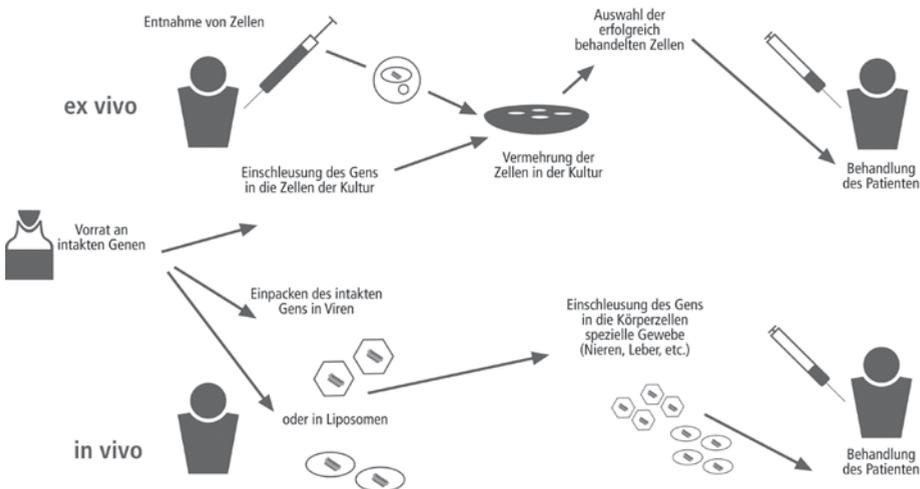


3. Stand wissenschaftlicher und medizinischer Entwicklungen

Für das Verständnis der wissenschaftlich-technischen sowie medizinischen Entwicklungen innerhalb der Gentransferforschung sind einleitend einige verfahrenstechnische Grundlagen notwendig: In Kapitel 2 war Gentransfer als ein Verfahren definiert worden, mittels dessen Gene in Zellen oder Gewebe eingebracht werden können; zielt ein Gentransfer auf therapeutischen oder präventiven Nutzen für einzelne Patientinnen und Patienten, spricht man von Gentherapie. Für die Durchführung einer solchen Gentherapie wird ein Gentransfer notwendig, der unabhängig von Zielsetzung und Eingriffstiefe entweder im Körper des Patienten (in vivo) oder außerhalb des Körpers (ex vivo) erfolgen kann:

Abbildung 1: Technische Verfahren eines Gentransfers



Quelle: mit Änderungen nach Winnacker et al., 2002:30.

ex vivo: Dem menschlichen Körper werden Zellen entnommen. Ein Gen oder ein Genbestandteil wird in diese Zellen außerhalb des Körpers eingeschleust und den vorhandenen Genen hinzugefügt. Die so behandelten Zellen werden vermehrt und anschließend dem Körper wieder zugeführt.

in vivo: Das Gen oder der Genbestandteil wird dem menschlichen Körper direkt zugeführt; es soll sich selbst in bestimmte Zellen beziehungsweise Zellkerne einschleusen und vor Ort zur Wirkung kommen.

Das Einbringen der genetischen Information in die Zielzelle außerhalb oder innerhalb des Körpers ist bei der gentherapeutischen Behandlung ein entscheidender Schritt; er erfolgt auf verschiedene Art, meist mit Hilfe so genannter Genfähren (medizinisch: Vektoren). Solche Vektoren dienen dazu, das zu übertragende Gen (Transgen) möglichst effizient in die jeweilige Zielzelle zu bringen. Zugleich übernehmen Kontrollelemente im Vektor die Expressionskontrolle des Transgens in der Zielzelle. Grundsätzlich gibt es verschiedene Methoden, DNA in die Zielzellen einzubringen; hier unterscheidet man prinzipiell zwischen nicht-viralem und viralem Gentransfer (ausführlich siehe Kapitel 3.3.2):

- ▶ Für einen nicht-viralen Gentransfer kommen verschiedene Methoden der so genannten Transfektion in Betracht; dazu zählt man chemische wie auch physikalische Methoden.¹ Derart lassen sich nicht-virale Vektoren, wie beispielsweise Plasmide („nackte DNA“), Liposomen, artifizielle virale Vektoren (Episomen mit viralen Elementen) oder artifizielle Chromosomen in die Zielzelle einschleusen. Ein Vorteil vieler nicht-viraler Gentransfermethoden ist die geringere Abhängigkeit von der Größe der übertragenen DNA. Ein Nachteil für viele Anwendungen ist die bislang meist niedrige Effizienz sowie die relativ hohe unspezifische Toxizität von Transfektionsmethoden (van Tendeloo et al., 2001; Papapetrou et al., 2005).

¹ Die chemische Transfektion als nicht-viraler Transfer kann zum Beispiel mit Hilfe von Calciumphosphat (Graham/van der Eb, 1973) und kationischen Lipiden und Polymeren erfolgen (Clark/Hersh, 1999; Kumar et al., 2003). Beispiele für physikalische Transfermethoden sind die Mikroinjektion (Capecchi, 1980), die Elektroporation (Bloquel et al., 2004), der Beschuss mit Partikeln (Yang et al., 1990) und die Verwendung magnetischer Nanopartikel (Scherer et al., 2002).

- ▶ Im Gegensatz dazu erfolgt der virale Gentransfer in Körperzellen mit Hilfe von viralen Vektoren. Solche Vektoren werden von Viren abgeleitet, die vermehrungsunfähig und aufnahmefähig für Fremd-DNA gemacht werden. Man unterscheidet zwischen Vektoren, die nach der Transduktion episodisch in der Zelle vorliegen und denen, die stabil in das Genom integrieren.² Häufig eingesetzte *episomale, nicht-integrierende Vektoren* sind zum Beispiel von Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren, Herpes Simplex Viren (HSV), Epstein-Barr-Viren (EBV), Polioviren oder Vacciniaviren abgeleitet (Romano et al., 2000). Dagegen leitet sich die Gruppe der *stabil in das Genom integrierenden Vektoren* von Retroviren ab. Hierzu gehören unter anderem die Spumaviren, die Lentiviren, und die Gammaretroviren (Baltimore, 1970; Coffin, 1997). Kürzlich wurden erstmals Vektoren entwickelt, die auf Alpharetroviren basieren (Suerth et al. 2010). Der Vorteil der stabilen Integration ist die Weitergabe des therapeutischen Gens an die Tochterzellen und damit die Gewährleistung der Expression über lange Zeit beziehungsweise „lebenslang“ (High, 1999; von Kalle et al., 1999).

Die Vielzahl verschiedener Vektoren macht deutlich, dass kein einzelner Vektor für alle Applikationen geeignet ist. Tatsächlich haben alle Vektoren, gemessen an den Maßstäben eines „idealen Vektors“, spezifische Vor- und Nachteile. Für einen solchen „idealen Vektor“ wurden die folgenden Charakteristika spezifiziert (Hodgson, 1995):³

- ▶ leichtes Eindringen in die Zielzelle
- ▶ regulierte und adäquate Expression des Transgens in spezifischen Zellen oder Geweben
- ▶ Integration von Vektoren in das Zielzellgenom oder autonome Replikation von Vektoren
- ▶ sicher, effizient und selektiv ablaufende Transduktion
- ▶ leichte und massenhafte Produktion der Vektoren

2 Neben diesen beiden Gruppen gibt es auch noch Vektoren, die sowohl episodisch als auch integriert vorkommen können (Nakai et al., 1999; Kay et al., 2001; Yanez et al., 2006).

3 Eine ganz ähnliche Charakterisierung liefern auch Monahan/Samulski, 2000.

3.1 Entwicklung des Gentransfers

Die Geschichte der Gentherapie lässt sich bis auf die Entdeckung der Regeln der Vererbung durch Gregor Mendel im 19. Jahrhundert zurückführen. Mit der Identifikation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information wurden Mitte des 20. Jahrhunderts die Voraussetzungen für die spätere Manipulation der Erbsubstanz geschaffen, die mit der Einführung der Technologie zur Herstellung rekombinanter DNA Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts zur Realität wurde. Bereits Mitte der 1960er hatten die beiden Genetiker und Nobelpreisträger Joshua Lederberg und Edward Tatum erstmals die Idee der Gentherapie öffentlich gemacht (Tatum, 1966).⁴ Eine ausführliche Diskussion des Potenzials und der ethischen Aspekte der Gentherapie erfolgte erstmals in zwei Aufsätzen im Jahr 1972 (Anderson, 1972; Friedmann/Roblin, 1972).⁵

Bereits in den frühen 70er und auch in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts kam es zu vereinzelt, oft fragwürdigen und vereinzelt nicht legalisierten gentherapeutischen Experimenten. Bemerkenswerterweise wurde der offensichtlich weltweit erste Gentherapieversuch, noch ohne die Nutzung der Technologie der rekombinanten DNA, Anfang der 1970er Jahre in der Kinderklinik Köln durchgeführt.⁶ Dazu wurden von dem Pädiater Heinz G. Terheggen und Kollegen drei Patienten mit schwerer Hyperarginämie gezielt mit dem Shope-Papillomvirus (SPV) infiziert, in der Hoffnung, dass die virale Arginase den menschlichen Enzymdefekt substituieren könnte (Terheggen et al., 1975). Grundlage dieses Ansatzes waren vorherige Beobachtungen des amerikanischen Forschers Stanfield Rogers (Memphis), dass die virale Arginase des SPV die fehlende Enzymaktivität in Patientengewebekulturen *in vitro* ersetzen kann (Rogers et al., 1973). Zudem wurden bei Virologen, die sich mit dem SPV infiziert hatten, wie auch bei infizierten Kaninchen, verringerte Argininspiegel im Plasma gemessen, was als Resultat der Aktivität der viralen Arginase interpretiert wurde. Da die Infektionen bei Menschen offensicht-

4 Durch Nachdruck in dem Open Access Journal „Cellular Therapy and Transplantation“ wurde Tatus wegweisender Aufsatz kürzlich einem breiten Publikum zugänglich gemacht. Auch wenn aus heutiger Sicht manche seiner Ideen anachronistisch erscheinen, so lohnt es sich in jedem Fall, diesen visionären Artikel zu lesen: www.ctt-journal.com/1-4-en-tatum-1966.html [20.06.2011]. Ebenfalls sehr zu empfehlen ist ein Kommentar zu diesem Aufsatz, der von einem Pionier der modernen Gentherapie (Charles Coutelle) verfasst wurde (<http://www.ctt-journal.com/1-4-en-coutelle-2009june25.html> [20.06.2011]).

5 Eine ausführlichere Darstellung der Geschichte der Gentherapie findet sich bei Friedmann, 1992.

6 Siehe auch www.spiegel.de/spiegel/print/d-44418151.html [20.06.2011].

lich symptomfrei abliefen, schien kein Risiko für die Patienten zu bestehen. Allerdings brachte der klinische Heilversuch auch keinerlei therapeutischen Nutzen (Terheggen et al., 1975) oder signifikanten Informationsgewinn (Friedmann, 1992).

Infolge der Entwicklung der Technik der rekombinanten DNA wurde die gezielte Manipulation der Erbinformation Mitte der 1970er zu einer realen Option. Dies, wie auch das Bekanntwerden spontaner Gentherapieversuche (wie des genannten Kölner Ansatzes), führte zu einer verstärkten öffentlichen Diskussion zum Potenzial, aber auch den ethischen Implikationen der Gentherapie (Freese, 1972; Friedmann/Roblin, 1972). Die Entwicklung kulminierte in einem freiwilligen internationalen Moratorium zur Nutzung der rekombinanten DNA-Technologie, welches erst 1975 nach der bekannten Asilomar-Konferenz aufgehoben wurde (Fredrickson, 1992). Als Ergebnis der Asilomar-Konferenz wurden strenge Richtlinien für die Nutzung rekombinanter DNA sowie nationale Regulierungsbehörden etabliert, deren bekannteste sicher das Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) des National Institute of Health (NIH) in den USA ist.

Auch diese strengen Richtlinien konnten nicht verhindern, dass es im Jahr 1980 einen Versuch gab, rekombinante DNA ohne rechtliche Grundlage für therapeutische Zwecke zu benutzen. Auf der Basis eigener, offensichtlich sehr optimistisch interpretierter Mausdaten, transfizierten Martin Cline und Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter an der University of California Los Angeles die Blutstamm- und Vorläuferzellen von Thalassämie-Patienten (einer lebensbedrohlichen Krankheit infolge defekter roter Blutkörperchen) mit einem Plasmid, welches eine korrekte Kopie des bei den Patienten defekten Globingens trug. Der an zwei Patienten durchgeführte Versuch kann nicht als Studie gewertet werden, da das Protokoll weder eine Überprüfung durch die Ethikkommission noch ein reguläres Genehmigungsverfahren durchlaufen hatte. Die Folgen des inakzeptablen Versuchs waren vielschichtig – während Cline seine wissenschaftliche Reputation verlor, wurde im Ergebnis verstärkt nach Lösungen für die objektiv existierenden wissenschaftlichen, ethischen und administrativen Probleme der Gentherapie gesucht (Anderson/Fletcher 1980; Friedmann, 1992). Anzumerken ist, dass derartige Überschreitungen ethischer Grenzen in klinischen Studien nicht nur ein Problem der Gentherapie darstellen, sondern leider auch in anderen Forschungsgebieten der Medizin zu beobachten sind.

Offiziell startete das Zeitalter der klinischen Gentherapie am 22.05.1989, als der erste Patient im Rahmen einer Studie zur genetischen Markierung tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) am National Institute of Health der USA (NIH) durch Anderson, Blaese, Rosenberg und Kollegen behandelt wurde (Rosenberg et al., 1990). Dies ist insofern bemerkenswert, da die

besagte Studie keinerlei therapeutische Intention hatte, sondern die genetische Modifikation der TIL ausschließlich diagnostischen Zielen diene.⁷ Allerdings wurde aus Sicherheitsaspekten (Patienten, behandelndes Personal, Allgemeinheit) wie auch aus praktischen Gründen (Zulassungskriterien, präklinische Toxikologieuntersuchungen) bereits seinerzeit festgelegt, jegliche Studien, die auf der genetischen Modifikation von Zellen beruhen, unter dem Begriff Gentherapie zu subsumieren.⁸

Erst im darauf folgenden Jahr wurde, ausgehend von derselben Gruppe und ebenfalls am NIH, die erste im engeren Sinne gentherapeutische Studie initiiert: In dieser Studie wurde am 14.09.1990 die erste Patientin, ein vierjähriges Mädchen mit einer autosomal rezessiven genetisch bedingten Krankheit, dem schweren Immundefizienzsyndrom ADA-SCID (Severe Combined Immune Deficiency), mit autologen T-Lymphozyten behandelt. Zuvor war in die T-Zellen ex vivo das Gen für das Enzym Adenosindeaminase (ADA) eingebracht worden; dieses Enzym ist insbesondere für die Vermehrung von Immunzellen wichtig (Blaese et al., 1995). Vergleichbar der Markierungsstudie kamen auch in dieser ersten therapeutischen Studie retrovirale Vektoren als Gentransfervehikel zum Einsatz. Mit diesen Vektoren konnte tatsächlich eine lang anhaltende stabile Expression des eingebrachten ADA-Gens gewährleistet werden; in einzelnen Klonen lässt sich die Expression auch heute noch nachweisen. Allerdings war der klinische Nutzen dieser Gentherapie sehr beschränkt.⁹

In den ersten zehn Jahren ihrer klinischen Anwendung entwickelte sich die Gentherapie rasant, ohne jedoch den umfassenden Heilsversprechen ihrer Protagonisten folgen zu können; letztere gingen bereits für das Jahr 2000 von mehreren Tausend durch Gentherapie geheilter Patientinnen und Patienten aus. Tatsächlich wurde eine Reihe alternativer Vektoren in die klinische Praxis eingeführt (z. B. 1992: nicht-virale Vektoren; 1995: adenovirale Vektoren; 1996: Adeno-assoziierte Vektoren)¹⁰ und neben den genetisch bedingten Krankheiten eine Vielzahl

7 Bei der genannten Markierungsstudie wurden retrovirale Vektoren benutzt, die sich stabil in das Zielzellgenom einbauen, um die zu infundierenden TIL ex vivo individuell zu markieren.

8 Dieser Definition der Gentherapie folgt man im Wesentlichen bis heute, auch wenn spezielle Formen genetischer Manipulationen (wie z. B. das Einbringen kurzer DNA- oder RNA-Moleküle, aber auch die genetische Vakzinierung) aus Gründen der Praktikabilität in vielen Ländern inzwischen nicht mehr als Gentherapie betrachtet werden.

9 Zum einen waren die technischen Voraussetzungen für die effiziente ex-vivo-Kultur und Transduktion von T-Lymphozyten zum damaligen Zeitpunkt nicht ausreichend; zum anderen wurden die Patientinnen und Patienten aus Sicherheitsgründen auch nach der Infusion der genetisch modifizierten Zellen weiterhin mit PEG-ADA substituiert.

10 Ausführlich zu den unterschiedlichen Vektoren – vgl. Kapitel 3.3.2; zu einzelnen Indikationen – vgl. Kapitel 3.4.

weiterer potenzieller Anwendungen vor allem im onkologischen Bereich¹¹ definiert (Überblick in Anderson, 2000; Williams et al., 2000). Durch das Ausbleiben des angekündigten Erfolgs in den vielfältigen ersten Studien trat jedoch eine gewisse Ernüchterung in der Öffentlichkeit, bei beteiligten Firmen und auch im Feld selbst auf. Diese verstärkte sich insbesondere durch den ersten zweifelsfrei auf die gentherapeutische Prozedur zurückzuführenden Tod eines Patienten, Jesse Gelsinger, im Jahr 1999 (im Einzelnen siehe Kapitel 2). Vor allem die mit dem Tod des Studienpatienten einhergehenden Begleitumstände (u. a. Ignorieren schwerer Nebenwirkungen im Tierversuch, unzureichende und teilweise manipulierte Patienteninformation, Applikation zu hoher Dosen) wurden inner- und außerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft massiv kritisiert.¹² Weitere Ernüchterung trat ein, als eine tiefgreifende Untersuchung des NIH im November 1999 ergab, dass im Rahmen der durch öffentliche Mittel geförderten Gentherapiestudien der vorhergehenden Jahre nur etwa 5% der meldepflichtigen Ereignisse (Erkrankungen und mehrere Todesfälle, die jedoch nicht notwendigerweise im kausalen Zusammenhang zur Gentherapie standen) gemeldet worden waren. Obwohl sich ein Teil der Versäumnisse sicher mit den unterschiedlichen Melderichtlinien von NIH und Federal Drug Administration (FDA) erklären ließ,¹³ waren die Folgen für das Feld insgesamt verheerend. Es kam zu einem erheblichen Verlust der Glaubwürdigkeit, welcher die bereits zuvor kritische Haltung in weiten Teilen der Öffentlichkeit bestärkte. Auf regulatorischer Ebene wurden strengere Maßstäbe und klarere Richtlinien etabliert. Insgesamt gewann zudem die detaillierte Risiko-Nutzen-Abwägung für einzelne Therapieansätze noch größere Bedeutung.

Ein Jahr nach dem Tod von J. Gelsinger konnte die Gruppe um Alain Fischer in Paris dahingegen den ersten durchschlagenden Erfolg der Gentherapie bei Kindern mit dem schweren X-chromosomal gebundenen Immundefizienzsyndrom SCID-X1 vermeiden. Durch retroviralen Gentransfer einer funktionellen Kopie der „common γ chain“, eines essenziellen Bestandteils des Interleukin-2-Rezeptors sowie weiterer Zytokinrezeptoren, der bei diesen Kindern fehlt,

11 Tumorerkrankungen werden oft auch als „erworbene genetische Erkrankungen“ angesehen.

12 www.asgt.org/meeting_archives/am00/presaddress.php [09. 11. 2010].

13 Vgl. Tröhler, 2000 und Thompson, 2000. Zwar bestanden Meldepflichten bei Zwischenfällen, so genannte „serious adverse events“ (SAE), sowohl gegenüber der FDA als auch dem NIH, jedoch nach sehr unterschiedlichen Standards. Während der FDA nur solche SAE gemeldet werden mussten, für die ein Zusammenhang mit der Gentherapie wahrscheinlich oder erwiesen war, mussten dem NIH alle SAE gemeldet werden „regardless of whether or not they are thought to be related to the gene transfer intervention“.

wurde in Paris eine vollständige Korrektur des genetischen Defekts und des damit verbundenen Phänotyps erreicht (Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2010). Diese Ergebnisse konnten in einer vergleichbaren Studie, initiiert von Adrian Thrasher und Kolleginnen und Kollegen in London, reproduziert werden (Gaspar et al., 2004; Gaspar et al., 2011). Während unbehandelte SCID-X1-Patienten¹⁴ nur unter Isolationsbedingungen leben können, trotzdem häufig unter schweren Infektionen leiden, massive Retardationen aufweisen und selten das 20. Lebensjahr erreichen, können fast alle der inzwischen 20 SCID-X1-Kinder, die in Frankreich und Großbritannien behandelt wurden, ein weitgehend normales Leben führen.

Trotzdem war es gerade die zunächst so erfolgreiche Pariser Studie, die auch durch ihre schweren Rückschläge in die Schlagzeilen geriet: Das plötzliche Auftreten von akuten T-Zellproliferativen Erkrankungen (Leukämien) bei inzwischen vier von neun erfolgreich behandelten Kindern konnte auf eine Nebenwirkung des Gentransfers zurückgeführt werden (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2008).¹⁵ Auch in der Londoner Studie trat in einem der Patienten eine Leukämie auf (Howe et al., 2008). In vier der fünf Fälle waren die malignen Klone vergleichsweise sensitiv gegenüber chemotherapeutischen Agenzien, sodass die betroffenen Patienten durch Chemotherapie in anhaltende komplette Remissionen gebracht werden konnten. Relativ unerwartet war dabei, dass auch nach der Chemotherapie bei diesen vier Patienten genügend genetisch korrigierte (Vorläufer-)Zellen im Knochenmark oder Thymus verblieben, um weiterhin einen therapeutischen Effekt im Hinblick auf die Grunderkrankung (SCID-X1) zu gewährleisten. Einer der vier betroffenen Pariser Patienten benötigte jedoch eine allogene Blutstammzelltransplantation, die mit so schweren Nebenwirkungen einherging, dass er in ihrer Folge verstarb (Cavazzana-Calvo/Fischer, 2007; Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Der klinische Erfolg der SCID-X1-Studie bestätigte das prinzipiell kurative Potenzial der Gentherapie bei monogen bedingten Krankheiten im hämatopoetischen System (siehe auch Kapitel 3.4.1).

Kurze Zeit später konnten diese Ergebnisse auch bei anderen schweren Immundefekten wie Adenosindeaminase-Mangel (ADA-SCID), Chronischer Granulomatose (CGD) oder Wiskott-

14 Da es sich um eine rezessive Mutation auf dem X-Chromosom handelt und Betroffene kaum das Erwachsenenalter erreichen, sind von der Krankheit praktisch nur Jungen betroffen.

15 Die Nebenwirkung bestand in der Aktivierung von Onkogenen infolge der benachbarten Insertion des mit starken Enhancer-Elementen ausgestatteten retroviralen Vektors; ausführlicher zur so genannten Insertionsmutagenese siehe auch Kapitel 3.3.4.

Aldrich-Syndrom (WAS) reproduziert werden.¹⁶ Insofern stellten diese Ergebnisse den lange ersehnten „proof of principle“ dar. Allerdings wurden mittlerweile auch in der CGD- und der WAS-Studie schwere Nebenwirkungen festgestellt, für die eine kausale Rolle der Genmodifikation, insbesondere des verwendeten gammaretroviralen Vektors, gezeigt wurde beziehungsweise wahrscheinlich ist (Stein et al., 2010; Press release MHH vom 11.11.2010¹⁷), sodass die Frage der unerwünschten Nebenwirkungen weiter auf der Tagesordnung bleibt. Dagegen wurden aus der Mailänder ADA-SCID-Studie trotz eines vergleichbaren Studiendesigns und der Benutzung ähnlicher Gentransfervektoren bisher keine schweren Nebenwirkungen berichtet, obwohl einige Patienten bereits vor mehr als zehn Jahren behandelt wurden (Aiuti et al., 2009). Ob diesen unterschiedlichen Ergebnissen krankheitsspezifische Ursachen, zum Beispiel durch Vorschädigungen der Blutstammzellen, zu Grunde liegen, wird derzeit noch erforscht.

Infolge dieses ambivalenten Erfolges wird seit Beginn des 21. Jahrhunderts an breiter Front an einer Verbesserung der existierenden Technologien für den Gentransfer gearbeitet. Inzwischen scheint diese Entwicklung die ersten Früchte zu tragen, zum Beispiel in Form vielversprechender klinischer Ergebnisse in einer Reihe von Studien bei unterschiedlichsten Grunderkrankungen und mit verschiedenen Vektorsystemen.

Bereits Mitte der 1990er Jahre begann sich die wissenschaftliche Gemeinschaft im Bereich der Genterapie zu institutionalisieren: Die Vorläuferorganisation der European Society for Gene and Cell Therapy wurde 1993 gegründet, 1996 folgte die American Society of Gene Therapy.¹⁸ In Deutschland gründete sich 1994 die Deutsche Gesellschaft für Genterapie (DG-GT) als Vereinigung forschender Ärzte und Naturwissenschaftler, die in diesem Bereich wissenschaftlich aktiv sind.¹⁹

Eine erste Marktzulassung eines genterapeutischen Produktes erfolgte im Oktober 2003 im Bereich der Tumorerkrankungen: In der VR China wurden die weltweit ersten kommerziellen Genterapieprodukte für die klinische Anwendung lizenziert – Gendicine® von SiBiono Genetech²⁰ sowie Oncorine® durch die Firma Shanghai Sunway Biotech (siehe auch Kapitel 3.4.2).

16 Vgl. Aiuti et al., 2002; Gaspar et al., 2006; Ott et al., 2006; Boztug et al., 2010.

17 www.mh-hannover.de/46.html?&no_cache=1&tx_ttnews%5Btt_news%5D=1798&tx_ttnews%5BbackPid%5D=45&cHash=41f20d5263 [04.03.2011].

18 Seit 2010: American Society of Cell and Gene Therapy.

19 www.dg-gt.de [10.11.2010].

20 www.sibiono.com [13.04.2011], die Website ist derzeit nur auf chinesischesch verfügbar.

3.2 Status quo klinischer Genterapiestudien

Die Genterapie wird als ein medizinisches Behandlungsverfahren mit Gentransfer-Arzneimitteln eingestuft und unterliegt als solches dem Arzneimittelgesetz (AMG); infolge dessen müssen vor der Zulassung eines neues Medikamentes klinische Studien zur Wirksamkeit und Toxizität von Arzneimitteln am Menschen durchlaufen und erfolgreich abgeschlossen werden (zur rechtlichen Zulassung siehe Kapitel 5). Klinische Studien werden üblicherweise in vier Phasen unterteilt (vgl. u. a. DFG, 2007:30f.):

- ▶ In der Phase I wird zunächst an einer kleinen Zahl von gesunden Probandinnen und Probanden die Verträglichkeit beziehungsweise Toxizität von neuen Wirkstoffen geprüft; bei Genterapiestudien werden allerdings derzeit auch in Phase I keine gesunden Probandinnen und Probanden eingeschlossen.
- ▶ Aufbauend auf den Ergebnissen der Phase I wird in Phase II an einer größeren Zahl von Studienteilnehmenden die optimale Dosis festgestellt.
- ▶ In Phase III wird die eigentliche Wirkung an einer für eine statistisch valide Auswertung ausreichend großen Zahl von Patientinnen und Patienten mit bestimmten Ein- und Ausschlusskriterien bestimmt. Hierzu gehört gegebenenfalls der Vergleich mit einem Scheinmedikament ohne wirksame Inhaltsstoffe (Placebo).
- ▶ Erst auf Basis einer erfolgreichen Phase-III-Studie ist die Zulassung eines neuen Arzneimittels möglich. Danach können die Wirkungen einer neuen Therapie in ihrer zugelassenen Anwendung weiter untersucht beziehungsweise beobachtet werden. Man spricht dann von einer so genannten Phase-IV-Studie.

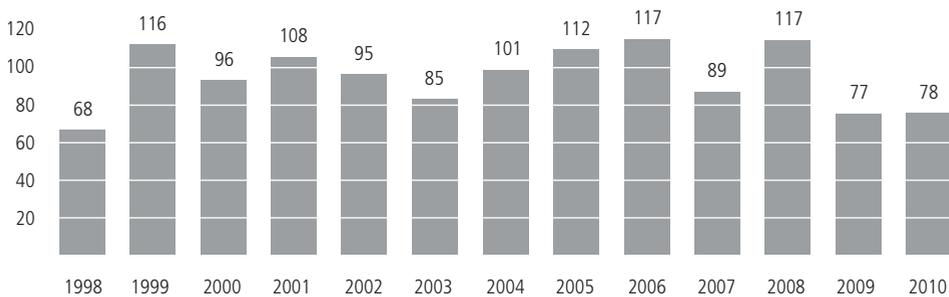
In der Bundesrepublik gibt es seit einigen Jahren am Zentrum Klinische Studien, Universitätsklinikum Freiburg, das Deutsche Register für somatische Gentransferstudien (DeReG). Dieses Register hatte bis 2005 einen sehr guten Überblick über die in Deutschland laufenden und abgeschlossenen klinischen Genterapiestudien erarbeitet, scheint aber seit einiger Zeit keine Daten mehr zu erheben.²¹ International bietet ein von der Fachzeitschrift „The Journal of Gene Medicine“ (Wiley) jährlich aktualisiertes Verzeichnis²² die vollständigste Datensammlung zu

21 www.dereg.de [10. 11. 2010].

22 www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/ [26. 04. 2011].

Gentherapiestudien. Auch wenn einige Länder keine oder nur unvollständige Daten bereitstellen, kann man sich anhand der Wiley-Datenbank einen sehr guten Überblick sowohl über die qualitative und quantitative Entwicklung der Gentherapie wie auch über die regionale Verteilung der laufenden Studien verschaffen (siehe Kapitel 9.2, Indikator 7). In dieser Datenbank sind mit Stand vom März 2011 circa 1700 internationale Gentherapiestudien verzeichnet. Die Entwicklung der letzten 13 Jahre illustriert Abbildung 2:

Abbildung 2: Anzahl der weltweit durchgeführten Gentherapiestudien seit 1998

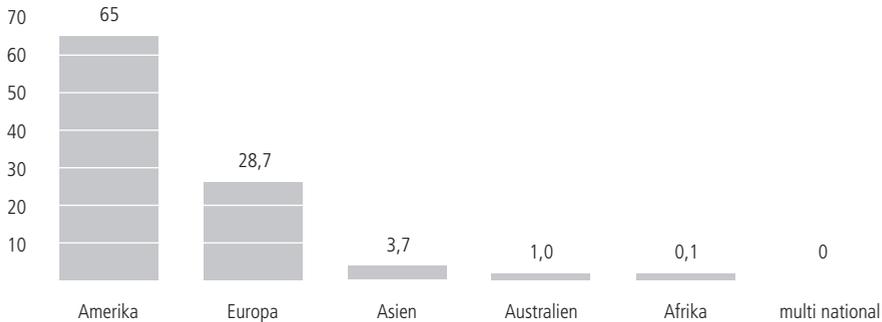


Quelle: Wiley-Datenbank, Stand März 2011; die Daten des letzten Jahres sind infolge der Meldeverzögerungen stets unvollständig.

Die geografische Verteilung der in der Wiley-Datenbank aufgeführten Gentherapiestudien zeigt eine deutliche Vormachtstellung der Vereinigten Staaten mit 63,7%. Auch wenn diese Zahlen dadurch beeinflusst sind, dass die USA über das am längsten funktionierende und zuverlässigste Studienregister im Bereich der Gentherapie verfügen, während andere Länder gar keine Studien an die Datenbank melden, ist der Abstand zu den folgenden Ländern doch eindeutig. Die europäischen Staaten werden mit circa 29% der Studien geführt, Asien mit knapp 4%. Allerdings liegen für wichtige Staaten wie China und Russland keine oder nur sehr unvollständige Daten vor.

Innerhalb Europas dominiert unverändert Großbritannien mit fast 12% der weltweiten Studien vor Deutschland (4,6%) und der Schweiz (knapp 3%). Deutschland liegt somit weiterhin auf dem dritten Platz weltweit – circa jede 20. der bis 2010 registrierten Studien wurde hier durchgeführt.

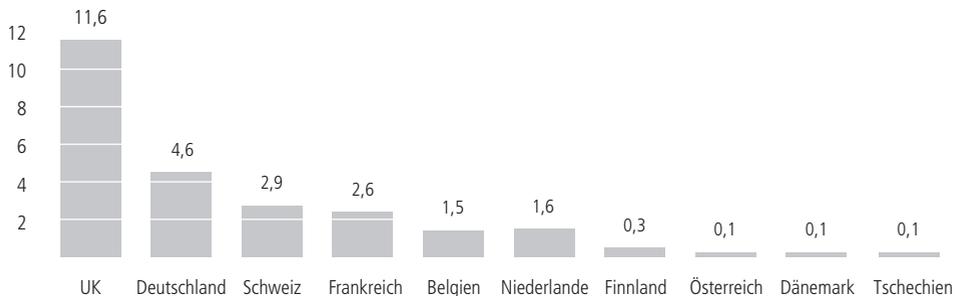
Abbildung 3: Kontinentale Verteilung von klinischen Gentransferstudien (in Prozent)



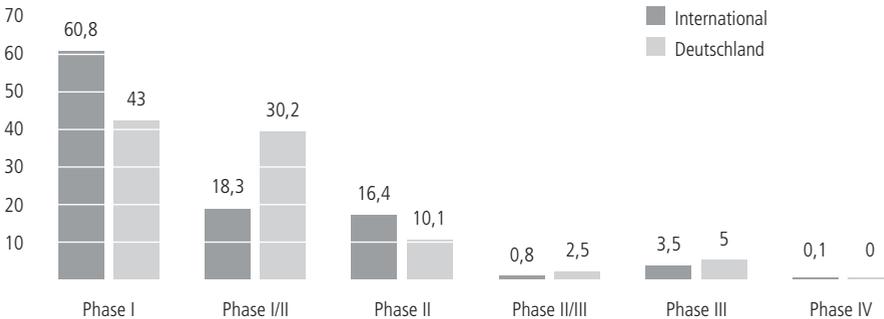
Quelle: Wiley-Datenbank, Stand März 2011.

Bei nahezu vier Fünftel aller bisher durchgeführten klinischen Studien handelte es sich um Studien der Phasen I beziehungsweise I/II (1347 Studien = 79,1%); 293 Studien (17,2%) entfielen auf die Phasen II (279) beziehungsweise II/III (13). Nur 59 Studien erreichten bisher die Phase III (3,5%), zudem gab es zwei Phase-IV-Studien. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die große Mehrheit der Studien nach wie vor das Ziel verfolgt, die prinzipielle Anwendbarkeit im Menschen („first in man“) und im Folgenden die generelle Machbarkeit und Sicherheit („feasibility and safety“) der entwickelten gentherapeutischen Strategien zu prüfen.

Abbildung 4: Verteilung klinischer Studien in Europa (in Prozent)



Quelle: Wiley-Datenbank, Stand März 2011, im weltweiten Vergleich.

Abbildung 5: Verteilung der Gentransferstudien nach Phasen (in Prozent)

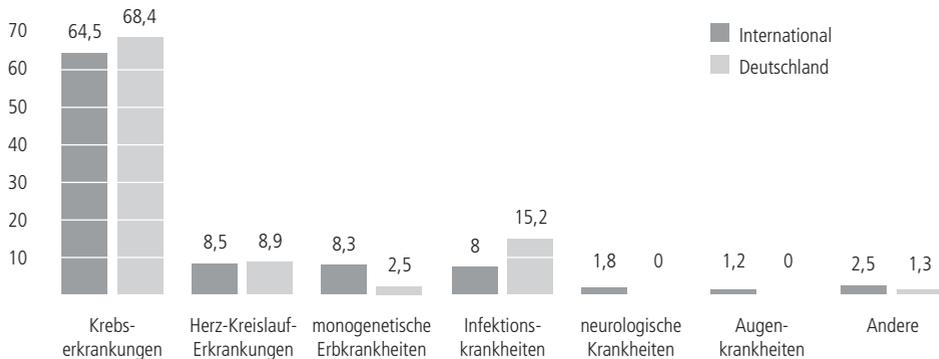
Quelle: Wiley-Datenbank, Stand März 2011; es werden alle Studien gezählt, die bewilligt beziehungsweise initiiert worden sind.

Bis zur Zulassung einzelner Arzneimittel und zur breiten Anwendung werden, sowohl in Europa als auch in den USA, wohl noch einige Jahre vergehen.²³ Eine Sonderrolle könnten allerdings gentherapeutische Konzepte bei seltenen Immundefizienzen wie ADA-SCID (siehe unten) einnehmen. Vorausgesetzt die klinische ADA-Studie verläuft weiter erfolgreich, könnte die Gentherapie-Behandlung einen Orphan-Drug-Status bekommen, welcher eine vereinfachte Form der Marktzulassung darstellt.

Ein Blick auf die Indikationen, für die weltweit gentherapeutische Strategien entwickelt wurden, ergibt folgendes Bild: Schon seit mehreren Jahren liegt der Anteil onkologischer Erkrankungen stabil bei circa zwei Drittel aller in Gentherapiestudien behandelten Krankheiten (siehe Kapitel 9.2, Indikator 8). Dagegen kommen nach dem neuesten Stand die genetisch bedingten (monokausalen) Krankheiten – als die klassische Indikation der Gentherapie – auf etwas über 8% und liegen damit hinter kardiovaskulären Erkrankungen (8,5%). Die letzte größere Indikation stellen Infektionskrankheiten (vor allem AIDS) mit 8% dar, während neurologische Erkrankungen (1,8%) und Augenkrankheiten (1,2%) zusammengenommen noch hinter den so genannten Genmarkierungsstudien (2,9%) liegen (siehe Abbildung 6), allerdings ein großes Wachstumspotenzial haben.

23 Die überraschende Zulassung des ersten Gentherapieproduktes (Gendicine®) in China im Jahr 2003 wurde bereits kurz erwähnt.

Abbildung 6: Indikationen für genterapeutische Studien (in Prozent)



Quelle: Wiley-Datenbank, Stand März 2011; es werden alle Studien gezählt, die bewilligt beziehungsweise initiiert worden sind.

Im Vergleich zur internationalen Situation unterscheidet sich die bundesdeutsche Forschungslandschaft aktuell nur leicht: Den weitaus größten Anteil bilden auch hier Studien zu Krebserkrankungen; an zweiter Stelle folgen jedoch schon die Infektionskrankheiten mit 15,2%, die damit deutlich über dem internationalen Durchschnitt liegen. An dritter Stelle stehen die Herz-Kreislaufkrankheiten. Derzeit sehr wenig (bis gar nicht) beforscht werden in Deutschland dagegen genterapeutische Interventionen für neurologische sowie okuläre Erkrankungen.

Die Verteilung der Indikationen spiegelt offensichtlich bis zu einem gewissen Grad auch die gesamtgesellschaftliche Relevanz der verschiedenen Krankheitsbilder (und damit auch die Bereitstellung von Forschungsgeldern in den verschiedenen Bereichen) wider. Allerdings spielen angesichts der Komplexität der Methoden und des teilweise hohen Risikos beziehungsweise einer schwierigen Risiko-Nutzen-Analyse immer wieder auch andere Faktoren eine Rolle. So lässt sich die Anwendung eines potenziell riskanten Behandlungsverfahrens vor dem Hintergrund lebensbedrohlicher Krankheiten (Krebs, schwere Immundefizienzsyndrome) eher rechtfertigen, als im Kontext beherrschbarer Erkrankungen. Aber auch die potenzielle Erreichbarkeit verschiedener Gewebe ist von Bedeutung. Nicht zufällig waren es Krankheiten des hämatopoetischen Systems, die als erste genterapeutisch angegangen wurden. Auch die relativ rasante Entwicklung in den letzten Jahren von gen- und zelltherapeutischen Verfahren zur Behandlung von neurolo-

gischen Krankheiten wie auch Augenerkrankungen steht sicher in Zusammenhang mit der vergleichsweise guten Zugänglichkeit beziehungsweise dem Immunprivileg der betroffenen Organe.

3.3 Aktueller wissenschaftlich-technischer Stand

Im Folgenden wird der derzeitige wissenschaftlich-technische Stand der Gentherapie dargestellt (siehe auch Kapitel 9.2, Indikator 3). Vor diesem Hintergrund werden die Realisierungschancen einzelner Konzepte analysiert. Die Darstellung beginnt mit einem kurzen Überblick über verschiedene gentherapeutische Wirkprinzipien, um sich dann unterschiedlichen Vektoren zu widmen. Die Entwicklung der Vektortechnologie stellt weiterhin eine der Grundvoraussetzungen für den Erfolg und die breite klinische Anwendung der Gentherapie dar (Mulligan, 1993).²⁴ Konzeptionell wird bei der Beschreibung unterschiedlicher Vektoren das Grundprinzip der „klassischen“ Aufteilung in virale und nicht-virale Vektoren beibehalten (siehe Einleitung zu Kapitel 3), obwohl die Kooperation von „Vektorologen“ aus beiden Sparten als besonders vielversprechend angesehen wird (Walker et al., 2005; Wagner, 2008). Es folgt ein kurzer Exkurs in das komplexe Thema der Gestaltung von Transgenkassetten, bevor Aspekte präklinischer Prüfverfahren erörtert werden.

3.3.1 Prinzipielle Wirkprinzipien eines Gentransfers

Das generelle Ziel der somatischen Gentherapie besteht darin, einen genetischen Defekt in pathophysiologisch relevanten Zellen des Körpers zu korrigieren.²⁵ Eine genetische Modifikation von Keimbahnzellen wird dabei ausdrücklich nicht angestrebt und ist auch nicht erwünscht. Es handelt sich also um eine kausale Therapie des genetischen Defekts, die sich aber auf die betroffenen Patientinnen und Patienten beschränkt und nicht dritte Personen oder die direkten Nachkommen betrifft. In praktischer Hinsicht bedeutet dies, dass eine ausreichend große Zahl von Zellen genetisch korrigiert werden muss, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen.²⁶ Im Rahmen der Gentherapie werden eine ganze Reihe verschiedener Ansätze verfolgt, die sich aber auf einige wenige Wirkprinzipien zusammenfassen lassen:

-
- 24 Unter Gentherapeuten wird der Gentherapie-Pionier Inder Verma gern mit dem Satz zitiert: „There are only three problems in gene therapy – delivery, delivery, and delivery.“ (Jaroff, 1999)
- 25 Einen Sonderfall stellen Genmarkierungsstudien dar, die dem besseren Verständnis der Entstehung bzw. Ausbreitung von Krankheiten und/oder der Entwicklung effizienterer Therapieansätze dienen.
- 26 Zum Beispiel besteht die menschliche Leber aus eins bis drei Billionen ($1-3 \times 10^{12}$) Zellen.

a) Genmarkierung – genetische Markierung von Zellen, in der Regel durch Insertion eines Gentransfervektors in das Zellgenom. Genmarkierungsstudien dienen zumeist der Ermittlung des therapeutischen Nutzens und des Risikos einer gegebenen Behandlungsstrategie.

b) Genersatz, „replacement“²⁷ – Die ursprüngliche Idee der Therapie mit Genen bestand darin, ein defektes Gen zu reparieren beziehungsweise zu ersetzen. Da eine solche Genkorrektur in situ aus praktischer Sicht sehr kompliziert ist, sind klinische Studien dazu noch nicht in Sicht. Als technisch wesentlich einfacher stellt sich die Addition einer funktionellen Genkopie in das Genom der Zielzellen mit Hilfe eines Gentransfervektors dar. Allerdings funktioniert ein solcher Ansatz nur im Falle rezessiver monogen bedingter Krankheiten. Außerdem ist zu beachten, dass die eingebrachte Genkopie nicht der natürlichen Expressionskontrolle unterliegt, sodass das Verfahren nicht einfach anwendbar ist, wenn eine sehr genaue Steuerung der Expression notwendig ist. Vielversprechende neue Ansätze für einen zukünftigen Genersatz stellen gerichtete gentherapeutische Ansätze im Sinne einer „Genchirurgie“ dar (s. unten).

c) Geninhibition – Ansätze zur Unterdrückung bestimmter Gene dienen verschiedenen Zielen: Zum einen können solche Verfahren benutzt werden, um defekte dominante Gene auszuschalten, beispielsweise bei monogen bedingte Krankheiten oder bei erworbenen genetischen Erkrankungen wie Krebs oder HIV. Alternativ können Gene supprimiert werden, um die Zelle gegen äußere Pathogene resistent zu machen, wie im Falle des als Ko-Rezeptor für HIV dienenden CCR5. Die Ausschaltung von Genen kann direkt durch ihre physische Zerstörung (im Sinne eines genetischen „knock out“) sowie durch die Hemmung der Expression über RNA-Interferenz („knock down“) oder indirekt durch die Expression inhibitorischer Moleküle erfolgen.

d) Genaddition – Der Einsatz von Gentransfervektoren eröffnet die Möglichkeit, eine Zelle mit einem völlig „neuen“ Gen²⁸ auszustatten, welches diese zum Beispiel vor Pathogenen schützt oder ihre Anwendbarkeit für zelltherapeutische Verfahren verbessert.²⁹ Beispiele hierfür sind:

27 Im engeren Sinne trifft die Bezeichnung nicht für alle der unter diesem Begriff subsumierten Verfahren zu, hat sich aber für unterschiedliche Verfahren zur Wiederherstellung einer Zellfunktion eingebürgert.

28 Neu bedeutet hier, dass die Gene in den entsprechenden Zielzellen zu diesem Zeitpunkt nicht oder nicht mehr exprimiert werden.

29 Diese Eingriffe dienen ausschließlich therapeutischen Zwecken. Sie sind abzugrenzen von Verfahren des „genetic enhancement“ (siehe Kapitel 7.2).

- ▶ Die Aufrüstung von Zellen des Immunsystems mit neuen Erkennungsmolekülen (Rezeptoren), die in anderen Patientinnen und Patienten erfolgreich Krebszellen oder Viren attackiert hatten.
- ▶ Ausstattung von virusinfizierten oder Tumorzellen mit Genen, die Abwehrzellen des Immunsystems anlocken.
- ▶ Das Einschleusen so genannter Suizidgene oder anderer inhibitorischer Gene mit dem Ziel der Zerstörung beziehungsweise Inhibition von Tumorzellen.
- ▶ Der Einbau von Selektionsgenen in genetisch modifizierte Zellen. Diese Gene können nach Infusion einen Selektionsvorteil in vivo, beispielsweise gegenüber einem bestimmten Wirkstoff, vermitteln, sodass genetisch modifizierte Zellen gezielt expandiert werden können. Alternativ können negative Selektionsgene (Suizidgene) eingebracht werden, um genetisch modifizierte Zellen im Falle des Auftretens unerwünschter Nebenwirkungen gezielt entfernen zu können.

3.3.2 Gentransfervektoren

Wie bereits dargelegt, dienen Vektoren dazu, das Transgen möglichst effizient in die jeweilige Zielzelle einzuschleusen. Zugleich übernehmen Kontrollelemente im Vektor, die entweder aus dem Ursprungsvirus stammen oder gezielt in den Vektor eingefügt wurden, die Regulation der Expression des Transgens in der Zielzelle. Es existieren eine ganze Reihe unterschiedlicher Methoden des Gentransfers, die sich jedoch alle den beiden grundlegenden Verfahren – viralem und nicht-viralem (bzw. physiko-chemischen) Gentransfer zuordnen lassen.

3.3.2.1 Virale Vektoren

Wie der Name schon sagt, macht man sich bei viralen Vektoren die Eigenschaften von Viren zu Nutze, um einen effizienten Gentransfer zu gewährleisten. Dabei können folgende Eigenschaften von Viren, in der Regel in modifizierter Form, ausgenutzt werden:

- ▶ ihr hohes Replikations- beziehungsweise Vermehrungspotenzial, welches vor allem im Zuge der Vektorherstellung erwünscht ist. Für den eigentlichen Gentransfer sind die Vektoren in der Regel replikationsinkompetent³⁰.

30 Es gibt auch Therapieansätze mit replizierenden Viren, vor allem in der Onkologie (onkolytische Viren).

- ▶ die Möglichkeit der Verpackung der zu übertragenden genetischen Information in biologische Nanopartikel (Durchmesser –20 bis 200 nm).
- ▶ die effiziente Übertragung der Nukleinsäure durch die Viruspartikel (Virionen) in die Zielzelle; idealerweise kann das Zielzellspektrum über die viralen Hüllproteine genau spezifiziert werden.

Nach der Aufnahme der Viruspartikel durch die Zielzelle kommt es zu einer Reihe weiterer, oft spezifischer molekularer Interaktionen im Zytoplasma beziehungsweise Zellkern der Zielzelle. Diese werden auf der Basis der Fortschritte der molekularen Virologie in den letzten Jahren immer besser verstanden und können dadurch zunehmend beeinflusst werden. Dies ist umso wichtiger, da jeder einzelne Schritt einen nachhaltigen Einfluss auf die Effizienz und die Spezifität des Gentransfers haben kann. Die derzeit wichtigsten Forschungsschwerpunkte im Bereich der viralen Vektorologie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ▶ Entwicklung sicherer und effizienter Verfahren für die Vektorproduktion in so genannten Verpackungszellen
- ▶ Modifikation viraler Hüll- beziehungsweise Oberflächenproteine, um eine spezifische(re) Wechselwirkung mit der gewünschten Zielzelle zu gewährleisten³¹
- ▶ Analyse der Wechselwirkungen zwischen viralem Vektor und zellulärem Umfeld mit dem Ziel der Verbesserung der Persistenz verschiedener Vektoren bei gleichzeitiger Minimierung ihres Einflusses auf die Zellphysiologie
- ▶ Design von virus- und zellkompatiblen Expressionskassetten, die eine dauerhafte, idealerweise gewebespezifische Expression gewährleisten

Für unterschiedliche Anwendungen stehen zwei sich prinzipiell unterscheidende Typen viraler Vektoren zur Verfügung – stabil in das Zellgenom integrierende Vektoren (a) sowie Vektoren, die vornehmlich episomal in der Zelle vorliegen (b):

31 Prinzipiell kann die Spezifität von Vektoren auf zwei Wegen erhöht werden: durch „targeting“ (Erhöhung der Spezifität für die Zielzelle, zum Beispiel durch Kopplung mit hochspezifischen Antikörpern) oder durch „detargeting“ (Verringerung der Bindungswahrscheinlichkeit an andere als die Zielzellen).

a) *Obligatorisch integrierende* Vektoren werden von Retroviren abgeleitet (Baum et al., 2006b). Dabei handelt es sich um eine große Familie von Einzel(+)-Strang RNA-Viren, bei denen die Integration in das Zielzellgenom einen essenziellen Schritt des Lebenszyklus darstellt. Diese Integration wird durch ein spezielles retrovirales Enzym, die Integrase, vermittelt, die zu diesem Zweck mit spezifischen Sequenzen im Virus, respektive Vektorgenom interagieren muss. Dagegen weist die Integrase keine ausgeprägte Spezifität für die Zielsequenz im Genom auf, die Integration erfolgt also weitgehend beliebig (Suzuki/Craigie, 2007). Jedoch kann der so genannte Präintegrationskomplex, der aus viralen Proteinen und dem viralen Genom gebildet wird, je nach Virustyp unterschiedliche Eigenschaften besitzen und auf verschiedene zelluläre Kofaktoren zurückgreifen. Dies resultiert für verschiedene Retroviren beziehungsweise daraus abgeleitete Vektoren in sehr unterschiedlichen Integrationspräferenzen (Mitchell et al., 2004; Derse et al., 2007). Dies kann deshalb von Bedeutung sein, da die Genotoxizität als wichtigste unerwünschte Nebenwirkung und dosislimitierender Faktor des retroviralen Gentransfers anzusehen ist.³² Als Genotoxizität eines Vektors wird die Möglichkeit der Aktivierung oder Suppression der Expression von Genen bezeichnet, die sich in der Nachbarschaft der Integrationsstelle des Vektors befinden (Baum et al., 2003; Baum et al., 2006a).

Da es sich bei den meisten Retroviren um potenzielle Pathogene für den Menschen handelt, wurden die abgeleiteten Vektoren so modifiziert, dass sie nicht mehr replikationskompetent sind, sich also im Wirtsorganismus nicht mehr vermehren können. Das Grundprinzip der Herstellung replikationsdefekter Partikel ist bei vielen viralen Vektoren sehr ähnlich (Kay et al., 2001). Der Vektor enthält nur die Anteile des viralen Genoms, die für die Verpackung des Genoms in die Viruspartikel sowie gegebenenfalls die Integration in das Zielzellgenom essenziell sind. Sequenzbereiche, die für virale Proteine kodieren, werden soweit möglich aus dem Genom entfernt. Die für die Generierung infektiöser Viruspartikel notwendigen Strukturproteine und Enzyme werden in einer so genannten Verpackungszelle in trans zur Verfügung gestellt. Generierte Vektorpartikel sind somit nur zu einer einzigen Infektion der Zielzelle in der Lage. Da es sich nicht um einen tatsächlichen Infektionszyklus handelt, wird der Prozess in diesem Fall Transduktion genannt.

Als Beispiele für obligatorisch integrierende Vektoren aus der Familie der Retroviren seien Gammaretroviren, Alpharetroviren und Lentiviren aus der Unterfamilie der Orthoretroviren

32 Vgl. Li et al. 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008; Stein et al., 2010.

sowie Foamyviren (auch Spumaviren) als einzige Gattung der Unterfamilie der Spumaviren genannt: Die *Gammaretroviren* (z. B. Mausleukämievirus, MLV) besitzen ein sehr kleines und einfach strukturiertes Genom, welches aus nur drei Genen besteht. Das so genannte *gag*-Gen (für *group antigen*) kodiert für die Strukturproteine des Viruskapsids, das *pol*- (*polymerase*) Gen für die viralen Enzyme (u. a. Integrase, Protease) und schließlich das *env*- (*envelope*) Gen für das Hüllprotein, welches die Wirtsspezifität definiert. Die beiden erst genannten Gene kodieren Polyproteine, welche durch die Protease prozessiert werden müssen, um ihre Funktion erfüllen zu können.

Gammaretroviren sind bereits recht lange bekannt; die stabile Integration in das Wirtsgenom machte sie bereits in den 1980er Jahren zu interessanten Gentransfervektoren, insbesondere für die genetische Modifikation von Stammzellen. Entsprechend wurden alle Gentherapie- und Markierungsstudien, die einer stabilen Integration bedurften, bis Mitte der 2000er Jahre mit gammaretroviralen Vektoren durchgeführt (Alexander et al., 2007; Alton et al., 2007; Edelstein et al., 2007). Insgesamt erwiesen sich die gammaretroviralen Vektoren in einer Reihe klinischer Studien wie auch zellbiologischer Forschungsansätze als effizientes und vielseitiges Gentransfersystem. Allerdings weisen MLV-abgeleitete Vektoren spezifische Nachteile auf. Dazu zählt insbesondere ihre Unfähigkeit, ruhende Zellen zu transduzieren (Suzuki/Craigie, 2007). Auch ihre relative „Vorliebe“, im Zielzellgenom in der Nähe von Genpromotoren zu integrieren (Wu et al., 2003; Cattoglio et al., 2007), gilt als Nachteil, da damit ein höheres Sicherheitsrisiko verbunden ist (Montini et al., 2009; Modlich et al., 2009). Dass die Genotoxizität integrierender Vektoren nicht vernachlässigt werden darf, zeigten die schweren Nebenwirkungen, die bei mehreren, aus therapeutischer Sicht weitgehend durchaus erfolgreichen Gentherapiestudien beobachtet wurden (siehe unten).

Traditionell hat Deutschland eine führende Rolle bei der Entwicklung gammaretroviraler Vektoren inne, die zu einem nicht geringen Teil auf der Arbeit des kürzlich verstorbenen, hervorragenden Zellbiologen und Virusgenetiklers Wolfram Ostertag beruht. Viele Arbeiten zielten auf eine Verbesserung der Genexpression durch retrovirale Vektoren.³³ Hier wurden wesentliche Beiträge im Bereich der Analyse der Sicherheit gammaretroviraler Vektoren, insbesondere zum

33 Vgl. Grez et al., 1990; Baum et al., 1995; Hildinger et al., 1999; Unsinger et al., 2001; Schambach et al., 2006a; Schambach et al., 2007; Zychlinski et al., 2008.

Integrationspektrum³⁴ und zur Genotoxizität geleistet. Darauf aufbauend wurden sicherheitsoptimierte, so genannte selbstinaktivierende (SIN-)Vektoren entwickelt sowie Methoden zu ihrer Produktion etabliert.³⁵ Auch zur Änderung des Zielzellspektrums durch Pseudotypisierung mit fremden oder modifizierten Hüllproteinen gab es wichtige Beiträge deutscher Gruppen.³⁶ Anzumerken ist schließlich, dass die erste europäische gammaretrovirale Genmarkierungsstudie 1996 an der Universitätsklinik Freiburg initiiert wurde und in Deutschland mit der Firma EUFETS in Idar-Oberstein eine der wenigen europäischen Firmen ansässig ist, die in der Lage ist, gammaretrovirale Vektoren in GMP-Qualität für nationale und internationale klinische Studien zu produzieren.

Lentiviren kamen vor allem mit der Entdeckung des AIDS-Erregers *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) in den Fokus der Forschung. Seitdem wurde kaum ein Virus so gut erforscht wie HIV. Es handelt sich dabei um ein komplexes Retrovirus, welches neben den drei für einfache Retroviren bekannten, oben genannten Genen (*gag*, *pol*, *env*) eine Reihe zusätzlicher, akzessorischer Gene enthält, die teilweise wichtig für die Pathogenese von AIDS sind. Die Idee, HIV als Grundlage für Gentransfervektoren zu benutzen, schien zunächst abwegig und für klinische Anwendungen inakzeptabel. Inzwischen hat sich aber gezeigt, dass sich HIV- (wie auch von anderen Immundefizienzviren) abgeleitete, lentivirale Vektoren in mancher Hinsicht besser für die genetische Modifikation verschiedener Zielzellen eignen als gammaretrovirale Vektoren (Naldini et al., 1996). So lassen sich mit HIV-abgeleiteten Vektoren auch Zellen transduzieren, die sich gammaretrovirale Vektoren gegenüber als resistent erwiesen haben. Zudem integrieren lentivirale Vektoren im Genom der Zielzelle seltener in Promotorbereiche von Genen, sodass sie eventuell weniger genotoxisch sind. Schließlich wurden die lentiviralen Vektoren aufgrund der natürlich höheren psychologischen Schwelle für ihren Einsatz in vielfältiger Weise sicherheitsoptimiert. Einige der dabei benutzten Ansätze wurden inzwischen auch auf andere Vektoren einschließlich der gammaretroviralen Vektoren übertragen, sodass sich die Entwicklung der Lentivektoren letztlich positiv auf das gesamte Feld ausgewirkt hat.

34 Vgl. Laufs et al., 2003; Deichmann et al., 2007; Schmidt et al., 2007; Schwarzwaelder et al., 2007; Gabriel et al., 2009; Paruzynski et al., 2010.

35 Vgl. Kraunus et al., 2004; Schambach et al., 2006b; Schambach et al., 2007; Zychlinski et al., 2008; Loew et al., 2010a.

36 Vgl. von Kalle et al., 1994; Schnierle et al., 1997; Buchholz et al., 1998; Miletic et al., 1999; Stitz et al., 2000a; Stitz et al., 2000b; Engelstadter et al., 2001; Beyer et al., 2002; Watson et al., 2002; Sandrin et al., 2003; Hartl et al., 2005; Merten et al., 2005; Funke et al., 2008, 2009; Anliker et al., 2010.

Erste klinische Studien in Frankreich und den USA bestätigten die prinzipielle Eignung lentiviraler Vektoren für gentherapeutische Ansätze (Humeau et al., 2004; Cartier et al., 2009; Cavazzana-Calvo et al., 2010). So werden derzeit verstärkt lentivirale Vektoren in Gentherapie-studien eingesetzt, da sie nach gegenwärtigem Kenntnisstand das wohl überzeugendste Risiko-Nutzen-Verhältnis aufweisen. Jedoch zeigte sich *in vitro* (Modlich et al., 2009), dass auch lentiviralen Vektoren eine inhärente Mutagenität (und damit potenzielle) Genotoxizität innewohnt. Diese kann sich auch im Rahmen klinischer Gentherapiestudien manifestieren, wie kürzliche Befunde belegten (Cavazzana-Calvo et al., 2010). Außerdem wurde bisher noch keine grundlegende Lösung für die GMP-gerechte³⁷ Herstellung lentiviraler Vektoren im großen Maßstab gefunden.

In Deutschland arbeitet eine Reihe von Arbeitsgruppen an der Weiterentwicklung lentiviraler Vektoren, die zumeist auf HIV-1 oder SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) beruhen.³⁸ Oft beruhen Arbeiten zur Optimierung lentiviraler Vektoren auf Erkenntnissen aus grundlagenwissenschaftlichen Studien zum besseren Verständnis der HIV-Infektion.³⁹

Die Entwicklung *retroviraler Vektoren* auf der Basis von Spuma- beziehungsweise Foamyviren beruht hauptsächlich auf grundlagenwissenschaftlichen Vorarbeiten aus Deutschland.⁴⁰ Mit den Arbeiten der deutschen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler kann sich nur die US-amerikanische Gruppe um Trobridge und Russell messen.⁴¹ Auch *Foamyviren* haben einen komplexeren Lebenszyklus und genomischen Aufbau als Gammaretroviren. Aufgrund eines hochinfektösen Hüllproteins und eines sehr stabilen Präintegrationskomplexes können sie auch Zellen effizient transduzieren, die sich nur sehr selten beziehungsweise langsam teilen (Heinkelein et al., 2002; Leurs et al., 2003). Für eine zukünftige klinische Anwendung sprechen

37 GMP – good manufacturing practice (Oberbegriff für die in der pharmazeutischen Herstellung geforderten Qualitätsstandards).

38 Vgl. Schnell et al., 2000; Wagner et al., 2000; Demaison et al., 2002; Scherr et al., 2002; Grunwald et al., 2004; Lucke et al., 2005; Muhlebach et al., 2005; Schambach et al., 2006b; Schambach et al., 2007; Scherr et al., 2007; Weber et al., 2008; 2010.

39 Vgl. Gross et al., 2000; Schnell et al., 2000; Wagner et al., 2000; Wodrich et al., 2001; Grunwald et al., 2004; Muller et al., 2004; Bohne et al., 2005; Lucke et al., 2005; Monse et al., 2006; Lampe et al., 2007; Münch et al., 2007; Sarkar et al., 2007.

40 Vgl. Enssle et al., 1996; Heinkelein et al., 2002; Leurs et al., 2003; Rethwilm, 2003; Juretzek et al., 2004; Picard-Maureau et al., 2004; Lochelt et al., 2005; Rethwilm, 2007; Wiktorowicz, 2009; Bodem et al., 2011.

41 Siehe die Arbeiten Trobridge et al. 2002; Trobridge/Russell, 2004; Trobridge et al. 2006; Trobridge et al., 2009.

überzeugende Daten bezüglich Effizienz und Sicherheit aus dem Großtiermodell.⁴² Allerdings sind die Verpackungssysteme bisher nicht ausgereift.

Kürzlich wurden erste Arbeiten zur potenziellen Nutzung von auf *Alpharetroviren* basierenden Vektoren für den Gentransfer vorgestellt (Suerth et al., 2010). Alpharetroviren haben das im Vergleich mit allen anderen Retroviren neutralste Insertionspattern, dürften also per se die geringste Genotoxizität aufweisen. Wie Suerth et al. (2010) zeigen konnten, lassen sich SIN-Alpharetrovirusvektoren sehr effizient herstellen und eignen sich ausgezeichnet zur Transduktion primärer menschlicher Zellen, unter anderen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen. Auch wenn die Studien im Hinblick auf eine potenzielle klinische Anwendung natürlich noch sehr präliminär sind, zeigen sie doch, dass im Gebiet der Vektorentwicklung auch weiterhin mit völlig neuen Entwicklungen zu rechnen ist und dass Deutschland dabei eine nicht unwesentliche Rolle spielt.

b) *Episomal vorliegende, nicht-integrierende* Vektoren dienen als effiziente Fährten für den Transport des therapeutischen Gens in die Zelle beziehungsweise den Zellkern ohne regelhafte Integration in das Zielzellgenom; es kann aber mit sehr geringer Frequenz von circa 1 in 1.000 – 10.000 zu zufälligen Insertionen kommen. Da nicht-integrierende Vektoren in der Regel im Rahmen der Zellteilung verloren gehen würden, eignen sie sich insbesondere für Kurzzeitanwendungen wie beispielsweise die gezielte Zerstörung von Tumorzellen. Allerdings ist eine langfristige Persistenz in Geweben möglich, die sich nicht mehr teilen. Daher werden nicht-integrierende Vektoren auch für die Transduktion von Geweben wie Muskeln oder Leber benutzt, um genetische Defekte zu korrigieren. Schließlich können episomale Vektoren über ein eigenes Replikationssystem verfügen, sich also unabhängig von einer Integration ins Zielzellgenom vermehren. Wenn genügend Kopien in der Zelle vorliegen oder sich die episomalen Vektoren mit dem Genom assoziieren, gelangen die Vektoren im Rahmen einer Teilung in beide Tochterzellen, sodass eine stabile genetische Modifikation auch aktiv replizierender Gewebe gewährleistet werden kann. Allerdings findet diese stabile Persistenz von Episomen nur in einem Bruchteil der transfizierten Zellen statt und es gibt bei autonom replizierenden Episomen immer auch gewisse Sicherheitsbedenken. Als wichtigste episomale Vektoren gelten die folgenden:

42 Vgl. Kiem et al., 2007; Bauer et al., 2008; Erlwein/McClure, 2010; Kiem et al., 2010; Bauer et al., 2011.

Herpesviren zählen zu den größten bekannten Viren. Sie verfügen über ein vergleichsweise komplexes, doppelsträngiges DNA-Genom von mehreren Hundert Kilobasen Länge. Die episodale Persistenz dieser Viren ist Teil ihrer Pathogenität, sodass ihre Mechanismen nicht nur aus Sicht der theoretischen Virologie oder der Vektorologie von Interesse sind. So kann das virale Genom (Episom) mit Hilfe eines viralen Proteins an zelluläre Chromosomen anhaften. Mit dem Ziel der Vektorentwicklung lässt sich dieses Prinzip für einfache Plasmidvektoren adaptieren. Komplexere Herpesvirus-abgeleitete Vektoren greifen auf die virale Replikationsmaschinerie zurück. Deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler haben zum Beispiel in Form der Klonierung und genetischen Modifikation herpesviraler Genome in Bakterien entscheidende Beiträge zur Herpes-Vektorologie geleistet. Zentrale Forschungsaktivitäten zielen dabei auf die genetische Modifikation von Epstein-Barr-Virus (EBV) und Cytomegalievirus (CMV).⁴³ Aufgrund ihrer hohen Immunogenität (durch die Expression zahlreicher viraler Proteine) ist die genetische Modifikation von Tumorzellen eine potenziell vielversprechende Indikation herpesviraler Vektoren; für andere Anwendungen stellt die Immunogenität des Vektorsystems jedoch ein Problem dar.

Adenovirale Vektoren zählen mit zu den ersten therapeutisch verwendeten Gentransfervektoren. Es handelt sich ebenfalls um DNA-Viren, die jedoch viel kleiner als Herpesviren sind. Trotzdem ist ihre Verpackungskapazität mehr als fünfmal so groß wie die von Retroviren und beträgt mehr als 40 Kilobasen (kb). Auch lassen sich adenovirale Vektoren mit infektiösen Titern produzieren, die jene für retrovirale Vektoren um mehrere Größenordnungen übersteigen. Moderne adenovirale Vektoren enthalten keine residualen viralen Gene, wodurch sowohl die Sicherheit als auch die Verpackungskapazität erhöht wird (Kochanek et al., 1996; Kochanek et al., 2001; Jager et al., 2009). Allerdings sind adenovirale Vektorpartikel stark immunogen, zudem besitzen viele Menschen infolge der verbreiteten Präexposition (es handelt sich um klassische Erkältungsviren) eine bereits vorbestehende Immunität gegen Vektorpartikel (Lowenstein/Castro, 2003; Lowenstein, 2004). Einen schweren Schlag für die klinische Anwendung dieser Vektoren (und die Gentherapie insgesamt) stellte der Tod eines Studienpatienten in einer Studie zur Behandlung einer monogen bedingten Krankheit (OTC-Mangel) mit adenoviralen Vektoren im Jahr 1999 dar. Der Tod des jungen Probanden wurde retrospektiv auf eine massive

43 Vgl. Kempkes et al., 1995; Messerle et al., 1997; Delecluse et al., 1999; Jacobs et al., 2001; Adler et al., 2003; Borst/Messerle, 2003; Hettich et al., 2006; Hoffmann/Wildner, 2007; Pich et al. 2008; Kalla et al., 2010.

systemische Entzündungsreaktion zurückgeführt (Raper et al., 2003). Jedoch machte der Fall auch durch massive Verletzungen des Studienprotokolls und grundlegender Prinzipien der guten klinischen Praxis von sich reden.⁴⁴

Da Adenoviren im Unterschied zu Herpes- und Retroviren keine Lipidmembranhülle aufweisen, sind die Viruspartikel relativ stabil. Zudem besteht die Möglichkeit, die Oberfläche der Virionen gezielt chemisch zu modifizieren. Im Bereich der Oberflächenmodifikation finden sich auch viele Forschungsaktivitäten deutscher Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler (z. B. Wortmann et al., 2008; Prill et al., 2010). Bevorzugt zielen diese auf eine Minderung der angeborenen und erworbenen Immunantwort⁴⁵ sowie auf die Generierung verbesserter Verpackungszellen für die Vektorherstellung im Großmaßstab (Jager et al., 2009). Ihre Immunogenität macht adenovirale Vektoren zu interessanten Werkzeugen für die genetische Vakzinierung (Wortmann et al., 2008). Zudem wird das zunehmende Verständnis der gegen Adenoviren beziehungsweise abgeleitete Vektoren gerichteten Immunantwort genutzt, um (konditional) replikationskompetente adenovirale Vektoren für die Onkolyse oder zur Tumorkonvaleszenz einzusetzen. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die beiden ersten für eine kommerzielle Anwendung zugelassenen Genterapieprodukte Gendicine® (SiBiono Gene Tech) und H101 (Sunway) beide auf adenoviralen Vektoren basieren (mehr Details, siehe unten). Auch in Deutschland widmen sich mehrere Gruppen dem Einsatz adenoviraler Vektoren in der Onkologie, wobei vor allem eine erhöhte Tumorspezifität und Effizienz im Mittelpunkt stehen.⁴⁶ Von Vorteil für die klinische Anwendung adenoviraler Vektoren ist die große Zahl unterschiedlicher Serotypen, welche unterschiedliche Gewebetropismen zeigen (Hoffmann et al., 2007). Aufgrund der großen Verpackungskapazität werden sie zudem benutzt, um so genannte Hybridvektoren zu generieren, die die Vorteile unterschiedlicher Vektorsysteme vereinen sollen (Yant et al., 2002; Picard-Maureau et al., 2004; Ehrhardt et al., 2007).

Durch die jüngsten, erfolgreichen Studien zur Genterapie von degenerativen Erkrankungen der Netzhaut⁴⁷ gelangten Vektoren auf der Grundlage der *Adeno-assoziierten Viren (AAV)* in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit. Diese sehr kleinen Vektoren zeichnen sich durch beson-

44 www.asgt.org/meeting_archives/am00/presaddress.php [25.01.2011].

45 Vgl. Schiedner et al., 2003; Jiang et al., 2004; Kreppel et al., 2005; Cretz et al., 2006.

46 Vgl. Nettelbeck et al., 2002; Wildnerr/Morris, 2002; Wirth et al., 2003; Wirth et al., 2005; Hoffmann et al., 2007; Hoffmann/Wildner, 2007; Nettelbeck, 2008.

47 Vgl. Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008.

ders hohe Titer und Partikelstabilität aus. AAV besitzen ein sehr kleines Einzelstrang-DNA-Genom, da sie als so genannte Dependoviren für ihre Replikation auf die Hilfe koinfizierter Adenoviren zurückgreifen. Das kleine Genom beziehungsweise die geringe Verpackungskapazität (< 4 kb) stellt zugleich den gravierendsten Nachteil der AAV-Vektoren dar. Dafür eignen sich AAV-Vektoren für die Transduktion ruhender Zellen wie Neuronen oder Muskelgewebe. Die Existenz einer Reihe von Serotypen mit unterschiedlicher Infektiosität für verschiedene Gewebe (z. B. Leber, Skelettmuskel oder Herzmuskel) verleiht AAV-Vektoren eine relativ große Flexibilität. Zudem ermöglichte die Aufklärung der für die Rezeptorinteraktion relevanten Oberflächenstrukturen ihre gezielte Modifikation mit dem Ziel der Vermittlung neuer Spezifitäten. Hierzu haben deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler entscheidende Beiträge geleistet.⁴⁸ Allerdings ist auch bei AAV-Vektoren ihre Immunogenität ein wichtiger limitierender Faktor. Dies wurde vor allem deutlich am Beispiel der Entwicklung einer AAV-basierenden Gentherapie für Hämophilie infolge Faktor-IX-Mangels. Während die Gentherapie bis in das Hunde- und sogar Primatenmodell sehr gut funktionierte, entwickelte sich bei Patienten eine T-Zellantwort gegen transduzierte Zellen. Diese wurde mit der Präexposition gegen AAV-Proteine des benutzten Serotyps (AAV2) erklärt, da sich praktisch alle Menschen als Kinder mit AAV2 infizieren (Manno et al., 2006). Die nach der in-vivo-Applikation persistierenden viralen Proteine reaktivieren virusspezifische Memory-T-Zellen, die zu einer verzögerten Immunreaktion gegen die offensichtlich über längere Zeiträume mit den Proteinen beladenen Zellen führen (Manno et al., 2006; Vandenberghe et al., 2006). Derzeit wird klinisch geprüft, ob ein Wechsel des Serotyps weiterhelfen kann. Während das Wildtyp-Virus weitgehend gerichtet auf einem bestimmten Abschnitt des Chromosom 19 integriert, haben AAV-Vektoren diese Fähigkeit verloren und liegen episomal vor. Allerdings kommt es mit einer gewissen Frequenz zu einer zufälligen Integration, welche durch Strangbrüche chromosomaler DNA gefördert wird (Miller et al., 2004). Diese kann offensichtlich genotoxisch wirken, wie Befunde zur Entstehung von Lebertumoren im Mausmodell infolge einer Insertionsmutagenese durch AAV-Vektoren zeigten (Donsante et al., 2007). Allerdings wurden vergleichbare Nebenwirkungen des AAV-Gen-transfers in anderen wichtigen Zielorganen wie Retina oder Muskel bisher nicht beobachtet.

48 Vgl. Girod et al., 1999; Huttner et al., 2003; Kern et al., 2003; Muller et al., 2003; Perabo et al., 2003; Büning et al., 2004; Bleker et al., 2006; Perabo et al., 2006; Büning et al. 2008; White et al., 2008; Boucas et al., 2009; Marsch et al., 2010.

Auch an und für sich integrierende Vektoren können so modifiziert werden, dass sie Transgene episomal etablieren. So werden Integrase-defiziente lentivirale Vektoren zum transienten oder sogar permanenten Gentransfer benutzt (Philpott/Thrasher, 2007; Yanez-Munoz et al., 2006). Eine zufällige Transgeninsertion kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden (Matrai et al., 2011).

Die wichtigsten Eigenschaften häufig benutzter viraler Vektoren fasst abschließend Tabelle 1 zusammen (nach Jain, 1998).

Tabelle 1: Eigenschaften viraler Vektoren

| | Retrovirus (inkl. Lentivirus) | Adenovirus | Adeno-assoziiertes Virus |
|------------------------|---|--|--|
| Verpackungskapazität | 8 kb | 40-45 kb | 4.5 kb |
| Integration | ja | selten | Vektor selten |
| Gewebespezifität | ja | ja | nein |
| Zellteilung notwendig | Gammaretroviren: ja Lentiviren: nein | nein | nein |
| Administration | ex vivo oder direkte Injektion | ex vivo oder direkte Injektion, Aerosol | ex vivo oder direkte Injektion |
| Titer (IU/ml) | 10^6 – 10^7 ⁽⁹⁾ | 10^8 – 10^{10} | 10^6 – 10^8 |
| Langzeitexpression | gut | transient | gut (?) |
| Expressionsstärke | moderat | hoch | moderat |
| Biologische Sicherheit | Insertionsmutagenese, RCR leukomogen | Entzündungsreaktion, direkte Toxizität, Immunreaktion | rep-Protein toxisch, Insertionsmutagenese, Insertion in Chr. 19 ohne Einfluss |

3.3.2.2 Nicht-virale Vektoren

Neben den viralen gibt es eine große Vielfalt nicht-viraler (auch: physikochemischer) Gentransfermethoden (Wagner et al., 2004; Wagner et al., 2008), die unter dem Begriff Transfektion zusammengefasst werden. Die einfachsten, mechanischen Verfahren basieren auf der Injektion plasmidhaltiger Lösungen in Gewebe, welche nach Kopplung der Plasmide an kleinste Partikel (meist aus Gold oder Wolfram) auch über so genannte Genkanonen (*gene guns*) und im Hochdurchsatz erfolgen kann. Die Elektroporation beruht auf der kurzzeitigen Zerstörung der Integrität der Zellmembran durch Anlegen eines hochvoltigen elektrischen Felds. Die magnet-

vermittelte Transfektion (Magnetofektion) nutzt ebenfalls die elektrostatische Bindung der DNA an winzige Partikel (Nanomagnet-Polymer-Komplexe), die in starken Magnetfeldern magnetisiert und durch letztere zur Zellmembran gelotst werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer letztlich spontanen Aufnahme der DNA per Endozytose entscheidend erhöht. Auch die Transfektion mit Hilfe von Liposomen nutzt diesen Eintrittsweg.

Die wichtigste Einschränkung für den Einsatz nicht-viraler Gentransfermethoden basiert jedoch nicht auf dem Problem der Überwindung der zellulären Bilipid-Membran. Vielmehr stellen die Zerstörung der übertragenen DNA in Endolysosomen und ihr ineffizienter Kerntransfer die entscheidenden Limitationen dar. Um einen ausreichenden Gentransfer zu ermöglichen, werden daher zumeist extrem hohe Kopienzahlen der zumeist Plasmid-kodierten Transgene in die Zellen eingebracht, was entsprechende Nachteile wie erhöhtes Rekombinationsrisiko oder Konkatamerbildung und mögliche Mehrfachintegrationen in einzelnen Zellen mit sich bringt. Wichtige Vorteile nicht-viraler Gentransfermethoden liegen dagegen in der erhöhten biologischen Sicherheit (i. d. R. keine Viruselemente, keine Entstehung replikationskompetenter Partikel) und dem höheren Reinheits- und Identitätsgrad der übertragenen Nukleinsäuren im Vergleich zu viralen Vektoren. Deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler arbeiten an verschiedensten Fragestellungen des nicht-viralen Gentransfers. Besondere Erfolge waren bei der Oberflächenmodifikation physikochemischer Vektoren sowie der Entwicklung neuer Applikationsmethoden zu verzeichnen.⁴⁹

Mit Hilfe nicht-viraler Gentransfermethoden können sowohl chromosomal integrierte als auch episomale Transgene in die Zielzellen transferiert werden. Um eine permanente Integration der Transgene zu erreichen, wird häufig auf die Aktivität so genannter Transposasen zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um Enzyme, welche die chromosomale Insertion und Exzision von mobilen Elementen (Transposons) über einen „cut-and-paste“ oder einen Replikationsmechanismus vermitteln. Dazu erkennen die Transposasen spezifische endständige Sequenzen des Transposons. Von Bedeutung für die Anwendung der Transposition mit therapeutischer Zielsetzung ist der Umstand, dass ähnlich wie bei der retroviralen Integration der Einbau in das Genom ohne chromosomale Rekombination erfolgt. Insbesondere jüngere Arbeiten zur signifikanten Erhöhung der Effizienz der Transposition haben diesem Forschungsfeld wichtige

49 Vgl. Gersting et al., 2004; Wagner, 2004; Rudolph et al., 2005; Siemen et al., 2005; Walker et al., 2005; Huth et al., 2006; Wagner, 2008; Sanchez-Antequera, et al., 2011.

Impulse gegeben. Hoffnungen richten sich zudem auf die Entwicklungen von Transposasen mit sequenzspezifischen Insertionseigenschaften. Herausragende Beiträge zur Erforschung mobiler genetischer Elemente kommen aus Deutschland.⁵⁰

Eine ideale Gentherapie im Sinne einer „genetischen Chirurgie“ würde die Korrektur defekter Gene in den relevanten Zellen des Körpers erlauben (Händel/Cathomen, 2010). Die Entwicklung sequenzspezifischer Nukleasen stellt einen wichtigen Schritt in diese Richtung dar. Diese Technologie kann zum Beispiel in der Zukunft dazu benutzt werden, den Ersatz defekter Genabschnitte durch homologe Rekombination zu stimulieren. Während ein solcher ortsspezifischer Genaustausch bisher für klinische Anwendungen noch nicht effizient genug erfolgt, könnten weitere Applikationen schon relativ schnell in die klinische Prüfung überführt werden. So können solche Nukleasen dazu benutzt werden, pathogene Sequenzen (wie z. B. das HIV-Genom) aus dem Zellgenom zu eliminieren (Sarkar et al., 2007). Alternativ können auch Gene gezielt zerstört werden, die Zellen verwundbar gegen gefährliche Erreger machen. Hier ist vor allem der Rezeptor CCR5 zu nennen, der als Korezeptor für den HIV-Zelleintritt dient. Circa 1% der Kaukasier (westliche Bevölkerung) weisen eine homozygote Mutation im CCR5-Gen auf (CCR5 Δ 32), die dazu führt, dass dieser Chemokinrezeptor in den Betroffenen überhaupt nicht vorhanden ist. Offensichtlich kann diese Mutation ohne Probleme kompensiert werden, da Betroffene keinerlei Pathologie aufweisen. Zugleich sind sie vollständig vor einer Infektion mit auf den CCR5-Rezeptor angewiesenen HI-Viren geschützt. Dieser Schutz ist sogar übertragbar, wie eine aufsehenerregende Fallbeschreibung aus Berlin nachwies, wo ein AIDS-Patient durch Transplantation mit Stammzellen von einem CCR5 Δ 32-homozygoten Spender offensichtlich von seiner HIV-Infektion geheilt werden konnte (Hütter et al., 2009; Allers et al., 2011). Die gezielte Ausschaltung des CCR5-Gens in autologen hämatopoetischen Stammzellen wird daher als sehr vielversprechende Strategie zur Gentherapie von AIDS betrachtet (van Lunzen et al., 2011).

Die Spezifität der Designernukleasen wird auch benutzt, um Gentransfervektoren mit potenziell therapeutischen Transgenen in „sichere Häfen“ zu lenken, um so das Risiko einer Insertionsmutagenese zu minimieren. Als „sicherer Hafen“ gilt beispielsweise die bevorzugte Integrationsstelle des Wildtyp-AAV auf Chromosom 19, da mit AAV-Insertionen in diesem Locus

50 Vgl. Ivics et al., 1997; Ivics et al., 2007; Walisko et al., 2004, Ivics et al. 2009; Mátés et al., 2009; Belay et al., 2010; Grabundzija et al., 2010.

keine negativen Auswirkungen verbunden sind (zumindest nicht im heterozygoten Zustand, also wenn nur ein Allel betroffen ist). An der Entwicklung der Nuklease-Technologie sind deutsche beziehungsweise in Deutschland tätige Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler führend beteiligt. Kernprojekte zielen auf die Entwicklung neuer sequenzspezifischer Nukleasen⁵¹, die Optimierung der Kassettenaustauschtechnologie für unterschiedliche Anwendungen⁵² oder auch die Entwicklung komplexer viraler Hybridvektoren unter Verwendung sequenzspezifischer Rekombinasen (Ehrhardt et al., 2007). Eine international führende Stellung nehmen ebenfalls die Projekte zur Spezifitätsbestimmung und Optimierung so genannter Designer-Zinkfinger-nukleasen ein, die ausgewählte Sequenzen im Genom hochspezifisch erkennen und zerstören beziehungsweise für eine Transgeninsertion, zum Beispiel über homologe Rekombination, zugänglich machen.⁵³ Die neue Entwicklung der TALE-Nukleasen aus dem Cathomen-Labor (Hannover) verspricht sogar eine noch höhere Flexibilität und Genauigkeit bei der sequenzspezifischen „Genchirurgie“ (Mussolino et al., 2011).

Um (bakterielle) Plasmide für therapeutische Zwecke einsetzen zu können, müssen sie in einem sehr hohen Reinheitsgrad produziert werden. Bei der Entwicklung von Plasmiden mit minimalen bakteriellen Sequenzen als auch bei ihrer Herstellung unter Vermeidung von Strangbrüchen zählen deutsche Biotech-Unternehmen zu den Vorreitern (Schleef/Blaesen, 2009; Schleef et al., 2010). Die Generierung so genannter Minicircle durch vollständige Eliminierung der Plasmidsequenzen erlaubt eine längere Persistenz und transkriptionelle Aktivität der transfizierten zirkulären Episome (Darquet et al., 1997; Chen et al., 2003). Auch bei der kommerziellen Nutzung dieser Technologie sind deutsche Firmen sehr aktiv (Mayrhofer et al., 2009). Ein Nachteil der Transfektion (z. B. von Plasmiden) ist das Risiko einer spontanen chromosomalen Integration, bevorzugt ausgelöst durch Doppelstrangbrüche der chromosomalen DNA, die mit nicht vorhersagbaren Rekombinationsereignissen im Zielzellgenom einhergehen.

Neue Entwicklungen zielen auf die langfristige Persistenz physikochemisch übertragener episomaler DNA. Auch hier leisteten deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler wichtige Beiträge.⁵⁴ So kann der Einbau von Kernmatrix-Anheftungsregionen eine dauerhafte

51 Vgl. Buchholz et al., 1998; Sarkat et al., 2007; Buchholz, 2009.

52 Vgl. Schlake/Bode, 1994; Baer/Bode, 2001; Schnutgen et al., 2005; Schucht et al., 2006.

53 Vgl. Alwin et al., 2005; Szczepek et al., 2007; Cathomen/Joung, 2008; Ramirez et al., 2008; Händel/Cathomen, 2010; Schambach et al., 2010; Gabriel et al., 2011.

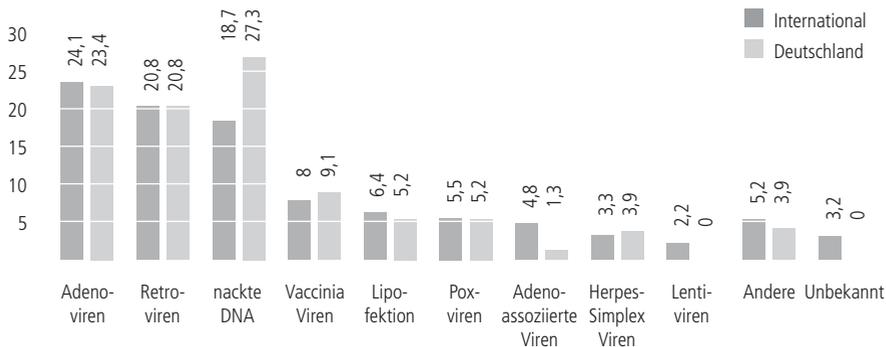
54 Vgl. Baiker et al., 2000; Jenke et al., 2004; Ehrhardt et al., 2008; Haase et al., 2010.

Assoziation der Plasmide mit zellulären Chromosomen ermöglichen, sodass sie gemeinsam mit letzteren replizieren und gleichmäßig auf die Tochterzellen übertragen werden. Allerdings funktioniert dies aus bisher unklaren Gründen nur in einem Teil der transfizierten Zellen, sodass die Effizienz des Verfahrens derzeit noch signifikant geringer ist als bei integrierenden Vektoren.

3.3.2.3 Kapazitäten und Verwendung

Die derzeit registrierten Gentherapiestudien favorisieren virale Vektoren, die in nahezu 70% der Studien zur Übermittlung der genetischen Information eingesetzt werden.⁵⁵ Nach wie vor dominierend sind adenovirale (24%) und retrovirale (23%) (einschließlich lentiviraler) Vektoren (siehe Abbildung 7). Allerdings wird aufgrund des inhärenten Risikos insertionsbedingter schwerer Nebenwirkungen bei integrierenden (retroviralen) Vektoren vermehrt nach alternativen Möglichkeiten sowohl des viralen als auch des nicht-viralen Gentransfers gesucht.

Abbildung 7: Genutzte Vektoren in klinischen Studien zur Gentherapie (in Prozent)



Quelle: Wiley-Datenbank, Stand März 2011; es werden alle Studien gezählt, die bewilligt beziehungsweise initiiert worden sind.

55 www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical [03.05.2011]. Die Entwicklung der eingesetzten Vektoren lässt sich in Kapitel 9.2, Indikator 9 nachvollziehen.

Tabelle 2: Vor- und Nachteile gebräuchlicher Gentransfervektoren

| Vektor | Vorteile | Nachteile |
|--------------------|--|---|
| nackte DNA | <ul style="list-style-type: none"> ▶ sehr einfache Produktion ▶ Transgen-Größe praktisch beliebig ▶ kein Bio-Risiko | <ul style="list-style-type: none"> ▶ ineffiziente Transfektion ▶ keine Langzeitexpression |
| Liposomen-DNA | <ul style="list-style-type: none"> ▶ sehr einfache Produktion ▶ Transgen-Größe praktisch beliebig ▶ Immunreaktionen unwahrscheinlich ▶ kein Bio-Risiko | <ul style="list-style-type: none"> ▶ ineffiziente Transfektion ▶ keine Langzeitexpression |
| Episomale Vektoren | <ul style="list-style-type: none"> ▶ einfache Produktion ▶ Transgen-Größe praktisch beliebig | <ul style="list-style-type: none"> ▶ Effizienz geringer als bei viralen Vektoren ▶ virale Elemente (Bio-Risiko) |
| Virale Vektoren | <ul style="list-style-type: none"> ▶ hohe Effizienz möglich (natürliche Eintrittswege...) ▶ verschiedene Optionen (integrierend, nicht-integrierend) ▶ Langzeitexpression möglich ▶ Produktion für manche Vektoren relativ einfach | <ul style="list-style-type: none"> ▶ replikationskompetente Viren potenziell gefährlich (Bio-Risiko) ▶ Transgen-Größe stark limitiert („Verpackungskapazität“) ▶ Transduktion abhängig vom Zelltyp |

Quelle: eigene Darstellung.

3.3.3 Design von Transgenen

Die Auswahl der oben beschriebenen Vektorsysteme ist entscheidend für die Effizienz des Gentransfers sowie die Persistenz der Transgene in unterschiedlichen Zielzellen. Weitere wichtige Aspekte wie die Expressionshöhe und/oder -regulierbarkeit lassen sich über das Design der Genexpressionskassetten steuern. Zu diesen Fragestellungen gibt es in der Vektorologie eigene Schwerpunktbereiche, die Elemente der biologischen (z. B. virologischen) Grundlagenforschung mit biotechnologischen Anwendungen verknüpfen. Auch Forschungen in Deutschland widmen sich einer Reihe von Aspekten dieser Entwicklung. International finden zum Beispiel die Arbeiten zu regulierbaren Promotoren, zur Transgenoptimierung und zu antiviralen Prinzipien ein breites Echo.

Mit Hilfe der in den Vektoren benutzten Promotoren, Verstärker- (Enhancer-) Sequenzen und RNA-Prozessierungsmodulen kann die Höhe der Transgenexpression wie auch bei Bedarf ihre mögliche Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der genetisch modifizierten Zelle reguliert werden. Allerdings können Größe und Komplexität der regulatorischen Elemente durch den verwendeten Vektortyp, beispielsweise aufgrund limitierter Verpackungskapazität oder der notwendigen RNA-Prozessierung, die zum Verlust von Introns führt (retrovirale Vektoren), stark

eingeschränkt werden. Aus diesem Grund ist die Entwicklung möglichst effizienter Expressionselemente mit minimalem Platzbedarf ein wichtiger Teilbereich der Vektorologie.

Von besonderem Interesse für viele Forschungs-, potenziell aber auch klinische Anwendungen sind unabhängig vom Vektortyp, solche Promotoren, die ein gezieltes An- und Abschalten des Transgens ermöglichen. Das erste und bekannteste System beruhte auf der Modifikation des bakteriellen Tetracyclin-Operons für die Verwendung in eukaryontischen Expressionsvektoren⁵⁶ und kann nach wie vor als paradigmatisch betrachtet werden. Es wird weiterhin beständig optimiert und für neue Applikationen adaptiert (Weidenfeld et al., 2009; Loew et al., 2010b). Die heute mögliche Feinjustierung der Transgenexpression für die klinische Anwendung zugelassener, nebenwirkungsarmer Tetracyclin-Derivate macht das System immer attraktiver auch für „schwierige“ therapeutische Gene wie Wachstumsfaktoren oder Hormone. Eine Limitation des Systems besteht in der Immunogenität der künstlichen Tetracyclin-abhängigen Transkriptionsfaktoren.

Eine Pionierrolle spielten deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler bei der Optimierung kodierender Sequenzen. Dabei wurden folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- ▶ Synthese kodonoptimierter Gene zur Verbesserung der Expression und der Vermeidung unerwünschter Spleißereignisse⁵⁷
- ▶ Entwicklung komplexer Designer-Proteine wie künstlicher T-Zellrezeptoren zur Erkennung von Tumorantigenen⁵⁸
- ▶ Generierung optimierter Suizidgene für die konditionale Elimination transplantierte Zellen⁵⁹

Als letztes Beispiel soll die Entwicklung potenter, gegen HIV gerichteter antiviraler Prinzipien angeführt werden, die unabhängig von mehreren deutschen Virologen vorangetrieben wurde. Dazu wurden inhibitorische Peptide oder Proteine designt, die genetisch modifizierte Zellen

56 Vgl. Gossen/Bujard, 1992; Gossen et al., 1995; Baron et al., 1997; Gossen/Bujard, 2002.

57 Kodonoptimierte Gene wurden unter anderem zur Korrektur genetischer Defekte (Moreno-Carranza et al., 2009) sowie für intrazelluläre Immunisierungsstrategien gegen HIV (Hildinger et al., 2001; van Lunzen et al., 2007) in therapeutischen Gentransfervektoren, aber auch für die verbesserte Expression viraler Proteine in Verpackungszellen (Wagner et al., 2000) benutzt.

58 Vgl. Hombach et al., 2002; Chmielewski et al., 2004; Engels et al., 2005; Xue et al., 2005; Weinhold et al., 2007; Bohne et al., 2008; Kieback et al., 2008; Kruschinski et al., 2008; Schmidt et al., 2011.

59 Vgl. Fehse et al., 2002; Sabini et al., 2003; Sato et al., 2007; Kieback et al., 2008; Preuß et al., 2010.

effizient vor einem Virus-Eintritt schützen⁶⁰ oder das Virus aus bereits infizierten Zellen eliminieren (Sarkar et al., 2007). Eine Sekretion der protektiven Peptide könnte sogar einen systemischen Schutz auch nicht-genmodifizierter Zellen gewährleisten (Egerer et al., 2011).

3.3.4 Aspekte präklinischer Evaluierung von gentherapeutischen Produkten

Parallel zur Etablierung der technischen Grundlagen und der Translation in die Klinik mussten auch die regulatorischen Anforderungen für gentherapeutische Studien entwickelt werden. Wie für alle Arzneimittel beziehungsweise Therapien gilt der Grundsatz, dass vor einer klinischen Prüfung zunächst umfassende Untersuchungen zur Effizienz und Sicherheit in präklinischen Modellen durchgeführt werden müssen. Die präklinischen Untersuchungen dienen dazu, eine realistische Risiko-Nutzen-Abschätzung im Einklang mit Erfahrungen für ähnliche Arzneimittel oder Therapieverfahren zu treffen. Angesichts dessen, dass es sich bei der Gentherapie um ein völlig neues Verfahren handelte, war es anfangs relativ problematisch, verbindliche Standards sowohl für notwendige präklinische Untersuchungen als auch für die Durchführung der eigentlichen Studien zu definieren (siehe Kapitel 6). Dies führte nicht nur zu sehr unterschiedlichen Anforderungen in einzelnen Staaten, sondern auch zu einer zeitweise relativ unübersichtlichen Rechtslage. Inzwischen hat zumindest im europäischen Rahmen eine weitgehende Harmonisierung stattgefunden und die Zulassungsverfahren folgen klaren Vorgaben (siehe Kapitel 5).

Eine wichtige Erkenntnis der frühen Entwicklung der Gentherapie bestand darin, dass die präklinische Analyse sowohl der Effizienz als auch der möglichen unerwünschten Nebenwirkungen systematisiert werden muss. Auf dem Gebiet der präklinischen Forschung mit toxikologischem Schwerpunkt haben deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler an vielen Stellen Pionierarbeit geleistet. So wurden und werden standardisierte Verfahren entwickelt, die sich kritischen Fragen wie Identität und Integrität des Vektor- beziehungsweise Zellprodukts, Dosisfindung, Biodistribution und Keimbahntransmission, ungewollter Freisetzung („Shedding“) und Mobilisierung, Genotoxizität und Immunotoxizität sowie Interferenz mit anderen therapeutischen Verfahren widmen. Weitere wichtige Aspekte, insbesondere im Zusammenhang mit gentherapeutischen Ansätzen entstehende ethische und rechtliche Aspekte werden ebenfalls umfassend beforcht (siehe Kapitel 5, 6 und 7).

60 Vgl. Hildinger et al., 2001; Egelhofer et al., 2004; Münch et al., 2007; van Lunzen et al., 2007; Zahn et al., 2008; Kimpel et al., 2010.

Integritätsprüfung: Mit zunehmender Komplexität der Vektoren steigt der Aufwand der Integritätsprüfung gentherapeutischer Produkte. Während für aus Bakterien gewonnene Plasmide die Reinheits- und Identitätsprüfung noch einfach ist, ist dieselbe für mit Hilfe von Eukaryontenzellen produzierte virale Vektoren relativ komplex, da viele Parameter zu beachten sind: (i) Integrität der übertragenen Nukleinsäure, (ii) mögliche Kontaminationen mit anderen Viren aus den Verpackungszellen, (iii) potenzielle bakterielle Kontaminationen über das Medium oder während der Kultivierungsphase. So wird angestrebt, als ProduzentInnenlinien nur solche Zellen zu benutzen, deren gesamte Kulturgeschichte lückenlos dokumentiert ist, bis hin zu verwendeten Medien und Medienzusätzen insbesondere tierischer Herkunft. Teilweise wird versucht, die Reinheit viraler Vektoren durch aufwendige Reinigungs- und Anreicherungsverfahren zu erhöhen. Schließlich ist zu beachten, dass bei ex-vivo-Gentherapieverfahren auch die zu modifizierenden Zielzellen in Kultur gehalten werden müssen, sodass nicht der Vektor sondern die genmodifizierten Zellen das Arzneimittel darstellen. Wie andere Zelltherapeutika unterliegen die Zellen ebenfalls entsprechend hohen Standards hinsichtlich der notwendigen Identitäts- und Sicherheitsprüfungen. Dies hat dazu geführt, dass gentherapeutische Produkte nur in wenigen spezialisierten Zentren hergestellt werden.

In Deutschland ist mit der Firma EUFETS GmbH eine der wenigen europäischen Biotec-Firmen ansässig, die gammaretro- und lentivirale Vektoren sowie damit transduzierte Zellen für die klinische Gentherapie herstellen (siehe Kapitel 9.2, Indikator 14). Grundsätzlich ist der Markt für solcherart Dienstleistungen bisher jedoch so klein, dass er für kommerzielle Anbieter nicht interessant ist (siehe Kapitel 9.2, Indikator 12 und 13). Daher bedarf es weiterhin einer Unterstützung akademischer Zentren, die die derzeitige Lücke im Bereich der GMP-gerechten Herstellung von Gentherapie-Produkten füllen können.

Biodistribution und Keimbahntransmission: Untersuchungen zur Biodistribution und einer möglichen Transmission des Transgens in die Keimbahn müssen im Einklang mit dem benutzten Gentransferverfahren durchgeführt werden. Dazu existiert eine Richtlinie der europäischen Regulationsbehörde (EMA, 2006). Grundsätzlich ist das Risiko einer Keimbahntransmission natürlich bei in-vivo-Gentherapieansätzen größer als bei Verfahren, die auf ex-vivo-Gentransfer beruhen. Während in Bezug auf die Unzulässigkeit einer gezielten Keimbahnveränderung international Konsens besteht, gibt es immer wieder Diskussionen hinsichtlich des Risikos akzidenteller Keimbahntransmissionen. So erscheint fraglich, ob eine mögliche akzidentelle Keimbahntrans-

mission bei Patientinnen und Patienten jenseits des reproduktiven Alters tatsächlich zu einem Therapieausschluss führen sollte. Schwierig ist zudem in vielen Fällen die Prüfung des tatsächlichen Risikos einer Keimbahntransmission in Tiermodellen, da zum Beispiel genmodifizierte Blutzellen in reproduktive Gewebe einwandern und die Probe somit „kontaminieren“ können. In jedem Fall kann das Risiko des akzidentellen Keimbahntransfers durch die Entwicklung spezifischerer Vektoren, die nur die gewünschten Zielzellen transduzieren, weitergehend minimiert werden.

Die Analyse der Verteilung der Gentransfervektoren beziehungsweise der genmodifizierten Zellen (Biodistributionsanalysen) ist auch in Hinsicht auf andere potenzielle Risiken der Gentherapie von Bedeutung, wie beispielsweise die Induktion einer Immunantwort oder die maligne Transformation infolge der Genotoxizität integrierender Vektoren (siehe oben). Weiterhin können die Genprodukte des benutzten Transgens in einigen Zellen oder bei systemischer Freisetzung ähnlich wie klassische pharmazeutische Agenzien unerwünschte Nebenwirkungen haben.⁶¹

Freisetzung und Mobilisierung: Die ungewollte Freisetzung infektiöser Gentransfervektoren, wie zum Beispiel über Körperausscheidungen, stellt ein weiteres potenzielles Risiko der Gentherapie dar. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Stabilität und damit Halbwertszeit der Vektorpartikel durch genetische oder chemische Modifikationen teilweise gezielt erhöht werden. Jedoch ist die Stabilität der Partikel in den meisten Fällen noch immer relativ gering, sodass das Risiko einer Freisetzung insgesamt als gering einzuschätzen sein dürfte. Allerdings liegen zu dieser Thematik nur wenige systematische Untersuchungen vor (Wildner/Morris, 2002; Schenk-Braat et al., 2007). Höher ist das Risiko bei der Verwendung replizierender Virusvektoren einzuschätzen, insbesondere wenn diese zur Therapie von Tumoren des Nase-Rachenraums zum Einsatz kommen.

Als Mobilisierung wird die Weiterverbreitung von Transgensequenzen aus einer genetisch modifizierten Zelle infolge einer Überinfektion mit einem dem Vektor verwandten Virus⁶² oder Bakterium bezeichnet. Der Vektor könnte auf diese Art im Körper weiter verbreitet werden, was einen möglichen Keimbahntransfer mit einschließen würde. Außerdem könnte es in der Folge

61 Die Bedeutung der Verfügbarkeit spezieller Verfahren zur Biodistributionsanalyse wird an folgendem Beispiel deutlich: Im Jahr 2007 kam es bei einer Phase-I-Studie zum Test eines AAV-Genvektors bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis zu einem tödlichen Zwischenfall. Eine sorgfältige Analyse konnte zeigen, dass die betroffene Patientin an einer Komplikation einer systemischen Immunsuppression verstorben war. Die Biodistributionsanalysen sprachen gegen einen Einfluss des Genvektors. Eine Nebenwirkung der Begleitmedikation war die plausible Erklärung (Kaiser, 2007; Frank et al., 2009).

62 Zum Beispiel könnte ein HIV-abgeleiteter lentiviraler Vektor, wenn er alle notwendigen Verpackungselemente enthielte, nach einer Infektion einer transduzierten Zelle mit HIV aus dieser Zelle mobilisiert werden. Dazu müsste ein Teil der in der Zelle verpackten neuen Viruspartikel anstelle des HIV-Genoms die Vektor-RNA verpacken.

zu einer Ausscheidung des Vektors und zu einer Übertragung auf andere Personen kommen. Mögliche medizinische Folgen einer solchen Ausbreitung müssten für den Einzelfall beurteilt werden, eine tatsächliche Relevanz der Mobilisierung ist in der Praxis bisher noch nicht gezeigt worden.⁶³ Dies dürfte auch darauf zurückzuführen sein, dass die potenzielle Mobilisierbarkeit genau wie die Freisetzung bereits seit dem Beginn der klinischen Gentherapie ein wichtiges Kriterium für die präklinische Sicherheitsevaluation von Vektoren darstellt.

Daher wurde beiden Risiken im Rahmen der Entwicklung neuer Vektortechnologien große Aufmerksamkeit zuteil. So kann das Risiko bei der Verwendung replizierender Vektoren dadurch gesenkt werden, dass immunologisch leicht beherrschbare Virenstämme benutzt werden. Oder es wird auf Viren zurückgegriffen, deren Sicherheitsprofil durch langjährige Verwendung als Lebendvakzine für Impfungen sehr gut etabliert ist. Eine Mobilisierung viraler Vektoren lässt sich beispielsweise durch die Entfernung von verpackungsnotwendigen Sequenzen verhindern. So enthalten beispielsweise selbst-inaktivierende (SIN) Retro- beziehungsweise Lentiviren keine Promotoren mehr in ihren endständigen Wiederholungen („long terminal repeats“, LTR), sodass keine für die Mobilisierung notwendigen kompletten Genome mehr hergestellt werden können.^{64, 65} Zudem können auch andere Vektorsequenzen so modifiziert werden, dass die Wahrscheinlichkeit der Mobilisierung stark herabgesetzt wird (Grunwald et al., 2004; Lucke et al., 2005). Schließlich können auch Viren für die Konstruktion von Vektoren benutzt werden, die humane Zellen nicht infizieren können (Baum et al., 2006b).

Genotoxizität: Die Genotoxizität integrierender Vektoren wurde in den vorherigen Abschnitten bereits kurz angesprochen. Sie beruht darauf, dass letztlich jede Integration eines neuen genetischen Elements in das Genom einer Zelle per se ein mutagenes Ereignis darstellt („Insertionsmutagenese“). Allerdings handelt es sich bei diesen wie auch bei der großen Mehrzahl natürlicher Veränderungen des Genoms um „stille Mutationen“, die keinen Einfluss auf die Funktion und/oder die Lebensfähigkeit einer Zelle haben. Manifestiert sich die Mutation in einer veränderten Zellphysiologie, insbesondere in Form einer malignen Transformation der Zelle, spricht

63 Um bei dem Beispiel der vorigen Fußnote zu bleiben: Die Mobilisierung eines lentiviralen Vektors, der ein anti-HIV-Gen trägt, wäre für den Patienten sicher weniger problematisch als die HIV-Infektion selbst.

64 Vgl. Kraunus et al., 2004, Schambach et al., 2006b; 2007.

65 SIN-Vektoren verringern zugleich die Genotoxizität integrierender Vektoren (siehe oben sowie den folgenden Abschnitt).

man von Genotoxizität des Vektors. Während früher das Risiko einer Insertionsmutagenese als vergleichsweise gering betrachtet wurde, ist die Genotoxizität heute zu einem entscheidenden Parameter für die Beurteilung der Sicherheit integrierender Vektoren geworden. Dies lag natürlich an den aufsehenerregenden Leukämiefällen in zwei aus therapeutischer Sicht überaus wirksamen Gentherapiestudien bei Patienten mit SCID-X1 in Paris und London (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008). Später wurde auch bei zwei anderen zunächst erfolgreichen Gentherapiestudien zur Behandlung anderer Immundefizienzkrankungen (CGD, WAS) über schwere Nebenwirkungen als Folge einer Insertionsmutagenese berichtet (Stein et al., 2010; Press release MHH vom 11. 11. 2010⁶⁶).

Die Genotoxizität hängt sowohl von den verwendeten Vektoren als auch von den Zielzellen ab (Baum et al., 2006a). Per se nicht-integrierende Vektoren werden als weitgehend nicht genotoxisch eingestuft. Allerdings sind spontane Insertionsereignisse solcher Vektoren oft mit größeren Genomschädigungen verbunden, welche das Risiko der Genotoxizität wiederum erhöhen können. Tatsächlich wurde auch für prinzipiell nicht integrierende Vektoren gezeigt, dass spontane Insertionen mit einer nachweisbaren Genotoxizität bis hin zur malignen Transformation verbunden sein können (Ehrhardt et al., 2006; Donsante et al., 2007).

Die Integration retroviraler Vektoren wird durch das Enzym Integrase vermittelt, die zu einer präzisen Insertion des Vektorgenoms in das zelluläre Genom der Zielzelle und somit nur einer minimalen Genomveränderung führt. Allerdings war das Design der retroviralen Vektoren der ersten Generation vor allem auf eine effiziente Transgenexpression ausgerichtet. Diese Vektoren besitzen daher starke, dauerhaft aktive Promotoren und Enhancer in den „long terminal repeats“ (LTRs). Wie sich inzwischen zeigte, führt eine solche Konfiguration besonders oft zur Beeinflussung benachbarter Gene. Die Verlagerung der Promotor/Enhancer-Elemente in das Innere des Vektorgenoms in einer sogenannten SIN-Konfiguration (s. o.) führt zu einer Verringerung der Genotoxizität.⁶⁷ Noch deutlicher war der Effekt, wenn die starken retroviralen Promotor/Enhancer durch zelluläre Elemente ersetzt wurden (Zychlinski et al., 2008). Zusätzlich kann die Genotoxizität integrierender Vektoren durch den Einbau von Elementen, die das

66 www.mh-hannover.de/46.html?&no_cache=1&tx_ttnews%5Btt_news%5D=1798&tx_ttnews%5BbackPid%5D=45&chash=41f20d5263 [04.03.2011].

67 Modlich et al., 2006; 2009; Montini et al., 2006; 2009.

Vektorgenom vom Zellgenom abschirmen (sog. „Insulatoren“), verringert werden. Jedoch ist die Effizienz dieses Ansatzes umstritten (Uchida et al., 2011).

Mit der Entwicklung von Techniken der Hochdurchsatzsequenzierung konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass unterschiedliche retrovirale Vektoren sehr unterschiedliche Integrationsprofile aufweisen (Mitchell et al., 2004; Derse et al., 2007). Auch dies beeinflusst ihr Genotoxizitätspotenzial. Zum Beispiel zeigen MLV-Vektoren eine erhöhte Präferenz für die Integration in Promotorbereiche von Genen, was eine Deregulation der Expression offensichtlich wahrscheinlicher macht. Lentivirale Vektoren hingegen integrieren in der Regel bevorzugt in genkodierende Regionen. Es bleibt anzumerken, dass natürlich auch eine vollkommen zufällige Verteilung eines Vektors über das Zielzellgenom bei einer ausreichenden Anzahl von Ereignissen in der Generierung gefährlicher Insertionen resultieren. Daher bleiben die Vektordosis und der zu erwartende Einfluss des integrierten Vektors auf benachbarte Strukturen entscheidende Parameter, die es zu optimieren gilt.

Auf Seite der Zielzellen ist von grundsätzlicher Bedeutung, ob diese das Potenzial besitzen, in maligne Zellen zu entarten. So konnte die Gruppe von Dorothee von Laer zeigen, dass T-Lymphozyten im Gegensatz zu Blutstamm- und -vorläuferzellen vergleichsweise resistent selbst gegen die Wirkung starker Onkogene sind (Newrzela et al., 2008). Auch legen neue Daten, bei deren Erhebung deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler eine zentrale Rolle spielten, nahe, dass sich das Insertionsprofil lentiviraler Vektoren in postmitotischen Geweben deutlich von dem in replizierenden Zellen unterscheidet (Bartholomae et al., 2011; Biasco et al., 2011). Dabei sinkt offensichtlich die Wahrscheinlichkeit von Integrationen in Zellzyklusregulatoren und somit auch die zu erwartende Genotoxizität. Auch hier gilt jedoch wieder, dass die Unterschiede im Insertionsprofil letztlich relativ klein sind, sodass auch ein „sichereres Insertionsprofil“ Integrationen im Bereich der Promotoren nicht ausschließen kann.

Deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler haben bei der Analyse der Ursachen der Genotoxizität retroviraler Vektoren sowie bei der Suche nach Möglichkeiten ihrer Prävention entscheidende Beiträge geleistet. So wurden sensitive präklinische Modelle zum Nachweis der Genotoxizität etabliert.⁶⁸ Zudem wurden innovative molekulare Detektionsmethoden zum Nachweis von Vektorinsertion in polyklonalen Proben entwickelt und optimiert.⁶⁹

68 Vgl. Li et al., 2002; Kustikova et al., 2005; 2009; Modlich et al., 2005; 2006; 2009; Zychlinski et al., 2008.

69 Vgl. Schmidt et al., 2001; Schmidt et al., 2002; Laufs et al., 2003; Wagner et al., 2005; Deichmann et al., 2007; Schwarzwaelder et al., 2007; Gabriel et al., 2009; Paruzynski et al., 2010.

Immunotoxizität: Sowohl Bestandteile der Vektorpartikel als auch das eingebrachte Transgen können im Körper von Patientinnen und Patienten eine Immunreaktion hervorrufen. Zudem wurden Immunreaktionen gegen xenogene Bestandteile der Zellkulturmedien beschrieben – zum Beispiel gegen das oft verwendete Kälberserum (Muul/Candotti, 2007). Mechanistisch lässt sich die Immunotoxizität sowohl auf Formen der angeborenen wie auch der erworbenen Immunität zurückführen. Immunantworten können zur Elimination des Vektors oder der gen-modifizierten Zellen und damit zum Verlust des therapeutischen Effekts führen. Es können sich aber auch lokale und eventuell systemische Entzündungsreaktionen entwickeln, die in der Regel transients Natur sind. Wie die Erfahrung im Fall Jesse Gelsinger zeigt, sind in Einzelfällen auch schwerste immunbiologische Nebenwirkungen möglich, die nicht mehr therapeutisch beherrschbar sind.

Auch die Immunotoxizität ist stark kontextabhängig. Eine wichtige Rolle spielt eine vorbestehende Immunität, von der bei Vektoren, die von humanpathogenen Viren abgeleitet wurden, natürlicherweise eher auszugehen ist. Beachtet werden müssen auch eventuelle Ko-Morbiditäten beziehungsweise Ko-Medikationen des Patienten. Während bei einer in-vivo-Gentherapie eine immunologische Reaktion gegen die Partikel in der Regel induziert wird (und somit eine Zweitapplikation meist kaum noch effizient ist), ist dies beim ex-vivo-Genstransfer nicht zu erwarten. Hier spielen wiederum mögliche Reaktionen gegen Mediumbestandteile und/oder das Transgen eine größere Rolle. In beiden Fällen können die Immunreaktionen, die sich ursprünglich gegen den Vektor oder Medienbestandteile richten, eine lokale Entzündung induzieren, in deren Folge auch eine Immunantwort gegen das therapeutische Transgen entsteht. Daher wird versucht, in Wachstumsmedien auf tierische Bestandteile zu verzichten. Auf der Seite der Vektoren greift man verstärkt auf Serotypen zurück, gegen die beim Menschen keine vorbestehende Immunität zu erwarten ist oder für die eine weniger starke T-Zell-Aktivierung gezeigt wurde (Mays/Wilson, 2011).

Die Immunogenität eines im Körper zuvor fehlenden oder defekten Proteins stellt bei der Therapie von monogen bedingten Krankheiten ein signifikantes Problem dar. In den letzten Jahren wurden vielversprechende Strategien entwickelt, um eine Toleranz im Körper zu erzeugen. Beispielsweise kann die Expression des Transgens nach Lebergentransfer so gesteuert werden, dass sie nur in Hepatozyten, aber nicht in Immunzellen der Leber erfolgt und es nicht zu einer Immunisierung kommt (Brown et al., 2006; 2007).

Auch in Bezug auf die Immunotoxizität ist es wichtig, aussagekräftige präklinische Modelle zu entwickeln. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die angeborene und erworbene Immunität wie auch die Biodistribution der Vektoren sich zwischen unterschiedlichen Spezies stark unterscheiden (Christ, 2002; Lowenstein/Castro, 2003; Lowenstein, 2004).

Interferenz: Mögliche Wechselwirkungen gentherapeutischer Ansätze mit anderen Therapieverfahren wie zum Beispiel mit Arzneimitteln sind bisher kaum erforscht. „Klassische“ Arzneimittelwechselwirkungen sind eher dann zu erwarten, wenn gentherapeutische Verfahren mit der Gabe von Wirkstoffen (z. B. zur Selektion der genetisch modifizierten Zellen) einhergehen. Möglich wären auch immunologische Kreuzreaktionen, wie bei der konsekutiven Anwendung mehrerer Gentherapien. Wie oben beschrieben könnten Immunreaktionen gegen Komponenten der Kulturmedien auftreten. Alternativ wäre vorstellbar, dass bei der Applikation von AAV-Vektoren, die mit Hilfe von Helferviren hergestellt werden, eine Immunisierung gegen adeno-virale Proteine eintritt beziehungsweise verstärkt wird. Solche offensichtlichen Fragen können in geeigneten Tiermodellen untersucht werden. Die Zukunft wird ebenfalls zeigen, ob die Kombination der Gentherapie mit anderen experimentellen Therapien das Potenzial für synergistische Effekte birgt.

Dosisfindung: Wie bei vielen anderen Therapieansätzen traten bei der Gentherapie zusammen mit den ersten überzeugenden Heilungserfolgen auch schwere Nebenwirkungen auf den Plan. Dies unterstreicht das klassische pharmakologische Prinzip, dass es keine Wirkung ohne Nebenwirkung gibt. Der Zusammenhang zwischen Vektordosis und Nebenwirkungen des Gentransfers wurde ausführlich am Beispiel der gammaretroviralen Vektoren dargestellt.⁷⁰

Zugleich wirft die Dosisfindung in der Gentherapie einige spezifische Probleme auf. So basieren die verwendeten viralen Vektoren auf Viren, die sich in der Regel optimal an einen bestimmten Wirt angepasst haben. Dies bedeutet zugleich, dass die Vektoren in unterschiedlichen Spezies völlig unterschiedliche Aktivitäten zeigen können. Daher sind Dosisvorhersagen aus dem Tiermodell nicht immer eins zu eins auf die klinische Gentherapie übertragbar. Während dies bei der ex-vivo-Gentherapie relativ einfach in Vorversuchen untersucht werden kann, kann es bei der in-vivo-Gentherapie durch Unterdosierung zu einem Therapieversagen oder durch

70 Kustikova et al., 2003; Fehse et al., 2004a; Modlich et al., 2005.

Überdosierung zu unerwarteter Toxizität kommen. Letzteres wurde am Beispiel des Todesfalles in der OTC-Studie bereits oben beschrieben. Die Gefahr der Überdosierung existiert vor allem im Falle einer im Menschen zu erwartenden Präimmunisierung, oder aber wenn die Vektoren im Tiermodell aufgrund spezifischer Restriktionen besonders ineffektiv sind. Die Entwicklung neuer Hüllproteine, die spezifisch bestimmte charakteristische Oberflächenmoleküle auf den gewünschten Zielzellen erkennen, dürfte dieses Problem noch vergrößern, da die Vektoren speziell für humane Zellen designt werden, sodass eventuell kein geeignetes Tiermodell zur Verfügung steht. Die Fortschritte bei der Entwicklung humanisierter Mausmodelle haben hier jedoch für deutliche Verbesserungen gesorgt (Traggiai et al., 2004; Manz/Di Santo, 2009).

Von ihrem Beginn an wurde die Entwicklung der Gentherapie durch eine breite, auch in weiten Teilen der Öffentlichkeit wahrgenommene Diskussion um ihre ethischen Grundlagen und Implikationen begleitet. Eine grundsätzliche Frage, die sich in dieser Debatte stellt, besteht darin, ob für die Gentherapie im Hinblick auf die Risiko-Nutzen-Abwägung andere Maßstäbe zu gelten haben als für klassische Therapieformen. Tatsächlich lassen sich die meisten der oben diskutierten möglichen Nebenwirkungen der Gentherapie auch bei anderen, bereits etablierten Therapieformen (virale Impfstoffe, Tumorchemotherapie und Nuklearmedizin, Antikörper und Seren etc.) beobachten. Als grundsätzlich neues Risiko kann dagegen der unintendierte Keimbahngentransfer angesehen werden. Zwar ist die Keimbahnmodifikation als unerwünschte Nebenwirkung bei Chemo- und Strahlentherapien wie auch der Röntgendiagnostik bekannt. Allerdings kann bei der Gentherapie insofern von einer neuen Qualität gesprochen werden, dass ein prinzipielles Risiko der Einführung kompletter, funktionell intakter Genkassetten besteht. Durch Verbesserung der Effizienz der Gentransfertechnologien könnte dieses Risiko in Zukunft prinzipiell sogar größer werden. Da dem Problem aber große Aufmerksamkeit gewidmet wird, ist damit zu rechnen, dass die Sicherheit in diesem Bereich weiter erhöht werden kann. Zudem ist das Risiko bei vielen klinischen Gentherapieanwendungen aus unterschiedlichen Gründen (z. B. Alter der Patienten, vorangegangene Chemotherapien, ex-vivo-Gentransfer) praktisch eher nicht relevant.⁷¹

71 Eine ausführliche Diskussion ethischer Implikationen, auch im Hinblick auf Anwendungen zum so genannten Enhancement findet sich in Kapitel 6 und 7.

3.4 Medizinischer Sachstand anhand ausgewählter Indikationen

Vergleichbar mit der modernen Informationstechnologie befindet sich die somatische Gentherapie in einem permanenten Entwicklungsprozess. Das bedeutet, dass für die klinischen Anwendungen von heute bereits Verbesserungen in präklinischen Modellen erforscht werden. Entsprechend kann eine erfolgreiche Entwicklung der somatischen Gentherapie nur als Ergebnis des fortgesetzten Erfahrungsaustausches zwischen biomedizinischer Grundlagenforschung und klinischer Anwendung möglich sein. Das bekannte Prinzip „aus dem Labor in die Klinik“ (*from bench to bedside...*) muss hier also durch den weiteren Aspekt „aus der Klinik zurück ins Labor“ (*...and back to bench*) ergänzt werden (DFG, 2007:10). Auch in Deutschland war und ist das Zusammenwirken von Grundlagenforscherinnen und -forschern mit klinisch tätigen Ärztinnen und Ärzten, die über entsprechende Erfahrung bei der Behandlung der Zielkrankheit verfügen, essenziell für die klinisch erfolgreiche Umsetzung von Gentherapiestrategien.

Um einen besseren Überblick über laufende Gentherapieprojekte zu ermöglichen, sollen in den folgenden Kapiteln zwei zentrale Anwendungsgebiete der Gentherapie ausführlicher dargestellt werden: einerseits der Bereich monogen bedingte Krankheiten, die als Paradigma für gentherapeutische Eingriffe gelten, andererseits der Bereich der Onkologie, in dem die weitaus meisten Studien laufen. Diese Beschränkung auf zwei Felder ermöglicht es, einige allgemein gültige Möglichkeiten, aber auch Probleme und Fragen anhand konkreter Beispiele zu erörtern.

3.4.1 Gentherapie bei genetisch bedingten Krankheiten

Monogen bedingte Krankheiten stellen den klassischen Gegenstand für gentherapeutische Verfahren dar; hier muss im Prinzip nur ein einziger genetischer Defekt korrigiert werden, um eine Reversion des Phänotyps zu erreichen. Daher und angesichts der großen Fortschritte bei der gentherapeutischen Behandlung dieser Krankheiten, die sich nicht zuletzt auf Arbeiten in Europa und auch in Deutschland zurückführen lassen, sollen sie hier zuvorderst behandelt werden.

Bei einer Reihe monokausaler genetischer Erkrankungen haben klinische Beobachtungen gezeigt, dass die Korrektur defekter Gene in seltenen Fällen auch ohne menschliches Zutun funktioniert, eine so genannte „natural gene therapy“: Genau wie Mutationen zum Verlust einer Genfunktion führen können, können umgekehrt andere Mutationen per Zufall zu einer teilweisen oder vollständigen Wiederherstellung der Funktion des Proteins führen. Man spricht dann von einem somatischen Mosaizismus, also der gleichzeitigen Präsenz defekter wie auch korrigierter

Genkopien.⁷² Erfolgt eine kompensatorische Mutation an anderer Stelle als der ursprüngliche Defekt, lassen sich die korrigierten Zellen anhand des entstandenen Sequenz-Polymorphismus von normalen wie auch defekten Zellen unterscheiden; sie sind also eindeutig identifizierbar. Anhand solcher Beobachtungen lässt sich ermitteln, wie viele korrigierte (Stamm-)Zellen nötig sind, um ein bestimmtes Korrekturniveau für einen gegebenen genetischen Defekt zu erreichen.

Ein besonders interessantes Beispiel für eine solche natürliche Gentherapie wurde vor einigen Jahren für die Fanconi-Anämie beobachtet: In jenem Fall war es zu einer intrauterinen Korrektur des FANCA-Gens in einer embryonalen hämatopoetischen Stammzelle bei einem von zwei eineiigen Zwillingen gekommen. Dieser eine Klon hatte dann bei beiden Zwillingen ausgereicht, um eine gesunde Blutbildung zu gewährleisten; es war also zu einer natürlichen Gentherapie der Fanconi-Anämie bei dem zweiten Zwilling durch eine intrauterine Übertragung einer genetisch korrigierten Stammzelle gekommen. Dieses Beispiel illustriert überzeugend das Potenzial der Transplantation genkorrigierter (Stamm-)Zellen (Mankad et al., 2006).

In der klinischen Medizin konnte schon vor über 40 Jahren gezeigt werden, dass die Transplantation intakter Blutstammzellen aus dem Knochenmark ausreicht, um schwere Immundefizienzsyndrome (SCID) zu kurieren, die auf genetischen Defekten basieren (Gatti et al., 1968). Diese Erkenntnis bildete die Grundlage dafür, dass solche primären Immundefizienzen („primary immune deficiencies“, PID⁷³) im Allgemeinen und zunächst vor allem SCID-Erkrankungen im Besonderen die ersten Ziele der Gentherapie darstellten. Neben dem nachgewiesenen Effekt der Transplantation genetisch korrekter Zellen waren vor allem die relativ gute Zugänglichkeit, die bereits erfolgte weitgehende Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen, Kenntnisse über die hierarchische Ordnung des blutbildenden Systems und das Vorhandensein geeigneter präklinischer Tiermodelle für die zunächst präferenzielle Behandlung von

72 Diese Besonderheit wurde bei einer Reihe von monogen bedingten Krankheiten beobachtet, zum Beispiel bei der Tyrosinämie, bei schweren Immundefizienzsyndromen (SCID), beim Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) oder der Fanconi-Anämie; zur Übersicht vgl. Hirschhorn, 2003.

73 Zu den bereits mit Gentherapie behandelten PID gehören: ADA-SCID, SCID-X1 (auch X-SCID genannt), CGD (chronische Granulomatose), LAD (Leukozyten-Adhäsionsdefizienz) und WAS (Wiskott-Aldrich-Syndrom); vgl. Kohn, 2010.

genetisch bedingten Krankheiten in diesem Organsystem von entscheidender Bedeutung. Tatsächlich weiß man angesichts der Erfolge der Knochenmark- beziehungsweise Blutstammzelltransplantation,⁷⁴ dass eine relativ geringe Zahl von Blutstammzellen ausreicht, die gesamte Blutbildung eines Menschen zu regenerieren. Mit anderen Worten: Die Korrektur einer begrenzten Zahl von Stammzellen kann ausreichen, um systemische therapeutische Effekte zu erzielen. Daher stellt ein Stammzellensystem wie die Blutbildung ein nahezu ideales Modell dar, um das Prinzip der Genterapie zu demonstrieren. Bis heute wurden weltweit mehrere Dutzend PID-Betroffene mit einem genterapeutischen Verfahren behandelt. Neben den bereits genannten Gründen sprechen folgende Fakten für die Anwendung der Genterapie bei diesen Patientinnen und Patienten:

- ▶ Patientinnen und Patienten mit schweren Immundefekten versterben meist im Kindesalter trotz permanenter Isolation.
- ▶ Während ADA-SCID-Patientinnen und Patienten bei Substitution mit dem modifizierten Enzym PEG-ADA, die selbst in westlichen Ländern aufgrund ihres hohen Preises nur für einen Teil der Erkrankten verfügbar ist, eine Überlebensrate von 75 % aufweisen, stellt die allogene Blutstammzelltransplantation (HSCT) die einzige therapeutische Option für andere Immunmangelerkrankungen dar.
- ▶ Eine allogene Blutstammzelltransplantation ist mit sehr schweren Nebenwirkungen assoziiert. Findet sich ein passender verwandter Spender, überleben circa 80 bis 90 % die Therapie langfristig, wobei bei allen Nebenwirkungen verschiedene Schweregrade⁷⁵ auftreten. Ist kein verwandter Spender verfügbar, muss in Abhängigkeit von der zu Grunde liegenden Erkrankung mit Transplantations-assoziierten Mortalitäten von bis zu 35 % (passender Fremdspender) oder sogar bis zu über 50 % bei haploidem Spender⁷⁶ gerechnet werden.
- ▶ Für ‚austherapierte‘ Patientinnen und Patienten bleibt oftmals nur noch die Möglichkeit einer genterapeutischen Behandlung, da der Organismus so stark geschwächt ist, dass herkömmliche Verfahren wie Transplantation nicht mehr anwendbar sind.

74 Im Weiteren wird der Terminus Blutstammzelltransplantation als Synonym sowohl für die Knochenmarktransplantation als auch die Transplantation mobilisierter peripherer Blutstammzellen benutzt.

75 Solche Nebenwirkungen reichen von Haarausfall über Wachstumsretardation und Unfruchtbarkeit bis hin zu schwerer chronischer Spender-gegen-Wirt-Krankheit mit massiv eingeschränkter Lebensqualität.

76 Haploidente Spender sind im Bezug auf die Gewebeverträglichkeitsantigene „halbidentisch“. In der Regel handelt es sich um einen Elternteil der betroffenen Kinder.

Während für die vor 1998 genterapeutisch behandelten SCID-Patientinnen und -Patienten kaum ein klinischer Nutzen nachgewiesen werden konnte, hat sich dies mit der Verbesserung der Gentransfertechnologie und der Einführung neuer klinischer Protokolle wesentlich geändert: In der Pariser SCID-X1-Studie zeigte sich bei neun der zehn zwischen März 1999 und April 2002 Behandelten ein deutlicher klinischer Nutzen.⁷⁷ Bisher vier der neun erfolgreich behandelten Patientinnen und Patienten entwickelten drei bis sechs Jahre nach der Genterapie eine Leukämie; drei dieser Leukämien wurden erfolgreich chemotherapeutisch behandelt (Komplettremission); überraschenderweise kam es bei ihnen zu keinem Verlust des Effekts der Genterapie. Der vierte Leukämiepatient musste jedoch in der Folge zweimal allogene transplantiert werden und starb an schweren Nebenwirkungen der Blutstammzelltransplantation. Somit beträgt die Langzeitüberlebensrate (alle befinden sich mehr als neun Jahre nach Genterapie) in Paris derzeit acht von zehn. Diesen acht Kindern und Jugendlichen geht es den Angaben der Pariser Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler zufolge sehr gut; sie führen ein weitgehend normales Leben und besuchen die Schule. Diese Erfolgsquoten sind somit mindestens vergleichbar mit den besten Resultaten einer allogenen Blutstammzelltransplantation bei Vorhandensein eines passenden Familienspenders.⁷⁸

Ähnlich positiv sind die Ergebnisse in London, wo trotz eines im Wesentlichen identischen klinischen Protokolls das Leukämierisiko geringer zu sein scheint. Tatsächlich trat diese befürchtete Nebenwirkung in der Londoner Studie im bisherigen Beobachtungszeitraum nur bei einem der zehn behandelten Patientinnen und Patienten auf. Erfreulicherweise konnte auch dieses Kind mit einer Standardchemotherapie erfolgreich behandelt werden, ohne dass die anderen genkorrigierten Zellen eliminiert worden wären. Auch in London wurde bei allen Kindern ein klarer klinischer Nutzen erreicht, während kein Effekt bei erwachsenen Patienten auftrat. Alle behandelten Kinder können einem normalen Leben nachgehen, denn viele der zuvor bestehenden Einschränkungen und Behinderungen haben sich grundlegend gebessert.⁷⁹ Da inzwischen auch bei allen Londoner Patientinnen und Patienten mehr als fünf Jahre nach Behandlung

77 Nur bei einem, bereits erwachsenen Patienten kam es nicht zu einem Anwachsen der korrigierten Zellen; dieser Patient wurde in der Folge allogene transplantiert und starb an den Folgen der Blutstammzelltransplantation.

78 Vgl. Cavazzana-Calvo et al., 2007; Cavazzana-Calvo/Fischer, 2007; Hacein-Bey-Abina et al., 2008; 2010.

79 Vgl. Gaspar et al., 2006; 2011; Qasim et al., 2007; Howe et al., 2008.

vergangen sind, kann der therapeutische Effekt genau wie in Paris als offensichtlich dauerhaft angesehen werden.⁸⁰

Ebenfalls überzeugende Ergebnisse wurden bei der ADA-SCID-Studie in Mailand nach der Umstellung auf ein neues Behandlungsprotokoll im Jahr 2000 erreicht. Dieses Protokoll verschafft den genetisch modifizierten Zellen dadurch einen Vorteil, dass zum einen die körpereigenen Blutstammzellen durch eine geeignete myelosuppressive Vorbehandlung (Konditionierung) unterdrückt werden und zum anderen keine PEG-ADA Supplementierung erfolgt (Aiuti et al., 2007). Anfang 2009 wurden ausführliche kumulative Daten für zehn seit 2000 in drei weitgehend identischen klinischen Studien (zwei in Mailand, eine in Jerusalem) behandelten Patientinnen und Patienten veröffentlicht. Sechs davon waren vor der Gentherapie für mehr als sechs Monate ohne grundlegende Verbesserung mit PEG-ADA behandelt worden, vier hatten eine haploidente Blutstammzelltransplantation erhalten.⁸¹ Nach einer mittleren Nachbeobachtungszeit von vier Jahren sind alle Therapierten am Leben, die meisten in sehr guter Verfassung: neun der zehn erreichten eine Immunrekonstitution, bei acht konnte das PEG-ADA dauerhaft abgesetzt werden. Die Inzidenz schwerer Infektionen konnte durch die Wiederherstellung sowohl des humoralen als auch zellulären Immunsystems massiv gesenkt werden (Aiuti et al., 2007; 2009). Auch diese Kinder können ein (nahezu) normales Leben führen. Zudem ist zu beachten, dass für keines der Kinder ein passender Familienspender verfügbar war.⁸²

Auch weitere Immunmangelerkrankungen wurden inzwischen mit unterschiedlichem Erfolg mit Hilfe genetisch korrigierter Blutstammzellen behandelt. Eine davon war die chronische beziehungsweise septische Granulomatose (CGD), die auf einer schweren Dysfunktion der Granulozyten beruht. Die Entwicklung einer geeigneten Gentherapie wurde und wird maßgeblich von deutschen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern vorangetrieben.⁸³ Auch das CGD-Protokoll bedurfte erst einer neuen klinischen Strategie, die ähnlich wie bei ADA-SCID auf einer milden Konditionierung beruht, ehe ein deutlicher klinischer Nutzen erzielt werden

80 Bei der Bewertung der Ergebnisse der beiden Studien in Paris und London ist zudem zu berücksichtigen, dass es für die betroffenen Kinder gerade keine passenden Familienspender gab, sodass bei einer Blutstammzell- oder Knochenmarktransplantation mit einer hohen behandlungsassoziierten Mortalität und Morbidität zu rechnen gewesen wäre.

81 Ein Patient erhielt beide, ein anderer keine dieser Behandlungen.

82 Eine Blutstammzelltransplantation von einem passenden unverwandten Spender ist mit einer Mortalität von 37 % assoziiert, eine haploidente Transplantation gar mit 70 % (Aiuti et al., 2009).

83 Federführend ist vor allem Manuel Grez (Georg Speyer-Haus; Frankfurt a. M.) mit der Unterstützung der Universitätsklinik der Goethe-Universität in Frankfurt a. M. (Prof. Hoelzer) und in Kooperation mit dem Kinderarzt Prof. Seger (UZH Zürich).

konnte. Die positiven Ergebnisse der Frankfurter Studie stießen insbesondere deshalb auf ein großes internationales Echo, weil hier erstmals eine klinische Korrektur einer monogen bedingten Krankheit durch Gentherapie bei Erwachsenen erreicht werden konnte (Ott et al., 2006). Leider zeigte sich bei beiden erfolgreich in Frankfurt Behandelten relativ früh eine Nebenwirkung – die klonale Dominanz einiger weniger (Stammzell-)Klone, die sich auf Insertionsmutagenese zurückführen ließ. Unerwarteterweise war die klonale Dominanz mit einem zunehmenden Funktionsverlust des eingebrachten Gens durch so genanntes „silencing“ verbunden, was zu einem allmählichen Therapieversagen bei beiden Patienten führte. Während einer der Patienten infolge dessen an einer schweren bakteriellen Sepsis verstorben ist, wurde der zweite allogene transplantiert (Stein et al., 2010). Im Falle des CGD-Protokolls kam es also zu einer initialen klinischen Besserung, die mit herkömmlichen Methoden nicht zu erreichen war. Nach relativ kurzer Zeit überwogen allerdings die negativen Nebenwirkungen, die sich in einer Mischung aus Insertionsmutagenese und epigenetisch vermitteltem Verlust des therapeutischen Effekts darstellten,⁸⁴ also deutlich dem zunächst beobachteten klinischen Nutzen widersprachen. Es bleibt anzumerken, dass beide Patienten zu dem Zeitpunkt des Studienbeginns „austherapiert“ waren und keine konventionellen Therapien mehr zur Verfügung standen.

Auch die Gentherapie für eine weitere genetische Immungängigkeitserkrankung, das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS), wurde in Deutschland durch Christoph Klein (Medizinische Hochschule Hannover) entwickelt und im Jahr 2006 klinisch etabliert. Beim WAS kommt es infolge eines Defekts in einem Signalgen zu einer Thrombozytopenie, die mit Defekten in der humoralen und zellulären Immunität vergesellschaftet ist. In 40% der Fälle hat die Krankheit eine autoimmune Komponente. Auch für das WA-Syndrom war bisher die allogene HSCT (beim Vorhandensein eines geeigneten Spenders) die einzige therapeutische Option. Klein und seine Kolleginnen und Kollegen haben in Hannover seit November 2006 zehn Kinder mit WAS genterapeutisch (in Anlehnung an das ADA-SCID-Protokoll, s. o.) behandelt. Nach den bisherigen Ergebnissen führte die Transplantation der genetisch korrigierten autologen Blutzustammzellen bei der großen Mehrzahl in einem sehr kurzen Zeitraum zu einem signifikanten klinischen Nutzen (Resolution der Thrombozytopenie und Verbesserung der Immunfunktion); für die beiden ersten Patienten wurden kürzlich ausführlichere Daten vorgestellt (Boztug et al.,

84 Inzwischen liegt eine detaillierte molekulare Analyse der Ursachen für die beobachteten Nebenwirkungen vor (Stein et al., 2010).

2010). Allerdings wurde Ende 2010 bei einem ersten Patienten eine Leukämie diagnostiziert, die auf eine Vektor-vermittelte Insertionsmutagenese zurückgeführt wurde. Da in der Studie ebenfalls ein „klassischer“ und, wie wir inzwischen wissen, besonders mutagener Vektor⁸⁵ benutzt wurde, könnte das Risiko der Leukämieentstehung auch bei weiteren Patienten bestehen. Daher befinden sich diese in einem engmaschigen Monitoring.

In der klinischen Gentherapie gab es inzwischen schwere Nebenwirkungen infolge von Insertionsmutagenese in einer Reihe klinischer Studien. Interessant ist die Beobachtung, dass in vielen Fällen in unabhängigen Studien die insertionelle Aktivierung ein und desselben Gens für die klonale Proliferation verantwortlich war. So wurden lymphoproliferative Erkrankungen in der Regel durch eine Aktivierung des LMO2-Gens ausgelöst, ohne dass die behandelte Erkrankung (z. B. SCID-X1 und WAS) von entscheidender Bedeutung war (Hacein-Bey-Abina et al. 2008; Howe et al., 2008, Pressemitteilung der MHH, Fußnote 17). Myeloproliferative Erkrankungen wurden durch Aktivierung des EVI1-Gens hervorgerufen (Stein et al., 2010), ein Befund der sich analog auch in unterschiedlichen präklinischen Tiermodellen bestätigen ließ. Das Risiko für eine Insertionsmutagenese scheint bei gammaretroviralen Vektoren der 1. Generation besonders hoch zu sein. Die Verwendung anderer integrierender Vektoren (z. B. auf der Basis von Lentiviren) kann zwar auch mit bisher nicht beobachteten Mechanismen der Mutagenese einhergehen (Cavazzana-Calvo et al., 2010), dennoch scheint infolge der SIN-Konfiguration des Vektors und des Integrationsstellenprofils (siehe oben) die Wahrscheinlichkeit für eine Aktivierung zellulärer Proto-Onkogene deutlich reduziert zu sein. Weitere klinische Studien und neue technologische Entwicklungen sind notwendig, um das Nutzen/Risiko-Profil zu verbessern.

Auch bei anderen Krankheiten, deren erfolgreiche Behandlung durch allogene HSC-Transplantationen gezeigt wurde, werden zurzeit gentherapeutische Ansätze entwickelt. Als Beispiel mag hier die Adrenoleukodystrophie (ALD) dienen, bei der es infolge eines gestörten Fettme-

85 Es handelte sich um einen mit vollständigen LTRs ausgestatteten gammaretroviralen Vektor. Aufgrund der vorliegenden Daten wurde für die zwei in Deutschland mit Vektoren dieses Typs noch laufenden Studien in Abstimmung zwischen den Studienleitern und dem Paul-Ehrlich-Institut beschlossen, keine weiteren Patienten aufzunehmen (Persons/Baum, 2011).

tabolismus' zu Fettablagerungen in der Nebenniere und im Gehirn kommt, was zu schweren neurologischen Störungen und einer ausgeprägten Demenz bereits im frühen Kindesalter führt. Ende 2006 und Anfang 2007 wurden die ersten beiden Kinder mit ALD in Paris durch Transplantation genetisch korrigierter autologer Blutstammzellen behandelt. Die bisher beobachteten Effekte entsprechen denen nach einer allogenen HSCT, sind also vielversprechend (Cartier et al., 2009). Eine Besonderheit der genannten Studie bestand darin, dass erstmals SIN-lentivirale Vektoren für den Gentransfer in Blutstammzellen benutzt wurden; bei allen vorgenannten Studien waren „klassische“ gammaretrovirale Vektoren im Einsatz.

Der erfolgreiche Nachweis der Machbarkeit, das so genannte „proof of principle“, bei genetischen Erkrankungen im Blutsystem hat auch bei der Therapie anderer monogen bedingter Krankheiten zu verstärkten Forschungsaktivitäten geführt.⁸⁶ Große Aufmerksamkeit in der Öffentlichkeit fanden erste Gentherapiestudien zur Behandlung angeborener degenerativer Netzhautkrankheiten. Hier konnten in einer Reihe unabhängiger Studien sehr überzeugende Beweise der Machbarkeit und Sicherheit der Gentherapie mit AAV-Vektoren am Auge erhoben werden. Da es nach der genterapeutischen Behandlung (und trotz der für eine Phase-I-Studie üblichen Schwerpunktsetzung auf Sicherheitsaspekte) bei einigen der Probanden zu deutlichen Verbesserungen der Sehleistung gekommen ist, wird der Gentherapie am Auge ein großes Potenzial beigemessen.⁸⁷ Allerdings sind die angeborenen degenerativen Augenkrankheiten sehr selten. Eine große Bedeutung würde der Ansatz gewinnen, sollte er sich auch auf die alters- beziehungsweise diabetesbedingte Makuladegeneration ausweiten lassen.

Insgesamt muss natürlich konstatiert werden, dass es sich bei der überwiegenden Mehrzahl der oben beschriebenen monogen bedingten Krankheiten um in der Regel sehr bis extrem seltene Erkrankungen handelt.⁸⁸ Die entwickelten Therapien kommen daher nur einer sehr begrenzten Zahl von Patientinnen und Patienten zugute. Dies macht die Entwicklung von Therapien für pharmazeutische Unternehmen weitgehend uninteressant, sodass praktisch alle Entwicklungen im Wesentlichen auf universitärer Basis und mit öffentlichen Geldern erfolgten; in Deutschland

86 Eine aktuelle Übersicht findet sich unter anderem in den Unterlagen der Jahrestagung der ESGCT in Mailand 2010 (vgl. ESGCT, 2010).

87 Einige seiner Eigenschaften machen das Auge zu einem nahezu idealen Zielorgan der Gentherapie: Es ist klein, das heißt es müssen nur relativ wenige Zellen korrigiert werden; es ist sehr gut erreichbar und zudem teilweise immunprivilegiert, das heißt die Gefahr von Immunreaktionen gegen den Vektor bzw. modifizierter Zellen ist gering.

88 Die Inzidenzen sind im Einzelnen: SCID = 1/75.000 Geburten (Fischer et al., 2005); CGD = 1 in 250.000 (Seger, 2010); WAS = 1 in 250.000 männlichen Lebendgeborenen (Galy et al., 2008).

werden zum Beispiel Verbundprojekte zur klinischen Gentherapie bei Immunmangelsyndromen durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.⁸⁹ Dies mag in der ersten, von mangelnder Effizienz und Rückschlägen gekennzeichneten Phase den Vorteil gehabt haben, dass die Forschungsprogramme trotz der negativen Ergebnisse nicht einfach eingestellt, sondern von den beteiligten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern weiter verfolgt wurden. Eine Entwicklung der neuen Therapien zum Standard für eine gegebene Erkrankung wird aber wahrscheinlich ein breiteres Engagement der pharmazeutischen Industrie erfordern, wie es in jüngster Zeit wieder verstärkt zu beobachten ist.⁹⁰

Bei anderen, vergleichsweise häufigen, monogen bedingten Krankheiten wie der Hämophilie war die Entwicklung klinischer Gentherapie-Strategien bereits vor einigen Jahren relativ weit fortgeschritten. Angesichts des hier erwarteten relativ großen Marktes (vergleichsweise hohe Patientenzahl, chronische Krankheit) und der theoretisch einfachen Therapie (schon die Präsenz eines geringen Prozentsatzes vom Normalniveau des betroffenen Gerinnungsfaktors führt zu einer Reversion des Phänotyps) war das Interesse der Industrie um einiges größer als bei den oben genannten Erkrankungen. Als Gentransfervehikel wurden vor allem AAV-Vektoren favorisiert, die eine stabile Genexpression im Muskelgewebe gewährleisten sollten. Tatsächlich waren die präklinischen Daten in verschiedenen Tiermodellen sehr überzeugend, auch wenn der Effekt mit zunehmender Größe des Modellorganismus abnahm. Leider hat sich bei der Anwendung im Rahmen klinischer Studien gezeigt, dass die AAV-transduzierten Zellen aufgrund vorbestehender Immunantworten gegen das Virus relativ schnell vom Immunsystem zerstört wurden (Mingozzi et al., 2007). Teilweise kam es sogar zu einer Immunantwort gegen den eingebrachten Gerinnungsfaktor.⁹¹ Daher arbeiten die beteiligten Gruppen zurzeit an verbesserten Vektoren; erste klinische Erfolge zeichnen sich ab (ESGCT 2011).

89 www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/1197.php [19. 11. 2007].

90 So gaben im Oktober 2010 GlaxoSmithKline und die beiden italienischen gemeinnützigen Stiftungen Telethon und San Raffaele die Unterzeichnung eines Kooperationsabkommens zur Entwicklung gentherapeutischer Ansätze für die Behandlung monogen vererbter Immundefizienzerkrankungen bekannt. Ob damit ein Wiedereinstieg von „Big pharma“ in das Gentherapiefeld eingeläutet wurde, bleibt abzuwarten. Vgl. www.gsk.com/media/pressreleases/2010/2010_pressrelease_10113.htm [14. 04. 2011].

91 Diese waren Faktor VIII bei Hämophilie A, Faktor IX bei Hämophilie B; vgl. High et al., 2004.

Weitere, relativ verbreitete, monogen bedingte Krankheiten beruhen auf Mutationen in der Beta-Kette des Hämoglobin-Gens, die zu unterschiedlichen Formen angeborener Anämien führen (Thalassämie, Sichelzellanämie). Da sich diese Krankheiten erfolgreich durch allogene Blutstammzelltransplantationen behandeln lassen, liegt die Anwendung gentherapeutischer Prinzipien nahe. Für gentherapeutische Ansätze stellte jedoch die auf rote Blutzellen zu beschränkende Expression des Beta-Globin Gens aufgrund von dessen komplexer Genstruktur lange Zeit ein großes Hindernis für die klinische Umsetzung dar, auch nachdem das therapeutische Potenzial des Ansatzes prinzipiell bereits nachgewiesen war (Pawliuk et al., 2001). Inzwischen läuft eine Phase I/II-Studie mit einem lentiviralen Vektor, für die die US-amerikanische Firma *BlueBirdBio* verantwortlich zeichnet (Bank et al., 2005). Erste vielversprechende klinische Daten wurden im letzten Jahr in „Science“ veröffentlicht (Cavazzana-Calvo et al., 2010).

3.4.2 Gentherapie bei onkologischen Erkrankungen

Im Gegensatz zu monogen bedingten Krankheiten entstehen maligne Erkrankungen im Ergebnis komplexer Prozesse, die in der Regel multiple Mutationen und/oder große genomische Aberrationen einschließen. Dabei kann es sich sowohl um angeborene als auch um erworbene genetische Defekte handeln. Letztere können als Ergebnis der Einwirkung externer Faktoren wie zum Beispiel durch Gifte (inkl. Nikotin oder Alkohol), Viren oder radioaktive Strahlen auftreten. Zudem entwickelt sich ein Tumor in der Wechselwirkung mit dem Immunsystem des jeweiligen Individuums. Daher kann bis zu einem gewissen Grad davon ausgegangen werden, dass auch Tumoren ein und derselben Art neben klaren Gemeinsamkeiten über individuelle Charakteristiken verfügen. Die jüngsten revolutionären Entwicklungen der Hochdurchsatzsequenzierung („next generation sequencing“) machten es möglich, diese Hypothese durch die vollständige Sequenzierung multipler Tumoren unterschiedlicher Patientinnen und Patienten zu verifizieren. Tatsächlich zeigten sich für definierte Tumorarten sowohl eine Reihe gemeinsamer, als auch viele nur in einzelnen Tumoren detektierte Mutationen (Sjöblom et al., 2006).

Für eine potenziell erfolgreiche Gentherapie ist es essenziell, entweder die für die Tumorentstehung grundlegenden Mutationen oder aber gemeinsame Eigenschaften aller Tumorzellen zu identifizieren. Während die auslösende Mutation für einige maligne Erkrankungen seit langem bekannt ist,⁹² wird sie bei anderen noch gesucht. Auch gemeinsame Eigenschaften aller Zellen eines Tumors (sog. Tumormarker) sind therapeutisch sehr interessant, insbesondere wenn sich diese Marker nicht ebenfalls auf gesunden Zellen finden. Durch die Erstellung so genannter Tumorlandkarten mit Hilfe der Hochdurchsatzsequenzierung wird derzeit versucht, den genauen Verlauf der Tumorentstehung zu verstehen sowie neue Tumormarker zu identifizieren.⁹³ Es ist zu hoffen, dass ein besseres Verständnis der Tumorbiologie in naher Zukunft zu zielgenaueren Therapieansätzen bei allen Tumoren führen wird.

Trotz der teilweise fehlenden vollständigen Einsicht in die Biologie der malignen Erkrankungen wurden schon seit Jahren circa zwei Drittel der klinischen Gentherapiestudien im Bereich der Onkologie durchgeführt (siehe Kapitel 3.2 sowie Kapitel 9.2, Indikator 8). Dabei versuchte man, sich einige bereits bekannte grundlegende Tumoreigenschaften zu Nutze zu machen. Schon in den Anfangsjahren der Gentherapie gab es in diesem Bereich ein signifikantes Engagement der großen Pharmaindustrie, was jedoch angesichts der Misserfolge der ersten größeren Studien im Folgenden stark nachließ. Die derzeit gebräuchlichsten Strategien gentherapeutischer Ansätze in der Onkologie lassen sich wie folgt charakterisieren:

- (1) direkte Zerstörung von Tumorzellen durch das Einbringen geeigneter Gene beziehungsweise Vektoren,
- (2) Modifikation der Tumorzellen, um das Immunsystem gegen den Tumor zu aktivieren,
- (3) Modifikation der Immunzellen, um sie für eine adoptive Immuntherapie gegen den Tumor zu aktivieren oder unerwünschte Aktivitäten gegen gesundes Gewebe zu verhindern,

92 Ein bekanntes Beispiel ist die chromosomale Translokation 9/21 in Blutstammzellen, die zum so genannten Philadelphia-Chromosom führt. Das dadurch entstehende Fusionsgen BCR-ABL vermittelt ein permanentes Wachstumssignal, welches in der Regel zur Entstehung einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) führt.

93 Dieses Projekt wird vor allem vom International Cancer Genome Consortium vorangetrieben; vgl. www.icgc.org/ [14.04.2011].

- (4) Zerstörung von „supportiven“ Geweben, die der Tumor für sein Wachstum benötigt (Tumorstroma einschließlich Blutgefäße),
- (5) Schutz gesunder Zellen gegen die Nebenwirkungen einer zytotoxischen Chemotherapie.

(1) Die direkte Zerstörung von Tumorzellen kann durch das Einbringen konditionell toxischer Gene oder Apoptose-fördernder Gene induziert werden. Die ersten Phase-III-Studien zur Gentherapie zielten zum Beispiel auf die Zerstörung von Hirntumoren durch retrovirale Transduktion mit dem *Herpes Simplex Virus* Suizidgen Thymidinkinase (HSV-tk) und anschließende Applikation des korrespondierenden Pro-Pharmakons („Prodrug“) Ganciclovir. Ein alternativer Ansatz beruht auf dem adenoviralen Gentransfer des Tumorsuppressorgens p53, dessen so wiederhergestellte Expression zur Induktion einer Apoptose oder Differenzierung in den Tumorzellen führen soll. Ein auf dieser Strategie basierender Vektor Adp53 wurde als weltweit erstes kommerzielles Gentherapieprodukt (Gendicine®) für die klinische Anwendung lizenziert (Wilson, 2005). Nach chinesischen Angaben wurden bisher mehrere Tausend Patientinnen und Patienten aus verschiedenen Ländern mit Gendicine® behandelt, wobei eine „signifikante Effizienz“ beobachtet wurde: Der Vektor wurde bei über 50 verschiedenen Tumorarten angewendet und über verschiedene Wege appliziert. Die beschriebene Effizienz trat nach Angaben der chinesischen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler vor allem auf, wenn der Vektor gemeinsam mit anderen Behandlungsformen (Radiotherapie, Chemotherapie) benutzt wurde (Peng et al., 2005; 2007). Leider ist die Datenlage schwierig zu sondieren, da von chinesischer Seite bisher keine Daten aus großen, Placebo-kontrollierten Studien vorgelegt wurden.

Besonders vielversprechend sind derzeit Gentherapieansätze, die auf so genannten onkolytischen Viren beruhen. Die Idee dieser Ansätze besteht darin, dass Tumorzellen durch Viren, die sich ausschließlich oder vorrangig im Tumorgewebe ausbreiten, lysiert werden. Diese Selektivität kann auf verschiedenen Viruseigenschaften beruhen, die vom bevorzugten Eintritt in die Tumorzellen bis zur selektiven Genexpression und/oder Virusreplikation in den malignen Zellen beruhen. Das Prinzip selektiv onkolytischer Viren lässt sich sehr gut am Beispiel des adenoviralen Vektors (AV) ONYX015 illustrieren, der ursprünglich 1987 als Deletionsvariante (dl1520) beschrieben wurde (Barker/Berk, 1987). Dem dl1520 AV fehlt das E1B55K-Gen, dessen Genprodukt an das p53-Molekül bindet und so verhindert, dass in einer durch das Virus infizierten Zelle der induzierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst wird. Mit Hilfe dieses Mechanismus' kann ein normales Virus die Zelle als Virusfabrik benutzen, bis genug neue Viruspartikel gebil-

det sind. Bekanntlich sind die meisten menschlichen Tumoren durch einen Verlust des Tumorsuppressorgens p53 charakterisiert. In solchen Zellen dürfte das E1B55K-Genprodukt also nicht benötigt werden, um eine Virusreplikation zu ermöglichen. Tatsächlich konnten Bischoff et al. (1996) zeigen, dass sich das defekte Virus (jetzt ONYX015) ausschließlich in p53-negativen Zellen replizierte und diese lysierte, während es normalen Zellen nichts anhaben konnte. Da die Vermehrung dieses somit konditionell replizierenden Vektors selbst-limitierend ist, also unmittelbar von der Präsenz maligner Zellen abhängt, schien der Vektor eine ideale Waffe gegen Tumoren und selbst entfernte Metastasen zu sein; diese Annahme führte zu einer breiten Anwendung in mehreren Studien. Allerdings erwies sich die starke Immunogenität der Adenoviren als hemmend für den Erfolg von ONYX015, da die Viren relativ schnell vom Immunsystem der so behandelten Patientinnen und Patienten eliminiert wurden, bevor sie den Tumor zerstören konnten. Trotzdem zeigte ONYX015 bei der gemeinsamen Anwendung mit Radio- und/oder Chemotherapie signifikante klinische Effekte in kontrollierten klinischen Studien. Inzwischen wurde ein dem Ursprungsvektor ONYX015 sehr ähnliches Konstrukt unter dem Namen Oncorine® als weltweit zweites kommerzielles Gentherapieprodukt durch die Firma *Shanghai Sunway Biotech* in der V.R. China lizenziert.⁹⁴ Jedoch ist auch hier die Datenlage nicht vollständig überzeugend (Kirn, 2006).

Zurzeit arbeiten weltweit viele Gruppen an verschiedenen onkolytischen Vektoren, die auf einer Reihe unterschiedlicher Viren basieren. Die Liste potenziell onkolytischer Viren wird kontinuierlich länger (vgl. zur Übersicht: Liu et al., 2007; Eager/Nemunaitis, 2011; Seymour, 2011).⁹⁵ Der kürzliche Einstieg der weltweit wichtigsten Biotechnologie-Firma *Amgen* in das Feld der onkolytischen Virotherapie durch die Übernahme der Firma *Biovex* deutet auf eine möglicherweise rasante klinische Entwicklung in den nächsten Jahren hin (Kirn, 2011).

(2) Die Idee, Tumorzellen durch genetische Modifikation für das Immunsystem erkennbar zu machen, gehörte bereits zu den ersten Strategien der Gentherapie. Bereits 1995 wurden hierzu die ersten beiden klinischen Gentherapiestudien in Deutschland durchgeführt; beide zielten auf die Aktivierung des Immunsystems durch die Einführung immunstimulatorischer Gene in die Tumorzellen. Diese, wie eine Reihe anderer initialer Studien zeigten jedoch nur sehr limitierte

94 www.sunwaybio.com.cn/en/product.html [13.04.2011].

95 Auch eine Reihe deutscher Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler arbeiten an unterschiedlichen onkolytischen Viren: Mühlebach et al., 2010; Rommelaere et al., 2010; Muik et al., 2011; Quirin et al., 2011; Weibel et al., 2011.

klinische Effizienz. Dies wurde damit erklärt, dass die Expression einzelner immunstimulatorischer Zytokine, die sich bei transplantierten Tumoren im Mausmodell als wirksam erwiesen hatten, bei einem zumeist über Jahre im Körper des Menschen evolvierten Tumor keine Wirkung mehr hat (Willimsky/Blankenstein, 2000). Trotz der relativ negativen Datenlage wurde das zu Grunde liegende Prinzip angesichts einzelner Erfolge und des sehr guten Sicherheitsprofils der Phase-I/II-Studien von mehreren Protagonisten weiter entwickelt. Zurzeit befinden sich verschiedene GM-CSF-exprimierende Tumor-Zelllinien („GVAX“) der Firma *BioSante*⁹⁶ in späten Phasen der klinischen Prüfung, sodass in relativ kurzer Zeit klar sein wird, ob ein signifikanter klinischer Nutzen mit dieser Strategie zu erreichen ist.

Zugleich wurde angesichts der beobachteten mangelnden Effizienz der ersten Studien das beschriebene Prinzip dahingehend weiterentwickelt, dass gleichzeitig mehrere immunstimulatorische Gene oder Kombinationen aus solchen zusammen mit den in Tumorzellen oft fehlenden MHC-Genen in die malignen Zellen eingebracht wurden. Gänsbacher und Kollegen entwickelten und testeten zum Beispiel eine allogene Prostata-Ca-Zelllinie, die gleichzeitig rekombinantes IL-2 und Interferon- γ sezerniert (Brill et al., 2007). Die Entwicklung dieser Zelllinie zu einer Prostatakrebsvakzine durch die Firma *VPM*⁹⁷ wurde im Rahmen der BioRegion vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.⁹⁸ Bisherige Testungen im Rahmen von Phase-I/II-Studien verliefen vielversprechend.

(3) Umgekehrt wird auch versucht, immunologische Effektorzellen genetisch zu modifizieren, um sie für eine adoptive Immuntherapie nutzbar zu machen. Dabei wird faktisch das Potenzial einer bereits existenten Immunantwort gegen auf dem Tumor präsente Antigene benutzt. Im Kontext der allogenen Blutstammzelltransplantation ist das Prinzip der adoptiven Immuntherapie durch Donorlymphozyteninfusionen seit 1990 etabliert (Kolb et al., 1990). Da die Spenderlymphozyten auch gesundes Gewebe als fremd erkennen können und dies zu einer lebensbedrohlichen Spender-gegen-Wirt-Krankheit (GvHD) führen kann, wurde Mitte der 1990er Jahre von mehreren Gruppen vorgeschlagen, die Spender-T-Lymphozyten mit einem Suizidgen auszustatten, um im Falle einer GvHD-Entwicklung eine Art Notbremse ziehen zu können

96 www.biosantepharm.com/Cancer-Vaccines.php [13.04.2011].

97 www.vakzine-manager.de/ [13.04.2011].

98 www.bioregion.de/ [13.04.2011].

(Bonini et al., 1997; Tiberghien et al., 2001). Diese Strategie wurde im Rahmen mehrerer EU-Verbünde auch unter deutscher Beteiligung entwickelt und wird zurzeit im Rahmen verschiedener klinischer Studien getestet. Mehrere Firmen sowohl in Europa⁹⁹ als auch in Übersee¹⁰⁰ versuchen, unterschiedliche Suizidgentchnologien zu kommerzialisieren. In Deutschland wurden bereits klinische Studien in Hamburg (Fehse et al., 2004b) und Hannover (Borchers et al., 2011) durchgeführt.

Ein wesentlich universelleres Prinzip benutzt den Transfer von spezifischen, gegen Moleküle auf den Tumorzellen gerichteten T-Zellreptoren (TCR) oder speziell entwickelten chimären Antigenrezeptoren (CARs, auch T-bodies) (Friedmann-Morvinski et al., 2005) in Spender-T-Zellen, um diese gegen den bisher ignorierten Tumor zu aktivieren (Übersicht: Xue/Stauss, 2007). Somit wird de facto ebenfalls eine Immunantwort auf den Patienten übertragen. Einen großen Schub bekam das Feld durch therapeutische Erfolge bei als „austherapiert“ geltenden Melanom-Patientinnen und -Patienten (Morgan et al., 2006). Inzwischen wurde die Strategie bei einer Reihe weiterer maligner Neoplasien erfolgreich angewendet (Parkhurst et al., 2011; Robbins et al., 2011). Auch der CAR-Gentransfer wird schon seit einigen Jahren in klinischen Studien getestet. Allerdings waren die ersten Ergebnisse trotz guter präklinischer Daten relativ ernüchternd. Als Ursache galten vor allem technische Schwierigkeiten, wie ein instabiler Gentransfer nach Transfektion sowie die kurze Überlebensdauer infundierter Zellen aufgrund (a) der ex-vivo-Aktivierung und (b) des Fehlens eines kostimulierenden Signals (Morgan et al., 2010b). Diese Probleme sollten durch „second“ und „third generation CARs“ überwunden werden (Schmidt et al., 2011). Tatsächlich weisen erste klinische Befunde auf eine höhere Effizienz der verbesserten CAR-Konstrukte (Büning et al., 2010).

Allerdings wurden inzwischen sowohl für den TCR- als auch den CAR-Gentransfer erste schwere Nebenwirkungen berichtet. Nach TCR-Gentransfer wurde im Mausmodell die Entstehung einer letalen GvHD infolge Rezeptorketten-Mispairing beobachtet (Bendle et al., 2010). Eine solche Nebenwirkung kann in Zukunft wahrscheinlich durch ein intelligentes Design der eingebrachten TCR-Ketten verhindert werden, welches die Paarung mit endogenen Rezeptorketten verhindert (Bendle et al., 2010). Ein weiterer limitierender Aspekt besteht in der Expression der als Tumorantigene gewählten Zielstrukturen auf normalen Zellen des Körpers. Diese

99 www.molmed.com/eng/pipeline_TK.asp [13.04.2011].

100 www.bellicum.com/ [13.04.2011].

können durch die transferierten hochreaktiven T-Zellen angegriffen werden und somit zur Schädigung gesunder Gewebe führen.¹⁰¹ Ähnliche Risiken der unerwünschten Zerstörung gesunder Gewebe infolge der Expression ihrer Zielstrukturen wurde auch für chimäre Antigenrezeptoren berichtet.¹⁰² Zudem besteht offensichtlich die Gefahr, dass die Infusion von CAR-exprimierenden T-Zellen in einigen Zellen einen Zytokinsturm auslöst, der potenziell tödliche Folgen haben kann (Büning et al., 2010).¹⁰³

Führende europäische Gruppen (einschließlich mehrerer deutscher Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern) haben die Strategie der adoptiven Immuntherapie in dem Verbund ATTACK gemeinsam weiterentwickelt;¹⁰⁴ in Deutschland werden entsprechende Arbeiten zudem in einem DFG-Transregio „Grundlagen und Anwendungen der adoptiven T-Zell-Therapie“¹⁰⁵ gefördert. Laufende und geplante klinische Studien werden zeigen, ob es durch T-Zell-rezeptor- beziehungsweise CAR-Gentransfer tatsächlich gelingt, eine effiziente und möglichst nebenwirkungsarme Immuntherapie für unterschiedliche Tumorentitäten zu entwickeln.

(4) Die ersten auf die Zerstörung des Tumorstromas gerichteten Strategien (zur Übersicht Kamertoens et al., 2005) haben, ähnlich wie verschiedene pharmazeutische Ansätze, das Ziel verfolgt, die für das Tumorwachstum notwendige Neubildung von Blutgefäßen zu unterdrücken (zur Übersicht Liu/Deisseroth, 2006; Brandwijk et al., 2007). So werden Endothelzellen und entsprechende Vorläuferzellen mit verschiedenen, in der Regel viralen Vektoren modifiziert, die

101 Johnson et al. (2009) berichteten, dass die Infusion von gegen Melanoma/Melanozyten-Antigene gerichteten T-Zellen nicht nur zur Tumorregression, sondern auch zur Zerstörung normaler Melanozyten führte. Dies äußerte sich in unerwünschten Nebenwirkungen wie Augenentzündung und Hörverlust. Im Rahmen einer klinisch erfolgreichen Studie zur Behandlung des metastasierenden Kolorektal-Karzinoms kam es in allen drei Patienten zu unerwünschten Nebenwirkungen in Form einer schweren, transienten Colitis. Die infundierten T-Zellen, die mit einem TCR gegen das „humane carcinoembryonic antigen“ (CEA) ausgestattet worden waren, hatten das Antigen offensichtlich auch auf gesunden Zellen des Darms erkannt (Parkhurst et al., 2011).

102 Schon in einer der ersten Studien mit CARs zur Behandlung des metastasierenden Nierenzellkarzinoms beobachteten Lamers et al. (2006) die Entwicklung von Cholangitiden infolge der Expression des Zielantigens carbonic anhydrase IX auf Gallengangszellen.

103 Kürzlich wurden zwei Todesfälle im Zusammenhang mit der Nutzung von CARs bei Patienten mit schweren Krebserkrankungen berichtet (Brentjens et al., 2010; Morgan et al., 2010a).

104 www.attack-cancer.org/ [13. 04. 2011].

105 www.sfb-tr36.de [13. 04. 2011].

unterschiedlichste anti-angiogenetische Faktoren exprimieren.¹⁰⁶ Auch können Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen ex vivo mit Suizidgenen ausgestattet werden, um später (im Tumor) neu gebildete Gefäße durch Induktion des Suizids zu zerstören.

Alternative Strategien richten sich gegen weitere Stromaelemente: So haben jüngere Arbeiten gezeigt, dass aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stromazellen sowie verwandte Zelltypen die bemerkenswerte Eigenschaft zeigen, selektiv in wachsende Tumoren einzuwandern und sich in das Tumorstroma zu integrieren. Aufbauend auf diesen Befunden wird versucht, diese Zellen zu benutzen, um analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen bei den Gefäßen das Tumorstroma direkt zu zerstören oder zur Produktion wachstumshemmender Agenzien einzusetzen (zur Übersicht Hall et al., 2007).¹⁰⁷

(5) Schließlich wurden in den USA und Japan klinische Studien durchgeführt, um mittels Gentransfer einen möglichen Schutz gesunder Blutstammzellen gegen die Nebenwirkungen einer zytotoxischen Chemotherapie zu vermitteln. Mit Hilfe retroviraler Vektoren werden Varianten menschlicher Gene übertragen, deren Überexpression Chemotherapeutika entgiftet oder bereits den Eintritt bestimmter toxischer Substanzen in die Zellen verhindert. Für den Tumorpatienten könnte dies die Möglichkeit einer intensivierten und damit wirksameren Chemotherapie eröffnen. Darüber hinaus ist dieser Ansatz der konditionalen Resistenz von grundsätzlichem Interesse für die Anreicherung genetisch modifizierter Blutstammzellen von einem eingangs niedrigen Niveau auf einen Wirkspiegel, der auch bei komplexen Erkrankungen der Blutbildung eine effiziente Therapie verspricht (Neff et al., 2006).

Die hier aufgezählten Strategien zur Gentherapie bei onkologischen Erkrankungen geben nur einen groben Überblick. Hinsichtlich der geografischen Verortung der hieran forschenden Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler lässt sich feststellen, dass die meisten klinischen Studien

106 Dazu gehören endogene Angiogenese-Inhibitoren wie Angiostatin, Endostatin und Platelet factor-4 oder auch Agenzien, die pro-angiogenetische Peptide oder deren Rezeptoren blockieren (z. B. Antikörper gegen FGF, VEGF, oder lösliche VEGF-Rezeptoren). Auch spezifische Inhibitoren des endothelialen Zellwachstums wurden bereits klinisch getestet; vgl. zur Übersicht: Liu/Deisseroth, 2006.

107 In einem noch komplexeren Ansatz werden mesenchymale Stromazellen als infiltrierende Vektorproduzenten benutzt, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Tumorzellen Vektoren freisetzen, welche konditionell toxische Gene tragen. Wichtige Arbeiten auf diesem Gebiet stammen von Dorothee von Laer; vgl. Miletic et al., 2007.

in diesem Bereich in den USA laufen, auch wenn in Europa insbesondere auf dem Feld der Immuntherapie sehr viele Gruppen im Bereich der klinischen und translationalen Forschung aktiv sind. Aufgrund des vergleichsweise großen Marktes ist im Bereich der Onkologie ein wieder erstarrendes Interesse der Pharmaindustrie an gentherapeutischen Strategien zu registrieren, sofern sich die Therapeutika in großen Maßstäben herstellen lassen. Individualisierte, zelltherapeutische Ansätze sind aufgrund der vergleichsweise hohen Kosten für die Industrie offensichtlich weniger interessant.

Krebserkrankungen sind zumeist mit komplexen genetischen Veränderungen in den malignen Zellen verbunden. In den Fällen, in denen eine bestimmte Mutation zwingend für das Überleben des bösartigen Klons notwendig ist, lassen sich effiziente gezielte Therapien entwickeln. Liegen dagegen komplexe Aberrationen vor und/oder ist das kausale Ereignis nicht bekannt, kommen Kombinationstherapien zum Einsatz, die sich gleichzeitig gegen mehrere Eigenschaften der Tumorzellen richten. So soll verhindert werden, dass sich Subklone der bösartigen Zellen der Therapie entziehen können. Entsprechend ist auch für die meisten Gentherapieansätze in der Onkologie nicht zu erwarten, dass sie als Monotherapien funktionieren werden, selbst wenn präklinische Daten oft andere Schlüsse nahelegen scheinen. Stattdessen dürfte die Zukunft der Gentherapie in der Kombination mit konventionellen Krebstherapien liegen.

3.5. Zusammenfassung

Betrachtet man die Entwicklung der Gentherapie über die letzten zwei Jahrzehnte, so muss festgestellt werden, dass die anfänglich hohen Erwartungen bezüglich der möglichen Marktreife erster gentherapeutischer Verfahren und abgeleiteter Arzneimittel bereits in den 1990er Jahren sehr unrealistisch waren. Nach der initialen Begeisterung und den Rückschlägen Ende des 20. und Anfang des 21. Jahrhunderts befindet sich die Gentherapie derzeit in einer Phase der Konsolidierung und technologischen Optimierung. Dabei gelang es durch eine breit angelegte Forschung, sowohl Wirkprinzipien als auch die Ursachen von Nebenwirkungen des therapeutischen Gentransfers besser zu verstehen. Zugleich brachten die letzten Jahre wichtige Fortschritte in akzessorischen Disziplinen wie Zelltherapie, einschließlich stammzellbiologischer Grundlagenforschung, molekularer Toxikologie sowie Applikations- oder verschiedener Bildgebungsverfahren.

Durch verstärkte Arbeit im präklinischen und translationalen Bereich wurden in mehreren Feldern signifikante Fortschritte erreicht: Bei einigen monokausalen, genetisch bedingten Krank-

heiten, insbesondere Immundefekten (Buckley, 2004), konnte das lange ersehnte „proof of principle“ erreicht werden. Wichtige klinische Studien mit therapeutischem Effekt wurden dabei vor allem in Europa durchgeführt; sie lassen sich im Jahr 2011 wie folgt zusammenfassen (Santilli et al., 2008; Qasim et al., 2009):

- ▶ 17 von 20 behandelten pädiatrischen SCID-X1-Patienten in Paris und London profitierten von der Therapie (Hacein-Bey-Abina et al., 2010; Gaspar et al., 2011). Weniger erfolgreich war die Therapie dagegen bei älteren Erkrankten (Thrasher et al., 2005; Chinen et al., 2007). Dies brachte die wichtige Erkenntnis, dass die Therapie von Immundefekten möglichst früh erfolgen sollte.
- ▶ Neun von zehn ADA-SCID-Patientinnen und Patienten in Mailand erreichten eine Immunrekonstitution (Aiuti et al., 2009). Auch die weltweiten Daten sind vielversprechend – bei zwei Dritteln der mehr als 30 behandelten Kinder konnte eine Immunrekonstitution erreicht werden. Dass die Ergebnisse in Italien so deutlich über dem internationalen Durchschnitt liegen, dürfte an der größeren Zahl transplantierte genkorrigierter Zellen liegen (Qasim et al., 2009).
- ▶ Bei zwei an septischer Granulomatose leidenden Patienten in Frankfurt a. M. kam es zu einem durchgreifenden (Ott et al., 2006), jedoch transienten klinischen Effekt. In der CGD-Studie funktionierte die Gentherapie monogen bedingter Krankheiten erstmals bei erwachsenen Patienten (Thrasher, 2005). Allerdings traten bei beiden Patienten schwere, therapieassoziierte Komplikationen auf (Stein et al., 2010).
- ▶ In Hannover wurde ein therapeutischer Effekt bei neun von zehn behandelten Kindern mit Wiskott-Aldrich-Syndrom beobachtet (Boztug et al., 2010). Allerdings wurde bei einem der Kinder in der Nachbeobachtung eine Leukämie diagnostiziert, die als Nebenwirkung der Gentherapie klassifiziert wurde.

Bezogen auf diese in Europa durchgeführten Studien lässt sich konstatieren, dass über 90% der beteiligten, zumeist pädiatrischen Patientinnen und Patienten (39 von 42) von der Behandlung zumindest zeitweise profitierten; bei 27 der 32 (>5 Jahre seit Therapiebeginn) besteht der therapeutische Nutzen fort. Bei einer Reihe beträgt die Nachbeobachtungszeit bereits mehr als zehn Jahre, sodass hier von einer langfristigen Heilung ausgegangen werden kann.

Allerdings traten auch schwere Nebenwirkungen auf – bisher sechs Patienten erkrankten an Leukämien, zwei an myelodysplastischen Syndromen. Zwei dieser Patienten verstarben, einer

an schweren Infektionen nach der Rückkehr seiner Grundkrankheit (CGD), der andere an Komplikationen nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Auch wenn das Auftreten weiterer Leukämien bei erfolgreich Behandelten nicht ausgeschlossen werden kann, spricht die bisherige Bilanz deutlich für die Gentherapie. Dies insbesondere angesichts der Tatsache, dass die Patientinnen und Patienten eine lange Vorgeschichte erfolgloser Therapieversuche hinter sich hatten, eine sichere Therapiealternative nicht zur Verfügung stand und die Gesamtlebenserwartung je nach Grundkrankheit sehr begrenzt war.

Mit Ausnahme des ADA-SCID steht für die schweren Immundefizienzen nur die allogene Stammzelltransplantation als alternative kausale Therapieoption zur Verfügung. Für ADA-SCID-Patientinnen und -Patienten besteht die prinzipielle Möglichkeit einer Immunersatztherapie mit Adenosideaminase. Diese führt bei der Mehrzahl zu einer Linderung der Krankheitssymptome, nicht jedoch zur Heilung (Fischer et al., 2004). Die Überlebensrate unter ADA-Ersatz beträgt jedoch nur circa 66% (Booth et al., 2007). Bei den genannten anderen Immundefizienzen wird versucht, das Infektionsrisiko durch umfassende Isolationsmaßnahmen sowie prophylaktische Antibiose zu verringern. Dies führt jedoch mit zunehmender Krankheitsdauer zur Generierung multipler Resistenzen, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Stammzelltransplantation verringert. Für eine Stammzelltransplantation muss ein passender Spender (mit identischen oder nahezu identischen humanen Leukozytenantigenen) gefunden werden (Buckley, 2004). Dies gelingt leider nur bei circa einem Drittel, und auch in diesem Fall ist die allogene Blutstammzelltransplantation mit sehr schweren Nebenwirkungen und relativ hohen Mortalitätsraten verbunden (Booth et al., 2007).

Die bisher bei der Behandlung von monogen bedingten Krankheiten beobachteten, zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen ließen sich in fast allen Fällen auf eine Insertionsmutagenese zurückführen. Zu berücksichtigen ist an dieser Stelle, dass die dort zum Einsatz gekommene Vektortechnologie in den 1990er Jahren entwickelt wurde, als das Risiko der Insertionsmutagenese als relativ gering eingeschätzt wurde. Seit Anfang der 2000er Jahre wird intensiv an der Verbesserung sowohl viraler als auch nicht-viraler Gentransfertechnologien geforscht. Wenn es

gelingt, das Risiko der Insertionsmutagenese zu minimieren, dürfte die Gentherapie schon in wenigen Jahren die Therapie der Wahl für einige schwere Immundefekte darstellen.

Mit dem seit Beginn der 2000er Jahre wiederkehrenden Optimismus im Gentherapiefeld wurden auch die Aktivitäten auf vielen anderen Feldern verstärkt. Paradigmatisch hierfür stehen zwei sehr unterschiedliche Anwendungsgebiete – Tumorerkrankungen und Augenkrankheiten. In beiden Bereichen war eine Reihe von Aktivitäten nicht nur im Bereich der präklinischen und translationalen Forschung sondern auch hinsichtlich der klinischen Umsetzung in Phase-I/II-Studien zu verzeichnen. Diese führten, nicht zuletzt auf der Basis einer verbesserten Effizienz und Sicherheit des Gentransfers, zu vergleichsweise großen Fortschritten, die sich in unmittelbaren klinischen Erfolgen widerspiegeln. Zugleich zeigt das Beispiel der adoptiven Immuntherapie mit chimären Antigenrezeptoren, dass auch hier eine zunehmende klinische Wirksamkeit direkt mit dem Auftreten schwerer Nebenwirkungen assoziiert ist – getreu dem pharmakologischen Grundprinzip „keine Wirkung ohne Nebenwirkung“. Inwieweit sich die jüngsten Erfolge auch im großen Rahmen bestätigen lassen, werden zukünftige vergleichende Studien zeigen müssen.

Ebenfalls zu konstatieren ist, dass sich deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler insbesondere in den Bereichen Vektorentwicklung, Sicherheit des Gentransfers und molekulare Analyse genetisch modifizierter Zellen international führende Positionen erarbeitet haben. Bei der klinischen Anwendung der Gentherapie sind vor allem die Studien bei angeborenen Immundefekten und im Bereich der Immuntherapie von malignen Erkrankungen zu nennen.¹⁰⁸ Aber auch in anderen Bereichen (Tumortherapie, HIV) wurden bereits wichtige klinische Erfahrungen gesammelt. Im internationalen Maßstab steht Deutschland hinsichtlich der Anzahl zugelassener Gentherapiestudien an dritter Stelle hinter den USA und Großbritannien. Insbesondere bei den seltenen monogen bedingten Krankheiten wird in Zukunft die internationale Zusammenarbeit eine noch wichtigere Rolle spielen. Mehrere deutsche Gruppen waren an der Etablierung eines „Transatlantic Gene Therapy Consortium (TAGTC)“¹⁰⁹ beteiligt. Die internationale Vernetzung trägt dazu bei, den oft hohen Forschungsaufwand durch Spezialisierung einzelner Zentren besser zu fokussieren.

108 Mit der Firma EUFETS GmbH ist in Deutschland zudem einer der in Europa führenden Produzenten retroviraler Vektoren für klinische Anwendungen beheimatet; www.eufets.com/ [11.04.2011].

109 Vgl. Williams et al., 2010.

Fraglich bleibt weiterhin, ob das Feld nur auf der Basis der limitierten Mittel von öffentlichen Geldgebern in der Lage sein wird, solche Studien erfolgreich durchzuführen. Aktuell unterstützt die Deutsche Forschungsgemeinschaft einige Forschungsverbände, die sich gentherapeutischen Fragestellungen widmen, unter anderem das Schwerpunktprogramm „Mechanisms of gene vector entry and persistence“¹¹⁰ (SPP1230) sowie den Sonderforschungsbereich Transregio (SFB-TR 36)¹¹¹ „Principles and Applications of Adoptive T-Cell Therapy“. Hinzu kommen andere SFBs und Graduiertenkollegs, in denen gentherapeutische Projekte eingebettet sind. Vom Bundesministerium für Bildung und Forschung werden im Rahmen des Programms „Innovative Therapien“ auch mehrere Gentherapieverbände gefördert:

- ▶ Innovative Zell- und Gentherapie für Morbus Gaucher Typ 2,
- ▶ Foamyvirus Netzwerk für die Gentherapie der Fanconi-Anämie (FoneFA),
- ▶ Innovative Gentherapie von Immundefizienz (iGENE),
- ▶ Netzwerk für pädiatrische Immundefizienzen (PIDNET).

Auch im Rahmen der Gründeroffensive wurden gentherapeutische Ansätze unterstützt, zum Beispiel das auf die Behandlung von AIDS zielende Projekt „Entwicklung und Kommerzialisierung eines biotechnologischen Verfahrens zur Eradikation proviraler HIV-1 DNA aus Patientenzellen.“ Zudem spielen deutsche Forscherteams auch in EU-geförderten Verbänden zur Gentherapie eine maßgebliche Rolle (siehe Kapitel 9.2, Indikator 5 und 6).

Solche Förderprogramme und andere Strukturmaßnahmen haben wesentlich dazu beigetragen, dass deutsche Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler die oben angesprochene führende Rolle in mehreren Feldern der gentherapeutischen Forschung einnehmen konnten (siehe Kapitel 9.2, Indikator 3). Allerdings hängt das Feld hauptsächlich von Initiativkraft und Innovationen der akademischen Forschung ab; die Unterstützung von Seiten der Industrie ist in Deutschland nach wie vor marginal. Sollte angesichts dessen die öffentliche Förderung zurückgeschraubt werden, ohne dass dies durch den Einstieg privater Geldgeber¹¹² kompensiert wird, droht die Gefahr, dass in Deutschland translationale Projekte und insbesondere klinische

110 www.schwerpunktprogramm1230.de/ [28.04.2011].

111 www.sfb-tr36.com/ [28.04.2011].

112 Unter diesem Gesichtspunkt sind die international zu beobachtenden ersten Anzeichen für eine allmähliche Rückkehr der großen Pharmaindustrie in die Gentherapie sicher positiv zu werten.

Studien nicht mehr durchgeführt werden können. Dies wäre besonders fatal im Angesicht der Leistungsfähigkeit der akademischen präklinischen Genterapieforschung.

3.6 Literatur

Adler, H. et al. (2003): Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. In: *Rev Med Virol* 13:111–121.

Aiuti, A. et al. (2002): Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. In: *Science* 296:2410–2413.

Aiuti, A. et al. (2007): Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. In: *J Clin Invest* 117(8):2233–2240.

Aiuti, A. et al. (2009): Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. In: *N Engl J Med* 360:447–458.

Alexander, B. L. et al. (2007): Progress and prospects. Gene therapy clinical trials (part 1). In: *Gene Ther* 14:1439–1447.

Allers, K. et al. (2011): Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. In: *Blood* 117:2791–2799.

Alton, E. et al. (2007): Progress and prospects. Gene therapy clinical trials (part 2). In: *Gene Ther* 14:1555–1563.

Alwin, S. et al. (2005): Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. In: *Mol Ther* 12:610–617.

Anderson, W. F. (1972): Genetic therapy. In: Hamilton, M. (ed.): *The New Genetics and the Future of Man*. Grand Rapids:109–124.

Anderson, W. F. (2000): Gene therapy. The best of times, the worst of times. In: *Science* 288(5466):627–629.

Anderson, W. F./Fletcher, J. C. (1980): Sounding boards. Gene therapy in human beings. When is it ethical to begin? In: *N Engl J Med* 303:1293–1297.

Anliker, B. et al. (2010): Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors. In: *Nat Methods* 7:929–935.

Baer, A./Bode, J. (2001): Coping with kinetic and thermodynamic barriers. RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. In: *Curr Opin Biotechnol* 12:473–480.

Baiker, A. et al. (2000): Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. In: *Nat Cell Biol* 2:182–184.

- Bainbridge, J. W. et al. (2008):** Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. In: *N Engl J Med* 358:2231–2239.
- Baltimore, D. (1970):** Viral RNA-dependent DNA polymerase. In: *Nature* 226:1209–1211.
- Bank, A. et al. (2005):** A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia. In: *Ann N Y Acad Sci* 1054:308–316.
- Barker, D. D./Berk, A. J. (1987):** Adenovirus proteins from both E1b reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. In: *Virology* 156:107–121.
- Baron, U. et al. (1997):** Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes. Novel transactivators with graded transactivation potential. In: *Nucleic Acids Res* 25:2723–2729.
- Bartholomae, C. C. et al. (2011):** Lentiviral Vector Integration Profiles Differ in Rodent Postmitotic Tissues. In: *Mol Ther* 19:703–710.
- Bauer, T. R. et al. (2008):** Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. In: *Nat Med* 14:93–97.
- Bauer, T. R. Jr. et al. (2011):** Treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors expressing CD18 from a PGK promoter. In: *Gene Ther* 18:553–559.
- Baum, C. et al. (1995):** Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug-resistance (mdr-1) gene in early hemopoietic cells. In: *J Virol* 69:7541–7547.
- Baum, C. et al. (2003):** Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. In: *Blood* 101:2099–2114.
- Baum, C. et al. (2006a):** Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. In: *Hum Gene Ther* 17:253–263.
- Baum, C. et al. (2006b):** Retrovirus vectors. Toward the plentivirus? In: *Mol Ther* 13(6):1050–1063.
- Belay, E. et al. (2010):** Novel hyperactive transposons for genetic modification of induced pluripotent and adult stem cells. A nonviral paradigm for coaxed differentiation. In: *Stem Cells* 28:1760–1771.
- Bendle, G. M. (2010):** Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. In: *Nat Med* 16(5):565–570.
- Beyer, W. R. et al. (2002):** Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein. Generation, concentration, and broad host range. In: *J Virol* 76:1488–1495.
- Biasco, L. et al. (2011):** Integration profile of retroviral vector in gene therapy treated patients is cell-specific according to gene expression and chromatin conformation of target cell. In: *EMBO Mol Med* 3:89–101.
- Bischoff, J. R. et al. (1996):** An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumour cells. In: *Science* 274:373–376.

- Blaese, R. M. et al. (1995):** T-lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. In: *Science* 270:475–480.
- Bleker, S. et al. (2006):** Impact of capsid conformation and Rep-capsid interactions on adeno-associated virus type 2 genome packaging. In: *J Virol* 80:810–820.
- Bloquel, C. et al. (2004):** Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression. New methodological developments and applications. In: *J Gene Med* 6:11–23.
- Bodem, J. et al. (2011):** Foamy viral nuclear RNA-export is distinct from other retroviruses. In: *J Virol* 85:2333–2341.
- Bohne, F. et al. (2008):** T-cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. In: *Gastroenterology* 134:239–247.
- Bohne, J. et al (2005):** Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end. In: *Nucleic Acids Res* 33:825–837.
- Bonini, C. et al. (1997):** HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. In: *Science* 276:1719–1724.
- Booth, C. et al. (2007):** Management options for adenosine deaminase deficiency. Proceedings of the EBMT satellite workshop (Hamburg, March 2006). In: *Clin Immunol* 123:139–147.
- Borchers, S. et al. (2011):** Genetically Modified Donor Leukocyte Transfusion and Graft-Versus-Leukemia Effect After Allogeneic Stem Cell Transplantation. In: *Hum Gene Ther* [Epub ahead of print].
- Borst, E. M./Messerle, M. (2003):** Construction of a cytomegalovirus-based amplicon. A vector with a unique transfer capacity. In: *Hum Gene Ther* 14:959–970.
- Boucas, J. et al. (2009):** Engineering adeno-associated virus serotype 2-based targeting vectors using a new insertion site-position 453-and single point mutations. In: *J Gene Med* 11:1103–1113.
- Boztug, K. et al. (2010):** Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. In: *N Engl J Med* 363:1918–1927.
- Brandwijk, R. J. et al. (2007):** Targeted gene-delivery strategies for angiostatic cancer treatment. In: *Trends Mol Med* 13(5):200–209.
- Brentjens, R. et al. (2010):** Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. In: *Mol Ther* 18:666–668.
- Brill, T. H. et al. (2007):** Allogeneic retrovirally transduced, IL-2- and IFN-gamma-secreting cancer cell vaccine in patients with hormone refractory prostate cancer—a phase I clinical trial. In: *J Gene Med* 9(7):547–560.
- Brown, B. D. (2006):** Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. In: *Nat Med* 12:585–591.

- Brown, B. D. et al. (2007):** A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. In: *Blood* 110:4144–4152.
- Buchholz, C. J. et al. (1998):** In vivo selection of protease cleavage sites from retrovirus display libraries. In: *Nat Biotech* 16:951–954.
- Buchholz, F. (2009):** Engineering DNA processing enzymes for the postgenomic era. In: *Curr Opin Biotechnol* 20:383–389.
- Buchholz, F. et al. (1998):** Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. In: *Nat Biotechnol* 16:657–662.
- Buckley, R. H. (2004):** The multiple causes of human SCID. In: *J Clin Invest* 114:1409–1411.
- Büning, H. et al. (2004):** Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. In: *Cells Tissues Organs* 177:139–150.
- Büning, H. et al. (2008):** Recent developments in adeno-associated virus vector technology. In: *J Gene Med* 10:717–733.
- Büning, H. et al. (2010):** Do CARs need a driver's license? Adoptive cell therapy with chimeric antigen receptor-redirectioned T cells has caused serious adverse events. In: *Hum Gene Ther* 21:1039–1042.
- Cartier, N. et al. (2009):** Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. In: *Science* 326:818–823.
- Cathomen, T./Joung, J. K. (2008):** Zinc-finger nucleases. The next generation emerges. In: *Mol Ther* 16:1200–1207.
- Cattoglio, C. et al. (2007):** Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. In: *Blood* 110:1770–1778.
- Cavazzana-Calvo, M. et al. (2010):** Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. In: *Nature* 467:318–322.
- Cavazzana-Calvo, M./Fischer, A. (2007):** Gene therapy for severe combined immunodeficiency. Are we there yet? In: *J Clin Invest* 117:1456–1465.
- Chen, Z. Y. et al. (2003):** Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. In: *Mol Ther* 8:495–500.
- Chinen, J. et al. (2007):** Gene therapy improves immune function in preadolescents with X-linked severe combined immunodeficiency. In: *Blood* 110:67–73.
- Chmielewski, M. et al. (2004):** T-cell activation by antibody-like immunoreceptors. Increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. In: *J Immunol* 173:7647–7653.

- Christ, M. (2002): Preclinical evaluation of gene transfer products. Safety and immunological aspects. In: *Toxicology* 174:13–19.
- Clark, P. R./Hersh, E.M. (1999): Cationic lipid-mediated gene transfer. Current concepts. In: *Curr Opin Mol Ther* 1:158–176.
- Coffin, J. M. (1996): Retroviridae. The viruses and their replication. In: Fields, B. N. et al. (eds.): *Fundamental Virology*. Lippincott Raven:763–844.
- Coffin, J. M. et al. (1997): *Retroviruses*. Cold Spring Harbor.
- Crettaz, J. et al. (2006): Intrahepatic injection of adenovirus reduces inflammation and increases gene transfer and therapeutic effect in mice. In: *Hepatology* 44:623–632.
- Darquet, A. M. et al. (1997): A new DNA vehicle for nonviral gene delivery. Supercoiled minicircle. In: *Gene Ther* 4:1341–1349.
- Deichmann, A. et al. (2007): Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. In: *J Clin Invest* 117:2225–2232.
- Delecluse, H.-J. et al. (1999): A first generation packaging cell line for Epstein-Barr Virus derived vectors. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5188–5193.
- Demaison, C. et al. (2002): High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. In: *Hum Gene Ther* 13:803–813.
- Derse, D. et al. (2007): Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome. Comparison with those of other retroviruses. In: *J Virol* 81:6731–6741.
- DFG (2007) = Deutsche Forschungsgemeinschaft: Entwicklung der Gentherapie. Senatskommission für Grundsatzfragen der Genforschung. Mitteilung 5. Weinheim.
- Donsante, A. et al. (2007): AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. In: *Science* 317:477.
- Eager, R. M./Nemunaitis, J. (2011): Clinical development directions in oncolytic viral therapy. In: *Cancer Gene Ther* 18:305–317.
- Edelstein, M. L. et al. (2007): Gene therapy clinical trials worldwide to 2007. An update. In: *J Gene Med* 9:833–842.
- Egelhofer, M. et al. (2004): Inhibition of HIV-1 entry in cells expressing Gp41-derived peptides. In: *J Virol* 78:568–575.
- Egerer, L. et al. (2011): Secreted Antiviral Entry Inhibitory (SAVE) Peptides for Gene Therapy of HIV Infection. In: *Mol Ther* 19:1236–1244.

- Ehrhardt, A. et al. (2006): Molecular analysis of chromosomal rearrangements in mammalian cells after phiC31-mediated integration. In: *Hum Gene Ther* 17:1077–1094.
- Ehrhardt, A. et al. (2007): Somatic integration from an adenoviral hybrid vector into a hot spot in mouse liver results in persistent transgene expression levels in vivo. In: *Mol Ther* 15:146–156.
- Ehrhardt, A. et al. (2008): Episomal Vectors for Gene Therapy. In: *Current Gene Therapy* 8:147–161.
- EMA (2006) = **European Medicine Agency**: ICH Considerations General Principles to Address the Risk of Inadvertent Germline Integration of Gene Therapy Vectors. Unter: www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/46999106en.pdf [03.03.2011].
- Engels, B. et al. (2005): Redirecting human T lymphocytes toward renal cell carcinoma specificity by retroviral transfer of T cell receptor genes. In: *Hum Gene Ther* 16:799–810.
- Engelstadter, M. et al. (2001): Targeted gene transfer to lymphocytes using murine leukaemia virus vectors pseudotyped with spleen necrosis virus envelope proteins. In: *Gene Therapy* 8:1202–1206.
- Enssle, J. et al. (1996): Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4137–4141.
- Erlwein, O./McClure, M. O. (2010): Progress and prospects. Foamy virus vectors enter a new age. In: *Gene Ther* 17:1423–1429.
- ESGCT (2010) = **European Society of Gene and Cell Therapy**: Human Gene Therapy. XVIII Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), October 22–25, 2010, Milan, Italy. In: *Hum Gen Ther* 21(10):1357–1499.
- Fehse, B. et al. (2002): A novel ‚sort-suicide‘ fusion gene vector for T cell manipulation. In: *Gene Ther* 9:1633–1638.
- Fehse, B. et al. (2004a): Pois(s)on – It’s a question of dose... In: *Gene Ther* 11:879–881.
- Fehse, B. et al. (2004b): Evidence for increased risk of secondary graft failure after in vivo depletion of suicide gene-modified T lymphocytes transplanted in conjunction with CD34+-enriched blood stem cells. In: *Blood* 104:3408–3409.
- Fischer, A. et al. (2004): Gene therapy for immunodeficiency diseases. In: *Semin Hematol* 41(4):272–278.
- Frank, K. M. et al. (2009): Investigation of the cause of death in a gene-therapy trial. In: *N Engl J Med* 361:161–169.
- Fredrickson, D. S. (1991): Asilomar and recombinant DNA. The end of the beginning. In: *Biomedical Politics*. Washington, D.C.:258–292.
- Freese, E. (1972): Prospects of gene therapy. In: *Science* 175:1024–1025.
- Friedmann, T. (1992): A brief history of gene therapy. In: *Nat Genet* 2:93–98.

- Friedmann, T./Roblin, R. (1972): Gene therapy for human genetic disease? In: *Science* 175:949–955.
- Friedmann-Morvinski, D. et al. (2005): Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. In: *Blood* 105(8):3087–3093.
- Funke, S. et al. (2008): Targeted cell entry of lentiviral vectors. In: *Mol Ther* 16:1427–1436.
- Funke, S. et al. (2009): Pseudotyping lentiviral vectors with the wild-type measles virus glycoproteins improves titer and selectivity. In: *Gene Ther* 16:700–705.
- Gabriel, R. et al. (2009): Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy. In: *Nat Med* 15:1431–1436.
- Gabriel, R. et al. (2011): An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. In: *Nat Biotechnol* 29(9):816–823.
- Gaspar, H. B. et al. (2004): Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. In: *Lancet* 364:2181–2187.
- Gaspar, H. B. et al. (2006): Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. In: *Mol Ther* 14:505–513.
- Gaspar, H. B. et al. (2011): Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. In: *Sci Transl Med* 3(97):97ra80.
- Gatti, R. A. et al. (1968): Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. In: *Lancet* 2:1366–1369.
- Gersting, S. W. et al. (2004): Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection. In: *J Gene Med* 6:913–922.
- Girod, A. et al. (1999): Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. In: *Nat Med* 5:1052–1056.
- Gossen, M. et al. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. In: *Science* 268:1766–1769.
- Gossen, M. et al. (2010): Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells. In: *Mol Ther* 18:1200–1209.
- Gossen, M./Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547–5551.
- Gossen, M./Bujard, H. (2002): Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. In: *Annu Rev Genet* 36:153–173.

- Grabundzija, I. et al. (2010):** Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells. In: *Mol Ther* 18(6):1200–1209.
- Graham, F. L./van der Eb, A. J. (1973):** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. In: *Virology* 52:456–467.
- Grez, M. et al. (1990):** Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9202–9206.
- Gross, I. et al. (2000):** A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. In: *Embo J* 19:103–113.
- Grunwald, T. et al. (2004):** Reducing mobilization of simian immunodeficiency virus based vectors by primer complementation. In: *J Gene Med* 6:147–154.
- Haase, R. et al. (2010):** pEPito. A significantly improved non-viral expression vector for mammalian cell. In: *BMC Biotechnology* 10:20.
- Hacein-Bey-Abina S. et al. (2008):** Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. In: *J Clin Invest* 118:3132–3142.
- Hacein-Bey-Abina, S. et al. (2002):** Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. In: *N Engl J Med* 346:1185–1193.
- Hacein-Bey-Abina, S. et al. (2003):** LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. In: *Science* 302:415–419.
- Hacein-Bey-Abina, S. et al. (2010):** Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. In: *N Engl J Med*. 363(4):355–364.
- Hall, B. et al. (2007):** Mesenchymal stem cells in cancer. Tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. In: *Int J Hematol* 86:8–16.
- Händel, E. M./Cathomen, T. (2010):** Zinc-Finger Nuclease Based Genome Surgery. It's all About Specificity. In: *Curr Gene Ther* 11:28–37.
- Hartl, I. et al. (2005):** Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metallo-protease-positive cells. In: *Gene Ther* 12:918–926.
- Hauswirth, W. et al. (2008):** Phase I Trial of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector. Short-term results. In: *Hum Gene Ther* 19:979–990.
- Heinkelein, M. et al. (2002):** Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. In: *J Virol* 76:3774–3783.
- Hettich, E. et al. (2006):** Genetic design of an optimized packaging cell line for gene vectors transducing human B cells. In: *Gene Ther* 13:844–856.

- High, K. A. (1999): Gene therapy for disorders of hemostasis. In: *Hematology* 1:438–446.
- High, K. et al. (2004): Immune responses to AAV and to Factor IX in a phase I study of AAV-mediated, liver-directed gene transfer for hemophilia B. In: *Mol Ther* 9:5383.
- Hildinger, M. et al. (1999): Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. In: *J Virol* 73:4083–4089.
- Hildinger, M. et al. (2001): Membrane-Anchored Peptide Inhibits Human Immunodeficiency Virus Entry. In: *J Virol* 75:3038–3042.
- Hirschhorn, R. et al. (2003): In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. In: *J Med Genet* 40:721–728.
- Hodgson, C. P. (1995): The vector void in gene therapy. In: *Bio/Technology* 13:222–225.
- Hoffmann, D. et al. (2007): Evaluation of twenty human adenoviral types and one infectivity-enhanced adenovirus for the therapy of soft tissue sarcoma. In: *Hum Gene Ther* 18:51–62.
- Hoffmann, D./Wildner, O. (2007): Comparison of herpes simplex virus- and conditionally replicative adenovirus-based vectors for glioblastoma treatment. In: *Cancer Gene Ther* 14:627–639.
- Hombach, A. et al. (2002): The recombinant T cell receptor strategy. Insights into structure and function of recombinant immunoreceptors on the way towards an optimal receptor design for cellular immunotherapy. In: *Curr Gene Ther* 2:211–226.
- Howe, S. J. et al. (2008): Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. In: *J Clin Invest* 118:3143–3150.
- Humeau, L. M. et al. (2004): Efficient lentiviral vector-mediated control of HIV-1 replication in CD4 lymphocytes from diverse HIV+ infected patients grouped according to CD4 count and viral load. In: *Mol Ther* 9:902–913.
- Huth, S. et al. (2006): Interaction of polyamine gene vectors with RNA leads to the dissociation of plasmid DNA-carrier complexes. In: *J Gene Med* 8:1416–1424.
- Hütter, G. et al. (2009): Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. In: *N Engl J Med* 360:692–698.
- Huttner, N. A. et al. (2003): Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. In: *Gene Ther* 10:2139–2147.
- Ivics, Z. et al. (1997): Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. In: *Cell* 91:501–510.
- Ivics, Z. et al. (2007): Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells. In: *Mol Ther* 15:1137–1144.
- Ivics, Z. et al. (2009): Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. In: *Nat Methods* 6:415–422.

- Jacobs, A. et al. (2001): Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors in vivo. In: *Cancer Res* 61:2983–2995.
- Jager, L. et al. (2009): A rapid protocol for construction and production of helper-dependent adenoviral vectors. In: *Nature Protocols* 4:547–564.
- Jain, K. K. (1998): *Textbook of Gene Therapy*. Seattle.
- Jaroff, L. (1999): Fixing the genes. In: *Time* 11 153(1):68–70.
- Jenke, A. W. et al. (2004): Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11322–11327.
- Jiang, Z. et al. (2004): Sustained muscle expression of dystrophin from a high-capacity adenoviral vector with systemic gene transfer of T cell costimulatory blockade. In: *Mol Ther* 10:688–696.
- Johnson, L. A. et al. (2009): Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. In: *Blood* 114:535–546.
- Juretzek, T. et al. (2004): Foamy virus integration. In: *J Virol* 78:2472–2477.
- Kaiser, J. (2007): Clinical trials. Gene transfer an unlikely contributor to patient's death. In: *Science* 318:1535.
- Kalla, M. et al. (2010): AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 107:850–855.
- Kammertoens, T. et al. (2005): Immunotherapy. Target the stroma to hit the tumor. *Trends*. In: *Mol Med* 11(5):225–231.
- Kay, M. A. et al. (2001): Viral vectors for gene therapy. The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. In: *Nat Med* 7:33–40.
- Kempkes, B. et al. (1995): Immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5875–5879.
- Kern, A. et al. (2003): Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. In: *J Virol* 77:11072–11081.
- Kieback, E. et al. (2008): A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 105:623–628.
- Kiem, H. P. et al. (2007): Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. In: *Blood* 109:65–70.
- Kiem, H. P. et al. (2010): Foamy combinatorial anti-HIV vectors with MGMP140K potently inhibit HIV-1 and SHIV replication and mediate selection in vivo. In: *Gene Ther* 17:37–49.

- Kimpel, J. et al. (2010):** Survival of the fittest. Positive selection of CD4+ T cells expressing a membrane-bound fusion inhibitor following HIV-1 infection. In: *PLoS One* 5:e12357.
- Kirn, D. H. (2006):** The End of the Beginning. Oncolytic Virotherapy Achieves Clinical Proof-of-Concept. In: *Mol Ther* 13:237–238.
- Kirn, D. H. (2011):** Redemption for the field of oncolytic virotherapy. In: *Mol Ther* 19:627–628.
- Kochanek, S. et al. (1996):** A new adenoviral vector. Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5731–5736.
- Kochanek, S. et al. (2001):** High-capacity ‘gutless’ adenoviral vectors. In: *Curr Opin Mol Ther* 3:454–463.
- Kohn, D. B. (2010):** Update on gene therapy for immunodeficiencies. In: *Clin Immunol* 135(2):247–254.
- Kolb, H. J. et al. (1990):** Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. In: *Blood* 76:2462–2465.
- Kraunus, J. et al. (2004):** Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing. In: *Gene Ther* 11:1568–1578.
- Kreppel, F. et al. (2005):** Combined genetic and chemical capsid modifications enable flexible and efficient de- and retargeting of adenovirus vectors. In: *Mol Ther* 12:107–117.
- Kruschinski, A. et al. (2008):** Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17481–17486.
- Kumar, V. V. (2003):** Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids. Evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH. In: *Gene Ther* 10(15):1206–1215.
- Kustikova, O. S. et al. (2003):** Dose finding with retroviral vectors. Correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. In: *Blood* 102:3934–3937.
- Kustikova, O. S. et al. (2005):** Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. In: *Science* 308:1171–1174.
- Kustikova, O. S. et al. (2009):** Cell-intrinsic and vector-related properties cooperate to determine the incidence and consequences of insertional mutagenesis. In: *Mol Ther* 17:1537–1547.
- Lamers, C. H. et al. (2006):** Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX. First clinical experience. In: *J Clin Oncol* 24:e20–22.
- Lampe, M. et al. (2007):** Double-labelled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction. In: *J Virol* 360:92–104.

- Laufs, S. et al. (2003):** Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. In: *Blood* 101:2191–2198.
- Leurs, C. et al. (2003):** Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. In: *Hum Gene Ther* 14:509–519.
- Li, Z. et al. (2002):** Murine leukemia induced by retroviral gene marking. In: *Science* 296:497.
- Liu, T. C. et al. (2007):** Clinical trial results with oncolytic virotherapy. A century of promise, a decade of progress. In: *Nat Clin Pract Oncol* 4:101–117.
- Liu, Y./Deisseroth, A. (2006):** Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. In: *Blood* 107:3027–3033.
- Lochelt, M. et al. (2005):** The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7982–7987.
- Loew, R. et al. (2010a):** A new PG13-based packaging cell line for stable production of clinical-grade self-inactivating gamma-retroviral vectors using targeted integration. In: *Gene Ther* 17:272–280.
- Loew, R. et al. (2010b):** Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. In: *BMC Biotechnol* 10:81.
- Lowenstein, P. R. (2004):** Immunological needles in the gene therapy haystack. Applying a genetic paradigm to gene therapy. In: *Gene Ther* 11:1–3.
- Lowenstein, P. R./Castro, M. G. (2003):** Inflammation and adaptive immune responses to adenoviral vectors injected into the brain: peculiarities, mechanisms, and consequences. In: *Gene Ther* 10:946–954.
- Lucke, S. et al. (2005):** Reduced mobilization of Rev-responsive element-deficient lentiviral vectors. In: *J Virol* 79:9359–9362.
- Maguire, A. M. et al. (2008):** Safety and efficacy of gene transfer for Leber’s congenital amaurosis. In: *N Engl J Med* 358:2240–2248.
- Mankad, A. et al. (2006):** Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia. In: *Blood* 107:3084–3090.
- Manno, C. S. et al. (2006):** Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. In: *Nat Med* 12:342–347.
- Manz, M. G./Di Santo, J. P. (2009):** Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology. In: *Nat Immunol* 10:1039–1042.
- Marsch, S. et al. (2010):** A novel directed evolution method to enhance cell-type specificity of adeno-associated virus vectors. In: *Comb Chem High Throughput Screen* 13:807–812.

- Mátés, L. et al. (2009):** Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. In: *Nat Genet* 41:753–761.
- Mátrai, J. et al. (2011):** Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. In: *Hepatology* 53(5):1696–1707.
- Mayrhofer, P. et al. (2009):** Use of minicircle plasmids for gene therapy. In: *Methods Mol Biol* 542:87–104.
- Mays, L. E./Wilson, J. M. (2011):** The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products. In: *Mol Ther* 19:6–27.
- Merten, C. A. et al. (2005):** Directed evolution of retrovirus envelope protein cytoplasmic tails guided by functional incorporation into lentivirus particles. In: *J Virol* 79:834–840.
- Messerle, M. et al. (1997):** Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14759–14763.
- Miletic, H. et al. (1999):** Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus. In: *J Virol* 73:6114–6116.
- Miletic, H. et al. (2007):** Bystander Killing of Malignant Glioma by Bone Marrow-derived Tumor-Infiltrating Progenitor Cells Expressing a Suicide Gene. In: *Mol Ther* 15(7):1373–1381.
- Miller, D. G. et al. (2004):** Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. In: *Nat Genet* 36:767–773.
- Mingozzi, F. et al. (2007):** CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. In: *Nat Med* 13(4):419–422.
- Mitchell, R. S. et al. (2004):** Retroviral DNA integration. ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. In: *PLoS Biol* 2:e234.
- Modlich, U. et al. (2005):** Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. In: *Blood* 105:4235–4246.
- Modlich, U. et al. (2006):** Cell culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. In: *Blood* 108:2545–2453.
- Modlich, U. et al. (2009):** Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. In: *Mol Ther* 17:1919–1928.
- Monse, H. et al. (2006):** Viral determinants of integration site preferences of simian immunodeficiency virus-based vectors. In: *J Virol* 80:8145–8150.
- Montini, E. et al. (2006):** Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. In: *Nat Biotechnol* (6):687–696.

- Montini, E. et al. (2009):** The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. In: *J Clin Invest* 119:964–975.
- Moreno-Carranza, B. et al. (2009):** Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp-91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells. In: *Gene Ther* 16:111–118.
- Morgan, R. A. et al. (2006):** Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. In: *Science* 314:126–129.
- Morgan, R. A. et al. (2010a):** Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. In: *Mol Ther* 18:843–851.
- Morgan, R. A. et al. (2010b):** Adoptive cell therapy. Genetic modification to redirect effector cell specificity. In: *Cancer J* 16:336–341.
- Mühlebach, M. D. et al. (2005):** Stable transduction of primary human monocytes by simian lentiviral vector PBj. In: *Mol Ther* 12:1206–1216.
- Mühlebach, M. D. et al. (2010):** Liver cancer protease activity profiles support therapeutic options with matrix metalloproteinase-activatable oncolytic measles virus. In: *Cancer Res* 70:7620–7629.
- Muik, A. et al. (2011):** Pseudotyping vesicular stomatitis virus with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins enhances infectivity for glioma cells and minimizes neurotropism. In: *J Virol* 85:5679–5684.
- Muller, B. et al. (2004):** Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. In: *J Virol* 78:10803–10813.
- Muller, O. J. et al. (2003):** Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. In: *Nat Biotech* 21:1040–1046.
- Mulligan, R. C. (1993):** The basic science of gene therapy. In: *Science* 260:926–932.
- Monahan, P. E./Samulski, R. J. (2000):** AAV vectors. Is clinical success on the horizon? In: *Gene Ther* 7(1):24–30.
- Münch, J. et al. (2007):** Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. In: *Cell* 129:263–275.
- Mussolino, C. et al. (2011):** A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. In: *Nucleic Acids Res* 2011 Aug 3. [Epub ahead of print].
- Muul, L. M./Candotti, F. (2007):** Immune responses to gene-modified T cells. In: *Curr Gene Ther* 7:361–368.
- Nakai, H. et al. (1999):** Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. In: *J Virol* 73:5438–5447.
- Naldini, L. et al. (1996):** In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. In: *Science* 272:263–267.

- Neff, T. et al. (2006): Survival of the fittest. In vivo selection and stem cell gene therapy. In: *Blood* 107(5):1751–1760.
- Nettelbeck, D. M. et al. (2002): Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma. Specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. In: *Cancer Res* 62:4663–4670.
- Nettelbeck, D. M. et al. (2008): Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer. In: *J Mol Med* 86:363–377.
- Newrzela, S. et al. (2008): Resistance of mature T cells to oncogene transformation. In: *Blood* 112:2278–2286.
- Ott, M. G. et al. (2006): Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. In: *Nat Med* 12:401–409.
- Papapetrou, E. P. et al. (2005): Genetic modification of hematopoietic stem cells with nonviral systems. Past progress and future prospects. In: *Gene Ther* 12:118–130.
- Parkhurst, M. R. et al. (2011): T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. In: *Mol Ther* 19:620–626.
- Paruzynski, A. et al. (2010): Genome-wide high-throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing. In: *Nat Protoc* 5:1379–1395.
- Pawliuk, R. et al. (2001): Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. In: *Science* 294:2368–2371.
- Peng, Z. et al. (2005): Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. In: *Hum Gene Ther* 16:1016–1027.
- Peng, Z. et al. (2007): Current status of gene therapy in China. In: *Hum Gene Ther* 18:942.
- Perabo, L. et al. (2003): In vitro selection of viral vectors with modified tropism. The adeno-associated virus display. In: *Mol Ther* 8:151–157.
- Perabo, L. et al. (2006): Heparan sulfate proteoglycan binding properties of adeno-associated virus retargeting mutants and consequences for their in vivo tropism. In: *J Virol* 80:7265–7269.
- Persons, D. A./Baum, C. (2011): Solving the problem of γ -retroviral vectors containing long terminal repeats. In: *Mol Ther* 19:229–231.
- Philpott, N. J./Thrasher, A. J. (2007): Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy. In: *Hum Gene Ther* 18:483–489.
- Picard-Maureau, M. et al. (2004): Foamy virus--adenovirus hybrid vectors. In: *Gene Ther* 11:722–728.
- Pich, D. et al. (2008): Conditional gene vectors regulated in cis. In: *Nucleic Acids Res* 36: e83.
- Preuß, E. et al. (2010): A novel, codon-optimised HSVtk(A168H) mutant [TK.007] for suicide gene therapy. In: *Hum Gene Ther* 21:929–941.

- Prill, J. M. et al. (2011): Modifications of adenovirus hexon allow for either hepatocyte detargeting or targeting with potential evasion from Kupffer cells. In: *Mol Ther* 19:83–92.
- Rogers, S. et al. (1973): Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. In: *J Exp Med* 137:1091–1096.
- Romano, G. et al. (2000): Latest developments in gene transfer technology. Achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. In: *Stem Cells* 18:19–39.
- Qasim, W. et al. (2007): Update on clinical gene therapy in childhood. In: *Arch Dis Child* 92:1028–1031.
- Qasim, W. et al. (2009): Progress and prospects. Gene therapy for inherited immunodeficiencies. In: *Gene Ther* 16:1285–1291.
- Quirin, C. et al. (2011): Selectivity and efficiency of late transgene expression by transcriptionally targeted oncolytic adenoviruses are dependent on the transgene insertion strategy. In: *Hum Gene Ther* 22:389–404.
- Ramirez, C. L. et al. (2008): Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. In: *Nat Methods* 5:374–375.
- Raper, S. E. et al. (2003): Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. In: *Mol Genet Metab* 80:148–158.
- Rethwilm, A. et al. (2003): The replication strategy of foamy viruses. In: *Curr Topics Microbiol Immunol* 277:1–26.
- Rethwilm, A. et al. (2007): Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. In: *Curr Gene Ther* 7:261–271.
- Robbins, P. F. et al. (2011): Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. In: *J Clin Oncol* 29:917–924.
- Rommelaere, J. et al. (2010): Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 21:185–195.
- Rosenberg S. A. et al. (1990): Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. In: *N Engl J Med* 323:570–578.
- Rudolph, C. et al. (2005): Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. In: *Mol Ther* 12:493–501.
- Sabini, E. et al. (2003): Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy. In: *Nat Struct Biol* 10:513–519.
- Sanchez-Antequera, Y. et al (2011): Magselectofection. An integrated method of nanomagnetic separation and genetic modification of target cells. In: *Blood* 117(16):e171–181.

- Sandrin, V. et al. (2003): Targeting retroviral and lentiviral vectors. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 281:137–178.
- Santilli, G. et al. (2008): Gene therapy of inherited immunodeficiencies. In: *Expert Opin Biol Ther* 8:397–407.
- Sarkar, I. et al. (2007): HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. In: *Science* 316:1912–1915.
- Sato, T. et al. (2007): Engineered human tmpk/AZT as a novel enzyme/prodrug axis for suicide gene therapy. In: *Mol Ther* 15:962–970.
- Schambach, A. et al. (2006a): Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. In: *Gene Ther* 13:641–645.
- Schambach, A. et al. (2006b): Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells. In: *Mol Ther* 13:391–400.
- Schambach, A. et al. (2007): Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. In: *Mol Ther* 15:1167–1173.
- Schambach, A. et al. (2010): Generation and genetic modification of induced pluripotent stem cells. In: *Expert Opin Biol Ther* 10:1089–1103.
- Schenk-Braat, E. A. et al. (2007): An inventory of shedding data from clinical gene therapy trials. In: *J Gene Med* 9:910–921.
- Scherer, F. et al. (2002): Magnetofection. Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. In: *Gene Ther* 9:102–109.
- Scherr, M. et al. (2002): Lentiviral gene transfer into peripheral blood-derived CD34+ NOD/SCID-repopulating cells. In: *Blood* 99:709–712.
- Scherr, M. et al. (2007): Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. In: *Nucleic Acids Res* 35:e149.
- Schiedner, G. et al. (2003): Selective depletion or blockade of Kupffer cells leads to enhanced and prolonged hepatic transgene expression using high-capacity adenoviral vectors. In: *Mol Ther* 7:35–43.
- Schlake, T./Bode, J. (1994): Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. In: *Biochemistry* 33:12746–12751.
- Schleef, M. et al. (2010): Production of non viral DNA vectors. In: *Curr Gene Ther* 10:487–507.
- Schleef, M./Blaesen, M. (2009): Production of plasmid DNA as a pharmaceutical. *Methods*. In: *Mol Biol* 542:471–495.
- Schmidt, M. et al. (2001): Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. In: *Hum Gene Ther* 12:743–749.
- Schmidt, M. et al. (2002): Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. In: *Blood* 100:2737–2743.

- Schmidt, M. et al. (2007):** High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). In: *Nat Methods* 4:1051–1057.
- Schmidt, P. et al. (2011):** Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2474–2479.
- Schnell, T. et al. (2000):** Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. In: *Hum Gene Ther* 11:439–447.
- Schnierle, B. S. et al. (1997):** Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4 expressing cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8640–8645.
- Schnutgen, F. et al. (2005):** Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7221–7226.
- Schucht, R. et al. (2006):** A new generation of retroviral producer cells. Predictable and stable virus production by Flp mediated site-specific integration of retroviral vectors. In: *Mol Ther* 14:285–292.
- Schwarzwaelder, K. et al. (2007):** Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. In: *J Clin Invest* 117:2241–2249.
- Seymour, L. W. et al. (2011):** Oncolytic virotherapy. Combining first-rate science with an unmet clinical need. In: *Hum Gene Ther* 22:387–388.
- Siemen, H. et al. (2005):** Nucleofection of human embryonic stem cells. In: *Stem Cells Dev* 14:378–383.
- Sjöblom, T. et al. (2006):** The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. In: *Science* 314:268–274.
- Stein, S. et al. (2010):** Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. In: *Nat Med* 16:198–204.
- Stitz, J. et al. (2000a):** Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. In: *Virology* 273:16–20.
- Stitz, J. et al. (2000b):** MLV-derived retroviral vectors selective for CD4-expressing cells and resistant to neutralization by sera from HIV-infected patients. In: *J Virol* 267:229–236.
- Suerth, J. D. et al. (2010):** Self-inactivating alpharetroviral vectors with a split-packaging design. In: *J Virol* 84:6626–6635.
- Suzuki, Y./Craigie, R. (2007):** The road to chromatin. Nuclear entry of retroviruses. In: *Nat Rev Microbiol* 5:187–196.
- Szczepek, M. et al. (2007):** Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. In: *Nat Biotechnol* 25:786–793.

- Tatum, E. L. (1967): Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. In: *Persp Biol Med* 10:19–32.
- Terheggen, H. G. et al. (1975): Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. In: *Z Kinderheilkd* 119:1–3.
- Themis, M. et al. (2005): Oncogenesis following delivery of a non-primate lentiviral gene therapy vector to fetal mice. In: *Mol Ther* 12:763–771.
- Thompson, L. (2000): Human Gene Therapy. Harsh Lessons, High Hopes. In: *FDA Consumer Magazine* September-October 2000. Unter: www.fda.gov/Fdac/features/2000/500_gene.html [19.07.2011].
- Thrasher, A. J. et al. (2005): Failure of SCID-X1 gene therapy in older patients. In: *Blood* 105:4255–4257.
- Tiberghien, P. et al. (2001): Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. In: *Blood* 97:63–72.
- Traggiai, E. et al. (2004): Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. In: *Science* 304:104–107.
- Trobridge, G. D. et al. (2006): Foamy virus vector integration sites in normal human cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1498–1503.
- Trobridge, G. D. et al. (2009): Foamy and lentiviral vectors transduce canine long-term repopulating cells at similar efficiency. In: *Hum Gene Ther* 20:519–523.
- Trobridge, G. D. et al. (2002): Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. In: *Mol Ther* 6:321–328.
- Trobridge, G. D./Russell, D. W. (2004): Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. In: *J Virol* 78:2327–2335.
- Tröhler, U. (2000): Gentechnik. Lösungen nicht in Sicht. In: *Deutsches Ärzteblatt* 97/36:A-2300, B-1992, C-1852.
- Uchida, N. et al. (2011): Chicken HS4 insulators have minimal barrier function among progeny of human hematopoietic cells transduced with an HIV1-based lentiviral vector. In: *Mol Ther* 19:133-139.
- Unsinger, J. et al. (2001): Retroviral vectors for the transduction of autoregulated, bidirectional expression cassettes. In: *Mol Ther* 4:484–489.
- van Lunzen, J. et al. (2007): Transfer of Autologous Gene-Modified T Cells in HIV-infected Patients with Advanced Immunodeficiency and Drug Resistant Viruses. In: *Mol Ther* 15:1024–1033.
- van Lunzen, J. et al. (2011): Gene Therapy Strategies. Can We Eradicate HIV? In: *Curr HIV/AIDS Rep* 8:78–84.
- Vandenbergh, L. H. et al. (2006): Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. In: *Nat Med* 12:967–971.

- van Tendeloo, V. F. et al. (2001): Gene therapy. Principles and applications to hematopoietic cells. In: *Leukemia* 15:523–544.
- von Kalle, C. et al. (1994): Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector. In: *Blood* 84:2890–2897.
- von Kalle, C. et al. (1999): Gentherapie in der Onkologie. In: *Der Onkologe* 5:898–909.
- Wagner, E. et al. (2004): Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer. Will “artificial viruses” be the answer? In: *Pharm Res* 21:8–14.
- Wagner, E. et al. (2008). Converging paths of viral and non-viral vector engineering. In: *Mol Ther* 16:1–2.
- Wagner, R. et al. (2000): Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. Implications for the safety of lentiviral vectors. In: *Hum Gene Ther* 11:2403–2413.
- Wagner, W. et al. (2005): Retroviral integration sites correlate with expressed genes in hematopoietic stem cells. In: *Stem Cells* 23:1050–1058.
- Walisko, O. et al. (2008): Transcriptional activities of the Sleeping Beauty transposon and shielding its genetic cargo with insulators. In: *Mol Ther* 16:359–369.
- Walker, G. F. et al. (2005): Toward synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro and in vivo. In: *Mol Ther* 11:418–425.
- Watson, D. J. et al. (2002): Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. In: *Mol Ther* 5:528–537.
- Weber, K. et al. (2008): A multi-color panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. In: *Mol Ther* 16:698–706.
- Weber, K. et al. (2010): LeGO vectors equipped with novel drug selectable fluorescent proteins - new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. In: *Gene Ther* 17:511–520.
- Weibel, S. et al. (2011): Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection. In: *BMC Cancer* 11:68.
- Weidenfeld, I. et al. (2009): Inducible expression of coding and inhibitory RNAs from retargetable genomic loci. In: *Nucleic Acids Res* 37:e50.
- Weinhold, M. et al. (2007): Dual T cell receptor expressing CD8+ T cells with tumor- and self-specificity can inhibit tumor growth without causing severe autoimmunity. In: *J Immunol* 179:5534–5542.
- White, K. et al. (2008): Engineering adeno-associated virus 2 vectors for targeted gene delivery to atherosclerotic lesions. In: *Gene Ther* 15:443–451.

- Wiktorowicz, T. et al. (2009):** Generation of an improved foamy virus vector by dissection of cis-acting sequences. In: *J Gen Virol* 90:481–487.
- Wildner, O./Morris, J. C. (2002):** Subcutaneous administration of a replication-competent adenovirus expressing HSV-tk to cotton rats. Dissemination, persistence, shedding, and pathogenicity. In: *Hum Gene Ther* 13:101–112.
- Williams, D. A. et al (2000):** Gene Therapy 2000. In: *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*:376–393.
- Williams, D. A. et al. (2010):** Transatlantic consortium spotlights need for changes in gene therapy trials. In: *Mol Ther* 18:1892.
- Willimsky, G./Blankenstein, T. (2000):** Interleukin-7/B7.1-encoding adenoviruses induce rejection of transplanted but not nontransplanted tumors. In: *Cancer Res* 60:685–692.
- Wilson, J. M. et al. (2005):** Gendicine. The First Commercial Gene Therapy Product. In: *Hum Gene Ther* 16:1014.
- Wirth, T. et al. (2003):** A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. In: *Cancer Res* 63:3181–3188.
- Wirth, T. et al. (2005):** Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. In: *Cancer Res* 65:7393–7402.
- Wodrich, H. et al. (2001):** A new RNA element located in the coding region of a murine endogenous retrovirus can functionally replace the Rev/Rev-responsive element system in human immunodeficiency virus type 1 Gag expression. In: *J Virol* 75:10670–10682.
- Wortmann, A. et al. (2008):** Fully detargeted polyethylene glycol-coated adenovirus vectors are potent genetic vaccines and escape from pre-existing anti-adenovirus antibodies. In: *Mol Ther* 16:154–162.
- Wu, X. et al. (2003):** Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. In: *Science* 300:1749–1751.
- Xue, S. A. et al. (2005):** Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells. In: *Blood* 106:3062-3067.
- Xue, S. A./Stauss, H. J. (2007):** Enhancing immune responses for cancer therapy. In: *Cell Mol Immunol* 4:173–184.
- Yanez-Munoz, R. J. et al. (2006):** Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. In: *Nat Med* 12:348–353.
- Yang, N. S. et al. (1990):** In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. In: *Proc Natl Acad Sci* 87:9568–9572.

Yant, S. R. et al. (2002): Transposition from a gutless adeno-transposon vector stabilizes transgene expression in vivo. In: *Nat Biotechnol* 20:999–1005.

Zahn, R. C. et al. (2008): Efficient entry inhibition of human and nonhuman primate immunodeficiency virus by cell surface-expressed gp41-derived peptides. In: *Gene Ther* 15:1210–1222.

Zychlinski, D. et al. (2008): Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. In: *Mol Ther* 16:718–725.