

**UiT - Norges Arktiske Universitet**  
Det helsevitenskapelige fakultet

# **HIV terapi ved modifisering av CCR5-reseptoren i CD4+ T-celler med CRISPR-Cas9:**

*- Kan modifisering av CCR5-reseptoren i stamceller kurere HIV-infeksjon?*

—

**Håkon Brustad**

Masteroppgave MED-3950

Juni 2019

## Forord

Profesjonsstudiet i medisin ved UiT, Norges arktiske universitet, inneholder krav om å levere masteroppgave innen utgangen av 5. studieår. Med dette som utgangspunkt har jeg utført en litteraturstudie som tar stilling til om bruk av stamcelletransplantasjon kan kurere pasienter med humant immunsviktvirus (HIV). Studien belyser også hvilke metoder som best kan benyttes i klinisk praksis nå og i fremtiden. Tor Brynjar Stuge har vært veileder for oppgaven. Jeg har basert arbeidet på spesifikke spørsmålsstillinger som må besvares for å kunne dedusere en konklusjon på hovedproblemstillingen, som har fått tittelen «HIV terapi ved modifisering av CCR5-reseptoren i CD4+ T-celler med CRISPR-Cas9: Kan modifisering av CCR5-reseptoren i stamceller kurere HIV-infeksjon?».

Arbeidet med masteroppgave ble påbegynt allerede 3. studieår, hvor foreløpig problemstilling og studiemodell ble valgt. Store endringer har blitt gjort underveis. Min studie har i hovedsak blitt gjennomført i perioden august 2018 til mai 2019. Ut over litteratursøk, studier, refleksjoner og skrivearbeid har en viktig del av prosessen vært jevnlig møter med veileder for oppsummering, oppklaringer, drøftinger og rådgivning. Immunsystemet er svært komplekst, og deler av arbeidet har på grunn av dette vært intellektuelt utfordrende.

Jeg benytter anledningen til å takke Tor Brynjar Stuge. I tillegg til hans fremstående faglige kompetanse innen immunologi, har jeg verdsatt høyt hans menneskelige egenskaper som gjennomgående vennlig, tålmodig og pragmatisk orientert.

Tromsø, 03.06.19



Håkon Brustad

## Innholdsliste

Forord.....	2
Resymé.....	4
Introduksjon.....	5
Materialer og metode.....	8
Materialer og metode .....	8
Forkortelser/uttrykk som benyttes i oppgaven.....	8
Resultater.....	10
Er mennesker som har CD4+ T-celler uten funksjonell CCR5-reseptor resistente mot HIV?.....	10
Vil stamceller uten funksjonelt CCR5-uttrykk kunne gi opphav til et normalt fungerende immunsystem?.....	14
Vil HIV kunne overleve i en infisert pasient som ikke har fungerende CCR5 reseptorer? .....	16
Kan stamceller uten CCR5-uttrykk produseres? .....	21
Vil stamceller uten CCR5 uttrykk kunne gi opphav til friske CD4+ T-celler ved transplantasjon?.....	24
Kan modifisering av CCR5-reseptoren i CD4+ T-celler med CRISPR-Cas9-teknologi kurere en HIV-infeksjon ved hjelp av transplantasjon av CCR5 $\Delta$ 32-modifiserte stamceller? .....	26
Diskusjon .....	29
Konklusjon.....	32
Referanser.....	33
Appendix.....	37
GRADING av studiemateriale.....	37
Sammendrag av kunnskapsevalueringer av nøkkel-/hovedartikler på referanselisten ...	40

## Resymé

CCR5 er en kjemokinreseptor som uttrykkes på forskjellige typer hvite blodceller. Mennesker med homozygot mutasjon i CCR5-genet er resistente mot HIV-smitte. Distribusjonen av CCR5-mutasjoner i befolkningen er ca. 1% på verdensbasis og opptil 10% i populasjoner med europeisk opphav. En dysfunksjonell CCR5-reseptor medfører ingen kjente defekter i motstandsdyktighet mot infeksjoner eller økt susceptibilitet for autoimmune sykdommer. Imidlertid har det vist seg at personer med defekte CCR5-reseptorer får alvorligere sykdomsforløp ved *flavivirus*-infeksjoner enn personer med friske CCR5-reseptorer.

Stamcelletransplantasjon med CCR5 $\Delta$ 32-muterte stamceller kan kurere en HIV-infeksjon. Stamcellebehandling mot HIV-infeksjon er i dag mulig å gjennomføre som en allogen transplantasjon. To pasienter har blitt kurert for HIV-infeksjon gjennom en slik behandling. Begge pasientene har fått forbehandling med cytostatika, noe som tilrettelegger for et godt resultat ved aktivering av hvilende memoryceller med latent virus, utradering av infiserte T-celler og frigjøring av plass til nye T-cellepopulasjon fra donor. Medikamentell antiretroviral terapi (ART) har blitt gitt før, under og en avgrenset tidsperiode etter stamcellebehandlingen. Denne metoden vil være særdeles kostnadsbesparende sammenliknet med dagens førstevalg som er livslang medikamentell ART-behandling.

Nye metoder som kan gjøre stamcellebehandling mer tilgjengelig, mer effektiv, mer skånsom for pasientene og atpåtill mer kostnadsbesparende enn allogen transplantasjon er under utforskning. Særlig knyttes det håp til fremtidig autolog stamcellebehandling ved hjelp av CRISPR-Cas9-mediert ablasjon av CCR5-reseptoren, gjennom knock-out/knock-in modifikasjon av CCR5-genet. Særlig har induerte pluripotente stamceller (iPSC) vist seg spesielt egnet til denne teknikken, som antas å kunne utføres *in vivo* ved hjelp av virale vektorer i fremtiden.

## Introduksjon

Som det kausale agens som forårsaker ervervet immunsviktsyndrom (AIDS), har humant immunsviktvirus (HIV) stått bak en av historiens dødeligste epidemier. Det finnes flere ulike stammer av viruset, hvor HIV-1 (senere kun omtalt som «HIV») er den stammen som står bak den globale epidemien. I dag er HIV/AIDS er den sykdommen som på verdensbasis tar livet av flest unge voksne mennesker. HIV-infeksjon er påvist i alle land i verden. WHO har anslått at nær 37 millioner mennesker levde med HIV-infeksjon ved utgangen av 2017, og at i overkant av 50% av disse mottar effektiv antiretroviral behandling. HIV hadde ved utgangen av 2017 krevd 35 millioner menneskeliv. I 2017 døde 940 000 mennesker av HIV-relaterte årsaker globalt, og 1,8 millioner mennesker ble smittet for første gang i 2017. Sett i lys av at HIV-epidemien startet så sent som på begynnelsen av 1980-tallet og for første gang ble påvist i et menneske i 1982, er dette overveldende tall. På global basis er tuberkulose i dag den vanligste dødsårsaken for personer som lever med HIV, og regnes å stå bak 1 av 3 HIV-relaterte dødsfall. Antall personer som lever med sin HIV-infeksjon er økende, hovedsakelig på grunn av at stadig flere mottar terapi for sin HIV-infeksjon og på grunn av dette lever lengre med sykdommen.

I Norge viser tall fra Folkehelseinstituttet at det i 2017 ble diagnostisert 213 nye HIV-smittede. Sammenliknet med data fra tidligere år viser dette den laveste insidensen på 20 år. Etter toppåret i 2008 med 299 nye tilfelle observeres en klar synkende trend. Nedgangen ses i hovedsak blant heteroseksuelt smittede. Økt testaktivitet, kondombruk og flere HIV-smittede som mottar effektiv terapi er de viktigste forebyggende tiltakene. Totalt var det ved starten av 2017 diagnostisert 6 277 HIV-positive i Norge, 4260 menn og 2017 kvinner. De siste årene rapporteres rundt 20-30 tilfeller av AIDS. Totalt 618 personer er meldt døde av AIDS siden registreringen startet og fram til utgangen av 2012. Dødelighet av HIV-infeksjon er med andre ord fortsatt forhøyet, men tendensen er sterkt avtagende. (1),(2),(3)

Til tross for over 30 år med forskning for å finne en kur mot HIV-infeksjon, er HIV fortsatt en kronisk sykdom i dag. De første tilgjengelige medikamentelle behandlingene viste seg

dessverre å ha liten eller forbigående effekt. Zidovudin var det første medikamentet som viste seg å ha en viss effekt på HIV-infeksjon. Særlig nyttig var zidovudin-terapi som profylakse mot mor-barn-smitte under amming. Senere har det kommet flere antiretrovirale medikamenter (ARV) som har ulike angrepspunkt på viruset. Disse inndeles i tre hovedgrupper: reverstranskriptasehemmere, proteasehemmere og fusjonshemmere. I 1996 kom det som i ettertid må regnes som et terapeutisk gjennombrudd i HIV-behandling, nemlig bruk av kombinasjoner av minst tre ulike ARV sammen med målinger av behandlingseffekten ved HIV-RNA-kvantitering i blodplasma. Slik «combined antiretroviral therapy» (cART) har vist seg å gi god effekt med sterkt nedsatt virusreplikasjon og redusert grad av immunsvikt hos de aller fleste av HIV-smittede, og således ført til betydelig reduksjon i sykdom og død som følge av HIV-infeksjon i de land hvor denne terapien har vært tilgjengelig. De fleste HIV-pasienter kan derfor i dag leve et relativt normalt liv og er stort sett kun i behov av poliklinisk oppfølging. (4)

Til tross for betydelig fremgang gjenstår det fortsatt én sentral utfordring når det gjelder terapi mot HIV-infeksjon: dagens behandling kurerer ikke sykdommen, noe som medfører livslang terapi med daglig inntak av tabletter. Ettersom antiretrovirale medikamenter er relativt dyre, er HIV-behandlingen svært kostbar og derfor ikke tilgjengelig for flertallet av den smittede befolkningen. Tall fra USA anslår at en livslang behandling for en pasient kommer på \$379.000, tilsvarende 3.462.582,- kroner med dagens kurs (mai 2019). (5) På grunn av de høye kostnadene ved ARV-behandling, ses altså store forskjeller mellom behandlingen i den rike delen av verden hvor HIV-smittede pasienter har tilgang til moderne og svært dyre ARV-medisiner med betydelig større effekt og mindre alvorlige bivirkninger enn de medisinene som det ut fra økonomi er mulig å få tilgang til for det store flertallet av verdens mange millioner HIV-pasienter. Tatt i betraktning at det store flertallet av HIV-smittede på verdensbasis kommer fra fattige land, kan en stille spørsmål hvorvidt dagens HIV-behandling er tilstrekkelig og etisk holdbar. I lys av dette har det vært et mål for forskningen innen HIV-terapi å utvikle en permanent og relativt kostnadseffektiv metode som kan komme til gode for hele verdens HIV-smittede. Frem til i dag har det dessverre ikke kommet noe klart gjennombrudd i forskningen.

I 2009 ble imidlertid optimismen vekket etter at en HIV-smittet leukemi-pasient, den såkalte «Berlin-pasienten» ble den første, og frem til helt nylig den eneste, kjente pasient som har blitt fullstendig kurert for HIV-smitte. Denne pasienten, som i 1995 hadde fått diagnostisert HIV og etterhvert mottok cART-behandling, utviklet i 2007 akutt myeloid leukemi (AML). Pasienten ble som følge av dette satt på stamcellebehandling hvor han fikk to allogene hematopietiske celletransplantasjoner (HCT) fra et individ som var kjent bærer av en  $\Delta 32$ -mutasjon i CCR5-genet. Som en tilleggseffekt av leukemibehandlingen ble pasienten kurert for sin HIV-infeksjon. (6), (7), Gjennomføringen av denne behandlingen satte fart i forskningen rundt en kurativ HIV-terapi basert på stamcellebehandling med CCR5-mutasjon. Arbeidet med genetisk konstruksjon av et immunsystem som kan motstå HIV-infeksjon er i dag godt igang, og det har blant annet blitt gjort flere forsøk på å gjenskape den behandlingen som «Berlin-pasienten» fikk. Inntil april i år hadde det ikke latt seg gjøre å kurere andre pasienter med denne metoden, blant annet på grunn av utfordringer med å finne individer med stor grad av HLA-likhet i en begrenset populasjon av donorer. Derfor kan det ha vært et avgjørende gjennombrudd at klinikere i London i april 2019 kunne fastslå at en ny pasient hadde blitt kurert for HIV-smitte med transfusjon av CCR5 $\Delta 32$ -muterte hematopietiske stamceller. (8), (9)

Denne litteraturstudien er ment å belyse det teoretiske grunnlaget for en kurativ HIV-terapi ved stamcellemodifikasjon som gir CCR5 $\Delta 32$ -muterte stamceller. Studien belyser de ulike forutsetningene som må være på plass for å kunne gjennomføre en suksessfull kurativ behandling av HIV-infeksjon, og undersøker samtidig hvorvidt en slik kur er gjennomførbar med dagens teknologi.

## Materialer og metode

### ***Materialer og metode***

Etter at problemstilling ble definert, ble det i den første fasen drøftet hvilke spørsmål som måtte besvares for å kunne konkludere hvorvidt en kurativ HIV-terapi ved hjelp av stamcelletransplantasjon er mulig å gjennomføre som en standard kurativ terapi i klinikken. Drøftingen ledet frem til seks sentrale spørsmål, som dannet grunnlaget for hele kapitler i en besvarelse. Deretter ble det sett på hvilken metode som ville være best egnet til oppgaven, noe som førte til valg av litteraturstudie. Ut fra problemstillingene i hvert spørsmål ble det gjort litteratursøk i PubMed. I tillegg ble spesifikke søk gjort ved databasene til WHO, Folkehelseinstituttet samt ved ulike interesseorganisasjoner for HIV-smittede. Jeg har også søkt råd hos veileder i forhold til relevante kilder. Min studie er i hovedsak basert på observasjonsstudier av CD4+ T-cellepopulasjoner med og uten CCR5. Bruk av dobbelt blinding i slike studier gir ikke mening, og materialet har derfor i stor grad blitt vurdert ut fra metode, relevans og konsistens. Studiene som er lagt til grunn for dette arbeidet er tatt med i referanselisten. Hovedartiklene, som omhandler modifisering av stamceller, er formelt gradet og vedlagt i Appendix.

### ***Forkortelser/uttrykk som benyttes i oppgaven***

CCR5 kemokinreseptor type 5

HIV humant immunsviktvirus

ART, cART antiretroviral therapy, combined antiretroviral therapy

CRISPR clustered regularly interspaced short palindromic repeats

AIDS acquired immune deficiency syndrome

WHO world health organization

ARV antiretrovirale medisiner

AML Akutt myeloid leukemi

HCT hematopoietic cell transplant

CD4+ cluster of differentiation 4 positive

CXCR4 kemokinreseptor type 4

IDO indolamin



TALEN transcription activator-like effector nucleases

ZFN zinc finger nucleases

iPSC induced pluripotent stem cells

MHC major histocompatibility complex

HLA human leukocyte antigen

HiFi high fidelity

GVH graft versus host

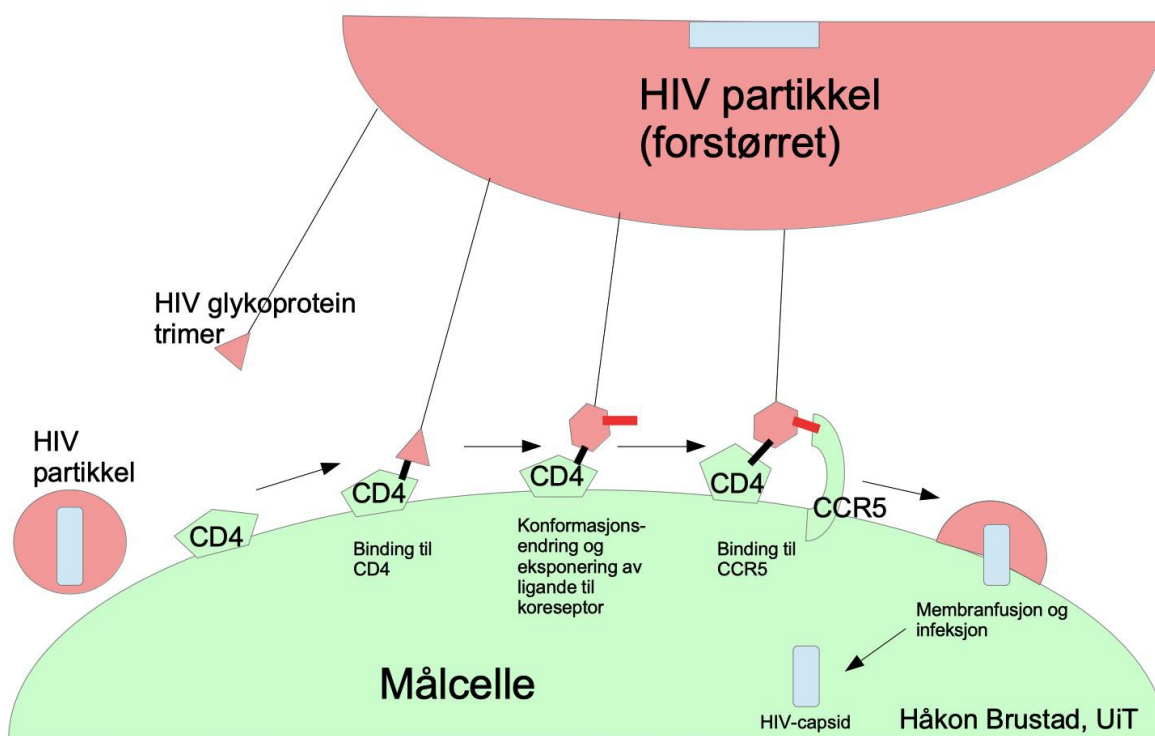
HSCT hematopoietic stem cell transplantation

## Resultater

### ***Er mennesker som har CD4+ T-celler uten funksjonell CCR5-reseptor resistente mot HIV?***

Infeksjon av HIV-virus krever en interaksjon mellom viruspartikkelen og to overflatecellereseptorer hos målcellen (CD4 positive T-celler). Hovedreseptoren for viral binding er overflatemarkøren CD4. Denne reseptoren er essensiell for immunforsvarets beskyttende funksjon mot patogener ved at binding til denne utløser igangsetting av det adaptive immunsystemet. Så snart en HIV-partikkel binder seg til en CD4-reseptor, gjennomgår HIV-partikkelens ligand/bindingssete en konformasjonsendring som muliggjør ko-binding til koreseptoren kemokinreseptor type 5 (heretter CCR5), se figur 1 under.

Figur 1 – Binding og membranfusjon av HIV-partikkel til en CD4+ T-celle.

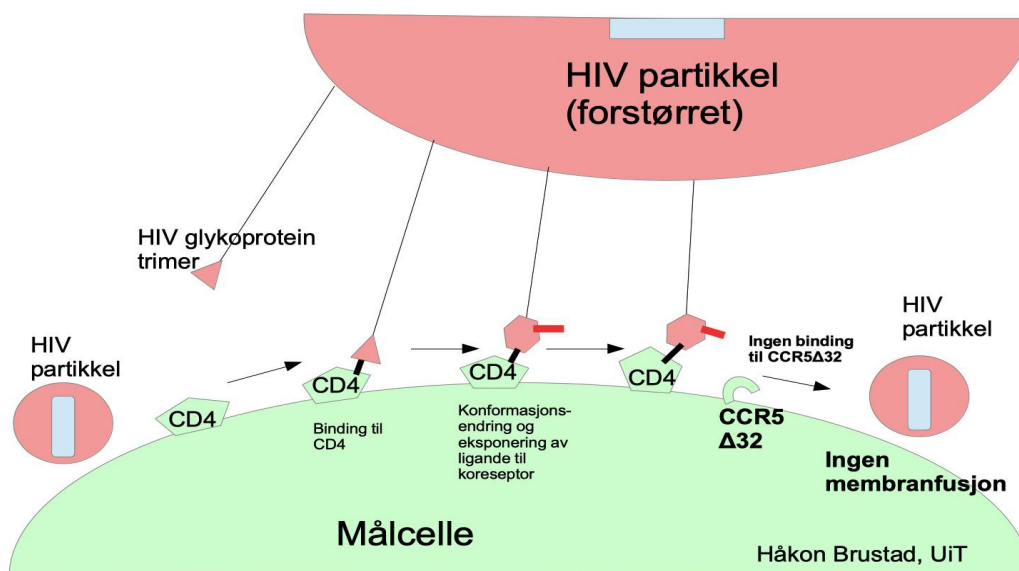


Figur 1. Figuren viser hvordan HIV-partikler interagerer med reseptorene på celleoverflaten av en CD4+ T-celle og etterhvert får introdusert sitt genetiske materiale til målcellen. HIV-partikkelens glykoprotein-ligand

interagerer først med CD4-reseptorer på T-celleoverflaten. Etter binding til CD4 undergår glykoprotein-liganden en konformasjonsendring slik at bindingsstedet til CCR5-koreseptoren eksponeres. CCR5-koreseptor bindes til liganden, og ved binding til både CD4-reseptoren og CCR5-reseptoren, utløses en ny konformasjonsendring som tillater membranfusjon mellom HIV-partikkelen og CD4<sup>+</sup> T-cellen. HIV-capsid, med virus-RNA og ulike proteiner, er nå inne i cellen og translokerer til cellekjernen hvor det virale genomet integreres med T-cellens DNA.

Det finnes to kjente koreseptorer som sammen med binding til CD4 fører til membranfusjon og påfølgende infeksjon av HIV-partikkelens genmateriale. CCR5 er den reseptoren som bindes ved en primær infeksjon av reseptor-5-tropiske HIV-virus som angitt i eksempelet over. Denne reseptoren, et 7-transmembran-protein, er en G-protein-mediert overflatereseptor som normalt antas å spille en rolle i T-cellenes inflammatoriske respons ved infeksjon. CCR5s eksakte funksjon i et normalt fungerende immunforsvar er enda ikke fullstendig kjent. En annen variant av den samme reseptoren er CXCR4 som er assosiert med mutasjoner i HIV-partikkelens bindende ligand, en endring som medfører hurtigere sykdomsprogresjon hos HIV-smittede. (10), (9), (11)

Etter oppdagelsen av CCR5 som den dominerende koreseptoren i HIV-infeksjoner, har reseptorens egenskaper og virkninger blitt belyst gjennom tallrike studier over hele verden. Et spesielt viktig funn var at metning av CCR5 koreseptoren ved tilførsel av små beta-kemokine molekyler gjorde T-cellene motstandsdyktige mot HIV-infeksjon av R5-tropiske virus. Denne oppdagelsen ledet til utvikling av såkalte «entry inhibitorer» som i dag er en egen subklasse av ART-medikamenter. (12) Et annet funn som har blitt viet stor interesse er virkningen av en spesiell type mutasjon i CCR5-genet som finnes i friske mennesker, den såkalte CCR5 $\Delta$ 32-mutasjonen, som gir dysfunksjonelle CCR5-reseptorer samtidig som immunsystemet eller virker å fungere tilnærmet normalt. T-celler som bærer to kopier av CCR5 $\Delta$ 32- genen får en delesjon av 32-nukleotider i koderegionen, noe som fører til en rammeskiftmutasjon som gir for tidlig stoppkode i transkripsjonen. Resultatet blir at CCR5 ikke uttrykkes som normalt på celleoverflaten, og CD4<sup>+</sup> T-celler blir derfor i praksis motstandsdyktige mot HIV-infeksjon, (13),(7) se figur 2 under.

Figur 2 – Immunitet mot HIV-infeksjon for CCR5 $\Delta$ 32-muterte CD4+Tceller

Figur 2. Figuren viser hvordan HIV-partikler gjennom mangelfull interaksjon med reseptorene på celleoverflaten av en CD4+ T-celle hindres i å få introdusert sitt genetiske materiale til målcellen. HIV-partikkelens glykoprotein-ligand interagerer først med CD4-reseptorer på T-celleoverflaten. Etter binding til CD4 undergår glykoprotein-liganden en konformasjonsendring slik at bindingsstedet til CCR5-koreseptoren eksponeres. En mutert CCR5-koreseptor har en konfoirmasjon som forhindrer uttrykk på celleoverflaten, og binding til både CD4-reseptoren og CCR5-reseptoren kan derfor ikke skje. Det utløses dermed ingen sekundær konformasjonsendring som tillater membranfusjon mellom HIV-partikkelen og CD4+ T-cellen, og T-cellen er dermed immun mot introduksjon av HIV-partikkelens genetiske materiale.

Opphavet til  $\Delta$ 32-mutasjonen er ikke eksakt kjent, men det antas at den har sitt utspring fra Nord-Europa. Rundt 2-5% av befolkningen i Europa, Midt-Østen og India er CCR5 $\Delta$ 32 homozygoter. (14)

Kunnskapen om CCR5-kobinding som et nødvendig mellomtrinn før membranfusjon, ble av tyske klinikere benyttet til å kurere en HIV-smittet pasient ved hjelp av stamcellebehandling med T-celler fra  $\Delta$ 32-muterte donorer hvis T-celler ikke uttrykker funksjonelle CCR5 på overflaten. Resultatet med suksessfylt CCR5-modifiseringsterapi i

et menneske er det første reelle gjennombruddet til nå i kampen mot HIV-epidemien, og bekrefter i stor grad CCR5s avgjørende rolle i HIV-partiklers infeksjonsmekanisme.

Det hersker i dag enighet om at 5-tropiske HIV-partikler, som er den vanligste varianten av HIV-partiklene, avhenger av kobinding til CCR5 for å infisere en CD4+ T-celle. Denne kunnskapen har vist seg å ha stor klinisk verdi gjennom å forhindre HIV-infeksjon ved å gjøre CCR5 utilgjengelig for virus-partikkelen. Medikamentell tilnærming med å mette reseptoren med CCR5-agonister har vist seg å ha en beskyttende effekt mot infeksjon, men dagens behandling er ikke kurativ og innebærer livslang daglig medikamentbruk. Medikamentene er i tillegg kostbare, noe som øker kostnadene ved medikamentell terapi rettet mot CCR5-reseptoren. Stamcellebehandling med CCR5-modifiserte stamceller har beviselig hatt en kurativ effekt mot HIV-smitte hos to pasienter, og kan representere en fremtidig kurativ behandlingsmetode som både senker total kostnadene og kan utrydde epidemien.

### ***Vil stamceller uten funksjonelt CCR5-uttrykk kunne gi opphav til et normalt fungerende immunsystem?***

Etter at immunitet mot 5-trofe HIV-partikler hos  $\Delta 32$ -homozygote ble kjent, har en kommet nærmere målet om en kurativ HIV-terapi. Det ville imidlertid vært betenkelig dersom en slik terapi skulle medføre at den behandlede blir utsatt for andre alvorlige sykdommer, noe som er bakgrunnen for at det har blitt utført en rekke studier som belyser hvorvidt en  $\Delta 32$ -mutasjon i CCR5 kan skape defekter i forhold til normalt fungerende immunitet hos  $\Delta 32$ -homozygoter.

CCR5 er en kemokinreseptor som finnes på flere typer immunceller, og bidrar i signaliseringen under inflammatorisk respons. En kan derfor tenke seg at en dysfunksjon i CCR5 kan ha både en positiv modulerende effekt ved immunmedierte og autoimmune sykdommer og en negativ reduserende effekt på immunrespons ved ulike typer infeksjoner.

I en finsk studie fra Universitetssykehuset i Tampa i 2004, hvor 89 MS-pasienter og en kontrollgruppe på 119 personer ble undersøkt for  $\Delta 32$ -homozygositet, ble det funnet at 6,7% av de syke hadde  $\Delta 32/\Delta 32$ -alleler mot kun 0,8% i kontrollgruppen.  $\Delta 32$ -homozygositet var hyppigere tilstede hos pasienter med primær progredierende type MS. Studien konkluderer med at CCR5-dysfunksjon kan predisponere for en kronisk utvikling av sykdommen. (15) Tilsvarende resultater ble funnet i en russisk studie fra 2002. (16) Flere andre studier har funnet at det *ikke* er økt frekvens av  $\Delta 32$ -homozygositet hos MS-pasienter. (17),(18) Mangelen på konsistens i resultater kan tyde på at det ikke er noen sterk sammenheng mellom progresjon av MS og dysfunksjonell CCR5.

En studie fra Storbritannia har undersøkt CCR5-hemming som profylakse mot kardiovaskulære sykdommer, ettersom dysfunksjonell CCR5 kan bremse det patofysiologiske bidraget fra immunceller. Studien konkluderer at CCR5 -dysfunksjon har en beskyttende effekt mot atherosklerose i dyremodeller, og anbefaler videre studier i menneskepopulasjoner. (19)

Sammenhengen mellom  $\Delta 32$ -homozygositet og astma samt atopi ble belyst i en engelsk

studie publisert i Lancet i 2000. I studien, hvor kjernefamilier på tilsammen 1284 personer - med og uten  $\Delta 32$ -homozygositet - ble undersøkt, ble det ikke funnet sammenheng mellom CCR5-dysfunksjon og astma eller atopi. (20) En ungarsk studie fra 2007 har funnet økt susceptibilitet for kronisk Mycoplasma-infeksjon hos barn med defekt CCR5. Samtidig ble det funnet at CCR5-dysfunksjon senker risikoen for utvikling av astma. (21)

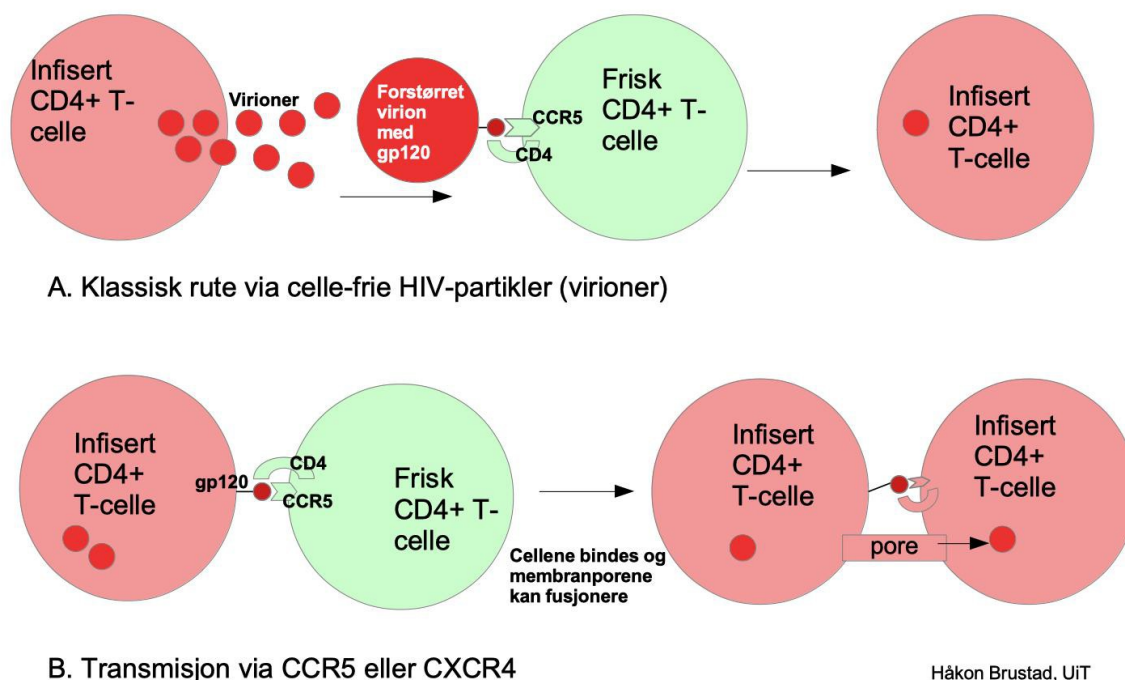
Når det gjelder beskyttelse mot infeksjoner er det god konsistens innen ulike studier som belyser dette aspektet. Det er særlig to faktorer som er interessant i denne sammenhengen, nemlig susceptibilitet for infeksjon og prognose ved infeksjon. Studier på dette området er i det vesentlige konsistente. Den eneste svakheten som til nå er påvist i immunforsvaret til CCR5 $\Delta 32$  homozygoter, er nedsatt evne til å håndtere *Flavivirus*-infeksjoner. CCR5 $\Delta 32$  homozygoter har ikke økt susceptibilitet for Flavavirusinfeksjoner, men det er påvist hurtigere sykdomsprogresjon og økt symptomtrykk hos smittede med dysfunksjonell CCR5. (22), (23)

Med den relativt høye forekomsten av  $\Delta 32$ -homozygositet i befolkningen (1/100), er det grunn til å anta at alvorlige konsekvenser av CCR5-dysfunksjon ville vært godt kjent. Hittil er det ingen studier av CCR5 $\Delta 32$  homozygoter som har klart å påvise uheldige innvirkninger på immunsystemet, med unntak av sykdomsutvikling under *Flavivirus*-infeksjoner. Det tilsynelatende fraværet av uheldige innvirkninger på immunsystemet gjør at CCR5 $\Delta 32$  kan anses som en benign mutasjon, og det var nettopp denne oppfatningen som ledet til beslutningen om å behandle Berlin-pasienten med med  $\Delta 32$ -muterte stamceller. Resultatet ble som kjent svært positivt for pasienten, og kan ha utgjort et gjennombrudd i forhold til kurativ behandling av HIV-infeksjon.

### **Vil HIV kunne overleve i en infisert pasient som ikke har fungerende CCR5 reseptorer?**

Det finnes to måter propagering av HIV mellom T-celler kan foregå: infeksjon av HIV-partikler i form av cellefrie virioner (som tidligere illustrert i figur 1) eller ved direkte celle-til-celle transmisjon. Gjennom direkte transmisjon mellom CD4+ T-celler sperrer viruset sitt genmateriale nokså direkte, og unngår dermed ekstracellulære hindringer på veien. Denne mekanismen er derfor en både hurtigere og mer effektiv spredningsmekanisme enn virion-mediert infeksjon. Transmisjon krever, på samme måte som virion-mediert infeksjon, kobinding til CCR5, noe som resulterer i at porer i celleoverflatene fusjonerer og skaper en inngang for HIV-partikler, se figur 3 under. (24)

Figur 3 – HIV-propagering i CD4+ T-celler



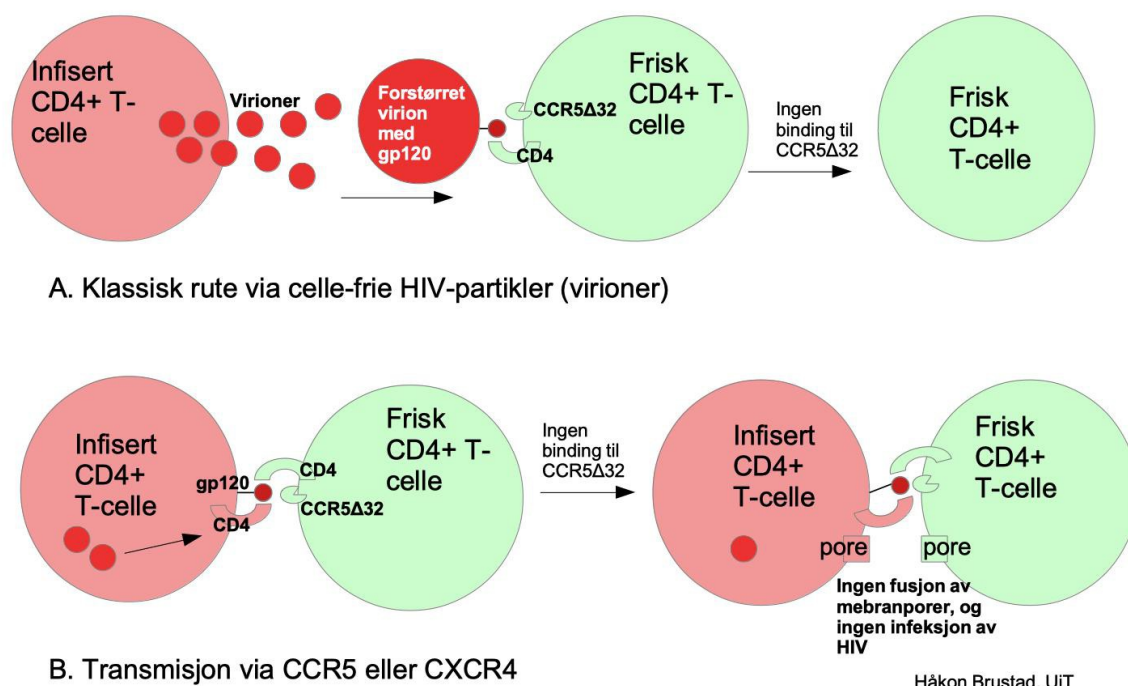
Figur 3 - To mekanismer for HIV propagering. (A) Klassisk rute via cellefrie partikler, hvor propagering skjer via binding av HIV-partikkelens glykoprotein til målcellens CD4 og CCR5 (eller CXCR4) med påfølgende membranfusjon, intracellulær tilgang og viral replikasjon. (B) Celle-til-celle transmisjon. En



HIV-infisert CD4+T celle, som presenterer Glykoprotein120 fra HIV-virionet, binder til CD4/CCR5 med påfølgende membranfusjon. Infeksjon skjer uten behov for ekstracellulært utslipp av virioner, noe som medfører en beskyttet og effektiv transmisjon mellom det intracellulære miljøet i to celler.

Som illustrert over, er HIV avhengig av funksjonelle CCR5 (eller CXCR4) for å kunne videreføre sitt arvemateriale til nye celler etter at infeksjonen har funnet sted. En dysfungerende CCR5, som ved en mutasjon i CCR5 $\Delta$ 32, vil derfor hindre HIV i å infisere nye celler. Når muligheten for transmisjon er utelukket, gjenstår kun to måter som viruset kan opprettholde seg selv på: enten kunne lagre sitt arvemateriale i beskyttede omgivelser eller ved å øke proliferasjonen av de allerede infiserte T-cellene.

Figur 4 – CCR5 $\Delta$ 32-immunitet mot transmisjon



Figur 4 - CCR5 $\Delta$ 32-immunitet mot transmisjon. (A) Klassisk rute via cellefrie partikler, hvor propagering forhindres ved manglende kobinding til målcellens dysfunksjonelle CCR5. Dermed forhindres påfølgende membranfusjon, intracellulær tilgang og viral replikasjon. (B) Celle-til-celle transmisjon. Manglende binding til CCR5 forhindrer direkte transmisjon gjennom fusjon av membranporer.

For å øke proliferasjonsraten, må HIV-viruset overkomme noen barrierer. Det er kjent at HIV-infiserte CD4<sup>+</sup> celler sekreterer det immunsupprimerende enzymet *Indolamin-2,3-oksigenase* (IDO), noe som på generell basis vil redusere proliferasjonsfrekvensen. For pasienter som mottar behandling med ART, er studier entydige på at proliferativ ratio (proliferasjon/ celledød) i HIV-infiserte CD4<sup>+</sup> T-celler er under 1. (25),(26),(27) Det er imidlertid kjent at antallet infiserte CD4<sup>+</sup> T-celler øker etter en viss tid dersom ART-behandling avsluttes. En studie fra USA har undersøkt hvorvidt forverring etter avsluttet ART skyldes proliferasjon av smittede celler eller om det skyldes aktivering av latent virus i memoryceller. Studien konkluderer at proliferasjon er hovedårsaken til oppbluss. (28)

Gjennom latenstilstand i langlivede memoryceller, kan HIV sannsynligvis holde seg selv i

live selv i et miljø dominert av CCR5 $\Delta$ 32-muterte CD4<sup>+</sup>-celler. T memoryceller uttrykker ikke infeksjons- markører på celleoverflaten når latenstilstand foreligger, og slik kan en infeksjon ligge skjult inni cellen i opptil flere tiår. (29) Latent HIV-virus i langlivede CD4<sup>+</sup> T-memory-celler kan deretter når som helst aktiveres, noe som kan bidra til at infeksjon kan gjenoppstå etter mange år uten påvisbar virusload hos pasienter med native CD4<sup>+</sup> T-celler som er under ART-behandling.

Det er altså ingen tvil om at viruset har mekanismer som sikrer overlevelse selv under vanskelige vilkår. Spørsmålet blir da hvor stor andel av gjenværende native T-celler som kan tolereres for suksessfull behandling med CCR5-defekte stamceller. Det er kjent at transplanterte CCR5 $\Delta$ 32-modifiserte T-celler både har lang gjennomsnittlig levetid og har saktere dødsrate enn native T-celler i en HIV-smittet pasient. (30) Spørsmålet er derfor om en stor nok CCR5 $\Delta$ 32-populasjon med tiden fullstendig vil erstatte den native populasjonen? Cytotoksisk forbehandling vil legge ytterligere til rette ved å drepe store deler av den native HIV-susceptible T-cellepopulasjonen før en stamcelletransplantasjon. Den nylige gjenskapelsen av Berlin-pasientens suksessfulle kurative behandling i London, hvor også denne pasienten mottok cytotoksisk behandling, gir en tydelig pekepinn på at den native T-cellepopulasjonen til en viss grad må utryddes for å oppnå en vellykket kurativ behandling med stamcelletransplantasjon. Dette er ikke overraskende med tanke på at en cytotoksisk kur legger til rette for godt resultat av en kurativ behandling gjennom tre viktige funksjoner – å gjøre plass til nye T-celler, å drepe infiserte T-celler som i neste trinn vil aktivere memoryceller som har latent virus og dermed gjøre disse synlig for immunforsvaret.

Det ser altså ut til at introduksjon av en viss mengde CCR5 $\Delta$ 32-CD4<sup>+</sup> progenitorer gjennom for eksempel stamcelletransplantasjon, vil medføre at friske CCR5 $\Delta$ 32-CD4<sup>+</sup> T-celler overtar og at alle HIV-infiserte celler med tiden dør ut gjennom cellenes naturlige livsløp. Det er kjent at T-cellers levetid varierer fra dager til måneder og opp til flere år alt etter subtype og hvilke signaler cellen mottar, og en modell for kurativ terapi må ta hensyn til dette. Sannsynligvis må store deler av den native T-cellepopulasjonen utradere før transfusjon. Grunnprinsippet er uansett klart: Såfremt populasjonen med CCR5 $\Delta$ 32-CD4<sup>+</sup> T-celler er stor nok i forhold til populasjonen med infiserte CD4<sup>+</sup> T-celler, skal HIV-

immune T-celler overta og fullstendig utradere HIV-viruset gjennom både immun-mediert og naturlig celledød.

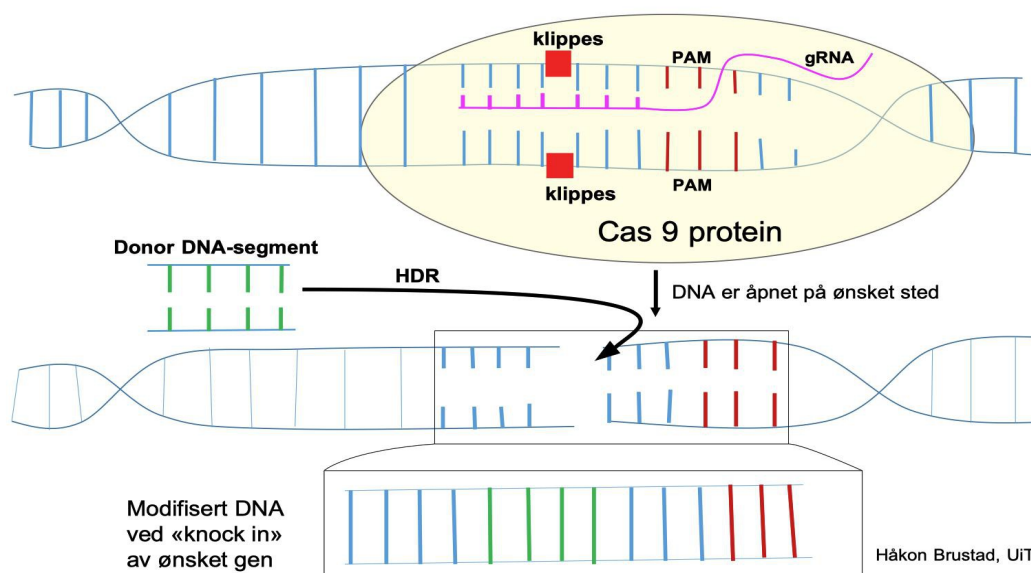
Ut fra det en kjenner om HIV-virusets angreps-, overlevelses- og spredningsmekanismer, kombinert med kunnskapen om CCR5 $\Delta$ 32-homozygotes immunitet mot viruset, kan det slås fast at man allerede har en modell for kurativ terapi mot HIV ved hematopoietisk stamcellebehandling med CCR5 $\Delta$ 32-muterte celler. To uavhengige behandlinger etter denne modellen, i Berlin i 2009 og i London i 2019 viser at de teoretiske prinsippene er gjennomførbare i klinikken. Dette belyses og senere drøftes mer detaljert i de kommende kapitler.

### **Kan stamceller uten CCR5-uttrykk produseres?**

Med tanke på det store antallet mennesker som er bærere av HIV, vil det kreves en enorm tilgang til CCR5 $\Delta$ 32-muterte stamceller for å kunne gi behandling til et stort nok antall HIV-pasienter for at epidemien skal dø ut. Til tross for at antallet potensielle CCR5 $\Delta$ 32-donor er relativt høyt med ca. 1 av 100 i befolkningen, høyere enn antall HIV-smittede, vil det være vanskelig å skaffe tilstrekkelig med stamceller for å kunne behandle alle. Hovedårsaken til dette er utfordringer knyttet til immunologisk uforlikelighet mellom donor og mottaker, noe som medfører større eller mindre grad av graft-versus-host reaksjon (GVH), som potensielt kan være dødelig. Tilstrekkelig grad av HLA-likhet vil være umulig å finne for alle transplantasjonstrengende, og det vil derfor være behov for andre kilder til CCR5 $\Delta$ 32-muterte stamceller om en skal ta sikte på å behandle den store massen med HIV-smittede.

Gjennom studier av adaptiv immunitet i bakterier og arkebakterier er det funnet et system som har vist seg å ha stor anvendbarhet innenfor bioteknologisk bruk. Oppdagelsen av CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) og det bakterielle enzymet Cas9, som kan åpne et DNA-kjede på en manipulerbar spesifikk rekkefølge av basepar, var et revolusjonerende funn med tanke på muligheten for å designe mutasjoner *in vivo* med full HLA- forlikelighet. I tillegg har metoden vist seg å være langt mer effektiv enn tidligere teknikker som transcription activator-like effector nucleases (TALEN) og zinc finger nucleases (ZFN). Funnet av Cas9-enzymet ledet til utviklingen av CRISPR-Cas9-teknologien for både «knock in» og «knock out» av spesifikke gener. CRISPR-Cas9-systemet består av en RNA-tråd som guider enzymet til ønsket plass på genomet (gRNA) samt Cas9-enzymet som splitter baseparene i det området hvor det ønskes en endring. (31),(32),(33) Figur 5 under illustrerer hvordan en «knock in»-manipulasjon av et genom utføres ved CRISPR-Cas9-teknologi.

Figur 5 – CRISPR-Cas9-modifisering av DNA



Figur 5 – «Knock in» DNA-modifisering ved CRISPR-Cas9-teknologi. Et Cas9-protein med et tilpasset guide-RNA-segment (gRNA) som skal matche den ønskede basepar-sekvensen kjenner først igjen en bestemt sekvens, PAM (protospacer adjacent motif), før Cas9 klipper på et bestemt antall nukleotider (ofte 3-4 nukleotider) bortenfor PAM. Deretter transfekteres det ønskede DNA-segmentet som i hver ende er designet til å matche sekvensen rundt helix-åpningen. Påfølgende HDR (homology direct repair), som er en naturlig prosess, besørger at det nye segmentet inkorporeres i det reparerte DNAet og slutfører transfeksjonen.

Med CRISPR-Cas9-teknologi kan man i utgangspunktet ta ut og/eller sette inn DNA-segmenter etter ønske in vivo, og på denne måten endre genuttrykket til cellene. CRISPR-Cas9 har et tilnærmet ubegrenset potensiale som terapeutisk verktøy for behandling av en hel rekke sykdomstilstander som har en arvelig komponent. Metoden har riktignok vært gjenstand for kontroverser og forbud i flere land, men da i forbindelse med manipulasjon av genmateriale i reproduksjonsceller. CRISPR-Cas9 er imidlertid tillatt i arbeid med somatiske celler. Med denne metoden vil man relativt enkelt kunne skape et reservoar av stamceller med  $\Delta 32$ -mutasjon i CCR5, og en har på denne måten tilgang til alle nødvendige verktøy for å starte opp en kurativ stamcellebehandling av HIV-smittede. Kang og medarbeidere har vist at CRISPR-Cas9-modifisering av induerte pluripotente

stamceller (iPSC), pluripotente stamceller som ikke er embryonale og kan produseres fra enhver persons egne hudceller, ved hjelp av dobbel gRNA er en relativt effektiv metode for å produsere homozygote CCR5 $\Delta$ 32-muterte pluripotente stamceller på. I den samme studien ble det forsøkt påvist off-target mutasjoner, uten at dette kunne påvises ved hjelp av den metoden de brukte. (13) Resultatene forteller at det er fullt mulig å produsere autologe iPSC fra hudceller *ex vivo* til enhver person som måtte være i behov av stamcellebehandling. En stor fordel med å bruke iPSC er at disse har vist seg å vokse svært enkelt samtidig som de tåler ulike behandlinger godt. Dermed kan vellykkede mutasjoner rendyrkes ved kloning. Med denne muligheten trenger en ikke bekymre seg for off-site mutasjoner fra CRISPR-Cas9-enzymet, da kvalitetssjekk utføres før kloning.

Qi og medarbeidere har studert modifisering av både Jurkat CD4<sup>+</sup> T-celler og primære CD4<sup>+</sup> T-celler ved CRISPR-Cas9. Resultatene viser at teknikken er effektiv og forholdsvis enkel, men foreløpig ikke egner seg til bruk på primære CD4<sup>+</sup> T-celler grunnet lavere frekvens med CCR5 $\Delta$ 32-mutasjoner samt manglende suksess i å isolere monoklonale primære CD4<sup>+</sup>-celler. (34)

En generell bekymring med CRISPR-Cas9-metoden er at enzymkomplekset ikke opererer feilfritt og dermed kan skape mutasjoner på uønskede lokasjoner i et gen. Relativt høy rate av off-target mutasjoner på opptil 50% er funnet i flere studier *ex vivo*. In vivo studier med dyremodeller rapporterer imidlertid om off-target frekvens på under 1%. (35) Off-target aktivitet medfører at metoden har et skadepotensiale med høy alvorlighetsgrad, og det er derfor behov for kvalitetssikring før metoden kan tas i bruk på hematopoietiske stamceller i mennesker. Bred forskning på forbedrende modifikasjoner av enzymkomplekset pågår i dag, med lovende resultater. Kang og medarbeidere har vist at bruk av dobbel gRNA i enzymkomplekset forbedrer både presisjon og effektivitet. (13) Teknikken er under stadig forbedring, med blant annet «HiFi-CRISPR-Cas9» og «CRISPR-Cas9/anti-CRISPR» som nye varianter av CRISPR-Cas9 med lovende forbedringer i spesifisitet.

### **Vil stamceller uten CCR5 uttrykk kunne gi opphav til friske CD4+ T-celler ved transplantasjon?**

Ved transplantasjon av stamceller kan man sette inn friske celler fra en donor - en allogene stamcelletransplantasjon - eller så kan pasientens egne stamceller tas ut og settes inn igjen etter å ha blitt behandlet – en autolog transplantasjon. Førstnevnte er godt utprøvd i klinikken ved behandling av blodsykdommer som leukemi. Ved en allogene transplantasjon får man en viss grad av HLA-uforlikelighet, noe som ved organtransplantasjoner er en svakhet på grunn av avstøtning. Imidlertid kan avstøtning være til fordel ved behandling av blodsykdommer ved at donorens friske leukocytter angriper vertens syke populasjon. Verten vil på denne måten også utvikle dendrittiske celler og makrofager som har donorens HLA, og med tiden vil derfor donorens friske immunceller fullstendig utradere vertens syke og populære pasienten. Det er denne teknikken som ble brukt i de to vellykkede behandlingene av HIV-pasienter i Berlin i 2009 og London i 2019. Ved en allogene stamcelletransplantasjon benyttes vertens egne stamceller. Metoden går ut på å ta ut friske stamceller fra verten, modifisere disse og deretter sette de inn igjen i verten. Modifiseringen kan foregå *in vivo* når en effektiv og fullstendig presis teknikk er utviklet. Fordelen med denne teknikken er at det oppnås full HLA-forlikelighet, noe som er spesielt viktig for å unngå avstøtning eller behov for langvarig bruk av immundempende medikamenter. Ulempen med autologe transplantasjoner ut fra dagens teknikker er at det har vist seg vanskelig å holde stamcellenepopulasjonene oppe etter uttak og modifikasjon. Nye teknikker med bruk av såkalte induerte pluripotente stamceller gir imidlertid håp med tanke på enkle og sikre metoder for autologe stamcellebehandlinger i fremtiden. En av disse teknikkene er CRISPR-Cas9-modifikasjon som ble omtalt i forrige kapittel («Kan stamceller uten CCR5-uttrykk produseres?»). Induserte pluripotente stamceller er spesialiserte celler, ofte hudceller, som har blitt modifisert til å ha nøyaktig samme egenskapene som embryonale pluripotente stamceller, noe som gjør disse stamcellene fullt fleksible i forhold til spesialisering. Slike stamceller er i tillegg relativt robuste og har vist seg å både tåle behandling samt å være nokså enkle å klonere. (13)

Som tidligere gjennomgått, er teknologien som skal til for å skape CD4+ T-celler med mutasjon i CCR5 $\Delta$ 32 allerede tilgjengelig gjennom CRISPR-Cas9 knock in/knock out. Fra



tidligere studier av T-cellepopulasjoner i etterkant av transplantasjon med hematopoietiske stamceller til pasienter med autoimmune sykdommer, er det kjent at T-cellerpopulasjonen tar seg relativt fort opp etter inngrepet. (36) Det store spørsmålet er derfor om CCR5 $\Delta$ 32-muterte stamceller vil utvikle seg til friske CD4+ T-celler. Dyremodeller av transfeksjon av CCR5 $\Delta$ 32-plasmid i autologe celler er helt konsistente i forhold til dette spørsmålet: Inngrepet gir opphav til friske CCR5 $\Delta$ 32 T-celler. I en studie fra England ble det funnet at gjennomsnittlig halveringstid for CCR5 $\Delta$ 32-muterte T-celler med opphav fra modifiserte stamceller var 48 uker. Videre ble det funnet at daglig tap av CCR5 $\Delta$ 32-muterte T-celler med opphav fra modifiserte stamceller var 1,81 mot 7,25 umodifiserte T-celler. (30) Resultatene levner med andre ord ingen tvil om at CCR5 $\Delta$ 32-modifisering av stamceller resulterer i en frisk T-celle-populasjon med fungerende modifikasjon.

Etter de to vellykkede kurative behandlingene av «Berlin-pasienten» og «London-pasienten» kommer ikke dette som noen overraskelse. Det er ikke lenger tvil om transplantasjon av CCR5-dysfunksjonelle stamceller gir friske CD4+ T-celler. Med to uavhengige suksessfulle kurative behandlinger med stamcelletransplantasjon, er det i realiteten påvist at innførsel av stamceller uten CCR5 uttrykk kan gi friske CD4+ T-celler. Enda viktigere er det at de to tilfellene har bevist at det finnes en kurativ behandling av HIV med dagens tilgjengelige metoder, noe som belyses i det kommende kapitlet.

### **Kan modifisering av CCR5-reseptoren i CD4+ T-celler med CRISPR-Cas9-teknologi kurere en HIV-infeksjon ved hjelp av transplantasjon av CCR5 $\Delta$ 32-modifiserte stamceller?**

Etter de to vellykkede kurative behandlingene av «Berlin-pasienten» og «London-pasienten» er det ikke lenger tvil om transplantasjon av CCR5-dysfunksjonelle stamceller kan kurere sykdommen. Imidlertid er det enkelte spørsmål som gjenstår å besvare før man har funnet en generell anvendelig prosedyre på kurativ terapi mot HIV-infeksjon. For det første, vil det sannsynligvis være behov for å inkludere en cytotoksisk forbehandling for å oppnå kurativt resultat av stamcelle-transfeksjon med CCR5 $\Delta$ 32. Med tanke på at de to eneste behandlingene som har gitt kurativt resultat har vært utført i etterkant av cytotoksisk forbehandling, er det grunn til å tro at utradering av native T-celler er et nødvendig trinn for å oppnå et kurativt resultat. En slik forbehandling har et særdeles viktig hovedformål, nemlig å frigjøre plass til de modifiserte stamcellene som skal innsettes. I tillegg vil denne forbehandlingen ha en viktig bieffekt ved at infiserte hvilende T-celler reduseres i antall. På denne måten reduseres risikoen for gjenoppbluss av HIV-infiserte celler gjennom proliferasjon av for eksempel T-memoryceller med latent virus.

Videre er det helt sentralt at man finner en metode for transplantasjon som er både sikker og effektiv samtidig som den er kostnadsbesparende sammenliknet med dagens behandling. I tillegg til dette må tilgjengeligheten være god nok. En utfordring her kan være tilgang til materiale, altså HLA-forlikelige stamceller. Nye teknikker, som for eksempel modifisering av iPSC medfører muligheter for effektiv CRISPR-Cas9-mediert produksjon av fullt HLA-forlikelige stamceller som etter selektering og kloning er renset for off target mutasjoner. Med CRISPR-Cas9-teknologien håper man også å kunne finne en metode for *in vivo* modifisering av CD4+ T-celler. Bruk av virale vektorer kan sågar medføre at behandlingen kan skje som injeksjoner, men dette ligger noe frem i tid.

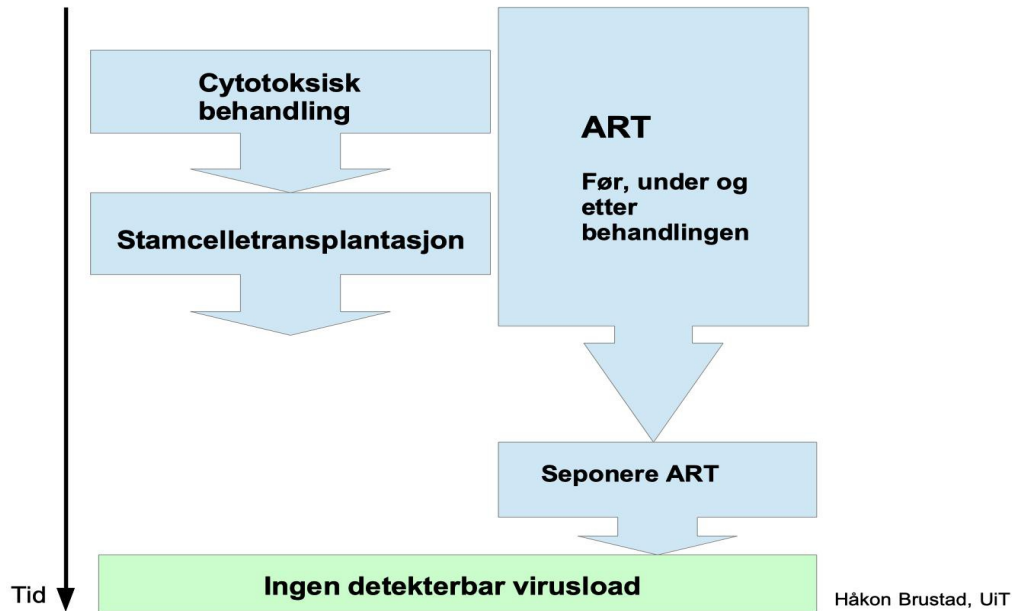
Teoretisk kunne en modell med oppsamling og konsentrering av T-celler ved leukaferese, behandling med CRISPR-Cas9 og til slutt transfusjon gitt en tilstrekkelig stor T-cellepopulasjon som er motstandsdyktig mot HIV-1. Det har ikke lyktes å finne litteratur som beskriver en slik modell. En kan likevel tenke seg betydelige fordeler ved å modifisere T-celler direkte. I tillegg til å være et potensielt skånsomt inngrep, har metoden en fordel

ved at T-celler er relativt enkle å behandle sammenliknet med HSC. En klar ulempe med en slik modell er at man risikerer å modifisere og gjeninnsette infiserte celler, og på denne måten bidra til å opprettholde infeksjonen. Metoden avhenger derfor av at det med tiden utvikles metoder for å selektere friske fra infiserte T-celler for på denne måten å bygge opp en frisk populasjon HIV-resistente CCR5-modifiserte T-celler som etterhvert overtar CD4+-populasjonen fullstendig.

Slik situasjonen er i dag, er det vist at behandling med HLA-forlikelige allogene stamceller kan kurere HIV-infeksjon. Selv om en ved allogen stamcellebehandling ikke skulle oppnå en stor populasjon med HIV-resistente CD4+ T-celler, vil partiell avstøtning sammen med de vanlige mekanismene for drap av virusinfiserte celler føre til total populasjon av donors HIV-resistente CD4+ T-celler (slik som i Berlin-pasienten og London-pasienten).

Hovedprinsippene i denne modellen, cytotoksisk forbehandling og innsetting av CCR5-dysfunksjonelle stamceller, er utprøvd i mennesker og har i to uavhengige tilfeller har vist seg å gi en suksessfull kurativ behandling mot HIV-smitte. At liknende metoder har blitt prøvd ut av andre behandlere uten kurativt resultat, forteller først og fremst at metoden p.t. ikke er standardisert og at pasientene sannsynligvis på grunn av dette ikke har fått samme behandling. Med utgangspunkt i de ulike pasienters langkommenhet av smitten - med ulik virusload, ulikt antall latente infiserte T-memoryceller og ulike virusstammer – vil det være avgjørende at pasienter får grundig utredning samt tilstrekkelig cytotoksisk forbehandling. Videre innsamling av data i tilknytning til de ulike trinnene av behandlingen vil, sammenliknet med data for outcome, kunne gi svar på hvilke tiltak innenfor de ulike trinnene som gir kurativt resultat.

Figur 6 – Behandlingsmodell for kurativ HIV-terapi



Figur 6 – modell for en standardisert kurativ behandling av HIV-infeksjon som starter med ART-behandling som deretter går parallelt med cytotoksisk forbehandling og påfølgende stamcellebehandling. ART avsluttes på et gitt tidspunkt etter behandlingen.

## Diskusjon

Den tradisjonelle tankegangen rundt HIV-terapi har dreid seg om medisinske tiltak som vaksiner og medikamentell behandling. ART-behandling er i dag en etablert terapi som har gitt gode resultater for de som har tilgang til daglig bruk av preparatene, men som verken kurerer sykdommen eller er tilgjengelig for den store massen av HIV-smittede i verden. Som et alternativ til den tradisjonelle medikamentelle tankegangen, har kirurgisk tankegods med transplantasjon blitt høyaktuelt etter to vellykkede kurative behandlinger av HIV-infeksjon ved stamcelletransplantasjon. Stamcellebehandling med CCR5-modifiserte HPSC har nemlig beviselig gitt kurative resultat hos to pasienter med HIV-infeksjon. CCR5 $\Delta$ 32 anses i dag som en benign mutasjon. I tillegg er det all grunn til å tro at såfremt populasjonen med CCR5 $\Delta$ 32-CD4<sup>+</sup> T-celler er stor nok i forhold til populasjonen med infiserte CD4<sup>+</sup> T-celler, vil HIV viruset ikke kunne overleve over tid. Alt dette tatt i betraktning, er det nærliggende å tenke at transplantasjon av HIV-immune hematopoietiske stamceller representere en fremtidig standard kurativ behandlingsmetode. Som tidligere drøftet, vil en slik behandling både kunne senke totalkostnadene og potensielt utrydde epidemien.

Med CRISPR-Cas9-teknologi kan man ha funnet en metode for å modifisere *in vivo* den behandlingstrengende sine egne stamceller, enten hematopoietiske eller induerte pluripotente, som transplantat. CRISPR-Cas9-teknologi vil således stå igjen som en bioteknisk revolusjon dersom en i fremtiden lykkes med genmodifiserende terapier mot HIV (og mot autoimmune og en rekke genetisk relaterte sykdommer). CRISPR-Cas9-teknologien er forholdsvis ny og man mangler derfor langsiktige resultater for å fullstendig kunne evaluere metodens sikkerhet i forhold til blant annet presisjon. Mulig mangel på presisjon har fra flere hold blitt fremholdt som en bekymring når det gjelder bruk av CRISPR-Cas9-knock in/knock out på mennesker. Metoden er derfor under stadig utvikling. En ny variant, HiFi-Cas9, har i studier frembringt resultater som konkluderer at HiFi-Cas9 vil kunne brukes klinisk. (37) Tillegg av anti-CRISPR-proteiner har også blitt funnet å øke presisjonen samt gi bedre kontroll gjennom å kunne både starte og stoppe prosessen. (38) I tillegg forskes det på beslektede enzymer som brukes etter samme prinsipp (åpne DNA, knock-in/knock-out), som for eksempel Cas12-proteinet.

En måte å omgå off target utfordringene på er å benytte iPSC istedenfor hematopoietiske stamceller. På grunn av robustheten til iPSC, kan CRISPR-Cas9-modifiserte iPSC uten feil-mutasjoner klones og effektivt dyrkes opp. Metoden har vist seg så effektiv at det i Japan allerede er etablert en «stamcelleblodbank» med iPSC fra donorer med celler som i stor grad matcher de vanligste HLA-kombinasjonene. (39) (40)

Etter de to vellykkede kurative behandlingene av «Berlin-pasienten» og «London-pasienten» er det ikke lenger tvil om transplantasjon av CCR5-dysfunksjonelle stamceller gir friske CD4+ T-celler og kurerer HIV-infeksjon. Utfordringene i dag ligger først og fremst i manglende erfaring og fullstendig oversikt over nøyaktig hva som gjør at en har lykkes med behandlingene. I tillegg er det en utfordring at pasientene sannsynligvis må gjennomgå en cytotoksisk forbehandling for at behandlingen skal kunne fungere, noe som helt klar reduserer skånsomheten ved denne terapien. Dersom en finner metoder for å unngå et slikt inngrep i fremtiden, vil dette kunne gjøre en stamcellebehandling mot HIV-infeksjon mer skånsom og mer tilgjengelig.

Som ved vurdering av enhver type behandling, er kostnadseffektivitet et sentralt spørsmål. Dersom kostnadene ved å behandle en enkelt pasient overstiger en satt grense, vil denne behandlingen være for dyr til å kunne gjennomføres. Som påpekt i introduksjonen, ligger dagens gjennomsnittskostnader i USA ved en livslang medikamentell behandling med ART på i underkant av 3,5 millioner kroner. Det vil derfor være et poeng at en ny type behandling ikke er vesentlig dyrere enn eksisterende behandling. En amerikansk studie fra 2017 som sammenlikner kostnader ved autolog og allogen stamcelletransplantasjon (HSCT) konkluderer med en gjennomsnittlig kostnad per pasient på \$140.792,- for autolog behandling, tilsvarende 1.286.290,- kroner med dagens kurs (mai 2019). Til sammenlikning var gjennomsnittskostnadene ved allogen behandling \$253.467,- per pasient. (41) En norsk studie fra 2016 som ser på gjennomsnittskostnader ved HSCT til €132.169,- tilsvarende 1.357.680,- kroner med dagens kurs (mai 2019). (42) Disse tallene er nokså samstemte og gir derfor et sannsynlig estimat over kostnader ved dagens HSCT. Som en kan lese ut fra tallene, vil HSCT innebære en kostnadsreduksjon på rundt 60% sammenliknet med livslang ART. Den massive økonomiske gevinsten ved å kunne bytte terapiform til HSCT-behandling for HIV-pasienter gjør at behandlingen på sikt vil kunne

være tilgjengelig for en langt større gruppe av de HIV-syke enn hva tilfellet er i dag. I dette ligger også økt sannsynlighet for å kunne få utryddet viruset.

Totalt fremstår kurativ stamcellebehandling som en overlegen metode for behandling av HIV-syke sammenliknet med nåværende terapi med livslang medikamentell behandling. Veien til et kurativt resultat er svært lovende, og kun detaljer synes å gjenstå før HSCT-behandling med CCR5-muterte stamceller kan standardiseres og implementeres som førstevalg. Med en global innsats med bedring av behandlingstilbudet til de smittede, kan man klare å redusere antallet nysmittede i en slik grad at HIV-epidemien dør ut. En forutsetning vil være at det er politisk vilje globalt til å ta kostnadene ved en slik kurativ medisinsk behandling av HIV-smittede. Selv om metoden med stamcelletransplantasjon medfører kostnadsbesparelser på rundt 60% i forhold til livslang ART-behandling, vil det medføre både praktiske og økonomiske utfordringer å inkorporere et så stort antall behandlingstrengende i et behandlingsprogram basert på transplantasjon. Den store gevinsten tatt i betraktning er det likevel vanskelig å forstå at man kan ha råd til å la være.

## Konklusjon

Stamcelletransplantasjon med CCR5 $\Delta$ 32-muterte hematopoietiske stamceller kan i dag kurere en HIV-infeksjon. Fra 2009 til 2019 har to pasienter behandlet med allogen stamcelletransplantasjon med CCR5 $\Delta$ 32-muterte hematopoietiske stamceller oppnådd kurativt resultat. Metoden vil være særdeles kostnadsbesparende, med en opptil 60% reduksjon i kostnader, sammenliknet med dagens førstevalg som er livslang medikamentell antiretroviral behandling.

Stamcellebehandling mot HIV-infeksjon er i dag mulig å gjennomføre som en allogen transplantasjon. To pasienter har blitt kurert for HIV-infeksjon gjennom en slik behandling. Begge pasientene har fått forbehandling med cytostatika, noe som tilrettelegger for et godt resultat ved aktivering av hvilende memoryceller med latent virus, utradering av infiserte T-celler og frigjøring av plass til nye T-cellepopulasjon fra donor.

Nye metoder som kan gjøre stamcellebehandling mer tilgjengelig, mer effektiv, mer skånsom for pasientene og attpåtil mer kostnadsbesparende enn allogen transplantasjon er under utforskning. Særlig knyttes det håp til fremtidig autolog stamcellebehandling ved hjelp av *in vivo* CRISPR-Cas9-mediert ablasjon av CCR5-reseptoren. I motsetning til dagens allogene teknikk som krever tilgang til en menneske-donor med homozygot CCR5 $\Delta$ 32-mutasjon, representerer CRISPR-Cas9 en mulighet til å endre pasientens egne celler, det være seg stamceller eller CD4<sup>+</sup>-T-celler, til å ikke uttrykke CCR5 på overflaten og på denne måten skape resistens mot HIV-smitte.



## Referanser

1. WHO. HIV/AIDS Key Facts 2018, July 19 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
2. Folkehelseinstituttet. Hivsituasjonen i Norge per 31. desember 2018 2018, 31 desember [Available from: [https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/trykksaker/gonore-syfilis-hiv-klamysdia/hivarsoppgjor-2018\\_050319.pdf](https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/trykksaker/gonore-syfilis-hiv-klamysdia/hivarsoppgjor-2018_050319.pdf).
3. AVERT. History of HIV and AIDS overview 2018, 26 November [Available from: <https://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/overview>.
4. Collaboration H-C, Ray M, Logan R, Sterne JA, Hernandez-Diaz S, Robins JM, et al. The effect of combined antiretroviral therapy on the overall mortality of HIV-infected individuals. *AIDS*. 2010;24(1):123-37.
5. CDC CfDCaP. HIV Cost-effectiveness 2017, 8 Mars [Available from: <https://www.cdc.gov/hiv/programresources/guidance/costeffectiveness/>.
6. Hütter G. Die Heilung des Timothy Brown. *MMW Fortschritte der Medizin*. 2018;2018. S2/160:27-9.
7. Eisenstein M. Disease: Closing the door on HIV. *Nature*. 2015;528(7580):S8-9.
8. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019;568(7751):244-8.
9. Heinrich TJ. HIV remission achieved in the clinic again. *Virology*. 2019, 11 April;VOL 568:175-6.
10. BreLOT A, Chakrabarti LA. CCR5 Revisited: How Mechanisms of HIV Entry Govern AIDS Pathogenesis. *J Mol Biol*. 2018;430(17):2557-89.
11. Grande F, Occhiuzzi MA, Rizzuti B, Ioele G, De Luca M, Tucci P, et al. CCR5/CXCR4 Dual Antagonism for the Improvement of HIV Infection Therapy. *Molecules*. 2019;24(3).
12. Qian K, Morris-Natschke SL, Lee KH. HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Med Res Rev*. 2009;29(2):369-93.
13. Kang H, Minder P, Park MA, Mesquitta WT, Torbett BE, Slukvin, II. CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective

Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015;4:e268.

14. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet*. 1997;16(1):100-3.
15. Pulkkinen K, Luomala M, Kuusisto H, Lehtimäki T, Saarela M, Jalonen TO, et al. Increase in CCR5 Delta32/Delta32 genotype in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2004;109(5):342-7.
16. Favorova OO, Andreewski TV, Boiko AN, Sudomoina MA, Alekseenkov AD, Kulakova OG, et al. The chemokine receptor CCR5 deletion mutation is associated with MS in HLA-DR4-positive Russians. *Neurology*. 2002;59(10):1652-5.
17. Bennetts BH, Teutsch SM, Buhler MM, Heard RN, Stewart GJ. The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis. *Hum Immunol*. 1997;58(1):52-9.
18. Ghorban K, Dadmanesh M, Hassanshahi G, Momeni M, Zare-Bidaki M, Arababadi MK, et al. Is the CCR5 Delta 32 mutation associated with immune system-related diseases? *Inflammation*. 2013;36(3):633-42.
19. Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2011;162(7):1453-69.
20. Mitchell TJ, Walley AJ, Pease JE, Venables PJ, Wiltshire S, Williams TJ, et al. Delta 32 deletion of CCR5 gene and association with asthma or atopy. *Lancet*. 2000;356(9240):1491-2.
21. Ungvari I, Tolgyesi G, Semsei AF, Nagy A, Radosits K, Keszei M, et al. CCR5 Delta 32 mutation, Mycoplasma pneumoniae infection, and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1545-7.
22. Lim JK, McDermott DH, Lisco A, Foster GA, Krysztof D, Follmann D, et al. CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection but not for viral transmission. *J Infect Dis*. 2010;201(2):178-85.
23. Lim JK, Louie CY, Glaser C, Jean C, Johnson B, Johnson H, et al. Genetic deficiency of chemokine receptor CCR5 is a strong risk factor for symptomatic West Nile virus infection: a meta-analysis of 4 cohorts in the US epidemic. *J Infect Dis*. 2008;197(2):262-5.
24. Monel B, Beaumont E, Vendrame D, Schwartz O, Brand D, Mammano F. HIV cell-to-cell transmission requires the production of infectious virus particles and does not

proceed through env-mediated fusion pores. *J Virol.* 2012;86(7):3924-33.

25. Hosmane NN, Kwon KJ, Bruner KM, Capoferri AA, Beg S, Rosenbloom DI, et al. Proliferation of latently infected CD4(+) T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J Exp Med.* 2017;214(4):959-72.

26. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, et al. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2007;109(8):3351-9.

27. Ribeiro RM, Mohri H, Ho DD, Perelson AS. In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15572-7.

28. Reeves DB, Duke ER, Wagner TA, Palmer SE, Spivak AM, Schiffer JT. A majority of HIV persistence during antiretroviral therapy is due to infected cell proliferation. *Nat Commun.* 2018;9(1):4811.

29. Sebastian NT, Collins KL. Targeting HIV latency: resting memory T cells, hematopoietic progenitor cells and future directions. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(10):1187-201.

30. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014;370(10):901-10.

31. Deng Q, Chen Z, Shi L, Lin H. Developmental progress of CRISPR/Cas9 and its therapeutic applications for HIV-1 infection. *Rev Med Virol.* 2018;28(5):e1998.

32. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res.* 2018;244:321-32.

33. Xu L, Yang H, Gao Y, Chen Z, Xie L, Liu Y, et al. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther.* 2017;25(8):1782-9.

34. Qi C, Li D, Jiang X, Jia X, Lu L, Wang Y, et al. Inducing CCR5Delta32/Delta32 Homozygotes in the Human Jurkat CD4+ Cell Line and Primary CD4+ Cells by CRISPR-Cas9 Genome-Editing Technology. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;12:267-74.

35. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4:e264.

36. Swart JF, Delemarre EM, van Wijk F, Boelens JJ, Kuball J, van Laar JM, et al.

Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(4):244-56.

37. Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, Turk R, Jacobi AM, Collingwood MA, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2018;24(8):1216-24.

38. Nakamura M, Srinivasan P, Chavez M, Carter MA, Dominguez AA, La Russa M, et al. Anti-CRISPR-mediated control of gene editing and synthetic circuits in eukaryotic cells. *Nat Commun*. 2019;10(1):194.

39. Bioteknologirådet. Stamceller 2019, 1 Mars [Available from: <http://www.bioteknologiradet.no/temaer/stamceller/>].

40. Cyranoski D. Stem-cell pioneer banks on future therapies. *Nature*. 2012, 7 August;Nature 488, 139 (09 August 2012).

41. Broder MS, Quock TP, Chang E, Reddy SR, Agarwal-Hashmi R, Arai S, et al. The Cost of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in the United States. *Am Health Drug Benefits*. 2017;10(7):366-74.

42. Phoi Phoi Diep HOM, Lorentz Brinch, Jochen Buechner, Yngvar Fløisand, Tobias Gedde-Dahl, Jon Håvard Loge, Geir Erland Tjønnfjord & Ellen Ruud Cost-utility of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Norway. *Nature*. 2018, 22 Januar;May 2018:657-60.

## Appendix

### GRADING av studiemateriale

Referanse: Qi et al. Inducing CCR5 delta32/delta32 homozygotes in the human Jurkat CD4+ cell line and primary CD4+ cells by CRISPR-Cas9 genome-editing technology			Studiedesign: Kohortestudie
			Grade - kvalitet <b>GOD</b>
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
<p>Utvikle en metode for introduksjon av CCR5delta32/CCR5delta32 homozygot gen ved hjelp av CRISPR-Cas9- teknologi</p> <p><b>Konklusjon</b> Native CCR5 gener ble omgjort til CCR5delta32/CCR5delta32 homozygoter i CD4+ Jurkat celler og i primære humane celler ved bruk av CRISPR-Cas9</p> <p><b>Land</b> Kina</p> <p><b>År data innsamling</b> 2017</p>	<p><b>Populasjon:</b> Kohorter: primære og Jurkat type CD4+ T-celler</p> <p><b>Hoved utfall:</b> Viktige konfunderende faktorer Ingen</p> <p><b>Statistiske metoder</b> Welch t-test</p>	<p><b>Hovedfunn</b> CCR5delta32-homozygote CD4+ T-celler kan dannes ved CRISPR-Cas9.</p> <p><b>Bifunn</b> Bruk av 2 guide-RNA i CRISPR-Cas9-komplekset forbedrer presisjonen</p>	<p><b>Sjekkliste:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Formålet klart formulert?</li> <li>Er gruppe rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? (seleksjons bias)</li> <li>Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? (seleksjons bias)*</li> <li>Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?*</li> <li>Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene? (Classification bias)**</li> <li>Er den som vurderte resultatene (endepunkt- ene) blindet for gruppetilhørighet?***</li> <li>Var studien prospektiv?</li> <li>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? (Attrition bias/follow-up-bias)</li> <li>Er det utført frafallanalyser? (Eval. attrition bias)</li> <li>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall?</li> <li>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/ gjennomføring/analyser?</li> <li>Tror du på resultatene?</li> <li>-Bradford Hills criteria (time sequence, dose-response gradient, biological plausibility, consistency...)</li> <li>Kan resultatene overføres til den generelle befolkningen?</li> <li>Annen litteratur som styrker/svekker resultatene?</li> <li>Hva betyr resultatene for endring av praksis?</li> </ul> <p><b>Hva diskuterer forfatterne som:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Styrke:</b> CRISPR-Cas9 er effektiv og gir ønsket resultat</li> <li><b>Svakhet:</b> Usikkerhet ift. Presisjon og dermed fare for off target mutasjoner.</li> </ul>

Referanse: Xu et al. «CRISPR/Cas9-mediated CCR5 Ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance in vivo»			Studiedesign: Kohortestudie
			Grade - kvalitet <b>GOD</b>
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
<p>Skape HIV-1 langtids-resistente HSPC ved CCR5-ablasjon av CRISPR-Cas9</p> <p><b>Konklusjon</b> Etablert et CRISPR/Cas9-modifikasjonssystem i humane CD34+ HPSC ved effektiv ablasjon av CCR5. HIV-1 resistens observert.</p> <p><b>Land</b> Kina</p> <p><b>År data innsamling</b> 2016</p>	<p><b>Populasjon:</b> Humane CD34+ HSPC</p> <p>Kohorter: Cellepopulasjoner</p> <p><b>Hoved utfall:</b> 1) Ablasjon av CCR5 2) Endring i nivå av HIV-1</p> <p><b>Viktige konfunderende faktorer</b> Ingen</p> <p><b>Statistiske metoder</b> ANOVA</p>	<p><b>Hovedfunn</b> CCR5-ablasjon i 27% ± 5,4% av humane CD34+ HSPC. Cellene var istand til å kolonisere etter behandling.</p> <p><b>CRISPR-Cas9-modifikasjonssystemet i studien hadde høy effektivitet</b></p>	<p><b>Sjekkliste:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Formålet klart formulert?</li> <li>Er gruppe rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? (seleksjons bias)</li> <li>Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? (seleksjons bias)*</li> <li>Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?*</li> <li>Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene? (Classification bias)**</li> <li>Er den som vurderte resultatene (endepunkt- ene) blindet for gruppetilhørighet?***</li> <li>Var studien prospektiv?</li> <li>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? (Attrition bias/follow-up-bias)</li> <li>Er det utført frafallanalyser? (Eval. attrition bias)</li> <li>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall?</li> <li>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/ gjennomføring/analyser?</li> <li>Tror du på resultatene?</li> <li>-Bradford Hills criteria (time sequence, dose-response gradient, biological plausibility, consistency...)</li> <li>Kan resultatene overføres til den generelle befolkningen?</li> <li>Annen litteratur som styrker/svekker resultatene?</li> <li>Hva betyr resultatene for endring av praksis?</li> </ul> <p><b>Hva diskuterer forfatterne som:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Styrke</b></li> <li><b>Effektiv og robust ablasjon av CCR5</b></li> <li><b>Fremtidig klinisk verdi i HIV-behandling</b></li> <li><b>Svakhet</b></li> <li><b>En mulig off target mutasjon</b></li> <li>CRISPR/Cas9 ny metode som krever en del utprøving med ulike gRNA</li> </ul>

HIV terapi ved modifisering av CCR5-reseptoren i CD4+ T-celler med CRISPR-Cas9: Kan modifisering av CCR5-reseptoren i stamceller kurere HIV-infeksjon? Håkon Brustad, UiT

Referanse: Vakulskas, Christopher A. et al. «A high fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells»			Studiedesign: Kohortestudie
			GOD
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
<p>Forbedre spesifisitet og effektivitet til CRISPR/Cas9-enzymkomplekset</p> <p><b>Konklusjon</b></p> <p>Nåværende Cas9-mutanter med forbedret spesifisitet har redusert on-target aktivitet</p> <p>Nye Cas9-mutanter har lik on-target effektivitet og redusert off-target aktivitet</p> <p>High-fidelity Cas9-R691A mutanten viser en overlegen on-target modifikasjon i RNP-format</p> <p>Redusert off-target modifikasjon ved bruk av high-fidelity formuleringen</p> <p>Land</p> <p>USA</p> <p>Ar data innsamling</p> <p>2017</p>	<p><b>Populasjon:</b></p> <p>Kohorter: Eukaryot cellepopulasjon, HEK293</p> <p><b>Hoved utfall:</b> On-target aktivitet eller off-target aktivitet</p> <p><b>Viktige konfunderende faktorer</b></p> <p>Ingen</p> <p><b>Statistiske metoder</b></p> <p>ANOVA Tukey multi sammenlikningstest T-test</p>	<p><b>Hovedfunn</b></p> <p>High-fidelity Cas9-R691A mutanten har en on-target aktivitet på 82%, dette er 62-80,3 prosentpoeng høyere enn andre typer høyspesifikke Cas9-mutanter som er testet.</p> <p><b>Bifunn</b></p>	<p><b>Sjekkliste:</b></p> <p>Formålet klart formulert?</p> <p>Er gruppe rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? (seleksjons bias)</p> <p>Var gruppe sammenlikbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? (seleksjons bias)*</p> <p>Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?*</p> <p>Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene? (Classification bias)**</p> <p>Er den som vurderte resultatene (endepunkt-ene) blindet for gruppetilhørighet?*</p> <p>Var studien prospektiv?</p> <p>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? (Attrition bias/follow-up-bias)</p> <p>Er det utført frafallsanalyser? (Eval. attrition bias)</p> <p>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall?</p> <p>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring/analyser?</p> <p>Tror du på resultatene?</p> <p>-Bradford Hills criteria (time sequence, dose-response gradient, biological plausibility, consistency...)</p> <p>Kan resultatene overføres til den generelle befolkningen?</p> <p>Annem litteratur som styrker/svekker resultatene?</p> <p>Hva betyr resultatene for endring av praksis?</p> <p><b>Hva diskuterer forfatterne som:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Styrke</li> <li>High-fidelity Cas9-R691A har høyere spesifisitet for HBB-genet i primære humane HPSC enn andre høyspesifikke Cas9-kompleks</li> <li>Svakhet</li> <li>Helt ny teknikk og ikke tilstrekkelig utprøvd for å kunne benyttes klinisk</li> </ul>

Referanse: HyunJun Kang et al. «CCR5 disruption in induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 provides selective resistance of immune cells to CCR5-tropic HIV-1 virus»			Grade - kvalitet
			GOD
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
<p>In vivo CCR5-modifikasjon av iPSC ved hjelp av CRISPR/Cas9-enzymet</p> <p>Utvikling til HIV-1 resistente CCR5-dysfungerende hematopoietiske celler</p> <p><b>Konklusjon</b></p> <p>CCR5-lokus nådd ved å bruke en guide RNA tråd</p> <p>Økt spesifisitet for target ved bruk av dobbel guide-RNA</p> <p>Land</p> <p>USA</p> <p>Ar data innsamling</p> <p>2015</p>	<p><b>Populasjon:</b></p> <p>Kohorter: Cellepopulasjon, eukaryote iPSC</p> <p><b>Hoved utfall:</b> Virusinfeksjon eller ikke målt som p24-antigen aktivitet</p> <p><b>Viktige konfunderende faktorer</b></p> <p>Ingen</p> <p><b>Statistiske metoder</b></p> <p>Ikke angitt</p>	<p><b>Hovedfunn</b></p> <p>Suksessfull targeting av CCR5 in vivo i iPSC med CRISPR/Cas9 med enkeltstående gRNA og med dobbel gRNA</p> <p><b>Bifunn</b></p> <p>Markant økt effektivitet i CCR5-modifikasjon med dobbel gRNA (12,5% mot 27%)</p>	<p><b>Sjekkliste:</b></p> <p>Formålet klart formulert?</p> <p>Er gruppe rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? (seleksjons bias)</p> <p>Var gruppe sammenlikbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? (seleksjons bias)*</p> <p>Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?*</p> <p>Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene? (Classification bias)**</p> <p>Er den som vurderte resultatene (endepunkt-ene) blindet for gruppetilhørighet?*</p> <p>Var studien prospektiv?</p> <p>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? (Attrition bias/follow-up-bias)</p> <p>Er det utført frafallsanalyser? (Eval. attrition bias)</p> <p>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall?</p> <p>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring/analyser?</p> <p>Tror du på resultatene?</p> <p>-Bradford Hills criteria (time sequence, dose-response gradient, biological plausibility, consistency...)</p> <p>Kan resultatene overføres til den generelle befolkningen?</p> <p>Annem litteratur som styrker/svekker resultatene?</p> <p>Hva betyr resultatene for endring av praksis?</p> <p><b>Hva diskuterer forfatterne som:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Styrke</li> <li>Multianvendelig verktøy klinisk med kurativ HIV-terapi som mulighet</li> <li>Svakhet</li> <li>Off target mutasjoner</li> </ul>

HIV terapi ved modifisering av CCR5-reseptoren i CD4+ T-celler med CRISPR-Cas9: Kan modifisering av CCR5-reseptoren i stamceller kurere HIV-infeksjon? Håkon Brustad, UiT

Referanse: Pablo Tebas et al. «Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV»			Grade - kvalitet
			<b>GOD</b>
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
<p>Studere om transfusjon av autologe CCR5-modifiserte CD4+ T-celler vha ZFN er trygt.</p>	<p><b>Populasjon:</b> Kohorter: 12 HIV-infiserte mennesker delt i 2 grupper</p> <p>Hoved utfall: Fravær av adverse effects</p> <p>Viktige konfunderende faktorer Ingen</p> <p><b>Statistiske metoder</b> Mann-Whitney test Kvantilregresjon Lineær blandet effekt modell</p>	<p><b>Hovedfunn</b> 1 tilfelle av adverse effect, grunnet reaksjon på transfusjon</p> <p>Infusjon ga signifikant økning i CD4-antall (p&lt;0.001)</p> <p><b>Bifunn</b></p> <p>1 uke etter infusjon utgjorde CCR5-muterte T-celler 13,9% av sirkulerende CD4 T-celler</p> <p>Modifiserte T-celler hadde gjennomsnittl halveringstid på 48 uker.</p> <p>Nivå av CCR5-modifiserte CD4+ celler falt saktere enn ikke-modifiserte CD4+ celler (p=0.02)</p> <p>HIV-DNA-nivå i blod falt i de fleste pasientene</p>	<p><b>Sjekkliste:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formålet klart formulert?</li> <li>• Er gruppe rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? (seleksjons bias)</li> <li>• Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? (seleksjons bias)*</li> <li>• Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?*</li> <li>• Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene? (Classification bias) **</li> <li>• Er den som vurderte resultatene (endepunkt-ene) blindet for gruppetilhøring?***</li> <li>• Var studien prospektiv?</li> <li>• Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? (Attrition bias/follow-up-bias)</li> <li>• Er det utført frafallsanalyser? (Eval. attrition bias)</li> <li>• Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall?</li> <li>• Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring/analyser?</li> <li>• Tror du på resultatene?</li> <li>• -Bradford Hills criteria (time sequence, dose-response gradient, biological plausibility, consistency,...)</li> <li>• Kan resultatene overføres til den generelle befolkningen?</li> <li>• Annen litteratur som styrker/svekker resultatene?</li> <li>• Hva betyr resultatene for endring av praksis?</li> </ul>
Konklusjon			
<p><b>CCR5-modifiserte autologe CD4+ T-celle-infusjoner er trygt innenfor begrensningene av studien.</b></p>			
Land			
USA			
År data innsamling			
2014			

HIV terapi ved modifisering av CCR5-reseptoren i CD4+ T-celler med CRISPR-Cas9: Kan modifisering av CCR5-reseptoren i stamceller kurere HIV-infeksjon? Håkon Brustad, UiT

### ***Sammendrag av kunnskapsevalueringer av nøkkel-/hovedartikler på referanselisten***

Ingen av studiene som jeg har brukt som kilder er dobbelt blindende RCT studier. De fleste studiene er observasjonsstudier hvor det i ulike cellepopulasjoner måles objektive data representert ved virusload. Noen av studiene har vært kohorter som observerer om pasienter resultatmessig enten har blitt kurert eller fremdeles har infeksjon i etterkant av stamcelletransplantasjon. Det er ikke observert noen tegn til systematiske feil i studiene. Dobbelt blinding gir ingen mening i denne typen studier. Ingen nedgradering er derfor gjort ut fra studiekvalitet. Konsistensen i studiene er god og sammenliknbarheten fra de utvalgte studiene til andre studier om HIV-terapi er entydig da infiseringsmekanismen til HIV samt dens videre liv i CD4+ T-celler er ubsetridt. Tiltak og utfall fremstår klart homogene. Det er brukt veletablerte metoder og målinger er utført etter gjeldende standarder. Ingen forvekslingsfaktorer eller rapportskjevheter er funnet i kildene.