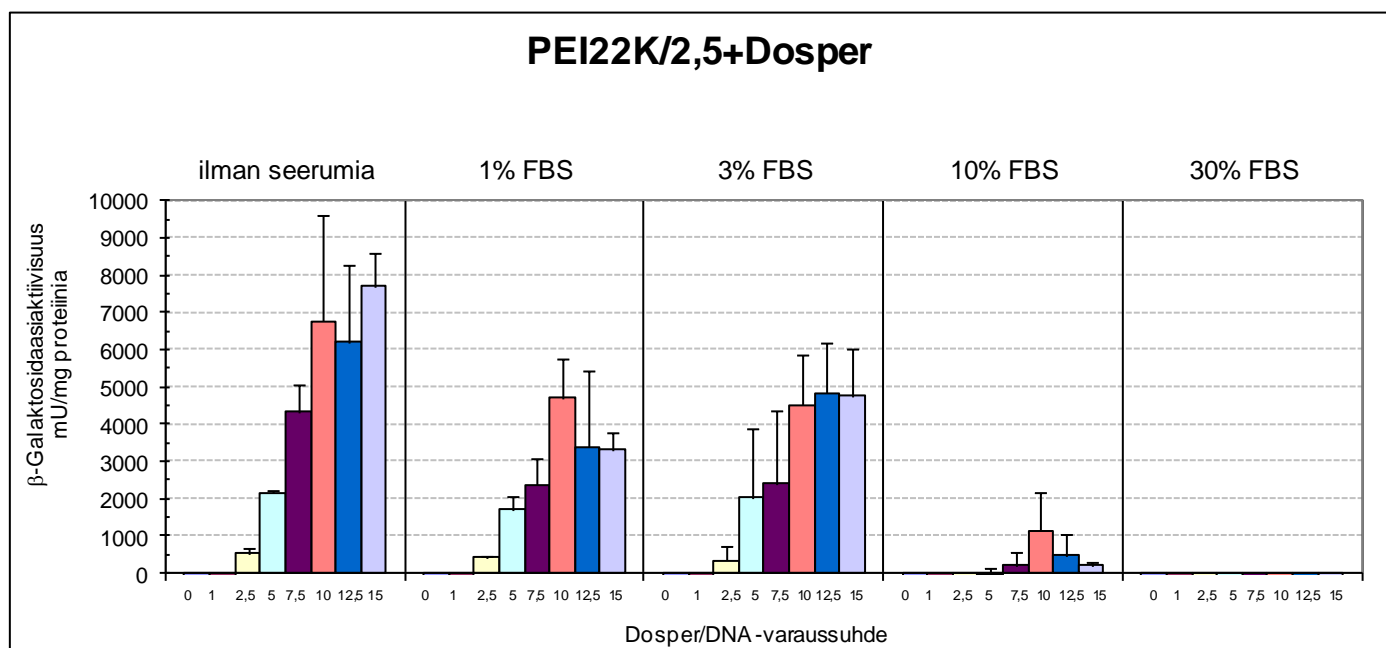
Seerumilla oli päinvastainen vaikutus PEI22K:n ja PEI22K/Dosper10-yhdistelmän maksimivasteisiin seerumipitoisuuksilla 1–10 % (Kuva 9 ja Kuva 10). PEI22K:lla maksimivasteet kasvoivat seerumin läsnäollessa (1 % ja 3 %) tai pysyivät ennallaan (10 %), kun taas yhdistelmällä maksimivaste laski huomattavasti seerumin läsnäollessa. 30 % :n seerumipitoisuudella kummallakaan ei havaittu lainkaan vastetta.

### 2.3.2.3 PEI22K/2,5+Dosper

Kuvassa 11 on esitetty PEI-ekvivalenssilla 2,5 Dosper-sarjalla (varaussuhde 0–15) saadut tulokset. Tarkoituksena oli selvittää kuinka Dosper/DNA-varaussuhteen muutos

vaikuttaa PEI22K/Dosper-yhdistelmän tehoon eri seerumipitoisuuksilla. PEI-ekvivalenssiksi valittiin 2,5, koska tällä ekvivalenssilla PEI22K:n ja Dosperin synergia oli selvimmin havaittavissa aiemmissä kokeissa (Kuva 5, Kuva 9 ja Kuva 10).

Paras transfektioteho seerumipitoisissa transfektio-olosuhteissa saatiin suurilla Dosper/DNA-varaussuhteilla (Kuva 11). Ilman seerumia, sekä 1 %:n ja 3 %:n seerumipitoisuuksilla  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus saatiin varaussuhteesta 2,5 alkaen siten, että aktiivisuus kasvoi varaussuhteen kasvaessa aina varaussuhteeseen 10 asti, minkä jälkeen aktiivisuus pysyi suunnilleen samana. Havaittava vaste 10 %:n seerumipitoisuudella saavutettiin vasta varaussuhteella 7,5 ja suurin aktiivisuus varaussuhteella 10. 30 %:n seerumipitoisuudella ei saatu lainkaan aktiivisuutta.



Kuva 11. Seerumin vaikutus PEI22K/Dosper-yhdistelmän transfektiotehoon SMC-soluissa. Soluihin transfektoitiin 1  $\mu$ g BPVTKlacZ-plasmidia ilman seerumia tai seerumin (1–30 % lämpöinaktivoitu FBS) läsnäollessa. DNA kondensoitiin PEI22K:n kanssa N/P-ekvivalenssilla 2,5 ennen Dosperin lisäystä (Dosper/DNA-varaussuhteilla 0–15). Soluja inkuboitiin transfektioliuoksessa 4 tuntia ja tämän jälkeen kasvatusmediumissa 44 tuntia.  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus mitattiin ONPG-tutkimuksella. Kuvassa on nähtävissä saatu  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuus / mg proteiinia  $\pm$  keskivirhe, n=4.

Maksimivasteet pienenivät seerumin vaikutuksesta (Kuva 11). 1 %:n ja 3 %:n seerumipitoisuuksilla maksimivasteessa ei ollut nähtävissä juurikaan eroa keskenään, mutta ne olivat pienempiä verrattuna ilman seerumia saatuun maksimivasteeseen. 10 %:n seerumipitoisuudella transfektioteho laski huomattavasti; maksimivaste oli vain noin neljännes seerumittomissa transfektio-olosuhteissa saadusta maksimivasteesta.

Verrattaessa absoluuttisia  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuusarvoja PEI22K:n ja PEI22K/Dosper-yhdistelmän välillä seerumipitoisessa transfektiossa, näytti PEI22K ja PEI22K/Dosper-yhdistelmä antavan 1 %:n ja 3 %:n seerumipitoisuudella maksimivasteiltaan samanlaisia transfektiotehoja, mutta 10 %:n seerumipitoisuudella PEI22K toimi yhdistelmää paremmin (Kuva 9 ja Kuva 11). Absoluuttisten arvojen vertailu keskenään eri koeasetelmien välillä ei kuitenkaan välttämättä anna oikeaa kuvaa  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuusarvojen suhteista, sillä samankin koeasetelman arvojen välillä oli jonkinasteista poikkeamista kokeita toistettaessa. Onkin mielekkäämpää tarkastella kunkin koeasetelman tuloksia erikseen ja selvittää mitkä kombinaatiot säilyttivät tehonsa parhaiten seerumipitoisessa transfektiossa verrattuna ilman seerumia saatuun tehoon. Yhdistelmistä parhaiten pienillä seerumipitoisuuksilla (1–3 %) tehonsa säilytti PEI22K/2,5+Dosper5. Kuitenkin, keskimäärin paras transfektioteho saatiin kombinaatiolla PEI22K/2,5+Dosper10, joka toimi vielä 10 %:n seerumipitoisuudessakin. PEI22K:n kombinaatioista optimaalisin lienee N/P-ekvivalenssi 12,5, jonka teho jopa lisääntyi seerumipitoisessa transfektiossa.

### 2.3.3 Yhdisteiden toksisuus

Transfektiokompleksien toksisuutta SMC-soluille tarkasteltiin seuraamalla soluista valmistettujen näytteiden proteiinipitoisuuksia. Proteiinipitoisuuksille laskettiin prosentuaaliset määrät suhteutettuna kontrollinäytteeseen, eli seerumittomissa transfektio-olosuhteissa pelkän DNA-käsittelyn (N/P=0) saaneisiin soluihin. Proteiinipitoisuuden pieneneminen kontrollinäytteeseen verrattuna tulkittiin lisääntyneenä toksisuutena. Näytteiden proteiinipitoisuudet korreloivat käsittelyiden aikana silmämääräisesti havaittujen solujen kasvatusalustasta irtoamisten (solukuolemien) kanssa. Myös seerumipuutteen vaikutus solujen irtoamiseen oli selvästi

havaittavissa; seerumittomassa elatusnesteessä inkuboidut solut eivät selviytyneet käsittelyistä yhtä hyvin kuin seerumipitoisessa elatusnesteessä inkuboidut.

PEI22K:n toksisuus riippui N/P-ekvivalenssista. Seerumittomissa transfektioolosuhteissa pelkkä DNA oli vähiten toksinen soluille ja PEI22K:n pitoisuuden nousu tiettyyn pitoisuuteen asti (N/P=12,5) lisäsi toksisuutta, minkä jälkeen toksisuus taas väheni. Seerumin läsnäolo transfektiossa vähensi kompleksien toksisuutta huomattavasti; samoilla kombinaatioilla ilman seerumia ja seerumin kanssa oli suurimmillaan jopa 40 %:n ero mitatuissa proteiinipitoisuuksissa. Transfektio- ja toksisuus eivät korreloineet keskenään seerumittomissa olosuhteissa tai millään seerumipitoisuudella, sillä suurin transfektio- ja pienin proteiinipitoisuus (suurin toksisuus) jokaisella seerumipitoisuudella saatiin eri komplekseilla.

PEI22K/2,5+Dosper-yhdistelmällä seerumipitoisuuksilla 0–1 % kompleksien toksisuus lisääntyi Dosperin määrän kasvaessa komplekseissa. Suuremmilla seerumipitoisuuksilla (3–30 %) Dosperin lisäys ei vaikuttanut toksisuuteen. Seerumittomissa transfektioolosuhteissa saadut proteiinipitoisuudet olivat huomattavasti pienempiä kuin millään seerumipitoisuudella. PEI22K/2,5+Dosper-yhdistelmällä erot proteiinipitoisuuksissa seerumittoman ja seerumipitoisen transfektion välillä olivat suurempia kuin PEI22K:lla, ja tehokkaimmat transfektio-kompleksit osoittautuivat myös toksisimmiksi.

## 2.4 Tulosten tarkastelu

### 2.4.1 PEI22K/Dosper-yhdistelmän synergia seerumittomissa transfektio-olosuhteissa

Sekä PEI22K että Dosper toimivat geeninsiirtäjinä SMC-soluissa. Näiden yhdistelmä toimi kuitenkin paremmin kuin kumpikaan yksinään seerumittomissa transfektioolosuhteissa. Dosperilla ja PEI22K:lla oli siis havaittavissa synergistinen yhteisvaikutus transfektio-olosuhteisiin.

Useilla eri lipopolypekseillä on havaittu vastaavanlainen synergia (Oku ym. 2001; Lampela ym. 2002; Hanzlíková ym. 2009). Synergian ei ole niinkään todettu selittyvän

muutoksilla DNA:n kondensaatioissa, kompleksien koossa tai soluunotossa, vaan kompleksien muuttuneella solunsisäisellä käyttäytymisellä (Lampela ym. 2003). Voidaankin olettaa, että lipopolypleksin parempi transfektioteho perustuu mm. siihen, että kompleksien vapautuminen endolysosomeista sytoplasmaan on tehokkaampaa komponenttien erilaisten membraaneja epästabiloivien mekanismien ansiosta (Uherek ym. 1998; Oku ym. 2001). Sekä Dosperilla että PEI:llä on puskurikapasiteettia ja yhdessä niiden endolysosomaalinen puskurointi on tehostunut. Lipopolypleksistä todennäköisesti irtoaa lipidiosa endolysosomeista vapautumisen yhteydessä, mutta polykationi on yhä sitoutuneena DNA:han suojaten sytoplasman nukleaaseilta ja ohjaten DNA:n tumaan. On myös esitetty, että PEI/DNA/Dosper-kompleksin muodostuessa Dosper muodostaisi ylimääräisen suojaavan kerroksen PEI/DNA-kompleksin ympärille tai aiheuttaisi kompleksin osittaisen uudelleenjärjestäytymisen, jolloin sekä polykationi että lipidi toimisivat synergistisesti DNA:ta suojaten (Pelisek ym. 2006). PEI22K kykenee myös kuljettamaan plasmidin tumaan (Brunner ym. 2002). Tämän vuoksi solujen ei tarvitse olla transfektiohetkellä jakautumassa, toisin kuin kationisilla lipideillä tapahtuvassa transfektiossa (Mortimer ym. 1999; Brunner ym. 2002).

Polyetyleni-imiinien protonisitomiskyvyn ja puskurointiominaisuuden merkitystä transfektion kannalta on myös epäilty. Gebhart ja Kabanov (2001) totesivat, että polyetyleni-imiinien puskurointikapasiteetti sijaitsee fysiologisen pH:n yläpuolella (pH 8–9,5), ja että endolysosomaalista ympäristöä kuvastavalla pH-alueella (4,5–7,4) puskurikapasiteetti olisi kyseenalainen. Valtaosassa polyetyleni-imiinien transfektiomekanismeja käsittelevissä tutkimuksissa on kuitenkin todettu, että heikosti emäksiset polykationit (myös PEI22K) edistävät transfektiota estämällä DNA:n hajoamista lysosomaalisten entsyymien välityksellä ja lisäämällä DNA:n vapautumista endolysosomeista puskurikapasiteettinsa avulla (Haensler ja Szoka 1993; Boussif ym. 1995).

#### 2.4.2 Seerumin vaikutus transfektiotehoon

Transfektioitehon on todettu lisääntyvän joissakin tapauksissa seerumipitoisessa transfektiossa *in vitro* (Godbey ym. 1999). Yleensä transfektioiteho kuitenkin laskee,



kun seerumia on mukana transfektiomediumissa (Yang ja Huang 1997). Ilmiön on selitetty johtuvan seerumin negatiivisesti varautuneista proteiineista, jotka sitoutuvat positiivisesti varautuneisiin transfektiokomplekseihin, sillä negatiivisesti varautuneiden proteiinien poistamisen on todettu kumoavan seerumin transfektiota inhiboivaa vaikutusta.

Transfektiokompleksien fysikaalisille ja biologisille ominaisuuksille tapahtuu muutoksia seerumialtistuksessa (Li ym. 1999). Seerumin proteiinit ”päällystävät” kompleksin tai tunkeutuvat kompleksin sisään kasvattaen kompleksin tiheyttä ja muuttaen varausta negatiivisemmaksi (Li ym. 1999; Zuhorn ym. 2002). Proteiinit saattavat häiritä kompleksien elektrostaattista tai hydrofobista sitoutumista solukalvoon ja siten haitata niiden soluunpääsyä (Dash ym. 1999). Toisaalta proteiinien sitoutuminen voi aiheuttaa kompleksien koon kasvamisen niin suureksi, että endosytoosi estyy tai kompleksit voivat jopa hajota (Li ym. 1999). Seerumittomissa olosuhteissa polykationi/DNA-kompleksit aggregoituvat keskenään nopeasti, kun taas seerumi stabiloi komplekseja estämällä niiden koon kasvua (Ogris ym. 1999; Zuhorn ym. 2002). Aggregaation puute heikentää kompleksien sedimentoitumista solujen päälle (Yang ja Huang 1997; Ogris ym. 1999).

Transfektiokehon *in vitro* -kokeissa ei kuitenkaan ole todettu suoraan korreloivan DNA:n assosiaatioon solujen kanssa tai soluunotetun DNA:n määrän kanssa (Yang ja Huang 1997; Escriou ym. 1998; Zaric ym. 2004). Transfektiokehon määrittävät pikemminkin DNA:n soluunpääsyä seuraavat vaiheet, ja seerumin on todettu vaikuttavan transfektiokompleksien stabiiliuteen solun sisällä häiriten kompleksien dissosiaatiota ja vapautumista endolysosomeista (Harvie ym. 1998; Zelphati ym. 1998; Dash ym. 1999; Li ym. 1999). Hyvän transfektiokehon on todettu edellyttävän mahdollisimman nopeaa vapautumista endosomeista (Zuhorn ym. 2002). Seerumi estää kompleksien aggregoitumista, jolloin muodostuvien pienten partikkelien vapautuminen endolysosomeista on vaikeutunut. Proteiinien tunkeutuminen komplekseihin saattaa aiheuttaa DNA:n konformaation muutoksia ja rakenteellisia muutoksia komplekseissa. Konformaation muutos heikentää transkriptiota. DNA:n paljastuminen transfektiokompleksin pinnalla saa aikaan kompleksin pinnalle negatiivisen varauksen,

jolloin interaktio endolysosomaalisen membraanin kanssa vaikeutuu ja DNA:n vapautuminen endolysosomeista voi estyä.

#### 2.4.2.1 PEI22K

PEI22K:n transfektioteho säilyi jopa 10 %:n seerumipitoisuudessa vastaavalla tasolla kuin ilman seerumia, mutta 30 %:n seerumipitoisuus kuitenkin esti transgeenin ilmentymisen kokonaan. Huomattavaa oli, että 1 %:n ja 3 %:n seerumipitoisuuksissa  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuudet olivat jopa suurempia kuin ilman seerumia, eli PEI22K näytti toimivan pienissä seerumipitoisuuksissa jopa paremmin kuin seerumittomissa olosuhteissa. Erot olivat kuitenkin varsin pieniä, mutta silti voitiin todeta, että 1–10 %:n seerumipitoisuudet eivät häirinneet transfektiota. Seerumin ei ole juurikaan todettu heikentävän PEI22K:n transfektiotehoa *in vitro* (Horbinski ym. 2001). Vastaavanlainen lievä nousu seerumin vaikutuksesta PEI22K:n tehossa joillakin N/P-ekvivalensseilla on havaittu myös aiemmissä tutkimuksissa (Bragonzi ym. 1999).

Näennäinen synergistinen seerumin ja PEI22K:n yhteisvaikutus voisi mahdollisesti johtua esimerkiksi proteiinipitoisuuksia tutkittaessa havaitusta PEI22K:n toksisuuden vähenemisestä seerumin vaikutuksesta, mikä pienillä seerumipitoisuuksilla saattaisi osittain kumota seerumin transfektiota estävää vaikutusta. Toisaalta seerumin on todettu sisältävän monia endosytoosia aktivoivia komponentteja, mm. transferrinia, insuliinia, ja tiettyjä kasvutekijöitä (Yang ja Huang 1997), jolloin etenkin pienillä seerumipitoisuuksilla seerumin endosytoosia aktivoiva vaikutus saattaisi olla transfektiotehon kannalta suurempi kuin isommilla seerumipitoisuuksilla havaittu transgeenin ekspressiota estävä vaikutus, eli endosytoosin lisäys osittain kumoaisi seerumin transfektiota haittaavaa vaikutusta.

PEI22K:n vaste oli riippuvainen N/P-ekvivalenssista. Seerumipitoisessa transfektiossa maksimivaste saavutettiin suuremmilla ekvivalensseilla (N/P=15–20) eli varaukseltaan positiivisemmilla komplekseilla kuin seerumittomissa olosuhteissa (N/P=5). Bragonzi ym. (1999) tutkivat myös ekvivalenssin vaikutusta transfektiotehoon; *in vitro* PEI22K:lla saatiin suurimmat vasteet pienillä ekvivalensseilla ja *in vivo*

intravaskulaarisesti annosteltuna suuremmilla ekvivalensseilla eli varaukseltaan positiivisemmilla komplekseilla. Suuremmilla N/P-arvoilla on todettu muodostuvan homogeenisempia ja kompaktimpia pallomaisia transfektiokomplekseja, jolloin kompleksit ovat muun muassa vähemmän herkkiä seerumin nukleaasien hajottavalle vaikutukselle (Pollard ym. 1998).

#### 2.4.2.2 Dosper

Dosperin teho hävisi kokonaan kaikilla seerumipitoisuuksilla. Dosperin on aiemmin todettu toimivan tehokkaasti 5 %:n seerumipitoisuudessa ja kykenevän transfektioon myös 10 %:n seerumipitoisuudessa (Dodds ym. 1998). Kuitenkin, 10 %:n seerumipitoisuus on pudottanut Dosperilla saatuja transfektiotuloksia jopa 100 kertaa pienemmiksi verrattuna seerumittomassa transfektiossa saatuihin vasteisiin (Haberland ym. 2000; Pelisek ym. 2006).

Seerumin vaikutus Dosper-välitteisessä transfektiossa on pystytty kumoamaan lisäämällä transfektiovaiheen jälkeen soluille annosteltuun elatusnesteeseen kalsiumioneja, jolloin transgeenin ilmentymistä on havaittu jopa 100 %:n seerumipitoisuudessa (Haberland ym. 2000). Kalsiumionit edesauttavat vektori/DNA-kompleksin vapautumista endolysosomeista fusogeenisella ja membranolyttisellä vaikutuksellaan (Haberland ym. 1999). Tästä on päätelty (olettaen, että kompleksit pääsevät solujen sisään transfektiovaiheessa), että korkeakaan seerumipitoisuus transfektiomediumissa ei häiritse Dosper/DNA-kompleksien sitoutumista solukalvoon tai kompleksien soluunottoa, vaan seerumin proteiinit vaikuttaisivat solun sisällä esimerkiksi estämällä DNA:n endolysosomaalista vapautumista (johtaen DNA:n hajoamiseen), tumaan pääsyä tai geenin ekspressiota (Haberland ym. 2000). Seerumin negatiivisesti varautuneiden molekyylien ja lipidivektoreiden interaktioiden on myös todettu hajottavan DNA-lipidivektorikomplekseja (Li ym. 1999).

#### 2.4.2.3 PEI22K/Dosper

Seerumittomissa transfektio-olosuhteissa PEI22K/Dosper-yhdistelmällä saatiin parempi transfektio-teho kuin PEI22K:lla tai Dosperilla yksinään. Tilanne kuitenkin muuttui, kun transfektiossa oli mukana seerumia. Tällöin PEI22K säilytti tehonsa yhdistelmää paremmin, ilmeisesti koska Dosper menetti tehoaan seerumin vaikutuksesta. Toisaalta PEI22K/Dosper-yhdistelmällä oli havaittavissa jonkinasteinen synergia myös seerumipitoisessa transfektiossa, nimenomaan verrattuna pelkkään Dosperiin; yhdistelmällä saatiin vasteita, toisin kuin Dosperilla.

Lampela ym. (2004) tutkivat seerumin vaikutusta polyetylenei-imiinien ja Dosperin yhdistelmien transfektio-tehoon SMC-soluissa. Myös heidän tutkimuksissaan seerumin läsnäolo pudotti transfektio-tehoa selvästi ja pelkällä Dosperilla (varaussuhde 7,5) ei saatu lainkaan aktiivisuutta seerumipitoisessa transfektiossa. Pelisek ym. (2006) tutkivat PEI25K/Dosper-lipopolypleksien transfektio-tehoa 10 %:n seerumipitoisuudessa. Seerumin läsnäolo pudotti lipopolypleksien transfektio-tehoa huomattavasti alhaisemmaksi verrattuna seerumittomissa olosuhteissa saatuun transfektio-tehoon.

Paras transfektio-teho PEI/Dosper-yhdistelmällä seerumin yhteydessä saatiin suurilla Dosper/DNA-varaussyhteillä. Varaussuhde määrittää kompleksien partikkelikoon ja pintavarauksen (Yang ja Huang 1997; Godbey ym. 1999). Pienillä varaussyhteillä muodostetut kompleksit mahdollisesti neutraloituvat kokonaan seerumin vaikutuksesta, jolloin kompleksien sitoutuminen soluihin heikkenee (Yang ja Huang 1997). Suurilla varaussyhteillä ylimääräiset positiiviset varaukset pystyvät osittain kumoamaan seerumin neutraloivan vaikutuksen.

Seerumipitoisessa transfektiossa PEI/Dosper-yhdistelmällä  $\beta$ -galaktosidaasientsyymiä tuottavien solujen lukumäärä oli pienempi kuin seerumittomassa transfektiossa, ja transfektoituneiden solujen lukumäärän muutos vastasi muutoksia transfektio-tehossa. Transfektio-tehon lasku seerumin vaikutuksesta johtui siten todennäköisesti transfektoituneiden solujen lukumäärän vähenemisestä. Aiemmissa tutkimuksissa on kuitenkin todettu, että transfektoituneiden solujen lukumäärä ja geeniekspression määrä

eivät välttämättä täysin korreloi keskenään vaan molempia ainakin osittain säätelevät eri tekijät, esimerkiksi kompleksien soluunotto ja solunsisäinen kinetiikka (Lampela ym. 2004).

#### 2.4.3 Yhdisteiden toksisuus

Yhdisteiden toksisuutta voidaan tarkastella näytteiden proteiinipitoisuuksia seuraamalla (Gebhart ja Gabanov 2001; Zaric ym. 2004). Toksisuus ilmenee kuolleiden solujen irtoamisena kuoppalevyiltä transfektion jälkeen ja solukuolemien kautta aiheutuvan proteiinipitoisuuden laskun on todettu olevan verrannollinen toksisuuden kanssa (Dodds ym. 1998; Gebhart ja Kabanov 2001; Zaric ym. 2004). Myös pelkän DNA:n on todettu aiheuttavan jonkinasteista toksisuutta soluille (Andrews ym. 1997). Liiallinen DNA:n määrä aiheuttaa soluissa stressireaktiota ja apoptoosia.

Seerumittomissa transfektio-olosuhteissa käsiteltyjen solujen näytteiden proteiinipitoisuudet olivat pienempiä kuin seerumipitoisissa transfektio-olosuhteissa käsiteltyjen solujen. Seerumittomassa transfektiossa kasvutekijöiden puute vähentää solujen selviytymistä (Dodds ym. 1998). Saatujen tulosten perusteella voidaan päätellä, että havaittu toksisuus ei johtunut pelkästään transfektiokomplekseista, vaan myös seerumipuute vähensi solujen selviytymistä (lisäsi näennäistä kompleksien toksisuutta). PEI22K:lla havaittu ”toksisuus” johtui todennäköisesti suurelta osin seerumipuutteesta, eikä niinkään PEI22K:sta, vaikkakin seerumipitoisuuden kasvattamisen on todettu myös vähentävän PEI22K:n sytotoksisuutta (Horbinski ym. 2001; Zaric ym. 2004). PEI:n sytotoksisuuden mekanismiksi on esitetty mm. PEI:n aikaansaamaa solun membraanien läpäisevyyden lisääntymistä (Godbey ym. 1999).

PEI/Dosper-yhdistelmällä seerumin läsnäolo vähensi toksisuutta huomattavasti. Seerumin läsnäolon on todettu vähentävän myös liposomaaliseen transfektioon liittyvää sytotoksisuutta (Yang ja Huang 1997). Lisäksi polymeeri/DNA-kompleksien +/- -varaussuhteen pienentämisen on todettu vähentävän transfektioon liittyvien solukuolemien määrää *in vitro* (Ferrari ym. 1997; Godbey ym. 1999). Tämä oli

havaittavissa PEI22K/Dosper-yhdistelmällä (eri Dosper-varaussuhteilla), mutta ei PEI22K:lla.

Toksisuutta tarkastelemalla voidaan myös pohtia toksisuuden vaikutusta saatuun transfektiotehoon, sillä näennäinen hyvä transfektioteho saattaa osittain johtua myös suuremmasta toksisuudesta (Gebhart ja Kabanov 2001). PEI22K:lla suurin transfektioteho ja suurin toksisuus kaikilla seerumipitoisuuksilla saatiin eri komplekseilla. PEI22K:n transfektioteho parani seerumin läsnä ollessa transfektiossa, mutta myös näytteiden proteiinipitoisuudet kasvoivat seerumittomiin transfektioolosuhteisiin verrattuna (toksisuus pieneni). Voidaan siis päätellä, että PEI22K:n transfektiotehon paraneminen ei johtunut toksisuuden lisääntymisestä. Sitä vastoin PEI22K/Dosper-yhdistelmällä tehokkaimmat kompleksit osoittautuivat myös toksisimmiksi. Parempi transfektioteho saattoi siis johtua myös suuremmasta toksisuudesta. PEI22K/Dosper-yhdistelmän toksisuus (Dosperin toksisuus) korostui seerumittomissa olosuhteissa, ja sekä toksisuus että transfektioteho pienenevät seerumin vaikutuksesta. Tämä viittaa siihen, että seerumi inaktivoi Dosperia, jolloin toksinen vaikutus ja samalla myös transgeenin ilmentyminen estyivät. Lipopleksien neutraloitumisen seerumin vaikutuksesta on todettu voivan vähentää lipopleksien soluunottoa, jolloin kompleksien toksisuus ei myöskään tule esiin (Dodds ym. 1998).

## 2.5 Pohdinta

Geeniterapian tuloa tehokkaaksi hoidoksi sairauksiin rajoittavat monet tekijät, muiden muassa geeniekspression lyhyt kesto tai huono teho, immuunivaste (haittaa etenkin toistuvaa annostelua vaativaa geeniterapiaa), sekä sairauksien aiheutuminen usean eri geenin virheellisen toiminnan summautumisesta (Plank ym. 1996; Sinn ym. 2009; Oak Ridge National Laboratory 2012). Näistä immuunipuolustuksen osuutta voidaan vähentää käyttämällä virusvektoreiden sijaan nonviraalisia geeninkuljettimia.

Nonviraalinen geeninsiirto kärsii tehottomuusongelmista *in vivo*. Yksi tärkeimmistä syistä tähän on transfektiokompleksien reagoiminen seerumin negatiivisesti varautuneiden proteiinien kanssa. Proteiinit inaktivoivat tai hajottavat komplekseja sekä

altistavat niitä immuunipuolustukselle, mikä voi johtaa komplementin aktivoitumiseen, opsonisaatioon ja fagosytoosiin (Felgner ja Ringold 1989; Ferrari ym. 1997; Dash ym. 1999; Ogris ym. 1999). Toisaalta reaktiot proteiinien kanssa voivat myös aiheuttaa geeninsiirtokompleksien suurenemisen ja ansaanjäämisen kapillaariverisuoniin (Dash ym. 1999). Kompleksit voivat myös reagoida punasolujen kanssa tai hajota seerumin nukleaasien vaikutuksesta (Chiou ym. 1994; Ogris ym. 1999). Jotta kohdesolut alkaisivat tuottaa haluttua proteiinia, tulee geeninsiirtokompleksien päästä soluihin ja mahdollistaa DNA:n pääsy tumaan transkriptoitavaksi. Solun fysikaaliset esteet (kalvorakenteet) ja metaboliset reaktiot (mahdollinen DNA:n hajoaminen) vaikeuttavat DNA:n pääsyä kohteeseensa (Lechardeur ja Lukacs 2002).

Tutkimalla seerumin vaikutusta transfektiotehoon *in vitro* voidaan ennakoida transfektiokompleksien toimivuutta *in vivo*. Tässä työssä tutkittiin voitaisiinko nonviraalisen geeninkuljettajan, PEI22K:n, transfektiotehoa seerumin läsnäollessa parantaa yhdistämällä PEI22K toisen nonviraalisen vektorin, Dosperin, kanssa. Vaikkakin PEI22K:n ja Dosperin yhdistelmä toimi paremmin kuin PEI22K seerumittomissa olosuhteissa, säilyi seerumipitoisissa transfektio-olosuhteissa PEI22K:n teho yhdistelmän tehoa paremmin. Tulos oli jokseenkin odotettavissa, sillä Dosperin tiedettiin menettävän transfektiotehoaan huomattavasti seerumin vaikutuksesta (Haberland ym. 2000). Transfektioehto seerumipitoisissa transfektio-olosuhteissa kuvastaa todennäköisemmin transfektiotehoa *in vivo* ja tulosten perusteella PEI22K soveltuukin PEI22K/Dosper-yhdistelmää paremmin *in vivo* -transfektioon. PEI22K:n tehoa on jonkin verran tutkittu *in vivo* -kokein, mutta vaihtelevalla menestyksellä (Goula ym. 1998; Bragonzi ym. 1999; Wightman ym. 2001).

Useat eri tekijät vaikuttavat työssä käytetyn nonviraalisen menetelmän *in vivo* -toimivuuteen suhteessa nyt saatuihin tuloksiin. Käytetty seerumi oli lämpöinaktivoitua, jolloin tietyt proteiinit ovat denaturoituneet (muun muassa komplementtisysteemi) eivätkä siten vaikuta transfektiotehoon samalla tavalla kuin lämpökäsittämättömässä seerumissa tai elävässä elimistössä (Plank ym. 1996). Olisikin selvitettävä millainen vaikutus seerumin inaktivoinnilla on geeninsiirtokompleksien transfektiotehoon. PEI22K:n on todettu suojaavan DNA:ta hajoamiselta myös lämpökäsittämättömässä

seerumissa (Moret ym. 2001). Inaktivoitua seerumia käytettäessä on joillakin kationisilla geeninsiirtokomplekseilla saatu noin 30 % suurempia transfektiotehoja kuin lämpökäsittelemätöntä seerumia käytettäessä (Plank ym. 1996). Myös PEI22K/DNA-kompleksien valmistusmenetelmällä on todettu olevan vaikutusta kompleksien kokoon ja siten myös transfektiotehoon *in vivo*, kuitenkin geeninsiirron kohde-elimistä riippuen (Goula ym. 1998; Wightman ym. 2001; Gharwan ym. 2003).

Seerumin negatiivisesti varautuneiden proteiinien interaktiot geeninsiirtokompleksien kanssa *in vivo* voitaisiin mahdollisesti estää kokonaan käyttämällä negatiivisesti varautuneita komplekseja, mutta nämä puolestaan sitoisivat todennäköisesti positiivisesti varautuneita plasman proteiineja aiheuttaen vastaavanlaisen tehon menetyksen samoista syistä (Dash ym. 1999). Negatiivisesti varautuneet kompleksit myös kondensoituvat vähemmän täydellisesti muodostaen isompia partikkeleja ja ovat herkempiä seerumin nukleaasien hajotukselle (Liu ym. 1997), joten niiden käyttökelpoisuus *in vivo* -geeninsiirroksessa olisi kyseenalainen.



### 3. YHTEENVETO

Tämän pro gradu -tutkielman kirjallisuuskatsauksessa tarkasteltiin geeniterapian kliinisten kokeiden tämänhetkistä tilaa. Geeniterapiasta on toivottu apua lukuisiin puutteellisista hoitovaihtoehdoista kärsiviin sairauksiin. Näitä sairauksia ovat muiden muassa vaikeat perinnölliset tilat ja lukuisat hankinnaiset sairaudet. Geenihoidon toteuttaminen kliinisesti merkittävien hoitotulosten saavuttamiseksi on kuitenkin osoittautunut haasteelliseksi. Toistaiseksi kliinisissä geeniterapiakokeissa positiivisia hoitotuloksia on saatu lähinnä monogeenisten, eli tietyn yksittäisen geenivirheen aiheuttamien sairauksien hoidoissa. Suurimpia esteitä geeniterapian laaja-alaisemmalle menestymiselle kliinisissä kokeissa ovat olleet aikaansaadun geeniekspression vähyyys ja lyhykestoisuus muun muassa vektoreiden geeninsiirtotehon heikkouden vuoksi.

Kokeellisessa osassa tutkittiin nonviraalisten geenivektoreiden geeninsiirtotehon synergiaa ja seerumiherkkyttä. Seerumiherkkyys on eräs nonviraalisen geeninsiirron tehokkuutta rajoittava tekijä, sillä seerumi inaktivoi geeninsiirtokomplekseja. Yhdistämällä polyetyleeni-imiini PEI22K ja liposomaalinen Dosper saatiin geeninsiirtotehoa seerumittomissa olosuhteissa parannettua huomattavasti verrattuna molempien yksittäiseen tehoon. Kuitenkin, seerumin lisääminen transfektiotapahtumaan heikensi PEI22K:n ja Dosperin yhdistelmän tehoa pelkällä PEI22K:lla saatua geeninsiirtotehoa huonommaksi.

Tehokas geeninsiirto seerumipitoisissa *in vitro* -transfektio-olosuhteissa saattaa ennakoita parempaa tehokkuutta myös *in vivo* -geeninsiirrossa. Kokeellisessa osassa saatujen tulosten perusteella PEI22K soveltuu Dosperin ja PEI22K:n yhdistelmää paremmin *in vivo* -geeninsiirtoon. Tavoitteena työssä oli seerumin vaikutuksen selvittämisen lisäksi kehittää systemaattista *in vitro* -menetelmää geeninsiirtokompleksien *in vivo* -geeninsiirtotehon arvioimiseksi; seuraava askel olisikin kompleksien *in vivo* -toimivuuden selvittäminen minkä jälkeen voitaisiin pohtia tarkemmin *in vivo* -geeninsiirtotehon ennustettavuutta tässä työssä käytetyn koeasetelman perusteella.

## 4. KIRJALLISUUSLUETTELO

Aebischer P, Schlupe M, Déglon N, Joseph J-M, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE: Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2: 696–699, 1996

Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C: Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296: 2410–2413, 2002

Aiuti A, Bachoud-Lévi AC, Blesch A, Brenner MK, Cattaneo F, Chiocca EA, Gao G, High KA, Leen AM, Lemoine NR, McNeish IA, Meneguzzi G, Peschanski M, Roncarolo MG, Strayer DS, Tuszyński MH, Waxman DJ, Wilson JM: Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 2). *Gene Ther* 14: 1555–1563, 2007

Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, Scaramuzza S, Andolfi G, Mirolo M, Brigida I, Tabucchi A, Carlucci F, Eibl M, Aker M, Slavin S, Al-Mousa H, Al Ghonaium A, Ferster A, Duppenhaller A, Notarangelo L, Wintergerst U, Buckley RH, Bregni M, Marktel S, Valsecchi MG, Rossi P, Ciceri F, Miniero R, Bordignon C, Roncarolo M-G: Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *New Engl J Med* 360: 447–458, 2009

Aiuti A, Roncarolo MG: Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 682–689, 2009

Al-Dosari MS, Gao X: Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J* 2009 11: 671–681, 2009

Alexander GE: Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci* 6: 259–280, 2004

Alexander BL, Ali RR, Alton EW, Bainbridge JW, Braun S, Cheng SH, Flotte TR, Gaspar HB, Grez M, Griesenbach U, Kaplitt MG, Ott MG, Seger R, Simons M, Thrasher AJ, Thrasher AZ, Ylä-Herttuala S: Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 1). *Gene Ther* 14: 1439–1447, 2007

Andrews JM, Newbound GC, Lairmore MD: Transcriptional modulation of viral reporter gene constructs following induction of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res* 25: 1082–1084, 1997

Arvanitakis Z, Tuszyński MH, Potkin S, Bartus R, Bennett D: A Phase 1 clinical trial of CERE-110 (AAV-NGF) gene delivery in Alzheimer's disease. American academy of neurology annual meeting, 2007. Haettu internetistä 15.10.2011: [http://www.ceregene.com/pdfs/Arvanitakis\\_Z,\\_2006,\\_Am\\_Acad\\_Neurol.pdf](http://www.ceregene.com/pdfs/Arvanitakis_Z,_2006,_Am_Acad_Neurol.pdf)

Bainbridge JWB, Tan MH, Ali RR: Gene therapy progress and prospects: the eye. *Gene Ther* 13: 1191–1197, 2006

Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR: Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2231–2239, 2008

Bar-Or A, Vollmer T, Antel J, Arnold DL, Bodner CA, Campagnolo D, Gianettoni J, Jalili F, Kachuck N, Lapierre Y, Niino M, Oger J, Price M, Rhodes S, Robinson WH, Shi FD, Utz PJ, Valone F, Weiner L, Steinman L, Garren H: Induction of antigen-specific tolerance in multiple sclerosis after immunization with DNA encoding myelin basic protein in a randomized, placebo-controlled phase 1/2 trial. *Arch Neurol* 64:1407–1415, 2007

Bartus RT, Herzog CD, Chu Y, Wilson A, Brown L, Siffert J, Johnson EM Jr, Olanow CW, Mufson EJ, Kordower JH: Bioactivity of AAV2-Neurturin gene therapy (CERE-120): differences between Parkinson's disease and nonhuman primate brains. *Mov Disord* 26: 27–36, 2011

Bartus RT, Baumann TL, Brown L, Kruegel BR, Ostrove JM, Herzog CD: Advancing neurotrophic factors as treatments for age-related neurodegenerative diseases: developing and demonstrating "clinical proof-of-concept" for AAV-neurturin (CERE-120) in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2012 (Epub). Haettu 5.9.2012 internetistä: [http://www.ceregene.com/pdfs/Bartus-et-al\\_2012\\_NBA.pdf](http://www.ceregene.com/pdfs/Bartus-et-al_2012_NBA.pdf)

Beck M: Therapy for lysosomal storage disorders. *Life* 62: 33–40, 2010

Björklund A, Björklund T, Kirik D: Gene therapy for dopamine replacement in Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 1: 2ps2, 2009

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF: T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475–480, 1995

Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugières P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M: Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 15: 968–975, 2004

Bonetta L: The inside scoop – evaluating gene delivery methods. *Nat Meth* 2: 875–883, 2005

Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, Ugazio AG, Mavilio F: Gene therapy in peripheral

blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 270: 470–475, 1995

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP: A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7297–7301, 1995

Bowers WJ, Breakefield XO, Sena-Esteves M: Genetic therapy for the nervous system. *Hum Mol Genet* 20 (R1): R28–41, 2011

Bragonzi A, Boletta A, Biffi A, Muggia A, Sersale G, Cheng SH, Bordignon C, Assael BM, Conese M: Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene Ther* 6: 1995–2004, 1999

Brantl S: Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 1575: 15–25, 2002

Brantly ML, Spencer LT, Humphries M, Conlon TJ, Spencer CT, Poirier A, Garlington W, Baker D, Song S, Berns KI, Muzyczka N, Snyder RO, Byrne BJ, Flotte TR: Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 alpha1-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther* 17: 1177–1186, 2006

Brantly ML, Chulay JD, Wang L, Mueller C, Humphries M, Spencer LT, Rouhani F, Conlon TJ, Calcedo R, Betts MR, Spencer C, Byrne BJ, Wilson JM, Flotte TR: Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16363–16368, 2009

Brigham KL, Lane KB, Meyrick B, Stecenko AA, Strack S, Cannon DR, Caudill M, Canonico AE: Transfection of nasal mucosa with a normal alpha1-antitrypsin gene in alpha1-antitrypsin-deficient subjects: comparison with protein therapy. *Hum Gene Ther* 11: 1023–1032, 2000

Brunner S, Fürtbauer E, Sauer T, Kursa M, Wagner E: Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther* 5: 80–86, 2002

Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, Klein ML, Holz E, Frank RN, Saperstein DA, Gupta A, Stout JT, Macko J, DiBartolomeo R, Wei LL: Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 17: 167–176, 2006

Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C, Huang L, Porteous DJ, Williamson R, Geddes DM: Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1: 39–46, 1995

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

Cavazzana-Calvo M, Fischer A: Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest* 117: 1456–1465, 2007

Ceregene: Ceregene presents interim phase 1 clinical data of CERE-110 for the treatment of Alzheimer's disease 2012a. Haettu 7.9.2012 internetistä:  
[http://www.ceregene.com/press\\_050207.asp](http://www.ceregene.com/press_050207.asp)

Ceregene: Alzheimer's Disease 2012b. Haettu 7.9.2012 internetistä:  
[http://www.ceregene.com/science\\_alzheimers.asp](http://www.ceregene.com/science_alzheimers.asp)

Chávez-Barrios P, Chintagumpala M, Mieler W, Paysse E, Boniuk M, Kozinetz C, Hurwitz MY, Hurwitz RL: Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol* 23:7927–7935, 2005

Chinen J, Davis J, De Ravin SS, Hay BN, Hsu AP, Linton GF, Naumann N, Nomicos EYH, Silvin C, Ulrick J, Whiting-Theobald NL, Malech HL, Puck J: Gene therapy improves immune function in preadolescents with X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 110: 67–73, 2007

Chiou HC, Tangco MV, Levine SM, Robertson D, Kormis K, Wu CH, Wu GY: Enhanced resistance to nuclease degradation of nucleic acids complexed to asialoglycoprotein-polylysine carriers. *Nucleic Acids Res* 22: 5439–5446, 1994

Christine CW, Starr PA, Larson PS, Eberling JL, Jagust WJ, Hawkins RA, VanBrocklin HF, Wright JF, Bankiewicz KS, Aminoff MJ: Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 73: 1662–1669, 2009

Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang J-J, Sumaroka A, Windsor EAM, Wilson JM, Flotte TR, Fishman GA, Heon E, Stone EM, Byrne BJ, Jacobson SG, Hauswirth WW: Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15112–15117, 2008

Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL, Windsor EA, Conlon TJ, Sumaroka A, Pang JJ, Roman AJ, Byrne BJ, Jacobson SG: Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Hum Gene Ther* 20: 999–1004, 2009

ClinicalTrials.gov: NCT00087789 (CERE-110 in subjects with mild to moderate Alzheimer's disease). Haettu 15.10.2011 internetistä:  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00087789?term=NCT00087789&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT00534703 (SERCA gene therapy trial). Haettu 6.10.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00534703?term=NCT00534703&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT00627588 (Phase I/II study of the safety, efficacy and dose evaluation of ProSavin for the treatment of bilateral idiopathic Parkinson's disease). Haettu 1.11.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00627588?term=gene+therapy&cond=Parkinson&rank=2>

ClinicalTrials.gov: NCT00643747 (Safety study of RPE65 gene therapy to treat Leber congenital amaurosis). Haettu 2.3.2012 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00643747?term=gene+therapy&cond=lebers&rank=4>

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00787059 (Ad5.hAC6 gene transfer for CHF). Haettu 12.9.2012 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00787059?term=NCT00787059&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT00794508 (MND-ADA transduction of CD34+ cells from children with adenosine deaminase (ADA)-deficient severe combined immunodeficiency (SCID)). Haettu 3.9.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00794508?term=NCT00794508&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT00876863 (Randomized, controlled study evaluating CERE-110 in subjects with mild to moderate Alzheimer's disease). Haettu 7.9.2012 internetistä:

<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00876863?term=cere-110-03&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT00999609 (Safety and efficacy study in subjects with Leber congenital amaurosis). Haettu 9.9.2012 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00999609?term=NCT00999609&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT01024998 (Safety and tolerability study of AAV2-sFLT01 in patients with neovascular age-related macular degeneration (AMD)). Haettu 4.10.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01024998?term=NCT01024998&rank=1>

ClinicalTrials.gov NCT01041222 (Safety, tolerability, and activity study of ISIS SOD1Rx to treat familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) caused by SOD1 gene mutations (SOD-1)). Haettu 17.3.2012 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01041222?term=NCT01041222&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT01129544 (Gene transfer for severe combined immunodeficiency, X-linked (SCID-X1) using a self-inactivating (SIN) gammaretroviral vector). Haettu 5.9.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01129544?term=NCT01129544&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT01161576 (Safety study of a gene transfer vector (Rh.10) for children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis). Haettu 10.10.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01161576?term=NCT01161576&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT01163825 (Encapsulated cell biodelivery of nerve growth factor to Alzheimer's disease patients (NsG0202)). Haettu 16.10.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01163825?term=NCT01163825&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT01175239 (Gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1)). Haettu 5.9.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01175239?term=NCT01175239&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT01410019 (Gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency (SCID2)). Haettu 5.9.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01410019?term=NCT01410019&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT01414985 (AAVRh.10 administered to children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis with uncommon genotypes or moderate/severe impairment). Haettu 10.10.2011 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01414985?term=NCT01414985&rank=1>

ClinicalTrials.gov: NCT01496040 (Clinical gene therapy protocol for the treatment of retinal dystrophy caused by defects in RPE65). Haettu 2.3.2012 internetistä:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01496040?term=gene+therapy&cond=lebers&rank=3>

Creager MA, Olin JW, Belch JF, Moneta GL, Henry TD, Rajagopalan S, Annex BH, Hiatt WR: Effect of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication. *Circulation* 124: 1765–1773, 2011

Dash PR, Read ML, Barrett LB, Wolfert MA, Seymour LW: Factors affecting blood clearance and *in vivo* distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther* 6: 643–650, 1999

Dodds E, Dunckley MG, Naujoks K, Michaelis U, Dickson G: Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. *Gene Ther* 5: 542–551, 1998

Dunbar CE, Kohn DB, Schiffmann R, Barton NW, Nolte JA, Esplin JA, Pensiero M, Long Z, Lockey C, Emmons RVB, Csik S, Leitman S, Krebs CB, Carter C, Brady RO, Karlsson S: Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34<sup>+</sup> cells from patients with Gaucher disease: *in vivo* detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther* 9: 2629–2640, 1998

Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, Starr P, Larson P, Bankiewicz KS, Aminoff MJ: Results from a phase 1 safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 70: 1980–1983, 2008

Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM: Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* 6: 597-602, 2004

Escriou V, Ciolina C, Lacroix F, Byk G, Scherman D, Wils P: Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1368: 276–288, 1998

Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Wasko MC, Tomaino MM, Kang R, Muzzonigro TA, Vogt M, Elder EM, Whiteside TL, Watkins SC, Herndon JH: Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8698–8703, 2005

Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD: Getting arthritis gene therapy into the clinic. *Nat Rev Rheumatol* 7: 244–249, 2011

FDA: Guidance for industry: Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy (Introduction: Definitions of somatic cell therapy and gene therapy) 1998. Haettu 6.3.2012 internetistä:  
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072987.htm>

Federici T, Boulis NM: Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 48: 236–242, 2012

Feigin A, Kaplitt MG, Tang C, Lin T, Mattis P, Dhawan V, During MJ, Eidelberg D: Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19559–19564, 2007

Felgner PL, Ringold GM: Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337: 387–388, 1989

Ferrari S, Moro E, Pettenazzo A, Behr JP, Zacchello F, Scarpa M: ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 4: 1100–1106, 1997

Fishbein I, Chorny M, Levy RJ: Site-specific gene therapy for cardiovascular disease. *Curr Opin Drug Discov Devel* 13: 203–213, 2010

Fjord-Larsen L, Kusk P, Tornøe J, Juliusson B, Torp M, Bjarkam CR, Nielsen MS, Handberg A, Sørensen JCH, Wahlberg LU: Long-term delivery of nerve growth factor by encapsulated cell biodelivery in the Göttingen minipig basal forebrain. *Mol Ther* 18: 2164–2172, 2010

Flotte TR, Mueller C: Gene therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Hum Mol Genet* 20 (R1): R87–R92, 2011

Forsyth P, Roldán G, George D, Wallace C, Palmer CA, Morris D, Cairncross G, Vallee Matthews M, Markert J, Gillespie Y, Coffey M, Thompson B, Hamilton M: A



Phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Mol Ther* 16: 627–632, 2007

Frank KM, Hogarth DK, Miller JL, Mandal S, Mease PJ, Samulski RJ, Weisgerber GA, Hart J: Investigation of the cause of death in a gene-therapy trial. *N Engl J Med* 361: 161–169, 2009

Friedmann T: A brief history of gene therapy. *Nat Genet* 2: 93–98, 1992

Garren H, Robinson WH, Krasulova E, Havrdova E, Nadj C, Selmaj K, Losy J, Nadj I, Radue E-W, Kidd BA, Gianettoni J, Tersini K, Utz PJ, Valone F, Steinman L: Phase 2 trial of a DNA vaccine encoding myelin basic protein for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63: 611–620, 2008

Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, Brouns G, Schmidt M, Von Kalle C, Barington T, Jakobsen MA, Christensen HO, Al Ghoniaim A, White HN, Smith JL, Levinsky RJ, Ali RR, Kinnon C, Thrasher AJ: Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364: 2181–2187, 2004

Gaspar HB, BJORKEGREN E, Parsley K, Gilmour KC, King D, Sinclair J, Zhang F, Giannakopoulos A, Adams S, Fairbanks LD, Gaspar J, Henderson L, Xu-Bayford JH, Davies EG, Veys PA, Kinnon C, Thrasher AJ: Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther* 14: 505–513, 2006

Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Adams S, Howe SJ, Al Ghoniaim A, Bayford J, Brown L, Davies EG, Kinnon C, Thrasher AJ: Long-term persistence of a polyclonal T cell repertoire after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med* 3: 97ra79, 2011

Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Restifo NP: Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6: 383–393, 2006

Gebhart CL, Kabanov AV: Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release* 73: 401–416, 2001

Gene Therapy Net: What is gene therapy 2012. Haettu 15.2.2012 internetistä:  
<http://www.genetherapynet.com/what-is-gene-therapy.html>

Gharwan H, Wightman L, Kircheis R, Wagner E, Zatloukal K: Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between the cationic polymer PEI and naked DNA). *Gene Ther* 10: 810–817, 2003

Gill DR, Southern KW, Mofford KA, Seddon T, Huang L, Sorgi F, Thomson A, MacVinish LJ, Ratcliff R, Bilton D, Lane DJ, Littlewood JM, Webb AK, Middleton PG, Colledge WH, Cuthbert AW, Evans MJ, Higgins CF, Hyde SC: A placebo-

controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 4: 199–209, 1997

Godbey WT, Wu KK, Mikos AG: Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release* 60: 149–160, 1999

Goula D, Remy JS, Erbacher P, Wasowicz M, Levi G, Abdallah B, Demeneix BA: Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther* 5: 712–717, 1998

Goyenville A, Seto JT, Davies KE, Chamberlain J: Therapeutic approaches to muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 20 (R1): R69–R78, 2011

Grez M, Reichenbach J, Schwäble J, Seger R, Dinauer MC, Thrasher AJ: Gene therapy of chronic granulomatous disease: the engraftment dilemma. *Mol Ther* 19: 28–35, 2011

Griesenbach U, Alton EW: Current status and future directions of gene and cell therapy for cystic fibrosis. *BioDrugs* 25: 77–88, 2011

Gupta R, Tongers J, Losordo DW: Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res* 105: 724–736, 2009

Haberland A, Knaus T, S. Zaitsev V, Stahn R, Mistry AR, Coutelle C, Haller H, Böttger M: Calcium ions as efficient cofactor of polycation-mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1445: 21–30, 1999

Haberland A, Knaus T, Zaitsev SV, Buchberger B, Lun A, Haller H, Böttger M: Histone H1-mediated transfection: serum inhibition can be overcome by Ca<sup>2+</sup> ions. *Pharm Res* 17: 229–235, 2000

Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M: Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346: 1185–1193, 2002

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M: Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118: 3132–3142, 2008

Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, Martinache C, Rieux-Laucat F, Latour S, Belohradsky BH, Leiva L, Sorensen R, Debré M, Casanova JL, Blanche S, Durandy A, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M: Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 363: 355–364, 2010

Haensler J, Szoka Jr FC: Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* 4: 372–379, 1993

Hakkarainen T, Kanerva A, Hemminki A: Adenovirukset syövän hoidossa. *Duodecim* 121: 2195–2203, 2005

Hanzlíková M, Soininen P, Lampela P, Männistö PT, Raasmaja A: The role of PEI structure and size in the PEI/liposome-mediated synergism of gene transfection. *Plasmid* 61: 15–21, 2009

Harvey B-G, Leopold PL, Hackett NR, Grasso TM, Williams PM, Tucker AL, Kaner RJ, Ferris B, Gonda I, Sweeney TD, Ramalingam R, Kovesdi I, Shak S, Crystal RG: Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 104:1245–1255, 1999

Harvie P, Wong FMP, Bally MB: Characterization of lipid DNA interactions. I. Destabilization of bound lipids and DNA dissociation. *Biophys J* 75: 1040–1051, 1998

Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivelä A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Närvänen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Laakso M, Ylä-Herttua S: 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: phase II results of the Kuopio angiogenesis trial (KAT). *Circulation* 107: 2677–2683, 2003

Hedman M, Hartikainen J, Ylä-Herttua S: Progress and prospects: hurdles to cardiovascular gene therapy clinical trials. *Gene Ther* 18: 743–749, 2011

Helminen M, Kainulainen L, Möttönen M, Heiskanen K, Ruuskanen O: Krooninen granulomatoosi. *Duodecim* 124: 790–795, 2008

Henry TD, Hirsch AT, Goldman J, Wang YL, Lips DL, McMillan WD, Duval S, Biggs TA, Keo HH: Safety of a non-viral plasmid-encoding dual isoforms of hepatocyte growth factor in critical limb ischemia patients: a phase I study. *Gene Ther* 18: 788–794, 2011

Herzog RW, Cao O, Srivastava A: Two decades of clinical gene therapy - success is finally mounting. *Discov Med* 45: 105–111, 2010

High KA: Gene therapy for haemophilia: a long and winding road. *J Thromb Haemost* 9 (Suppl 1): 2–11, 2011

den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP: Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27: 391–419, 2008

Horbinski C, Stachowiak MK, Higgins D, Finnegan SG: Polyethyleneimine-mediated transfection of cultured postmitotic neurons from rat sympathetic ganglia and adult human retina. *BMC Neurosci* 2: 2, 2001 (Epub)

Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE, Gooi HC, Goddard CA, Hannavy K, Smyth SE, Egan JJ, Sorgi FL, Huang L, Cuthbert AW, Evans MJ, Colledge WH, Higgins CF, Webb AK, Gill DR: Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 7: 1156–1165, 2000

Immonen A, Vapalahti M, Tyynelä K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, Langford G, Murray N, Ylä-Herttuala S: AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther* 10: 967–972, 2004

Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, Cappola TP, Pauly DF, Greenberg B, Borow K, Dittrich H, Zsebo KM, Hajjar RJ: Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail* 15: 171–181, 2009

Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Dittrich H, Hajjar RJ: Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 124: 304–313, 2011

Journal of Gene Medicine: Disease category: Infectious diseases 2011a. Haettu 2.10.2011 internetistä: <http://www.abedia.com/wiley/search.php>

Journal of Gene Medicine: Vectors used in gene therapy clinical trials 2011b. Haettu 20.11.2011 internetistä: <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>

Journal of Gene Medicine: Indications addressed by gene therapy clinical trials 2012. Haettu 11.2.2012 internetistä: <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>

Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3, 95ra73, 2011

Kang EM, Choi U, Theobald N, Linton G, Long Priel DA, Kuhns D, Malech HL: Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils. *Blood* 115: 783–791, 2010

Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, Bland RJ, Young D, Strybing K, Eidelberg D, Doring MJ: Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369: 2097–2105, 2007

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L: Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7: 33–40, 2001

Kay MA: State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* 12: 316–328, 2011

Kirn D, Niculescu-Duvaz I, Hallden G, Springer CJ: The emerging fields of suicide gene therapy and virotherapy. *Trends Mol Med* 8 (Suppl 4): S68–73, 2002

Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, Heiss LN, Lenarsky C, Crooks GM, Hanley ME, Annett G, Brooks JS, El-Khoureyi A, Lawrence K, Wells S, Moen RC, Bastian J, Williams-Herman DE, Elder M, Wara D, Bowen T, Hershfield MS, Mullen CA, Blaese RM, Parkman R: Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1: 1017–1023, 1995

Kuo J-H: Effect of Pluronic-block copolymers on the reduction of serum-mediated inhibition of gene transfer of polyethyleneimine-DNA complexes. *Biotechnol Appl Biochem* 37: 267–271, 2003

Lampela P, Räisänen J, Männistö PT, Ylä-Herttuala S, Raasmaja A: The use of low-molecular-weight PEIs as gene carriers in the monkey fibroblastoma and rabbit smooth muscle cell cultures. *J Gene Med* 4: 205–214, 2002

Lampela P, Elomaa M, Ruponen M, Urtti A, Männistö PT, Raasmaja A: Different synergistic roles of small polyethylenimine and Dospers in gene delivery. *J Control Release* 88: 173–183, 2003

Lampela P, Soininen P, Urtti A, Männistö PT, Raasmaja A: Synergism in gene delivery by small PEIs and three different nonviral vectors. *Int J Pharm* 270: 175–184, 2004

Lechardeur D, Lukacs GL: Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr Gene Ther* 2: 183–194, 2002

Ledley FD: Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 6: 1129–1144, 1995

Lee B, Davidson BL: Gene therapy grows into young adulthood: special review issue. *Hum Mol Genet* 20(R1): R1, 2011

Leung PSC, Dhirapong A, Wu P-Y, Tao M-H. Gene therapy in autoimmune diseases: challenges and opportunities. *Autoimmun Rev* 9: 170–174, 2010

Levine BL, Humeau LM, Boyer J, MacGregor RR, Rebello T, Lu X, Binder GK, Slepishkin V, Lemiale F, Mascola JR, Bushman FD, Dropulic B, June CH: Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17372–17377, 2006

LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, Siddiqui MS, Tatter SB, Schwalb JM, Poston KL, Henderson JM, Kurlan RM, Richard IH, Van Meter L, Sapan CV, Doring MJ, Kaplitt MG, Feigin A: AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* 10: 309–319, 2011

Li S, Huang L: Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* 7: 31–34, 2000

Li S, Tseng WC, Stolz DB, Wu SP, Watkins SC, Huang L: Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther* 6: 585–594, 1999

Liu F, Qi H, Huang L, Liu D: Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection *in vivo* via intravenous administration. *Gene Ther* 4: 517–523, 1997

Liu MM, Tuo J, Chan C-C: Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol* 95: 604–612, 2011

Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A: Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Phar Biopharm* 60: 247–266, 2005

Luoma J, Ylä-Herttuala S: Sydän- ja verisuonisairauksien geenihoido. *Suom Lääkäril* 54: 1809–1814, 1999

MacLahlan I, Cullis P, Graham RW: Progress towards a synthetic virus for systemic gene therapy. *Curr Opin Mol Ther* 1: 252–259, 1999

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace E, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma J-X, Redmond MT, Zhu X, Hauck B, Zeleniaia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright FJ, Volpe NJ, McDonnell J, Wellman, Auricchio A, High KA, Bennett J: Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2240–2248, 2008

Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ, Li F, Miller JA, DeCarlo E, Holland SM, Leitman SF, Carter CS, Butz RE, Read EJ, Fleisher TA, Schneiderman RD, Van Epps DE, Spratt SK, Maack CA, Rokovich JA, Cohen LK, Gallin JI: Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USAmerica* 94: 12133–12138, 1997

Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Jen Tai S, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DGB, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B: AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101: 2963–2972, 2003

Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA: Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12: 342–347, 2006

Marks WJ, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RAE., Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW, Bartus RT: Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* 7: 400–408, 2008

Marks WJ, Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, Vitek J, Stacy M, Turner D, Verhagen L, Bakay R, Watts R, Guthrie B, Jankovic J, Simpson R, Tagliati M, Alterman R, Stern M, Baltuch G, Starr PA, Larson PS, Ostrem JL, Nutt J, Kiebertz K, Kordower JH, Olanow CW: Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomized, controlled trial. *Lancet Neurol* 9: 1164–1172, 2010

Mease PJ, Wei N, Fudman EJ, Kivitz AJ, Schechtman J, Trapp RG, Hobbs KF, Greenwald M, Hou A, Bookbinder SA, Graham GE, Wiesenhutter CW, Willis L, Ruderman EM, Forstot JZ, Maricic MJ, Dao KH, Pritchard CH, Fiske DN, Burch FX, Malin Prupas H, Anklesaria P, Heald AE: Safety, tolerability, and clinical outcomes after intraarticular injection of a recombinant adeno-associated vector containing a tumor necrosis factor antagonist gene: results of a phase 1/2 study. *J Rheumatol* 37: 692–703, 2010

Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales-Quintero X, Kota J, Coley BD, Galloway G, Craenen JM, Lewis S, Malik V, Shilling C, Byrne BJ, Conlon T, Campbell KJ, Bremer WG, Viollet L, Walker CM, Sahenk Z, Clark KR: Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* 66: 290–297, 2009

Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Shilling C, Lewis S, Bowles D, Gray S, Li C, Galloway G, Malik V, Coley B, Reed Clark K, Li J, Xiao X, Samulski J, McPhee SW, Samulski RJ, Walker CM: Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 363: 1429–1437, 2010a

Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales XQ, Coley BD, Galloway G, Lewis S, Malik V, Shilling C, Byrne BJ, Conlon T, Campbell KJ, Bremer WG, Taylor LE, Flanigan KM, Gastier-Foster JM, Astbury C, Kota J, Sahenk Z, Walker CM, Clark KR: Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* 68: 629–638, 2010b

Mitchell P: Ark's gene therapy stumbles at the finish line. *Nat Biotechnol* 28: 183–184, 2010

Mitrović T: Gene Transfer Systems. *Facta Univ Ser Med Biol* 10: 101–105, 2003

Mochizuki H, Yasuda T, Mouradian MM: Advances in gene therapy for movement disorders. *Neurotherapeutics* 5: 260–269, 2008

Moret I, Esteban Peris J, Guillem VM, Benet M, Revert F, Dasi F, Crespo A, Alino SF: Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum. *J Control Release* 76: 169–181, 2001

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA: Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314: 126–129, 2006

Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, Mori K, Yang HS, Zack DJ, ETTYREDDY D, BROUGH DE, WEI LL, CAMPOCHIARO PA: Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 188: 253–263, 2001

Mortimer I, Tam P, MacLachlan I, Graham RW, Saravolac EG, Joshi PB: Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther* 6: 403–411, 1999

Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, Zeitlin PL, Waltz D, Milla C, Brody AS, Clancy JP, Ramsey B, Hamblett N, Heald AE: Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 125: 509–521, 2004

Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18: 1731–1735, 2010

Muul LM, Tuschong LM, Soenen SL, Jagadeesh GJ, Ramsey WJ, Long Z, Carter CS, Garabedian EK, Alleyne M, Brown M, Bernstein W, Schurman SH, Fleisher TA, Leitman SF, Dunbar CE, Blaese RM, Candotti F: Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for twelve years and immune reaction to gene transfer components: Long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 101: 2563–2569, 2003

Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, Ylä-Herttuala S: 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* 6: 127–133, 2002

Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Pratima Chowdhary BC, Riddell A, Jaquilmac Pie A, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CYC, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F,



High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM: Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 365: 2357–2365, 2011

Nienhuis AW: Development of gene therapy for blood disorders. *Blood* 111: 4431–4444, 2008

Oak Ridge National Laboratory: Gene therapy 2012. Haettu 11.2.2012 internetistä: [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/medicine/genetherapy.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml)

Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, Wagner E: PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 6: 595–605, 1999

Ohashi S, Kubo T, Ikeda T, Arai Y, Takahashi K, Hirasawa Y, Takigawa M, Satoh E, Imanishi J, Mazda O: Cationic polymer-mediated genetic transduction into cultured human chondrosarcoma-derived HCS-2/8 cells. *J Orthop Sci* 6: 75–81, 2001

Oku N, Yamazaki Y, Matsuura M, Sugiyama M, Hasegawa M, Nango M: A novel non-viral gene transfer system, polycation liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 52: 209–218, 2001

Onodera M, Ariga T, Kawamura N, Kobayashi I, Ohtsu M, Yamada M, Tame A, Furuta H, Okano M, Matsumoto S, Kotani H, McGarrity GJ, Blaese RM, Sakiyama Y: Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91: 30–36, 1998

Orion: Kliiniset tutkimukset 2012. Haettu 30.9.2012 internetistä: <http://www.orion.fi/Tutkimus-ja-tuotekehitys/Alkuperalaakkeiden-kehitys/Alkuvaiheen-kehitys/Kliiniset-tutkimukset/>

Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kühlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Lüthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M: Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVII, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12: 401–409, 2006

Oxford BioMedica: ProSavin® 2012a. Haettu 31.8.2012 internetistä: <http://www.oxfordbiomedica.co.uk/page.asp?pageid=29>

Oxford BioMedica: Discover the facts: ProSavin® 2012b. Haettu 31.8.2012 internetistä: [http://www.oxfordbiomedica.co.uk/userfiles/file/presentations/prosavin\\_fact\\_sheet.pdf](http://www.oxfordbiomedica.co.uk/userfiles/file/presentations/prosavin_fact_sheet.pdf)

Oxford BioMedica: Oxford BioMedica announces successful completion of ProSavin® phase I/II study in Parkinson disease – 16/04/2012 2012c. Haettu 1.10.2012 internetistä: <http://www.oxfordbiomedica.co.uk/page.asp?pageid=59&newsid=639>

- Palmer DH, Young LS, Mautner V: Cancer gene-therapy: clinical trials. *Trends Biotechnol* 24: 76–82, 2006
- Pechan P, Rubin H, Lukason M, Ardinger J, DuFresne E, Hauswirth WW, Wadsworth SC, Scaria A: Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. *Gene Ther* 16: 10–16, 2009
- Peng Z: Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* 16: 1016–1027, 2005
- Pelisek J, Gaedtke L, DeRouchey J, Walker GF, Nikol S, Wagner E: Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under *in vitro* conditions. *J Gene Med* 8: 186–197, 2006
- Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, Takeda S, Wilton SD, Wolff JA, Wooddell CI, Xiao X, Tremblay JP: Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther* 19: 830–840, 2011
- Pindolia KR, Wolf B: Candidate disorders for gene therapy: newborn screening facilitates ascertainment of presymptomatic individuals. *Hum Gene Ther* 19: 213–216, 2008
- Plank C, Mechtler K, Szoka FC Jr, Wagner E: Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther*, 7: 1437–1446, 1996
- Pollard H, Remy J-S, Loussouarn G, Demolombe S, Behr J-P, Escande D: Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 273: 7507–7511, 1998
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH: Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365:725–733, 2011
- Porteus MH, Connelly JP, Pruett SM: A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases. *PLoS Genet* 2: e133, 2006
- Powell JS, Ragni MV, White GC II, Lusher JM, Hillman-Wiseman C, Moon TE, Cole V, Ramanathan-Girish S, Roehl H, Sajjadi N, Jolly DJ, Hurst D: Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion. *Blood* 102: 2038–2045, 2003
- Prestwich RJ, Errington F, Harrington KJ, Pandha HS, Selby P, Melcher A: Oncolytic viruses: do they have a role in anti-cancer therapy? *Clin Med Oncol* 2: 83–96, 2008
- Promega: Transfection 2012. Haettu 14.2.2012 internetistä:  
<http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/>

Qiu X, Lu D, Zhou J, Wang J, Yang J, Meng P, Hsueh JL: Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients. *Chin Med J (Engl)* 109: 832–839, 1996

Rainov NG: A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* 11: 2389–2401, 2000

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066–1073, 1989

Romero NB, Braun S, Benveniste O, Leturcq F, Hogrel JY, Morris GE, Barois A, Eymard B, Payan C, Ortega V, Boch AL, Lejean L, Thioudellet C, Mourot B, Escot C, Choquel A, Recan D, Kaplan JC, Dickson G, Klatzmann D, Molinier-Frenckel V, Guillet JG, Squiban P, Herson S, Fardeau M: Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 15: 1065–1076, 2004

Rossi JJ, June CH, Kohn DB: Genetic therapies against HIV. *Nat Biotechnol* 25: 1444 – 1454, 2007

Roth DA, Tawa NE Jr, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF: Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med* 344:1735-1742, 2001

Russell SJ, Peng KW, Bell JC: Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30: 658–670, 2012

Räty JK, Pikkarainen JT, Wirth T, Ylä-Herttua S: Gene Therapy: The first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. *Curr Mol Pharmacol* 1: 13–23, 2008

Sah DW, Aronin N: Oligonucleotide therapeutic approaches for Huntington disease. *J Clin Invest* 121: 500-507, 2011

Sandmair A-M, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossilal M, Puranen M, Hurskainen H, Tyynelä K, Turunen M, Vanninen R, Lehtolainen P, Paljärvi L, Johansson R, Vapalahti M, Ylä-Herttua S: Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther* 11: 2197–2205, 2000

Sands MS, Davidson BL: Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther* 13: 839–849, 2006

Sari Y: Huntington's disease: from mutant huntingtin protein to neurotrophic factor therapy. *Int J Biomed Sci* 7: 89–100, 2011

Segal AW: The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today* 2: 129–135, 1996

Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 588–594, 1998

Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, Daniels G, Gonzalez R, Glaspy J, Whitman E, Harrington K, Goldsweig H, Marshall T, Love C, Coffin R, Nemunaitis JJ: Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor–encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 27:5763–5771, 2009

Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce EA, Mingozzi F, Bennicelli JL, Rossi S, Marshall K, Banfi S, Surace EM, Sun J, Redmond TM, Zhu X, Shindler KS, Ying GS, Ziviello C, Acerra C, Wright JF, McDonnell JW, High KA, Bennett J, Auricchio A: Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther* 18: 643–650, 2010

Sinn PL, Burnight ER, McCray PB Jr: Progress and prospects: prospects of repeated pulmonary administration of viral vectors. *Gene Ther* 16: 1059–1065, 2009

Small EJ, Carducci MA, Burke JM, Rodriguez R, Fong L, van Ummersen L, Yu DC, Aimi J, Ando D, Working P, Kirn D, Wilding G: A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther* 14: 107–117, 2006

Somia N, Verma M: Gene Therapy: Trials and Tribulations. *Nat Rev Genet* 1: 91–99, 2000

Stewart DJ, Kutryk MJ, Fitchett D, Freeman M, Camack N, Su Y, Della Siega A, Bilodeau L, Burton JR, Proulx G, Radhakrishnan S: VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol Ther* 17: 1109–1115, 2009

Swisher SG, Roth JA, Komaki R, Gu J, Lee JJ, Hicks M, Ro JY, Hong WK, Merritt JA, Ahrar K, Atkinson NE, Correa AM, Dolormente M, Dreiling L, El-Naggar AK, Fossella F, Francisco R, Glisson B, Grammer S, Herbst R, Huaranga A, Kemp B, Khuri FR, Kurie JM, Liao Z, McDonnell TJ, Morice R, Morello F, Munden R, Papadimitrakopoulou V, Pisters KM, Putnam JB Jr, Sarabia AJ, Shelton T, Stevens C, Shin DM, Smythe WR, Vaporciyan AA, Walsh GL, Yin M: Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin Cancer Res* 9: 93–101, 2003

Thornhill SI, Schambach A, Howe SJ, Ulaganathan M, Grassman E, Williams D, Schiedlmeier B, Sebire NJ, Gaspar HB, Kinnon C, Baum C, Thrasher AJ: Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Mol Ther* 16: 590–598, 2008

Thrasher AJ, Hacein-Bey-Abina S, Gaspar HB, Blanche S, Davies EG, Parsley K, Gilmour K, King D, Howe S, Sinclair J, Hue C, Carlier F, von Kalle C, de Saint Basile G, de Leist F, Fisher A, Cavazzana-Calvo M: Failure of SCID-X1 gene therapy in older patients. *Blood* 105: 4255–4257, 2005

Timonen T, Möttönen M, Nousiainen T, Herva R, Savolainen E-R: Gaucherin tauti. *Duodecim* 121: 2068–2076, 2005

Turku Clinical Research Centre: Kliininen lääketutkimus 2011. Haettu 16.10.2011 internetistä: <http://www.turkucrc.fi/?s=23>

Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, Hoi SU, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G., Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J: A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11: 551–555, 2005

Uherek C, Fominaya J, Wels W: A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J Biol Chem* 273: 8835–8841, 1998

Uil TG, Haisma HJ, Rots MG: Therapeutic modulation of endogenous gene function by agents with designed DNA-sequence specificities. *Nucleic Acids Res* 2003 1: 6064–6078, 2003

Vapalahti M, Puumalainen AM, Ylä-Herttua S: Geenihoidon lainsäädännölliset ja eettiset ongelmat. *Suom Lääkäril* 52: 2546–2549, 1997

Verma IM, Weitzman MD: Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74: 711–738, 2005

Viiala NO, Larsen SR, Rasko EJ: Gene therapy for hemophilia: clinical trials and technical tribulations. *Semin Thromb Hemost* 35: 81–92, 2009

Vinge LE, Raake PW, Koch WJ: Gene therapy in heart failure. *Circ Res* 102: 1458–1470, 2008

VIRxSYS: VIRxSYS' RNA immuno-therapy solution for HIV/AIDS 2012. Haettu 11.8.2012 internetistä: <http://www.virxsys.com/pages/human-therapies/hiv-rna-therapy.php>

Wehling P, Reinecke J, Baltzer AWA, Granrath M, Schulitz KP, Schultz C, Krauspe R, Whiteside TW, Elder E, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH: Clinical responses to

gene therapy in joints of two subjects with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 20: 97–101, 2009

Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E: Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery *in vitro* and *in vivo*. *J Gene Med* 3: 362–372, 2001

Wolff JA, Lederberg J: An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther* 5: 469–480, 1994

Worgall S, Sondhi D, Hackett N R, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, Dyke JP, Ballon D, Heier L, Greenwald BM, Christos P, Mazumdar M, Souweidane MM, Kaplitt MG, Crystal RG: Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther* 19: 463–474, 2008

Xu Y, Szoka FC Jr: Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35: 5616–5623, 1996

Yang J-P, Huang L: Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther* 4: 950–960, 1997

Yang Y, Walsh CE: Spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing. *Mol Ther* 12: 1006–1012, 2005

Yang ZJ, Xu SL, Chen B, Zhang SL, Zhang YL, Wei W, Ma DC, Wang LS, Zhu TB, Li CJ, Wang H, Cao KJ, Gao W, Huang J, Ma WZ, Wu ZZ: Hepatocyte growth factor plays a critical role in the regulation of cytokine production and induction of endothelial progenitor cell mobilization: a pilot gene therapy study in patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36: 790–796, 2009

Ylä-Herttua S, Ollikainen A, Vapalahti M: Ihmisen geeniterapia. *Duodecim* 112: 77–79, 1996

Ylä-Herttua S, Salo M: Periytyvien tautien hoito. Kirjassa: Perinnöllisyyslääketiede, s. 317–322. Toim. Aula P, Kääriäinen H, Palotie A. *Duodecim*, Hämeenlinna 2006

Ylä-Herttua S: Geenihoito. *Duodecim* 125: 1729–1739, 2009

Yu W, Fang H: Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 141–148, 2007

Yu S-F, Von Ruden T, Kantoff PW, Garber C, Seiberg M, Ruther U, Anderson WF, Wagner EF, Gilboa E: Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3194–3198, 1986

Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ: Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 270: 18997–19007, 1995

Zaric V, Weltin D, Erbacher P, Remy J-S, Behr J-P, Stephan D: Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J Gene Med* 6: 176–184, 2004

Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG, Szoka FC Jr: Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta* 1390: 119–133, 1998

Zuhorn IS, Visser WH, Bakowsky U, Engberts JBFN, Hoekstra D: Interference of serum with lipoplex-cell integration: modulation of intracellular processing. *Biochim Biophys Acta* 1560: 25–36, 2002