

## 4.1 Gentherapie

*Ulrich R. Hengge*

### 4.1.1 Einleitung – 380

### 4.1.2 Gentransfer – 380

4.1.2.1 Strategie – 380

4.1.2.2 Vektoren – 381

### 4.1.3 Experimentelle Anwendungen der DNA-Vakzinierung – 383

4.1.3.1 Infektionskrankheiten – 383

4.1.3.2 Tumoren – 385

4.1.3.3 Stoffwechselkrankheiten – 387

### 4.1.4 Update zu weiteren klinischen Studien und Herausforderungen der Zukunft – 388

4.1.4.1 Sicherheit der Gentherapie – 388

### 4.1.5 Ausblick – 389

### 4.1.6 Literatur – 390

### 4.1.7 Zeittafel – 394

## 4.1.1 Einleitung

Die Gentherapie ist eine junge Wissenschaft, die Nucleinsäuren zur Therapie einsetzt (Hengge u. Bardenheuer 2004). Die somatische Gentherapie befasst sich mit der Behandlung von somatischen (Körper-)Zellen (▶ Tab. 4.1.1), wobei das therapeutische Gen ein im Organismus benötigtes Protein kodiert.

Die erste klinische Gentherapie wurde 1989 von Rosenberg et al. (1990) durchgeführt, bei der ein Retrovirus zur Transduktion tumorinfiltrierender Lymphozyten verwendet wurde, der für ein Neomycin-Markergen kodierte. Hierdurch konnte das T-Zell-Infiltrat in Melanomen über die Zeit verfolgt werden. Die erste therapeutische Studie wurde an Kindern mit Adenosindeaminase-Immundefektsyndrom (ADA-SCID) Anfang der 1990er Jahre erfolgreich durchgeführt (Blaese et al. 1995; Muul et al. 2003). Mittlerweile wurden weltweit mehr als 1.000 klinische Gentherapiestudien mit über 10.000 Patienten durchgeführt. Eine aktuelle internationale Internetdatenbank findet sich unter <http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical>.

## 4.1.2 Gentransfer

### 4.1.2.1 Strategie

Grundsätzlich sind verschiedene Aspekte zur Strategie bzw. zur Wahl des Gentaxis (Vektors) zu bedenken (▶ Tab. 4.1.2).

Bezüglich der Strategie lassen sich In-vivo- von Ex-vivo-Methoden unterscheiden (▶ Abb. 4.1.1). Bei der In-vivo-Strategie wird genetisches Material direkt in Körperzellen transferiert. Die therapeutische DNA oder RNA kann entweder direkt z. B. durch Injektion oder

■ **Tab. 4.1.1.** Somatische Gentherapie

- Therapie von Erkrankungen durch DNA und RNA in Körperzellen
- Therapeutisches Gen kodiert für ein im Organismus benötigtes Protein
- Synthese- und Einsatzort des Proteins können auch verschieden sein (z. B. Gerinnungsfaktoren bzw. Hormone)

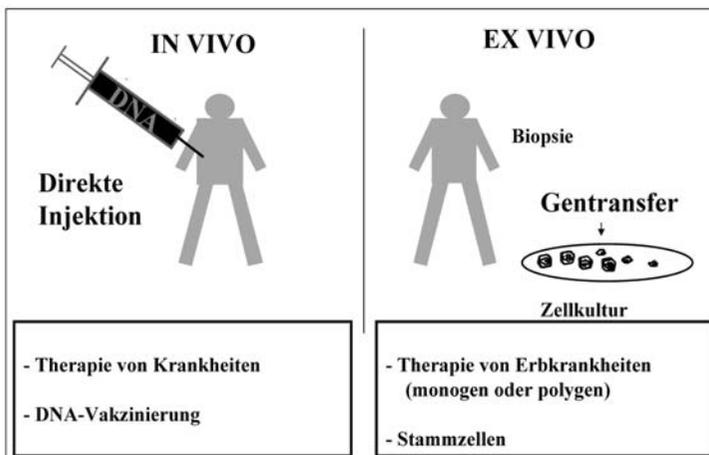
■ **Tab. 4.1.2.** Grundsätzliche Aspekte

- Strategie – in vivo oder ex vivo?
- Organsystem – z. B. Haut (Keratinocyten oder Fibroblasten)
- Gentransfermethode (chemisch, biologisch, physikalisch)?
- Expressionsdauer – lang oder kurz?
- Regulation der Expression- z. B. Insulin, Immunisierung

Elektroporation oder indirekt mittels liposomaler bzw. viraler Vektoren in die Zielzellen eingebracht werden. Die hier in Zielzellen bzw. Gewebe eingebrachten nicht-viralen Vektoren werden durch die Anwesenheit von Nucleasen innerhalb weniger Tage degradiert (Hengge et al. 2001). Bei der Ex-vivo-Methode werden Körperzellen entnommen, und der Gentransfer erfolgt in Kultur. Nach entsprechender Proliferation des gewünschten genkorrigierten Gewebes lässt sich das Transplantat dem Wirt zurückgeben (z. B. modifizierte Fibroblasten oder Endothelzellen) (▶ Abb. 4.1.1).

Generell kann die erforderliche Erbsubstanz (Gen) mittels chemischer, physikalischer oder biologischer Methoden (▶ Tab. 4.1.3) in die verschiedenen Zelltypen bzw. Organe eingebracht werden.

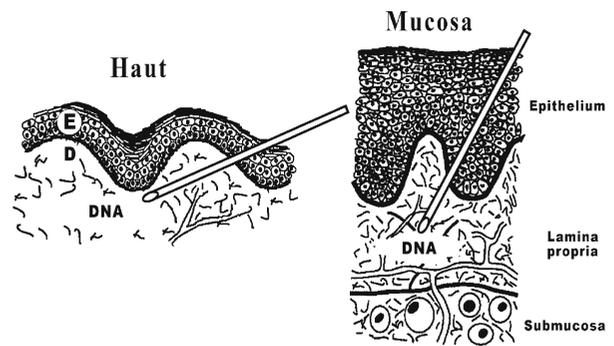
### In-vitro- vs. In-vivo-Strategie



■ **Abb. 4.1.1.** In-vitro- vs. In-vivo-Strategie.

■ **Tab. 4.1.3.** Techniken des Gentransfers

<i>Chemisch</i>	Liposomen rezeptormedierte Transfektion
<i>Biologisch</i>	Retro-/Lentiviren Adenoviren Adeno-assoziiertes Virus Herpes-simplex-Virus
<i>Physikalisch</i>	Mikroprojekteile („gene gun“) Direkte Injektion Ultraschall Elektroporation



■ **Abb. 4.1.2.** Direkte Injektion nackter DNA

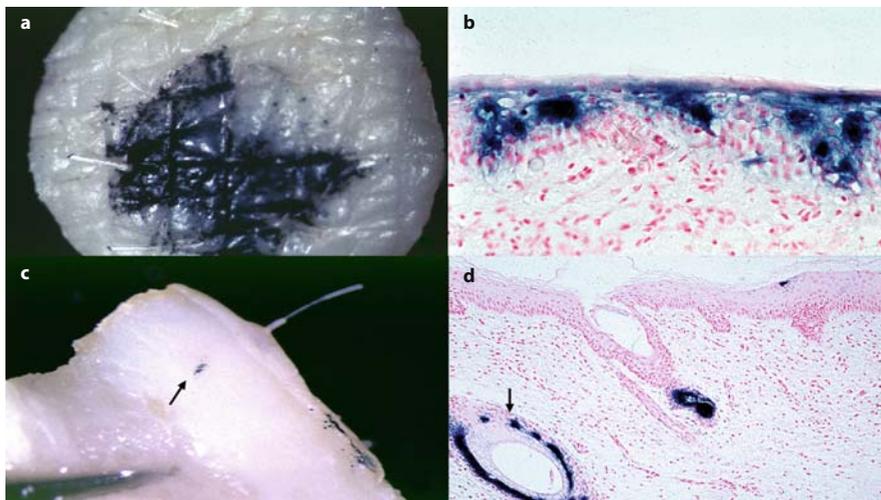
Je nach der beabsichtigten Anwendung ist eine kurzzeitige Herstellung des Genprodukts (z. B. bei der DNA-Vakzinierung oder zur Abheilung chronischer Wunden) bzw. eine Langzeit- oder Dauersynthese (z. B. bei angeborenen Stoffwechselerkrankungen) wünschenswert.

#### 4.1.2.2 Vektoren

##### Nichtvirale Vektoren

Nichtvirale Vektoren führen zur transienten Expression des kodierten Genprodukts. Neben liposomal, d. h. durch kationische Lipide komplexierter Plasmid-DNA kann diese auch durch Elektroporation (mittels elektrischer Pulse) bzw. durch Ultraschallbehandlung (transiente Ruptur der Zellmembranen) sowie auch durch direkte Injektion sog. nackter Plasmid-DNA appliziert werden. Während nahezu alle Gewebe mittlerweile mit-

tels nichtviraler Vektoren transfiziert wurden, bietet die Haut die Möglichkeit der leichten Zugänglichkeit und stellt ein potentes Immunorgan dar. Von unserer Arbeitsgruppe wurde daher die Methode der direkten In-vivo-Injektion nackter DNA, d. h. ohne virale Vektoren, mit einer Insulinnadel und Tuberkulinspritze entwickelt (▶ Abb. 4.1.2) (Hengge et al. 1995, 1996). Hierbei wird Plasmid-DNA in die obere Dermis unter Aufbau eines hydrostatischen Drucks injiziert und nach Aufnahme transient für einige Tage exprimiert (▶ Abb. 4.1.3a–d) (Hengge et al. 1995, 1996). Schon nach wenigen Stunden kann das hergestellte Protein (z. B.  $\beta$ -Galaktosidase) vorwiegend in den Keratinozyten der Epidermis nachgewiesen werden (▶ Abb. 4.1.3a–d). Das entsprechende Protein wird für 3 bis maximal 7 Tage nach Injektion der korrespondierenden DNA synthetisiert. Eine Integration der zugeführten DNA in das chromosomale Erbgut findet nicht statt, was die Sicherheit der Methode



■ **Abb. 4.1.3a–d.** Expression von Plasmid-DNA und AAV in der Haut. **a** 24 h nach Injektion nackter Plasmid-DNA, die für das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen kodiert, lässt sich das Genprodukt makroskopisch darstellen. **b** Histologisch findet sich  $\beta$ -Galaktosidase-Protein in allen Schichten der Epidermis. **c** 7 Tage nach Injektion eines AAV- $\beta$ -Gal-

Vektors ist  $\beta$ -Galaktosidase-Protein in der Epidermis und in den Haarfollikeln nachweisbar (6 mm Stanzbiopsie in der Mitte halbiert). Man beachte den Haarfollikel (Pfeil). **d** Histologisch findet sich das Genprodukt in der Epidermis und im Haarfollikel (Pfeil)

unterstreicht (Hengge et al. 2001). Seit kurzem können wir die topische Applikation nackter DNA in Form von Sprayliposomen erfolgreich anwenden (Meykadeh et al. 2005). Der intrakutane Transport- und Aufnahmemechanismus von DNA in Keratinozyten scheint an eine aktive Proteinsynthese sowie an die Existenz von DNA-bindenden Proteinen (z. B. Ezrin und Moesin) gekoppelt zu sein (Basner-Tschakarjan et al. 2004). Im Gegensatz zu den häufig in der Gentherapie eingesetzten viralen Vektoren lässt sich die „nackte“ DNA beliebig oft erneut in der Haut exprimieren; es kommt hier nicht zum Auftreten unerwünschter Immunreaktionen, die bei wiederholter Applikation die Genexpression verhindern könnten.

Sog. Lipoplexe oder molekulare Konjugate führen zur Komprimierung der DNA und machen sie somit leichter aufnahmefähig (Chen u. Huang 2005). Diese Polyplexe genannten Kombinationen z. B. aus Polyethylenimin und DNA können auch systemisch verabreicht werden (Erbacher et al. 2004). Gegebenenfalls werden die kleinen Partikel mit spezifischen Liganden, z. B. Transferrin, ausgestattet, was ein selektiveres Targeting an Zielzellen ermöglicht (Kloekner et al. 2004).

#### Targeting und zellspezifische Expression

Um die DNA-Aufnahme in den gewünschten Zielzellen zu steigern, lassen sich Polyplexe mit Transferrin oder epidermale Wachstumsfaktor koppeln, was zur rezeptorvermittelten Endozytose in die entsprechenden rezeptortragenden Zellen führt (Ogris et al. 2003). Diese auch als Nanokomplexe bezeichneten molekularen Konjugate besitzen eine geringe Toxizität und eine gegenüber der klassischen Lipofektion vergleichbare Transfektionseffizienz, die sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nutzen lässt.

Die Selektivität der Genexpression lässt sich durch den Einsatz von Promotoren erhöhen, die vorzugsweise im Zielgewebe aktiv sind. Für das maligne Melanom zum Beispiel sind dies melanozytenspezifische Promotoren (z. B. Tyrosinase). Der melanozytenspezifische Promotor (melanozyteninhibitorische Aktivität, MIA) in adeno-assoziierten Virus- (AAV-) Vektoren zusammen mit dem HSV-Thymidinkinase- (TK-) Gen zeigte eine spezifische Expression in Melanomzellen (Schoensiegel et al. 2004). In Tierexperimenten induzierte das in diesem Konstrukt vorhandene HSV-TK-Gen bei nachfolgender Therapie mit Ganciclovir einen Rückgang der Melanome (Schoensiegel et al. 2004). Konditional replizierende Adenovirusvektoren wurden ebenfalls in der Therapie des Melanoms eingesetzt (Liu et al. 2004b). Ein mit einem Targeting-Peptid (RGD) gekoppelter Adenovirusvektor, der das adenovirale E1A-Protein selektiv in tyrosinasepositiven Melanomzelllinien exprimierte, führte zu einer höheren Transduktion von Melanomzel-

len. Nach intratumoraler Injektion zeigte sich in einem Melanom-Xenotransplantationsmodell darüber hinaus eine Tumorregression (Liu et al. 2004b). Auch in eigenen Untersuchungen des menschlichen BLM-Melanoms führten trunkierte adenovirale E1A-Proteine unter der Kontrolle des humanen Telomerase-Promotors zur tumorgerichteten Expression und Regression von Melanommetastasen im Tiermodell (Kirch et al. 2002).

In ähnlicher Weise lassen sich leberspezifische, muskelspezifische oder neuronenspezifische Promotoren einsetzen, um eine präferenzielle Expression im erwünschten Zielgewebe zu erreichen.

Neue Verfahren des Vektor-Targetings sowie interessante Techniken wie Elektroporation und hydrodynamische Injektion konnten die Transgenexpression *in vivo* verbessern, indem eine verbesserte Verteilung der Plasmid-DNA im Zielorgan erreicht wurde (Wolff u. Budker 2005). Darüber hinaus wurden verschiedene attenuierte Stämme von Salmonellen, Shigellen, Listerien, Yersinien und apathogenen *E. coli*-Stämmen als Vektoren zum Transport von DNA in Säugetierzellen erfolgreich eingesetzt (Vassaux et al. 2006).

#### Virale Vektoren

Viren haben während der Evolution die Fähigkeit entwickelt, DNA oder RNA in Zellen eines Organismus einzuschleusen und der Transkriptionsmaschinerie zuzuführen. Sie eignen sich daher als hervorragende Vehikel für den Gentransfer (► Tab. 4.1.1). Hierbei lassen sich nichtintegrierende [Adenoviren (Ad) und adeno-assoziierte Viren (AAV)] von integrierenden Viren (z. B. Retroviren) unterscheiden. Zur Einführung in den Aufbau und die Klonierung wird auf hervorragende Übersichtsarbeiten verwiesen (*Adenoviren*: Volpers u. Kochanek 2004; Alba et al. 2005; *AAV*: Büning et al. 2004; Ding et al. 2005; Flotte 2005; Muzyczka et al. 2005; Vasileva u. Jessberger 2005; *Retroviren*: Naldini u. Verma 2000; Mangeat u. Trono 2005; *Herpes-Virus-Vektoren*: Glorioso u. Fink 2004; Epstein et al. 2005).

Onkolytische Viren replizieren in Krebszellen mit höherer Selektivität als in normalen Zellen. Indem sie in den Zielzellen replizieren, lysieren sie diese. Gerade für Tumorzellen, bei denen der antivirale Interferonsignalweg inaktiviert ist bzw. Tumorsuppressorgene mutiert sind, ist in diesen Zellen eine ungehinderte virale Replikation möglich. Vor allem onkolytische Adenoviren oder Herpes simplex-Viren werden zu diesem Zweck auch klinisch eingesetzt (Galani et al. 2005). Bis heute wurden mehr als 250 Patienten mit ONYX-015, einem replizierenden Adenovirus, in verschiedenen Phase-I- und -II-Studien behandelt. Bis zu 20% der weit fortgeschrittenen unterschiedlichen Tumoren zeigten ein partielles Ansprechen auf die Therapie. Weitere Viren (z. B. Newcastle-disease-Virus, Reovirus, Poliovirus, Vaccinia-

virus und Masernvirus) wurden aufgrund ihrer präferenziellen Replikation in Tumorzellen als onkolytische Viren getestet (Lin u. Nemunaitis 2004; Lorence et al. 2003). Eine ungeklärte Frage onkolytischer Viren mit hoher Mutationsfrequenz besteht darin, ob das nach Replikation freigesetzte Virus mit dem ursprünglich injizierten jeweils identisch ist oder sich weiterentwickelt hat. Darüber hinaus sind onkolytische Viren hoch immunogen. Sie sind deshalb auf eine lokale Applikation und auf wenige Verabreichungen beschränkt. Eine Weiterentwicklung der onkolytischen Viren ist die Ausstattung mit Zytokinen, antiangiogenetischen Faktoren bzw. immunologisch aktiven Molekülen, auch „arming“ genannt. Ein Problem dieser Vektoren besteht in der Möglichkeit des Hervorrufens von Autoimmunerkrankungen, z. B. der Vitiligo (Depigmentierung), die nach Vakzinierung von Melanompatienten mit einem Vacciniavirus-Konstrukt aufgetreten ist (Kaufman et al. 2005). Darüber hinaus muss die Fähigkeit onkolytischer Viren zur Rekombination zweifelsfrei untersucht und geklärt werden. Auch die verschiedenen Strategien der Immun-evasion, z. B. durch Expression immunsuppressiver Zytokine im Zusammenspiel mit dem effektiven Transgen, bedarf einer sorgfältigen präklinischen Testung. Ebenfalls ist das Überschreiten der Speziesrestriktion eine wesentliche, zu klärende Frage, was durch das aviäre Influenzavirus (Vogelgrippe; H5N1) deutlich wird (Chernajovsky et al. 2006).

Lentiviren besitzen die wichtige Eigenschaft, sowohl proliferierende Zellen als auch ruhende Zellen effizient zu infizieren und transduzieren. Diese Eigenschaft zeichnet sie gegenüber klassischen Retroviren aus. Bei den Viren ist die Insertion in das Genom gemeinsam, was eine Weitergabe des genetischen Materials an die Tochterzellen in sich birgt. Um die retrovirale Transduktion sicherer zu machen, wurde untersucht, ob ekotrope murine Moloney Leukämieviren (emMLV) zur Transduktion menschlicher hämatopoetischer Progenitorzellen eingesetzt werden könnten (Yang et al. 2006). Die emMLV waren mit Polylysin gekoppelt, um die normalerweise in humanen Zellen nicht permissiven Viren aufzunehmen. Die Transduktionsrate der emMLV-PL war gleich derjenigen amphotroper emMLV (mit oder ohne Polylysinokopplung).

Auch lentivirale Vektoren werden zur Gentherapie eingesetzt. So konnte z. B. mit einem Lentivirusvektor (nach Pseudotypisierung mit einem Sindbis-Virus-Oberflächenprotein) in einem Melanom-Mausmodell nach intravenöser Injektion eine hohe Transduktionsrate im Tumor erzielt werden (Morizono et al. 2005). Ein wesentlicher Fortschritt in der lentiviralen Vektortechnologie war die Herstellung integrationsdefizienter lentiviraler Vektoren, die eine stabile Langzeittransduktion ermöglichen (Vargas et al. 2004). Ein solcher Vektor

führte in postmitotischen Geweben wie Augen und Gehirn von Nagetieren zur Langzeitexpression über mehrere Monate (Yanez-Munoz et al. 2006).

Alphaviren besitzen einen breiten Tropismus und führen zu hohen Konzentrationen an Transgen (Lundstrom 2005). Aufgrund einer Präferenz für neuronale Zellen haben Alphavirusvektoren eine große Beliebtheit in den Neurowissenschaften erfahren. Darüber hinaus wurden Semliki-Forest-Virusvektoren zur Aktivierung gegen Viren und Tumoren eingesetzt. Aufgrund der hohen Dichte an Lamininrezeptoren auf Krebszellen wurden konventionelle Sindbis-Vektoren zum tumorspezifischen Targeting in Tiermodellen eingesetzt (Lundstrom 2005). Durch die Anwendung von Nanotechnologie wurden virusartige Funktionen auf Nanopartikel transferiert, was zur Herstellung artifizierlicher Viren führen wird (Mastrobattista et al. 2006). Hierbei werden wenige Nanometer große Komplexe aus Nukleinsäuren in kompakter Form verwendet, die durch entsprechende virale Liganden mit der Fähigkeit zur Bindung an zelluläre Rezeptoren versehen werden.

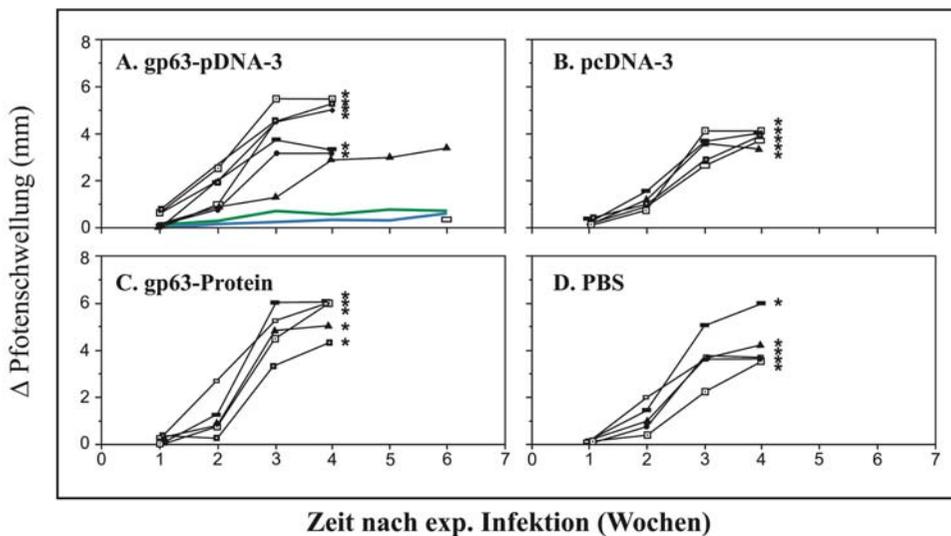
### 4.1.3 Experimentelle Anwendungen der DNA-Vakzinierung

#### 4.1.3.1 Infektionskrankheiten

Bei der DNA-Vakzinierung soll ein immunogenes Antigen (eines Pathogens oder eines Tumors) im Zielgewebe exprimiert werden und zu einer Verbesserung der Immunantwort führen. Als die gewünschten Transgene exprimierende Zellen wurden anfangs Myozyten oder Keratinozyten gewählt. In den letzten Jahren hat sich jedoch die Transfektion von dendritischen Zellen und epidermalen Langerhans-Zellen (ggf. mit Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren, TLR) etabliert, um eine potente Antigenpräsentation zu erreichen.

Neben verschiedenen Tumoren sind auch Infektionskrankheiten einer therapeutischen Vakzinierung zugänglich. In einer Proof-of-concept-Studie konnten wir eine DNA-Vakzinierung gegen *Leishmania major* im Modell der suszeptiblen Balb/c-Mäuse durchführen (Walker et al. 1998). Durch wiederholte Applikation des gp63-enthaltenden Expressionsvektors konnten spezifische CD8-positive Lymphozyten induziert werden, die zur Protektion in 40% der vakzinierten Tiere führten (Abb. 4.1.4) (Walker et al. 1998). Vorwiegend die problematischen Infektionen wie HIV, Ebola- (Nabel 2003), Dengue-Virus (Costa et al. 2006) oder SARS (Kong et al. 2005; Wang et al. 2005; See et al. 2006) stellen eine große Herausforderung dar.

Die meisten Experten sehen eine Beherrschung der HIV-Infektion nur dann, wenn es gelingt, eine prophy-



**Abb. 4.1.4.** Protektion gegen *Leishmania major* nach DNA-Vakzinierung. Nach DNA-prime- und DNA-boost-Schema über 6 Wochen wurden Mäuse experimentell an den Pfoten infiziert. Die ausblei-

bende Schwellung im Vergleich zum Kontrollwert zeigt die Protektion von 40% der vakzinieren Tiere

laktische Vakzinierung zu entwickeln. Eine solche funktionsfähige prophylaktische HIV-Vakzinierung ist gegenwärtig nicht in Sicht. Neben der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) wurden Fortschritte auf dem Gebiet der therapeutischen HIV-Vakzinierung gemacht. Diese verfolgt das Ziel, durch Induktion HIV-1-spezifischer T-Zellen die HIV-Replikation einzudämmen. Hierzu sind verschiedene Prime-Boost-Ansätze im Sinne einer DNA-Vakzinierung und einer Vacciniavirus-Ankara-Boosterung verfolgt worden (Ceber et al. 2006; Goonetilleke et al. 2006).

Neben der therapeutischen Vakzinierung wurden verschiedene gentherapeutische Strategien erprobt, um dem Fortschreiten der HIV-Infektion Einhalt zu gebieten. Hierzu zählen verschiedene Strategien RNA-basierter Technologien, dominant-negative virale Proteine oder intrazelluläre Antikörper.

**Tab. 4.1.4.** Tumorabwehr durch Gentherapie

- Stärkung der Immunantwort gegen Tumorzellen durch immunstimulatorische Zytokine
- Expression von Tumorantigenen\*
- Blockade von essenziellen Signalwegen, z. B. durch Expression inhibitorischer Regulatorproteine
- Expression von Tumorsuppressorproteinen (z. B. Wildtyp p53)
- Suizidstrategien und Bystander-Effekt

\* Nicht die Überexpression von Tumorantigenen, sondern die Expression von Neoantigenen (modifizierte Selbstantigene) scheint hierbei die wesentlichere Rolle zu spielen.

RNA-basierte gentherapeutische Strategien gegen HIV-1, z. B. Ribozyme, RNA-Decoys und siRNA, wurden erfolgreich gegen HIV eingesetzt (Michienzi et al. 2003). Katalytische RNA, auch Ribozyme genannt, greifen in die Regulation der Transkription ein und führen zur Hemmung der HIV-Vermehrung (Puerta-Fernandez et al. 2002). Mittels multimerer Ribozyme gegen env-RNA konnten humane, CD4-positive T-Zell-Linien durch Ribozymexpression für mindestens 60 Tage gegenüber einer HIV-Infektion resistent gemacht werden (Ramezani et al. 2002). Wie die siRNA-Technologie (► Kap. 4.3), so sind auch Ribozyme immer dann nicht mehr wirksam, wenn das Zielgen im HIV-Genom mutiert. Eine induzierbare Anti-HIV-Hairpin-RNA gegen rev (unter der Kontrolle des Polymerase-II-Promotors) war nach Induktion durch HIV-Tat imstande, nach intrazellulärer Prozessierung zu si-RNA die HIV-Vermehrung in infizierten Zellen selektiv zu vermindern (Unwalla et al. 2004). Weitere In-vitro-siRNA-Studien gegen Rev und Tat führten ebenfalls zum „gene silencing“ und werden experimentell klinisch gegen HIV eingesetzt (Coburn u. Cullen 2002; Jacque et al. 2002).

Lentiviren vom Typ HIV wurden gegen die HIV-Infektion eingesetzt, um siRNA in humanen Zellen dauerhaft zu exprimieren (Trono 2000; Mautino u. Morgan 2002). Hierbei waren HIV-1-Vektoren besonders gut in der Lage, hämatopoietische Stammzellen effizient zu transduzieren. Auf diese Weise exprimieren die nachfolgenden Zellpopulationen das therapeutische Genprodukt und lassen sich so ggf. vor einer HIV-Infektion schützen (An et al. 2003; Morris u. Rossi 2006). Effizienterweise sollten möglichst mehrere siRNA-Gene ver-

wendet werden, um eine gewisse Anzahl von Genen simultan zu reprimieren.

Auch können Lentiviren eingesetzt werden, um andere Lentiviren zu verpacken (sog. „Cross-packaging“) (Browning et al. 2001). Eine solche Strategie, bei der HIV-1-Vektoren durch felines Immundefizienz-Virus (FIV) verpackt wurden, war imstande, CD4-Zellen vor einer HIV-Infektion zu schützen (Morris et al. 2004). Das Cross-packaging lentiviraler Vektoren, wie z. B. HIV-1 mit einem FIV-packaging-System, stellt eine sichere Methode dar, um lentivirale Vektoren an Zielzellen HIV-infizierter Individuen zu targetieren. Zusammen mit einer entsprechenden Pseudotypisierung lassen sich auf diese Weise Zelltypen spezifisch und effektiv mittels lentiviraler Vektoren transduzieren (Kobinger et al. 2001).

Auch das Konzept der transkriptionellen Repression durch Blockade von Transkriptionsfaktoren, welche an den HIV-Promotor binden, stellt ein interessantes Konzept dar. Solche Transkriptionsrepressoren betreffen die Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne innerhalb des HIV-1 „long-terminal repeat“ (LTR). Diese Strategie war bereits *in vitro* erfolgreich (Reynolds et al. 2003). Auf diese Weise ließ sich eine bis zu 100-fache Reduktion der HIV-Vermehrung durch Inhibition des HIV-1-Promoters erzielen (Segal et al. 2004).

Auch die intrazelluläre Expression rekombinanter Antikörper, sog. „Intrabodies“, führt zur intrazellulären Immunisierung gegen HIV, z. B. gegen das Vif-Protein, das für die Virusproduktion und die reverse Transkription notwendig ist (Goncalves et al. 2002). Lymphozyten, die einen Intrabody gegen Vif exprimierten, zeigten eine vermehrte Resistenz gegenüber der HIV-Infektion, und zwar sowohl gegenüber adaptierten als auch primären HIV-Stämmen. Eine deutliche Wirkung ist vor allem dann zu erwarten, wenn sich diese Intrabodies an Proteine binden, die wirtsseitige Interaktionspartner für HIV-Proteine darstellen, da das Virus keine Strategie besitzt, nichtviral kodierte Proteine zu synthetisieren. Ein Beispiel eines kritischen, wirtsseitig synthetisierten Proteins stellt der Chemokin-Co-Rezeptor CXCR-4 dar, dessen Blockade zu reduzierter Infizierbarkeit führt (BouHamdan et al. 2001).

### 4.1.3.2 Tumoren

Die meisten Gentherapiestudien werden gegen Krebs durchgeführt (mehr als 66% der Indikationen) (Prud'homme 2005; Edelstein et al. 2004). Eine Übersicht über die in Deutschland laufenden Gentherapiestudien findet sich auf der Webseite des Deutschen Gentransferregisters (<http://www.dereg.de>), die gemeinsam von der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie und

dem Zentrum für Klinische Studien der Universität Freiburg etabliert wurde.

Mit Blick auf das maligne Melanom wurden verschiedene genterapeutische Strategien zur Therapie des malignen Melanoms entwickelt (Tab. 4.1.2). Das Konzept der Immuntherapie gegen Krebs basiert auf der Annahme, dass Tumoren zur Generierung schwacher humoraler und/oder zellulärer Immunreaktionen führen (Sahin et al. 1995). Durch Immunisierungsstrategien soll die immunologische Toleranz durchbrochen und eine breite immunologische Antwort auf die Tumorzellen generiert werden, die die individuellen Tumorzellen abtötet (Hengge u. Schadendorf 2000). Entsprechend lassen sich immunstimulatorische Zytokine als Adjuvantien (z. B. IL-2, IL-12, IL-15, GM-CSF und Interferon- $\gamma$ ) einsetzen, um eine systemische Antitumorantwort zu forcieren. Die Transfektion von Tumorzellen mit Zytokin-Genen soll zu einer Aktivierung von natürlichen Killerzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) führen, die direkt oder indirekt an der Bekämpfung der Tumorzellen beteiligt sind. Hierdurch lassen sich CD8-positive Effektor-T-Zellen und CD4-positive Helfer-T-Zellen induzieren.

Kürzlich wurde über eine DNA-Vakzinierung mit dem IL-12-Gen an Patienten mit malignem Melanom der Stadien III und IV berichtet. Diese Studie basiert auf dem B16-F10 Mausmelanommodell, wo 12 von 15 Mäusen mit subkutanen Melanomen für bis zu 100 Tage metastasenfrem blieben. Bei den ersten 3 behandelten Patienten fand sich ein klinischer Rückgang der Lymphknotenmetastasen nach Vakzinierung mit 200  $\mu$ g IL-12-Expressionsplasmid (Heller et al. 2006). In einer ähnlichen Studie wurde ein IL-12-Expressionsvektor in einer Dosisesskalationsstudie 3-mal pro Zyklus für maximal 7 Zyklen intratumoral appliziert (Heinzerling et al. 2005). Hierbei zeigte sich bei 2 von 9 Patienten je eine stabile Erkrankung bzw. komplette Remission. Bei allen Patienten fand sich eine antigenspezifische Immunantwort gegen MAGE-1 und MART-1. Bei einer weiteren Zytokin-Gentherapie wurde Melanompatienten intratumoral ein Canarypox-Virus-Vektor injiziert, der das IL-12-Gen exprimiert, und zur T-Zell-Akkumulation in injizierten Melanomen führte (Triozi et al. 2005). Bei 3 von 9 Patienten fand sich im Serum ein Anstieg von IL-12 und Interferon- $\gamma$ . Bei einem Patienten fand sich eine komplette klinische Remission. Unerwünschte Wirkungen waren grippale Symptome, Myalgie und Müdigkeit.

Das „melanoma-differentiation-associated“- (mda-) 7/IL-24-Gen, das zu irreversibler Wachstumshemmung und terminaler Differenzierung führt, wurde mittels eines vermehrungsinkompetenten Adenovirus in Melanomzellen exprimiert (Fisher et al. 2003). Bei Patienten, die unter adenoviraler mda-7/IL-24-Gentherapie eine

klinische Teilremission und deutliche Apoptose zeigten, fanden sich signifikant höhere IL-6- und TNF- $\alpha$ -Serumkonzentrationen (Tong et al. 2005). In der klinischen Anwendung dieses Vektors zeigte sich eine komplette und eine partielle Remission (Cunningham et al. 2005).

Eine andere interessante Anwendung ist die adaptive Immuntherapie nach T-Zell-Rezeptor-Transfer. Hierbei wurde der Rezeptor von  $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten, die CD8-positiv waren und zytotoxische Eigenschaften besaßen, eingesetzt (Willemsen et al. 2005). Um eine anhaltende Immunität zu erzielen, wurden MHC-Klasse-II-restringierte CD4-T-Lymphozyten mit einem HLA-A1/MAGE.A1-spezifischen  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor transduziert, was nach spezifischer Stimulation zu einer starken Interferon- $\gamma$ -, TNF- $\alpha$ - sowie IL-2-Produktion führte (Willemsen et al. 2005).

### **Vakzinierung mit dendritischen Zellen**

Bei der DC-Vakzinierung werden antigenpräsentierende Zellen mit definierten immunogenen Peptiden (z. B. eines Tumors) beladen, die T-Zellen mit dem entsprechenden Rezeptor aktivieren und zur Expansion bringen sollen. So wurden melanom-antigen-gepulste DC seit einigen Jahren in der Therapie des metastasierten Melanoms eingesetzt (Nestle et al. 1998; Thurner et al. 1999). Eine neuere Studie mit DC und autologen Lysaten (n=19) bzw. den melanomassoziierten Antigenen MAGE-3.A2, Tyrosinase, gp100 und MART-1 – zusammen mit dem Adjuvans KLH –, die wöchentlich in die inguinalen Lymphknoten von 32 Patienten injiziert wurden, bestätigte das immunologische Wirkprinzip (Hersey et al. 2004). Wie in früheren Studien fanden sich auch hier drei partielle Remissionen (3/19) in der Gruppe von Patienten, die mit lysat-gepulsten DC vakziniert wurden. In dieser Studie zeigte sich, dass die „delayed-type hypersensitivity“- (DTH-)Reaktion auf autologe Tumorzelllysate eine Voraussetzung für das klinische Ansprechen war (Hersey et al. 2004). Jedoch fand sich keine Interferon- $\gamma$ -Produktion in der ELISPOT-Technik. Es ist jedoch schwierig, einen Zusammenhang zwischen Tumorregression und der Existenz einer durch die Vakzinierung induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort unzweifelhaft festzustellen, da nicht alle Patienten mit zellulären Immunantworten auf den Tumor eine Regression desselben zeigten. Zytotoxische Effektor-T-Zellen (CTL) sind zur Tumorzelllyse befähigte T-Zellen, die nach Andocken an die Zielzelle diese durch Sekretion von Granzym und Perforin permeabilisieren und damit lysieren. Nach der Vakzinierung mit einem rekombinanten Canarypox-Vektor, der MAGE-3.A1-Peptide exprimiert, zeigte sich, dass Patienten mit Zeichen einer klinischen Tumorregression in 3/4 der Fälle eine CTL-Antwort aufwiesen, während dies nur bei 1/11 Patienten ohne Zeichen der Tumorregression der Fall

war (Karanikas et al. 2003). Kürzlich wurden verschiedene Klonotypen der CTL-Antworten gegenüber dem MAGE-3.A1 identifiziert (Lonchay et al. 2004). Hierdurch wurde es möglich, nicht nur die CTL-Vorläuferfrequenz im Blut als Marker für die zytotoxische Immunantwort zu untersuchen, sondern auch vorherrschende Klonotypen der Anti-MAGE-3 A1-Immunantworten zu identifizieren.

In jüngster Zeit wird verbreitet auch RNA in DC transfiziert und zur Induktion tumorspezifischer T-Zell-Antworten eingesetzt (Gilboa u. Vieweg 2004; Grunebach et al. 2005). Ein Vorteil gegenüber der (konventionellen) Peptidbeladung von DC besteht darin, dass eine Vakzinierung gegen multiple, durch die RNA kodierte Epitope möglich ist. Entsprechende klinische Studien wurden sowohl gegen das Prostatakarzinom (Rini 2004) als auch gegen das Melanom (Kyte et al. 2006) durchgeführt. Verschiedene Fragestellungen wie die intradermale oder intranodale Administration der Vakzine sowie die optimale Generierung und Reifung von DC werden gegenwärtig untersucht und können noch nicht abschließend beurteilt werden.

Eine wichtige Rolle für die resultierenden Immunantworten scheint auch der Tumorphänotyp und weniger die Vakzinierungsplattform zu spielen (Leitch et al. 2004). Die Transduktionsraten von DC und die Expressionsdauer wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Vektor untersucht. Je nach Ziel des Gentransfers ist diese bei Langzeitexpression im Gegensatz zur genetischen Vakzinierung unerwünscht. Nach intravenöser Injektion von Hochkapazitäts-Adenovirus-Vektoren sowie lentiviraler Vektoren fand sich eine Transduktion antigenpräsentierender Zellen und B-Zellen trotz Verwendung leberspezifischer Promotoren in bis zu bis zu 30%, während T-Zellen refraktär waren. Im Gegensatz hierzu zeigte die In-vivo-Applikation von AAV8 und 9 nur eine Expression in DC von unter 0,1% (Riviere et al. 2006).

### **Transfektion von Tumorsuppressorgenen bzw. Inaktivierung von Onkogenen**

Bei den meisten Tumoren findet sich ein Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgenen. Tumorsuppressorgene können zum Wachstumsstopp von Tumorzellen führen und diese der Apoptose (programmierter Zelltod) zuführen. Ein Paradebeispiel hierfür ist das p53-Protein, das erst nach einem aufgetretenen DNA-Schaden den Zellzyklus blockiert und die Zellen der Apoptose unterwirft (Roth 2006). Die effektive Expression von Wildtyp p53 konnte Tumorregressionen bereits etablierter, menschlicher Tumoren induzieren und das Wachstum humaner Melanomzellen in Kultur oder Nacktmäusen blockieren (Sauter et al. 2002). Die Kombination von Chemotherapie und adenoviral vermit-

teltem Wildtyp p53 war imstande, die amifostin-induzierte Apoptoserate menschlicher Bronchialkarzinomzellen zu erhöhen (Pataer et al. 2006).

Ein interessanter Ansatz ist auch die Wachstums- und Invasionshemmung von Melanomen durch Inaktivierung des *BRAF*-Onkogens mittels lentiviral vermittelter RNA-Interferenz (Sumimoto et al. 2004). Nach lentiviralem Transfer von siRNA gegen die häufigste Mutation des *BRAF*-Antigens (V599E) zeigte sich, dass die meisten Melanomzelllinien nach Transduktion ein gehemmtes Wachstum sowie eine reduzierte Invasivität aufwiesen. Die reduzierte Invasivität zeigte sich auch in einer Verminderung der Matrixmetalloproteinase-Aktivität und der  $\beta$ 1-Integrin-Expression (Sumimoto et al. 2004).

### Suizidgentherapie

Daneben findet sich die Gentherapie, bei der Vorstufen zytotoxischer Medikamente durch Gentransfer metabolisierender Enzyme möglichst selektiv in Tumorzellen in toxische Produkte umgewandelt werden (van Dillen et al. 2002; Fillat et al. 2003). Nach Umwandlung der Prodroge in einen toxischen Metaboliten stirbt die transduzierte Zelle und meist auch einige der Nachbarzellen (sog. „Bystander-Effekt“) (Niculescu-Duvaz u. Springer 2005). So wurde zum Beispiel die Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-TK) transferiert, um das nichttoxische Ganciclovir selektiv in Tumorzellen zum toxischen Ganciclovir-Triphosphat umzusetzen.

#### 4.1.3.3 Stoffwechselkrankheiten

Als Paradebeispiel der gentherapeutischen Behandlung von Stoffwechselkrankheiten dient die Chronik der Gentherapie der Hämophilie (humaner Gerinnungsfaktor VIII bzw. IX) (Lillicrap et al. 2006). Während bei den zurückliegenden Versuchen an hämophilen Mäusen und Hunden (durch Expression im Muskel) mittels AAV-Gentransfer eine anhaltende Faktor-IX-Aktivität von 4–23% erzielt wurde (Arruda et al. 2004; Liu et al. 2004a), war bei den initialen Versuchen an Patienten der Muskel zwar zur Langzeitexpression befähigt, jedoch ließen sich nur subtherapeutische Serumkonzentrationen erzielen. Daraufhin wurde der Gentransfer in die Leber als dem natürlichen Bildungsort der Gerinnungsfaktoren gewählt, wo zwar therapeutische Spiegel erzielt wurden, jedoch die Expression auf wenige Wochen beschränkt war (Manno et al. 2006). Insgesamt wurden bei den klinischen Hämophiliepatienten mit Missense-Mutationen eingeschlossen, obwohl die Immunreaktion bzw. die Inhibitorformation bei Vorliegen eines prämaternen Stoppkodons oder Frameshift-Mutationen im Faktor-IX-Gen stärker ausgeprägt waren. Auffällig

war bei den bislang 7 behandelten Patienten, dass die Faktor-IX-Aktivität innerhalb von 4 Wochen auf unter 1% abfiel. Zu diesem Zeitpunkt traten bei den Patienten Hepatitiden mit erhöhten Leberwerten (ALT 600 U/l, AST 200 U/l) auf, weshalb zunächst keine weiteren Patienten eingeschlossen wurden. Diese unerwünschte Wirkung wurde bei den vorangegangenen Tierstudien nicht beobachtet. Die systematische Analyse der Immunreaktionen mittels AAV-Kapsid- und Faktor-IX-Peptid-Bibliotheken führte zur Identifizierung hoher CTL-Precursor-Frequenzen für 2 hochkonservierte Peptide (Peptid 74 und Peptid 82) der Serotypen AAV1-8. Interessant war, dass bei Patienten, die vor Therapie hohe Antikörpertiter gegen AAV aufwiesen, die Hepatitis und die entsprechende zelluläre Immunantwort ausblieb und sie nur bei Patienten mit geringen oder fehlenden AAV-Titern auftrat (Manno et al. 2006). Dementsprechend werden Patienten ab sofort vor Einschluss in klinische Studien hinsichtlich bestehender humoraler und zellulärer Immunantworten gegen AAV-Kapside genau untersucht. Eine Immunantwort gegen das Faktor-IX-Protein war bei keinem der behandelten Patienten feststellbar. Als neue Strategie wird bei diesen Patienten die transiente Immunsuppression für einen Zeitraum von etwa 4 Monaten erprobt, bis das AAV-Kapsid von den transfizierten Zellen eliminiert ist. Die Expression des Transgens im Muskelgewebe wurde nach AAV-Gentransfer bis zu 2 Jahre beobachtet (Riviere et al. 2006). In der Haut findet sich ein Tropismus von AAV für den Haarfollikel (Abb. 4.1.3c,d) (Hengge u. Mirmohammadsadegh 2002).

Bei einer anderen seltenen Stoffwechselkrankheit stellt die Gentherapie eine echte Alternative zur Knochenmarktransplantation dar, wenn entsprechende allogene HLA-gematchte Spender nicht zur Verfügung stehen. So zeigte eine kürzlich erschienene deutsche Studie die Korrektur der X-gebundenen chronischen Granulomatose (CGD) durch retroviralen Transfer des gp91<sup>phox</sup>, einem wichtigen Protein in der oxidativen antimikrobiellen Abwehr (Ott et al. 2006). Diese Arbeit ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert: Zum einen wurde hier die erste myeloide Immundefizienz behandelt, indem die neutrophilen Granulozyten von zwei betroffenen Individuen phänotypisch und funktionell korrigiert wurden, die sich beide klinisch signifikant verbesserten. Zum anderen zeigte diese Studie nach nichtmyeloablativer Knochenmarkkonditionierung die insertionelle Aktivierung von 3 wenig erforschten Genen MDS1-EV11, PRDM16 bzw. SETBP1, die bezeichnenderweise die Langzeithämatopoiese stimulierten und somit zur Expansion der transduzierten Zellpopulation beitrugen. Nach dem Gentransfer zeigten beide Patienten zwischen 15% und 60% funktionell rekonstituierte neutrophile Granulozyten mit guter lytischer Aktivität gegenüber

opsonierten *E. coli*-Bakterien. Im Gegensatz zu den Gentherapiestudien der schweren kombinierten Immundefizienz (SCID-X1 und ADA-SCID) stellt die Rekonstitution des Gendefekts des gp91<sup>phox</sup> keinen Wachstumsvorteil für die myeloiden Vorläuferzellen dar. Außerdem bedürfen Phagozyten als kurzlebige Zellen einer konstanten Erneuerung. Diese Ausgangsbedingungen lassen eine kurative Gentherapie unter diesen Gesichtspunkten schwierig erscheinen. Offensichtlich war jedoch die hohe Rate der Vektorintegration in die o. g. drei Loci von determinierten myeloiden Progenitorzellen so effizient, dass dadurch das myeloide Kompartiment unabhängig von Wachstumsfaktoren eine Rekonstitution erfuhr.

#### 4.1.4 Update zu weiteren klinischen Studien und Herausforderungen der Zukunft

Derzeit werden verschiedene Strategien erprobt, die klinische Wirksamkeit der Tumorstimmung durch Kostimulation und Amplifikation entsprechender Immunzellen zu verstärken. Generell haben die Studien Pilotcharakter, weshalb nur wenige Zentren diese Therapien anbieten können bzw. nur wenige Patienten eingeschlossen werden konnten. Außerdem handelt es sich durchweg um seltene Entitäten bzw. in einigen Fällen um individualisierte Therapeutika, was die geringen Patientenzahlen erklären hilft. Dennoch lässt sich aus kleinen, aber sehr gut analysierten Patientenkollektiven ein hohes Maß an Information gewinnen. Beim Neuroblastom war nach einer IL-2- und lymphotactin-enthaltenden Vakzinierung in 4 von 21 Fällen eine komplette Remission für mehr als 48 Monate zu verzeichnen (Brenner et al. 2000). Weiterhin fand sich bei 5 der 21 Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung für mehr als 400 Tage. Bei der Untersuchung des zellulären Immunsystems zeigte sich, dass nicht alle Patienten auf die Vakzine in der gewünschten Weise antworten und dass nicht alle Patienten mit nachweisbaren zellulären Immunantworten wirklich imstande sind, den Tumor zu kontrollieren.

Die Vakzinierung gegen Tumoren mit sog. potenten Antigenen stellt kein großes immunologisches Problem dar. Jedoch stellt die Vakzinierung gegen die häufigeren schwächeren Tumorantigene (z. B. „latency membrane protein“-1 und -2 von Epstein-Barr-Virus bei nasopharyngealem Karzinom und Hodgkin-Erkrankung) ein großes Problem dar. Hier ist es wichtig, entsprechende Kombinationen (z. B. ablative Chemotherapie oder spezifische Antikörpertherapien) begleitend einzusetzen, um regulatorische T-Zellen zu eliminieren, die inhibierende Immunwirkungen bei der Vakzinierung entfalten können. Dies kann z. B. in Form der zeitlich begrenzten

Applikation eines CD45-Antikörpers oder mit ablativer Chemotherapie im Sinne einer Lymphozytendepletion durchgeführt werden. So sind Vakzinierungsanstrengungen in der Zukunft ggf. mit temporärer Lymphodepletion zu kombinieren, um synergistische Effekte zu erhalten.

##### 4.1.4.1 Sicherheit der Gentherapie

Im Jahr 1999 ereignete sich der erste tödliche Zwischenfall in der Gentherapie bei einem Jungen mit vererbtem Ornithin-Transcarbamylase-Defekt nach adenoviralem Gentransfer (Raper et al. 2003). Bei hoher Virusdosis und vorgeschädigter Leber kam es nach intrahepatischer Injektion des Virus zum akuten Leberzerfall durch massive Immunaktivierung und einen Zytokin-Boost.

Drei Jahre später fanden sich bei der sonst sehr erfolgreichen Therapie der X-chromosomalen kombinierten schweren Immundefizienz (SCID) drei Formen von Leukämie (Hacein-Bey-Abina et al. 2003a,b). Bei diesen Patienten ist es zur insertionellen Mutagenese mit nachfolgender Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gekommen. Im Jahr 2004 sind zwar keine neuen Fälle insertionell bedingter Tumoren oder Leukämien in klinischen Studien der retroviralen Gentherapie aufgetreten; allerdings sind zwei der drei betroffenen Kinder der SCID-X1-Studie an den Folgen der insertionell bedingten malignen Lymphoproliferation gestorben. Zugleich zeigen jüngste Daten aus mittlerweile mindestens 5 laufenden Studien zur retroviralen Korrektur von Immundefizienzkrankungen (*Mailand*: ADA-Defizienz; *Paris*: SCID-X1; *London*: SCID-X1 und ADA-Defizienz; *NIH*: SCID-X1; Muul et al. 2003; *Frankfurt*: CGD) positiven therapeutischen Nutzen ohne das Auftreten von Sicherheitsproblemen. Da das therapeutische Potenzial des retroviralen Gentransfers kaum mehr infrage steht, ist es nun das höchstrangige Ziel, die früher beobachteten Komplikationen durch ein besseres mechanistisches Verständnis zu vermeiden.

##### Insertionelle Mutagenese

Während nichtvirale Vektoren keine Integration in das Genom zeigen und deshalb nur transient exprimieren, ist dies bei retroviralen und lentiviralen Vektoren die Regel. Wie aus den Zwischenfällen der retroviralen Gentherapie bekannt wurde, hat jede Integration in das Genom ein gewisses Risiko der insertionellen Mutagenese. Diese wurde sowohl in Mausmodellen als auch in der klinischen SCID-X1-Gentherapie beobachtet (Li et al. 2002; Baum et al. 2003; Hacein-Bey-Abina et al. 2003a,b).

Im Rahmen der Aufklärung der drei lymphoproliferativen Erkrankungen im Rahmen der SCID-X1-Gen-

therapie wurde in einem X-SCID-Mausmodell gefunden, dass das korrektive therapeutische Gen die IL-2-Rezeptor-Gammakette selbst in 1/3 der Tiere zur Lymphomgenese beitragen kann (Woods et al. 2006). Bei der Entwicklung der lymphoproliferativen Erkrankungen nach SCID-Korrektur der IL-2-Rezeptor-Gammakette ist es zur ungebremsten Expression dieses *LMO2*-Onkogens gekommen (Hacein-Bey-Abina et al. 2003a,b). Im Rahmen der Experimente im X-SCID-Modell der Maus zeigten sich in 33% der Fälle T-Zell-Lymphome, die jedoch frühestens erst 6 Monate nach Transplantation auftraten. Hierbei stellt sich die Frage nach dem Beitrag des Transgens neben der Insertionsstelle im *LMO2*-Onkogen. In Vorstudien zur klinischen Gentherapie wurden weltweit 88 Mäuse mit demselben Transgen in retroviralen Vektoren behandelt, ohne dass innerhalb einer Experimentalphase von 6 Monaten Lymphome aufgetreten waren. Auch die langfristige Beobachtung von Hunden, Rhesusaffen oder Schafen, die das humane Gen für bis zu 1 Jahr nach der Transplantation exprimierten, zeigten keine Lymphome. Auch in der klinischen Gentherapie traten die beobachteten, leukämieähnlichen Krankheitsfälle 2–3 Jahre nach Transplantation auf. Die lange Latenz bis zum Auftreten von Lymphomen kann möglicherweise durch die Akquisition weiterer komplementärer Mutationen bedingt sein.

Um das Risiko der insertionellen Mutagenese zu reduzieren, wurden integrationsdefiziente lentivirale Vektoren konstruiert, die eine stabile Transduktion ermöglichen (Saenz et al. 2004; Vargas et al. 2004). Diese Untersuchungen wurden in vivo in Nagermodellen durchgeführt, bei denen in Augen und Gehirn injiziert wurde (Yanez-Munoz et al. 2006). Die hohe Effizienz des Gentransfers und der Expression eines therapeutischen Proteins führte zur dauerhaften klinischen Besserung im Modell der Retinadegeneration (Yanez-Munoz et al. 2006). An diesem Beispiel konnte gezeigt werden, dass für postmitotische Gewebe eine Vektorintegration keine unabdingbare Voraussetzung für eine Langzeitexpression darstellt.

### Immunreaktionen

Nachdem es in den vergangenen Jahren gelungen ist, eine adäquat hohe Expression des erwünschten Transgens zu gewährleisten, stellen sich zunehmend Probleme der Immunogenität der häufig verwendete Virusvektoren. So wurden beispielsweise die Immunreaktionen auf die AAV-Serotypen 2, 5 und 8 systematisch untersucht, um zelluläre Immunantworten gegen das Viruskapsid bzw. gegen das therapeutische Transgen zu definieren. Insgesamt ging es um die Frage, wie sich eine CD8-positive MHC-Klasse-I-Immunantwort gegen Kapsidproteine entwickelt, wo bei diesem Reaktionsweg

doch die Aufnahme der Viruspartikel erfolgt und somit normalerweise eine MHC-Klasse-II-Präsentation stattfinden müsste. Am Modell der C57bl/6-Mäuse konnte mittels ELISPOT und intrazytoplasmatischer Zytokinfärbung in Abhängigkeit von den zur Immunisierung bzw. zur Boosterung eingesetzten AAV-Serotypen die Induktion Interferon- $\gamma$ -positiver, CD8-positiver Lymphozyten in der Abstufung  $AAV2/8 > AAV2/5 > AAV2/2$  (Serotypen des AAV bei der Prime- bzw. bei der Boost-Reaktion) nachgewiesen werden (Grimm et al. 2003). Bei dem Versuch, die B-Zell-Antworten in analoger Weise zu untersuchen (Modellgen: Hunde-Gerinnungsfaktor IX), zeigte sich ein komplexes Bild. Interessant war, dass neutralisierende In-vitro-Aktivitäten nicht automatisch mit einer In-vivo-Neutralisationswirkung verbunden waren.

### 4.1.5 Ausblick

Die Konsolidierungsphase der Gentherapie scheint überwunden und berechtigter Optimismus dahingehend angebracht, dass man in Zukunft molekulare Therapien für eine wachsende Zahl klinischer Erkrankungen entwickeln wird. Trotz aller Fortschritte dieses – noch nicht einmal 15 Jahre alten – Forschungsgebiets gilt es, Lösungen für die gegenwärtigen Probleme der Gentherapie zu finden (🔗 Tab. 4.1.5).

Die regulatorischen Auflagen im Umgang mit genetisch markierten Organismen (GMO) und den Voraussetzungen zur Durchführung klinischer Studien sind in den verschiedenen Ländern unterschiedlich. Auch die ethischen Gesichtspunkte international durchgeführter klinischer Studien sind von unterschiedlichen Auflagen geprägt. Es wäre für die Vereinheitlichung und Vergleichbarkeit der verschiedenen Studienaktivitäten notwendig, eine internationale Standardisierung zu erreichen. Dies ist gerade deshalb so wichtig, weil z. B. in

■ **Tab. 4.1.5.** Herausforderungen an die Gentherapie

- Gewebe- und zellzyklusspezifisches Targeting
- Langzeitexpression/-korrektur (Transduktion von Stammzellen)
- Therapie eines ganzen Organs
- In-vivo-Regulation der Genexpression
- Kontrolle der Immunantwort gegen den Vektor bzw. siRNA
- Exzisionsreparatur dominant-negativer Mutationen
- Verbesserte topische Applikation („Gencreme“)
- Sicherheit und Biokompatibilität

China eine adenovirale Gentherapie zur Expression des Wildtyps p53 zugelassen ist. Die dortigen Sicherheitsbestimmungen sowie die regulatorischen Auflagen entsprechen jedoch nicht den europäischen bzw. amerikanischen Standards. Dennoch wird eine solche hochbrisante Therapie aus China in das europäische Ausland und nach Amerika exportiert.

Die Positronenemissionstomographie- (PET-)Technologie hat im molekularen Real-time-Imaging in den letzten 5 Jahren große Beliebtheit erfahren (Serganova u. Blasberg 2005). Neben dem klassischen Reporter-Design wird „gene imaging“ in absehbarer Zeit zum Überwachen der viral und zellbasierten Gentherapie von Tumoren eingesetzt werden (Serganova u. Blasberg 2005). Hierdurch lassen sich mittels nichtinvasiver In-vivo-Darstellung quantitative Aussagen zu Vektor-konzentrationen und zur Transduktionseffizienz in klinischen Studien treffen, indem die Lokalisation, das Ausmaß und die Dauer der Transgenexpression verfolgt werden. Weitere Anwendungen stellen das zelluläre Trafficking, das Targeting und die Replikation von Vektoren dar.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte bei systemischer Anwendung von siRNA nach hepatischer Applikation der korrespondierenden Hairpin-RNA in einem AAV-Vektor schwere toxische Reaktionen mit Todesfolge in Mäusen (Grimm et al. 2006). Die Hairpin-RNA-Therapie führte zur Übersaturierung des MikroRNA-Stoffwechselwegs in der Leber mit Konkurrenz um das nukleäre Karyopherin Exportin-5. Diese Ergebnisse sollten die Gentherapeuten zur Umsicht und weiterem Studium zum Verständnis der siRNA mahnen, bevor in klinischen Studien möglicherweise schwere unerwünschte Ereignisse auftreten.

#### 4.1.6 Literatur

- Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 2005; 12: 518–27
- An DS, Xie Y, Mao SH, Morizono K, Kung SK, Chen IS. Efficient lentiviral vectors for short hairpin RNA delivery into human cells. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1207–12
- Arruda VR, Schuettrumpf J, Herzog RW, Nichols TC, Robinson N, Lotfi Y, Mingozzi F, Xiao W, Couto LB, High KA. Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* 2004; 103: 85–92
- Basner-Tschakarjan E, Mirmohammsadegh A, Hengge UR. Uptake and trafficking of DNA in keratinocytes: Evidence for DNA-binding proteins. *Gene Ther* 2004; 11: 765–74
- Baum C, Dullmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, von Kalle C. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101: 2099–114
- 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* 1995; 270: 475–80
- BouHamdan M, Strayer DS, Wei D, Mukhtar M, Duan LX, Hoxie J, Pomerantz RJ. Inhibition of HIV-1 infection by down-regulation of the CXCR4 co-receptor using an intracellular single chain variable fragment against CXCR4. *Gene Ther* 2001; 8: 408–18
- Brenner MK, Heslop H, Krance R, Horowitz M, Strother D, Nuchtern J, Grilley B, Martingano E, Cooper K. Phase I study of chemokine and cytokine gene-modified autologous neuroblastoma cells for treatment of relapsed/refractory neuroblastoma using an adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1477–88
- Browning MT, Schmidt RD, Lew KA, Rizvi TA. Primate and feline lentivirus vector RNA packaging and propagation by heterologous lentivirus virions. *J Virol* 2001; 75: 5129–40
- Büning H, Braun-Falco M, Hallek M. Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Cells Tissues Organs* 2004; 177: 139–50
- Cebere I, Dorrell L, McShane H, Simmons A, McCormack S, Schmidt C, Smith C, Brooks M, Roberts JE, Darwin SC, Fast PE, Conlon C, Rowland-Jones S, McMichael AJ, Hanke T. Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers. *Vaccine* 2006; 24: 417–25
- Chen WC, Huang L. Non-viral vector as vaccine carrier. *Adv Genet* 2005; 54: 315–37
- Chernajovsky Y, Layward L, Lemoine N. Fighting cancer with oncolytic viruses. *BMJ* 2006; 332: 170–2
- Coburn GA, Cullen BR. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 2002; 76: 9225–31
- Costa SM, Freire MS, Alves AM. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* 2006; 24: 4562–4
- Cunningham CC, Chada S, Merritt JA, Tong A, Senzer N, Zhang Y, Mhashilkar A, Parker K, Vukelja S, Richards D, Hood J, Coffee K, Nemunaitis J. Clinical and local biological effects of an intratumoral injection of mda-7 (IL24; INGN 241) in patients with advanced carcinoma: a phase I study. *Mol Ther* 2005; 11: 149–59
- Ding W, Zhang L, Yan Z, Engelhardt JF. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 2005; 12: 873–80
- Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview. *J Gene Med* 2004; 6: 597–602
- Epstein AL, Marconi P, Argnani R, Manservigi R. HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy. *Curr Gene Ther* 2005; 5: 445–58
- Erbacher P, Bettinger T, Brion E, Coll JL, Plank C, Behr JP, Remy JS. Genuine DNA/polyethylenimine (PEI) complexes improve transfection properties and cell survival. *J Drug Target* 2004; 12: 223–36
- Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther* 2003; 3: 13–26
- Fisher PB, Gopalkrishnan RV, Chada S, Ramesh R, Grimm EA, Rosenfeld MR, Curiel DT, Dent P. mda-7/IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: S23–37
- Flotte TR. Adeno-associated virus-based gene therapy for inherited disorders. *Pediatr Res* 2005; 58: 1143–7

- Galanis E, Okuno SH, Nascimento AG, Lewis BD, Lee RA, Oliveira AM, Sloan JA, Atherton P, Edmonson JH, Erlichman C, Randlev B, Wang Q, Freeman S, Rubin J. Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Gene Ther* 2005; 12: 437–45
- Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 2004; 199: 251–63
- Glorioso JC, Fink DJ. Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58: 253–71
- Goncalves J, Silva F, Freitas-Vieira A, Santa-Marta M, Malho R, Yang X, Gabuzda D, Barbas C 3rd. Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication. *J Biol Chem* 2002; 277: 32036–45
- Goonetilleke N, Moore S, Dally L, Winstone N, Cebere I, Mahmoud A, Pinheiro S, Gillespie G, Brown D, Loach V, Roberts J, Guimaraes-Walker A, Hayes P, Loughran K, Smith C, De Bont J, Verlinde C, Vooijs D, Schmidt C, Boaz M, Gilmour J, Fast P, Dorrell L, Hanke T, McMichael AJ. Induction of multifunctional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cells capable of proliferation in healthy subjects by using a prime-boost regimen of DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored vaccines expressing HIV-1 Gag coupled to CD8+ T-cell epitopes. *J Virol* 2006; 80: 4717–28
- Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways p537. *Nature* 2006; 441: 537–41
- Grimm D, Zhou S, Nakai H, Thomas CE, Storm TA, Fuess S, Matsushita T, Allen J, Surosky R, Lochrie M, Meuse L, McClelland A, Colosi P, Kay MA. Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* 2003; 102: 2412–9
- Grunebach F, Muller MR, Brossart P. New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 517–25
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulfraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003a; 348: 255–6
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulfraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003b; 302: 415–9
- Heinzerling L, Burg G, Dummer R, Maier T, Oberholzer PA, Schultz J, Elzaouk L, Pavlovic J, Moelling K. Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 35–48
- Heller L, Merkler K, Westover J, Cruz Y, Coppola D, Benson K, Daud A, Heller R. Evaluation of toxicity following electrically mediated interleukin-12 gene delivery in a B16 mouse melanoma model. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3177–83
- Hengge UR, Bardenheuer W. Gene therapy and the skin. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004; 131C: 93–100
- Hengge UR, Chan EF, Foster RA, Walker PS, Vogel JC. Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nat Genet* 1995; 10: 161–6
- Hengge UR, Dexling B, Mirmohammadsadegh A. Safety and pharmacokinetics of naked plasmid DNA in the skin: studies on dissemination and ectopic expression. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 979–982
- Hengge, A Mirmohammadsadegh. Adeno-associated virus (AAV) expresses transgenes long-term in epidermis and hair follicles. *Mol Ther* 2002; 2: 189–94
- Hengge UR, Schadendorf D. Modification of melanoma cells via ballistic gene delivery for vaccination. In: Lasic, Templeton (Hrsg.): *Gene Therapy: Therapeutic mechanisms and strategies*. Marcel Dekker, New York, 2000, 317–338
- Hengge UR, Walker PS, Vogel JC. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest* 1996; 97: 2911–6
- Hersey P, Menzies SW, Halliday GM, Nguyen T, Farrelly ML, DeSilva C, Lett M. Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 125–34
- Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; 418: 379–80
- Karanikas V, Lurquin C, Colau D, van Baren N, De Smet C, Lethe B, Connerotte T, Corbiere V, Demoitie MA, Lienard D, Dreno B, Velu T, Boon T, Coulie PG. Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus. *J Immunol* 2003; 171: 4898–904
- Kaufman HL, Deraffle G, Mitcham J, Moroziewicz D, Cohen SM, Hurst-Wicker KS, Cheung K, Lee DS, Divito J, Voulo M, Donovan J, Dolan K, Manson K, Panicali D, Wang E, Horig H, Marincola FM. Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma. *J Clin Invest* 2005; 115: 1903–12
- Kirch HC, Ruschen S, Brockmann D, Esche H, Horikawa I, Barrett JC, Opalka B, Hengge UR. Tumor-specific activation of hTERT-derived promoters by tumor suppressive E1A-mutants involves recruitment of p300/CBP/HAT and suppression of HDAC-1 and defines a combined tumor targeting and suppression system. *Oncogene* 2002; 21: 7991–8000
- Kloekner J, Prasmickaite L, Hogset A, Berg K, Wagner E. Photochemically enhanced gene delivery of EGF receptor-targeted DNA polyplexes. *J Drug Target* 2004; 12: 205–13
- Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, Wilson JM. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 225–30
- Kong WP, Xu L, Stadler K, Ulmer JB, Abrignani S, Rappuoli R, Nabel GJ. Modulation of the immune response to the severe acute respiratory syndrome spike glycoprotein by gene-based and inactivated virus immunization. *J Virol* 2005; 79: 13915–23
- Kyte JA, Mu L, Aamdal S, Kvalheim G, Dueland S, Hauser M, Gulletad HP, Ryder T, Lislud K, Hammerstad H, Gaudernack G. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 905–18
- Leitch J, Fraser K, Lane C, Putzu K, Adema GJ, Zhang QJ, Jefferies WA, Bramson JL, Wan Y. CTL-dependent and -independent antitumor immunity is determined by the tumor not the vaccine. *J Immunol* 2004; 172: 5200–5
- Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuhlcke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002; 296: 497
- Lillicrap D, Vandendriessche T, High K. Cellular and genetic therapies for haemophilia. *Haemophilia* 2006; 12 (Suppl 3): 36–41
- Lin E, Nemunaitis J. Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 643–64

- Liu YL, Mingozzi F, Rodriguez-Colon SM, Joseph S, Dobrzynski E, Suzuki T, High KA, Herzog RW. Therapeutic levels of factor IX expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1 vector. *Hum Gene Ther* 2004a; 15: 783–92
- Liu Y, Ye T, Sun D, Maynard J, Deisseroth A. Conditionally replication-competent adenoviral vectors with enhanced infectivity for use in gene therapy of melanoma. *Hum Gene Ther* 2004b; 15: 637–47
- Lonchay C, van der Bruggen P, Connerotte T, Hanagiri T, Coulie P, Colau D, Lucas S, Van Pel A, Thielemans K, van Baren N, Boon T. Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101 (Suppl 2): 14631–8
- Lorence RM, Pecora AL, Major PP, Hotte SJ, Laurie SA, Roberts MS, Groene WS, Bamat MK. Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5: 618–24
- Lundstrom K. Biology and application of alphaviruses in gene therapy. *Gene Ther* 2005; 12: 592–7
- Mangeat B, Trono D. Lentiviral vectors and antiretroviral intrinsic immunity. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 913–20
- Manno CS, Arruda VR, Pierce GF, Glader B, Ragni M, Rasko J, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, 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* 2006; 12: 342–7
- Mastrobattista E, van der Aa MA, Hennink WE, Crommelin DJ. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 115–21
- Mautino MR, Morgan RA. Gene therapy of HIV-1 infection using lentiviral vectors expressing anti-HIV-1 genes. *AIDS Patient Care STDS* 2002; 16: 11–26
- Meykadeh N, Mirmohammadsadegh A, Wang Z, Basner-Tschakarjan E, Hengge UR. Topical application of plasmid DNA to mouse and human skin. *J Mol Med* 2005; 83: 897–903
- Michienzi A, Castanotto D, Lee N, Li S, Zaia JA, Rossi JJ. RNA-mediated inhibition of HIV in a gene therapy setting. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1002: 63–71
- Morizono K, Xie Y, Ringpis GE, Johnson M, Nassanian H, Lee B, Wu L, Chen IS. Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection. *Nat Med* 2005; 11: 346–52
- Morris KV, Gilbert J, Wong-Staal F, Gismi M, Looney DJ. Transduction of cell lines and primary cells by FIV-packaged HIV vectors. *Mol Ther* 2004; 10: 181–90
- Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther* 2006; 13: 553–8
- 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 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 2003; 101: 2563–9
- Muzyczka N, Warrington KH Jr. Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 408–16
- Nabel GJ. Vaccine for AIDS and Ebola virus infection. *Virus Res* 2003; 92: 213–7
- Naldini L, Verma IM. Lentiviral vectors. *Adv Virus Res* 2000; 55: 599–609
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328–32
- Niculescu-Duvaz I, Springer CJ. Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol* 2005; 30: 71–88
- Ogris M, Walker G, Blessing T, Kircheis R, Wolschek M, Wagner E. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J Control Release* 2003; 91: 173–81
- Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kuhlcke 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, Luthi 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-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 2006; 12: 401–9
- Pataer A, Fanale MA, Roth JA, Swisher SG, Hunt KK. Induction of apoptosis in human lung cancer cells following treatment with amifostine and an adenoviral vector containing wild-type p53. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 806–14
- Prud'homme GJ. DNA vaccination against tumors. *J Gene Med* 2005; 7: 3–17
- Puerta-Fernandez E, Barroso-DelJesus A, Berzal-Herranz A. Anchoring hairpin ribozymes to long target RNAs by loop-loop RNA interactions. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12: 1–9
- Ramezani A, Ma XZ, Nazari R, Joshi S. Development and testing of retroviral vectors expressing multimeric hammerhead ribozymes targeted against all major clades of HIV-1. *Front Biosci* 2002; 7: a29–36
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 148–58
- Reynolds L, Ullman C, Moore M, Isalan M, West MJ, Clapham P, Klug A, Choo Y. Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1615–20
- Rini B. Recent clinical development of dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1729–34
- Riviere C, Danos O, Douar AM. Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther* 2006; 13: 1300–8
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323: 570–8
- Roth JA. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 55–61
- Saenz DT, Loewen N, Peretz M, Whitwam T, Barraza R, Howell KG, Holmes JM, Good M, Poeschla EM. Unintegrated lentivirus DNA persistence and accessibility to expression in nondividing cells: analysis with class I integrase mutants. *J Virol* 2004; 78: 2906–20
- Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11810–3

- Sauter ER, Takemoto R, Litwin S, Herlyn M. p53 alone or in combination with antisense cyclin D1 induces apoptosis and reduces tumor size in human melanoma. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 807–12
- Schoensiegel F, Paschen A, Sieger S, Eskerski H, Mier W, Rothfels H, Kleinschmidt J, Schadendorf D, Haberkorn U. MIA (melanoma inhibitory activity) promoter mediated tissue-specific suicide gene therapy of malignant melanoma. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 408–18
- See RH, Zakhartchouk AN, Petric M, Lawrence DJ, Mok CP, Hogan RJ, Rowe T, Zitzow LA, Karunakaran KP, Hitt MM, Graham FL, Prevec L, Mahony JB, Sharon C, Auperin TC, Rini JM, Tingle AJ, Scheifele DW, Skowronski DM, Patrick DM, Voss TG, Babiuk LA, Gauldie J, Roper RL, Brunham RC, Finlay BB. Comparative evaluation of two severe acute respiratory syndrome (SARS) vaccine candidates in mice challenged with SARS coronavirus. *J Gen Virol* 2006; 87: 641–50
- Segal DJ, Goncalves J, Eberhardy S, Swan CH, Torbett BE, Li X, Barbas CF 3rd. Attenuation of HIV-1 replication in primary human cells with a designed zinc finger transcription factor. *J Biol Chem* 2004; 279: 14509–19
- Serganova I, Blasberg R. Reporter gene imaging: potential impact on therapy. *Nucl Med Biol* 2005; 32: 763–80
- Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, Yamagata S, Shimizu A, Taira K, Kawakami Y. Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene* 2004; 23: 6031–9
- Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669–78
- Tong AW, Nemunaitis J, Su D, Zhang Y, Cunningham C, Senzer N, Netto G, Rich D, Mhashilkar A, Parker K, Coffee K, Ramesh R, Ekmekcioglu S, Grimm EA, van Wart Hood J, Merritt J, Chada S. Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients. *Mol Ther* 2005; 11: 160–72
- Triozzi PL, Strong TV, Bucy RP, Allen KO, Carlisle RR, Moore SE, Lobuglio AF, Conry RM. Intratumoral administration of a recombinant canarypox virus expressing interleukin 12 in patients with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 91–100
- Trono D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther* 2000; 7: 20–3
- Unwalla HJ, Li MJ, Kim JD, Li HT, Ehsani A, Alluin J, Rossi JJ. Negative feedback inhibition of HIV-1 by TAT-inducible expression of siRNA. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1573–8
- van Dillen IJ, Mulder NH, Vaalburg W, de Vries EF, Hospers GA. Influence of the bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. A review. *Curr Gene Ther* 2002; 2: 307–22
- Vargas J Jr, Gusella GL, Najfeld V, Klotman ME, Cara A. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 361–72
- Vasileva A, Jessberger R. Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 837–47
- Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, Lemoine NR. Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol* 2006; 208: 290–8
- Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 2004; 6: S164–71
- Walker PS, Scharton-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Bouloc A, Udey MC, Vogel JC. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1899–907
- Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, Margalith M, Ng J, Weiss WR, Sedegah M, de Taisne C, Norman JA, Hoffman SL. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1998; 282: 476–80
- Wang Z, Yuan Z, Matsumoto M, Hengge UR, Chang YF. Immune responses with DNA vaccines encoded different gene fragments of severe acute respiratory syndrome coronavirus in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327: 130–5
- Willemsen R, Ronteltap C, Heuveling M, Debets R, Bolhuis R. Redirecting human CD4+ T lymphocytes to the MHC class I-restricted melanoma antigen MAGE-A1 by TCR alphabeta gene transfer requires CD8alpha. *Gene Ther* 2005; 12: 140–6
- Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 2005; 54: 3–20
- Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma IM. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* 2006; 440: 1123
- Yanez-Munoz RJ, Balaggan KS, Macneil A, Howe SJ, Schmidt M, Smith AJ, Buch P, Maclaren RE, Anderson PN, Barker SE, Duran Y, Bartholomae C, von Kalle C, Heckenlively JR, Kinnon C, Ali RR, Thrasher AJ. Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* 2006; 12: 348–353
- Yang G, Zhong Q, Huang W, Reiser J, Schwarzenberger P. Retrovirus molecular conjugates: a versatile and efficient gene transfer vector system for primitive human hematopoietic progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 460–8

### 4.1.7 Zeittafel

Die angegebenen Zitate sind in den Literaturteil integriert.

Jahr	Ereignis	Referenz
1989	Erste klinische Markergen-Therapie (tumorinfiltrierende Lymphozyten)	Rosenberg et al. 1990
1990	Erste therapeutische Gentherapie Adenosindeaminase-Immundefekt-Syndrom (ADA-SCID)	Blaese et al. 1995; Muul et al. 2003
1995	Erste klinische DNA-Vakzinierung gegen Malaria	Wang et al. 1998
1999	Hepatische Gensatztherapie mit AD-Vektor fordert erstes Todesopfer	Raper et al. 2003
2002	Insertionelle Mutagenese nach retroviralem Gentransfer bei X1-SCID verursacht leukämieähnliche Lymphoproliferation	Hacein-Bey-Abina et al. 2003a, b
2004	Mehr als 10.000 Patienten in über 1.000 Gentherapiestudien behandelt	<a href="http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical">http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical</a>
2006	Erfolgreiche Behandlung der chronischen Granulomatose	Ott et al. 2006