

Nya genterapier med CRISPR/Cas9

TEXT: Mia Olsson, Gentekniknämnden, mia.olsson@genteknik.se

Många genetiska sjukdomar som idag är obotliga orsakas av en liten förändring i en enda gen. Tänk om det skulle gå att korrigera eller stänga av den? Med utvecklandet av gentekniker som CRISPR/Cas9 kan det bli verklighet.

Genterapier tillhör gruppen avancerade läkemedel och används för att behandla genetiska sjukdomar. Gemensamt för alla genetiska sjukdomar är att de orsakas av mutationer, antingen nedärvda eller förvärvade. Ett exempel på det senare är olika typer av cancer.

Godkända genterapier

Vid den hittills vanligaste formen av **genterapi** förs en ny gen in i några av en patients cellkärnor med hjälp av ofarliga virus som kallas **virusvektorer**. Det kan liknas vid en organtransplantation där genen är det nya organet. På plats inne i cellkärnan översätts den nya genen till ett protein och kompenserar för den gen som producerar ett felaktigt protein och orsakar sjukdom.

En annan form av genterapi är CAR-T-cellterapi som används för att behandla cancer. Då utrustas T-celler, en typ av immunceller, med en ny gen som kodar för en ny **receptor** (CAR) på cellytan. Receptorn känner igen cancer-celler vilket leder till att T-cellerna angriper och dödar dessa.

Gemensamt för alla genterapier är att somatiska celler används, alltså celler som inte är könsceller (ägg och spermier). Den genetiska förändringen blir

därmed inte ärftlig utan påverkar bara den individ som får behandlingen. De flesta genterapier är också *ex vivo*-behandlingar. Det betyder att specifika målceller tas ut från patienten, modifieras i ett laboratorium och kontrolleras innan de återförs till kroppen. Vid *in vivo*-behandlingar modifieras celler istället direkt i kroppen. Det är en mycket ovanlig strategi eftersom det inte går att kontrollera modifieringen på samma sätt.

Sedan 1980-talet har forskare försökt utveckla genterapier. Det har varit en lång och skakig väg, inte minst eftersom det varit svårt att ta fram säkra virusvektorer. De senaste åren har det äntligen lossnat och antalet genterapier som godkänts har ökat. Idag finns tretton godkända genterapier inom EU varav nästan hälften godkänts under de senaste tre åren.

Gensaxar prövas

När gensaxen **CRISPR/Cas9** introducerades för knappt tio år sedan öppnades ett fönster till en ny typ av genterapi som baseras på **genomredigering**. Det betyder att befintligt DNA kan förändras utan att en ny gen tillförs. CRISPR/Cas9 är varken det första eller enda verktyget för

genomredigering men det är billigt, snabbt och flexibelt.

Med CRISPR/Cas9 kan forskare till exempel korrigera en mutation som orsakar sjukdom eller stänga av och aktivera gener. Ännu är ingen genterapi som baseras på CRISPR/Cas9 godkänd men över hundra testas just nu på patienter **i kliniska prövningar** runt om i världen. Ännu fler testas i prekliniska studier, det vill säga på celler och försöksdjur.

CRISPR/Cas9 består av två komponenter, enzymet Cas9 och ett **guide-RNA**. Cas9 är själva saxen som klipper itu DNA-spiralen och guide-RNA:t, som är konstruerat för att binda till en specifik DNA-sekvens, visar exakt var klippet ska ske. När cellens egna reparationsystem sedan lagar skadan uppstår ofta en mutation, eftersom lagningen sällan blir perfekt. Utöver att styra exakt var mutationen ska uppstå, via guide-RNA:t, kan forskare även påverka hur mutationen ska se ut genom att koppla en specifik reparationsmall till CRISPR/Cas9.

Läs artikeln "CRISPR – introduktion till en mycket uppmärksam metod" i *Fascinerande forskning*, som finns på Bioresurs webbplats.





”...VISST KÄNNS
DRÖMMEN INTE SÅ
OVERKLIG LÄNGRE?”

Röda blodkroppar från patient med sicklecellanemi.
FOTO: EM Unit, UCL Medical School, Royal Free Campus,
Wellcome Images, commons.wikimedia.org, CC BY 4.0

Patienter blev symtomfria

I den kliniska prövning med CRISPR/Cas9 som kommit längst testas en genterapi på patienter med sicklecellanemi och beta-thalassemi. Båda sjukdomarna orsakas av mutationer i en av de gener som behövs för att bilda hemoglobin. Hemoglobin finns i röda blodkroppar och transporterar syre från lungorna till resten av kroppen. Hos patienterna tillverkas hemoglobinet felaktigt vilket leder till blodbrist, blodproppar och syrebrist i delar av kroppen. Patienter med sicklecellanemi har dessutom skärformade röda blodkroppar. För att få tillgång till fungerande hemoglobin behöver de svårast sjuka regelbundna blodtransfusioner.

I den nydanande genterapin återaktiveras tillverkningen av så kallat fetalt hemoglobin. Fetalt hemoglobin fyller samma funktion som "vuxet" hemoglobin men har en något annorlunda sammansättning och binder syre till sig hårdare. Det fetala hemoglobinet bildas under fostertiden och ersätts av vanligt hemoglobin några månader efter födseln. Det betyder att det finns gener som kodar för fetalt hemoglobin som stängs av när proteinet inte behövs längre. Avstängningen sköts av ett reglerande protein som heter BCL11A. Tidigare studier har visat att fetalt hemoglobin kan kompensera för bristen på fungerande hemoglobin. Därför har forskare med hjälp av CRISPR/Cas9 inaktiverat en DNA-sekvens som gör att BCL11A hämmas, vilket resulterar i att tillverkningen av fetalt hemoglobin startas igen. Genterapin är en *ex vivo*-behandling och de celler som genomredigeras är blodstamceller som isolerats från patienten.

Den kliniska prövningen har pågått sedan 2018 och nu kan forskarna försiktigt dra slutsatser om behandlingens långtidseffekter. För 22 patienter har mer än tre månader passerat sedan de fick behand-

lingen, och för flera av dem mer än ett år. Hos samtliga tillverkas nu fetalt hemoglobin i mängder som fungerar kompensatoriskt och symtomen har avtagit. De här resultaten har kallats för "CRISPR's "magnificent moment" in the clinic" av den ansedda tidskriften Nature Biotechnology. Under året kommer företagen bakom genterapin att ansöka om ett marknadsgodkännande och den förväntas bli den första genomredigerande behandling som når patienter.

CRISPR/Cas9 direkt i kroppen

Förra året testades för första gången CRISPR/Cas9-baserade genterapier *in vivo*. En av dessa är utvecklad för en sjukdom som kallas Skelleftesjukan men har det mer vetenskapliga namnet ärftlig transtyretinamyloidos. Den sjukdomsalstrande mutationen finns i en gen som kodar för transtyretin, ett transportprotein som främst tillverkas av celler i levern. Hos personer som har mutationen tillverkas transtyretin felaktigt, klumpar ihop sig och lagras i kroppen. Dessa inlagringar skadar framför allt perifera nerver och hjärtmuskeln vilket ger symtom som känselbortfall, muskelförsvagning och rubbningar i hjärtrytm.

Strategin bakom genterapin är att med CRISPR/Cas9 stänga av genen för transtyretin i leverceller. För att nå till levern transporteras CRISPR/Cas9 av en **nanopartikel** som är designad för att ta sig in i leverceller. Fäst vid nanopartikeln sitter nämligen en molekyl som känns igen av mottagarproteiner på just levercellerna. När cellerna upptäcker molekylerna absorberar de nanopartikeln som omsluter CRISPR/Cas9.

En månad efter behandlingen hade transtyretinet i patienternas blod minskat. Det betyder att CRISPR/Cas9 hittat rätt och att forskarna lyckats stänga av tillverkningen i en del celler. Eftersom inlagringarna finns kvar kan patienterna inte bli symtomfria efter genterapin, men det progressiva sjukdomsförloppet förväntas avta.

Begreppet genterapi myntades 1971. Minst lika gammal är nog drömmen att kunna bota genetiska sjukdomar med hjälp av genteknik. Eftersom alla genterapier som ges idag har kommit i bruk under det senaste årtiondet går det ännu inte att säkert säga att de ger en livslång behandlingseffekt. Men visst känns drömmen inte så överklig längre?

Mer information och några referenser

Godkända genterapier, en sida på Gentekniknämndens webbplats: www.genteknik.se

Zipkin, M. (2019) CRISPR's "magnificent moment" in the clinic. *Nature Biotechnology News*, 6 december.

Gallagher, J. (2022) Sickle cell: The revolutionary gene-editing treatment that gave me new life'. *BBC News*, 20 februari.

För fler referenser, skriv till info@bioresurs.uu.se

CRISPR-redigerad tomat och fisk på marknaden i Japan

TEXT: Marie Nyman, Gentekniknämnden,
marie.nyman@genteknik.se

I maj 2021 lanserade ett japanskt uppstartsföretag en genomredigerad tomat i form av småplanter. Plantorna kunde beställas av hemmaodlare via en webbplats. Växten fick ett mycket positivt mottagande och själva frukterna började därför säljas i mitten av september.

Med CRISPR/Cas9 som verktyg har riktade mutationer skapats i tomatens arvs massa. Dessa resulterar i tomatfrukter med fem till sex gånger mer gammaaminosmörtsyra (GABA), än andra tomater. GABA påverkar många funktioner i växter men är även en signalsubstans i hjärnan. Tillskott av GABA sägs kunna sänka blodtrycket och göra en person mer avslappnad. GABA i form av kosttillskott och GABA-berikade livsmedel är mycket populärt i Japan.

Under oktober började genomredigerad fisk av arten **japansk rödbraxen** (*Pagrus major*, se bilden ovan) att säljas. En gen hos fisken som kodar för myostatin, som hämmar muskeltillväxt, har inaktiverats med CRISPR/Cas9, vilket resulterat i 20 procent mer muskelmassa. Motsvarande gen är inaktiverad i **belgisk blå**, ett framavlat nötkreatur med extra stora muskler.

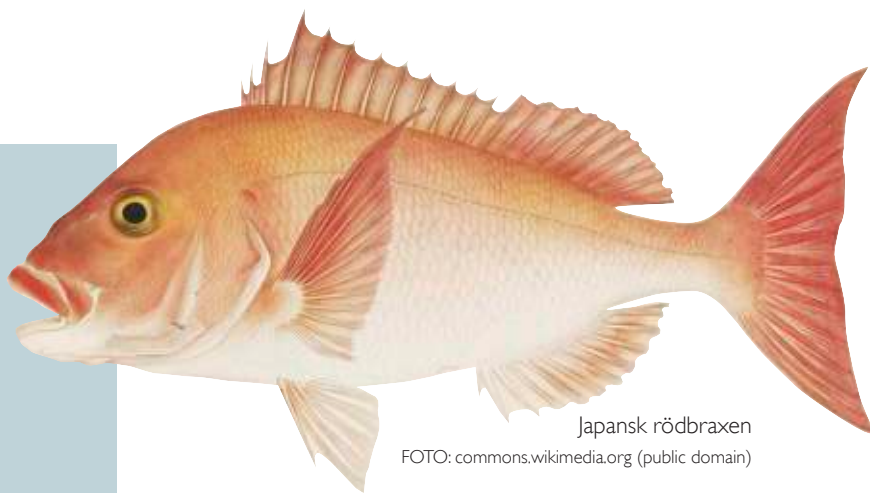
En månad senare började ytterligare en genomredigerad fisk att säljas, en **tiger puffer** (*Takifugu rubripes*). Hos denna har en gen som styr aptiten inaktiverats, vilket gör att fisken äter mer och därmed växer snabbare.

Fiskarna är de första genomredigerade djur som nått marknaden och tomaten är den första CRISPR-redigerade grödan som börjat säljas. En genomredigerad sojaböna finns sedan tidigare på marknaden, men i det fallet användes ett äldre verktyg, TALEN, för riktade mutationer i arvs massan.

Referenser

Waltz, E. (2021) GABA-enriched tomato is first CRISPR-edited food to enter market. *Nature Biotechnology News*, 14 december.

News in Brief (2021) Japan embraces CRISPR-edited fish. *Nature Biotechnology*, 40, 30 december.



Japansk rödbraxen

FOTO: commons.wikimedia.org (public domain)

ORDLISTA

- Cas** En förkortning av engelskans *CRISPR associated proteins*. En grupp enzymer som kan klippa DNA. Cas9 är det enzym som oftast används som enzym i CRISPR-baserade tekniker.
- CRISPR/Cas9** En genomredigerings teknik som bland annat kan användas för att inducera mutationer. Förkortningen CRISPR står för *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*. CRISPR/Cas9 är ett komplex bestående av Cas9 och ett guide-RNA.
- Genomredigering** En genteknik som möjliggör att inducera mutationer i arvs massan. De tekniker som används kallas populärt för gensaxar och inkluderar CRISPR/Cas9 och TALEN. Kallas även genredigering eller geneditering.
- Genterapi** En behandlingsform där patientens genetiska information eller hur det uttrycks förändras.
- Guide-RNA** I sammanhanget CRISPR/Cas9, en kort sekvens RNA som binder till ett specifikt ställe i arvs massan. Är designat för att visa var i sekvensen Cas9-enzymet ska klippa.
- Klinisk prövning** En undersökning på människor av ett läkemedels säkerhet och behandlingseffekt.
- Nanopartikel** En partikel vars storlek i diameter är i storleksordningen nanometer (en miljarddels meter). Tillräckligt små för att ta sig in och ut ur celler och kan därför nyttjas som transportörer av till exempel läkemedel.
- Receptor** Ett mottagarprotein på utsidan av eller inuti celler som tar emot och vidarebefordrar signaler.
- Virusvektor** Genetiskt modifierade virus som fungerar som transportörer av nytt genetiskt material vid genterapi. Kan ta sig in i celler och i cellkärnan men har modifierats så att de inte kan föröka sig inne i värdcellen och ska inte orsaka sjukdom. Kallas även virala vektorer.