

Gentherapie ist ein neuer Therapiebereich, bei dem die therapeutische Substanz eine Nukleinsäuresequenz und nicht ein Protein oder ein kleines Molekül ist. Da die Applikation nackter DNS oder RNS in eine Zelle ein ineffizienter Prozess ist, erfolgt der Gentransfer in der Regel unter Verwendung eines Vektors oder Gen-Transportmittels. Ein solches Vehikel wird in der Regel aus Viren hergestellt. Vor Einsatz des Virus werden einige Bereiche des viralen Genoms beseitigt, durch das interessierende, therapeutische Gen ersetzt und unter die Kontrolle eines geeigneten Promoters gestellt (Tab. 91e-1). Gentransferstrategien beruhen auf drei grundlegenden Elementen: (1) dem Vektor, (2) dem einzubringenden Gen und (3) der physiologisch relevanten Zielzelle, in welche die DNS oder RNS gelangen soll. Den Prozess, bei dem der Vektor und die therapeutische DNS in die Zielzelle gelangen und dort zur Expression gebracht werden, bezeichnet man als *Transduktion*. Man unterscheidet bei der Gentherapie In-vivo- von Ex-vivo-Verfahren. Bei der In-vivo-Applikation des Gens erhält der Patient den Vektor direkt injiziert. Hingegen werden bei der Ex-vivo-Transduktion hämatopoetische und andere Zielzellen aus dem Patienten entfernt und nach Gentransfer im Labor als modifizierte autologe Zellen in den Patienten zurückgegeben. Bei dem zweiten Verfahren lassen sich Gentransfertechniken mit zellulären Therapien kombinieren (Kap. 90e).

Die Gentransfertechnologie ist eines der stärksten Konzepte der modernen Molekularmedizin und kann möglicherweise bei einer Vielzahl von Krankheiten, für die es bislang keine Behandlung gibt, eingesetzt werden. Klinische Studien zur Gentherapie laufen seit 1990. Ein aktueller Meilenstein war die Zulassung des ersten Gentherapieprodukts im Jahr 2012 in Europa und den USA (siehe unten). Da die vektorvermittelte Gentherapie wohl eine der komplexesten jemals entwickelten Therapien ist und aus einer Nukleinsäure- und einer Proteinkomponente besteht, ist der zeitliche Verlauf von der ers-

ten klinischen Studie bis zur Marktzulassung bemerkenswert. Er ähnelt demjenigen von anderen neuen Medikamentenklassen, wie den monoklonalen Antikörpern oder der Knochenmarkstransplantation. Bislang wurden mehr als 5000 Menschen in Gentransferstudien behandelt, und schwere Nebenwirkungen waren selten. Typisch für einige der frühen Studien waren ein überbordender Optimismus und die fehlende kritische Betrachtung der Ergebnisse von präklinischen Tierstudien. So wurde oft nicht ausreichend berücksichtigt, dass Tiermodelle nur eingeschränkte Rückschlüsse auf die Sicherheitsprofile der Produkte beim Menschen zulassen (z. B. insertionale Mutagenese). Nachdem ein Teenager an den Komplikationen einer Vektorinfusion verstorben war, durchlief das Forschungsgebiet eine Konsolidierungsphase. Durch weitere Studien wurden Risiken und Nutzen dieser neuen Therapien besser verstanden und konnten die Angriffspunkte bei den Krankheiten besser ausgewählt werden. Derzeit werden für zahlreiche Erkrankungsentitäten Gentherapieansätze entwickelt (Abb. 91e-1).

GENTRANSFER ZUR THERAPIE GENETISCHER ERKRANKUNGEN

Gentransferstrategien zur Therapie genetischer Erkrankungen beruhen in der Regel auf der Addition eines Gens. Dieser Ansatz umfasst normalerweise den Transfer des fehlenden Gens in physiologisch bedeutsame Zielzellen. Es sind jedoch auch andere Strategien möglich, z. B. die Bereitstellung eines Gens, das einen ähnlichen biologischen Effekt durch einen alternativen Weg erreicht (z. B. Faktor VIIa zur Therapie der Hämophilie A), der Einsatz eines Antisense-Oligonukleotids zur Entfernung eines mutierten Exons, dessen Sequenz für die Funktion eines Proteins nicht notwendig ist (z. B. das Dystrophinogen bei der Duchenne-Muskeldystrophie) oder die Herunterregulation einer für den Organismus schädlichen Zellantwort durch eine siRNA. Um eine langfristige Genexpression zu erreichen, werden zwei

TABELLE 91e-1 Eigenschaften von Gentransfervehikeln

Eigenschaften	Virale Vektoren							
	Retroviral	Lentiviral	Adenoviral	AAV	Humanes Spumavirus	HSV-1	SV-40	Alpha-Virus
Virales Genom	RNS	RNS	DNS	DNS	RNS	DNS	DNS	RNS
Notwendigkeit der Zellteilung	Ja	G1-Phase	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Verpackungslimitierung	8 kb	8 kb	8–30 kb	5 kb	8,5 kb	40–150 kb	5 kb	5 kb
Immunogenität des Vektors	Gering	Gering	Ausgeprägt	Gering	Gering	Gering in rekombinanten Viren	Gering	Gering
Genomintegration	Ja	Ja	Schwach	Schwach	Ja	Nein	Schwach	Nein
Langfristige Expression	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
Wesentliche Vorteile	Anhaltender Gentransfer in sich teilende Zellen	Anhaltender Gentransfer in transduziertem Gewebe	Hohe Effizienz bei der Transduktion unterschiedlicher Gewebe	Induziert nur eine geringe inflammatorische Reaktion, ist nicht pathogen	Anhaltender Gentransfer in sich teilende und anhaltender Zellen	Große Verpackungskapazität und anhaltender Gentransfer	Große Bandbreite unterschiedlicher Wirtszellen; nicht immunogen	Begrenzte Immunantwort gegen den Vektor
Wesentliche Nachteile	Theoretisches Risiko der insertionellen Mutagenese (trat in vielen Fällen auf)	Induziert möglicherweise in einigen Fällen Onkogenese (bislang noch nicht beobachtet)	Virales Kapsid verursacht eine starke Immunantwort	Begrenzte Verpackungskapazität	Stabiles Verpackungssystem fehlt	Residuale Zytotoxizität mit neuronaler Spezifität	Begrenzte Verpackungskapazität	Transiente Expression des transduzierten Gens

Abkürzungen: AAV = adenoassoziiertes Virus; HSV = Herpes-simplex-Virus; SV = Sarkomavirus.

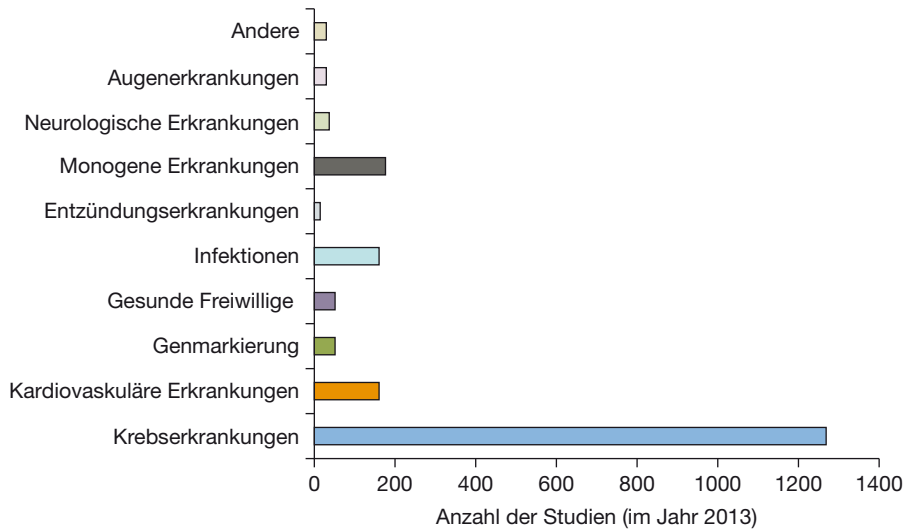


Abbildung 91e-1 Indikationen klinischer Genthapiestudien. Das Balkendiagramm unterteilt klinische Gentransferstudien anhand von Erkrankungsklassifikationen. Die Mehrheit der klinischen Studien hatte die Behandlung von Krebsserkrankungen zum Ziel, monogenetische Erkrankungen, infektiöse Erkrankungen sowie kardiovaskuläre Erkrankungen waren die nächstgrößeren Kategorien. (Mit frdl. Genehmigung aus SL Ginn et al: *J Gene Med* 15:65-77, 2013. Online veröffentlicht bei Wiley Online.)

verschiedene Strategien angewandt: Bei der ersten erfolgt die Transduktion von Stammzellen mit einem Vektor, der sich in das Genom integriert. Dies führt dazu, dass alle von dieser Zelle abstammenden Zellen das transduzierte Gen enthalten. Bei der zweiten Strategie werden langlebige Zellen, wie z. B. Skelettmuskel oder Nervenzellen, transduziert. Hierbei ist keine Integration in das Zielzellgenom erforderlich. Weil sich die Zielzellen nicht teilen können, muss die bereitgestellte DNS in episomaler Form stabilisiert werden, um die Genexpression zu ermöglichen. Dieser Ansatz umgeht die Probleme der Integration und der insertionalen Mutagenese.

■ IMMUNSCHWÄCHE: BEWEIS DES PRINZIPS

In den Anfängen der Genthapie wurde der Versuch, hämatopoetische Stammzellen zu transduzieren, durch die vergleichsweise niedrige Transduktionseffizienz retroviraler Vektoren behindert. Diese geringe Effizienz beruht auf dem Umstand, dass retrovirale Vektoren sich teilende Zellen für die Integration des Vektors benötigen und hämatopoetische Stammzellen normalerweise ruhen. Hämatopoetische Stammzellen sind jedoch ein wichtiges genthapeutisches Ziel. Die Identifikation von Zytokinen, die eine Zellteilung induzieren, ohne die Zelldifferenzierung zu fördern, erbrachte, gemeinsam mit technischen Verbesserungen bei der Isolation und Transduktion der hämatopoetischen Stammzellen, bescheidene, aber reale Gewinne der Transduktionseffizienz.

Der erste überzeugende therapeutische Effekt eines Gentransfers wurde bei Patienten mit der X-gekoppelten SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease) erreicht. Diese Erkrankung ist Folge der Mutationen in einem Gen (IL2RG), das für die γ c-Untereinheit des Rezeptors kodiert, der für die normale Entwicklung von T- und NK-Zellen (Kap. 374) notwendig ist. Betroffene Kinder erleiden in den ersten Monaten ihres Lebens vital bedrohliche Infektionen und/oder gedeihen nicht. Nach erfolgter Genthapie zeigte sich, dass die transduzierten Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den nicht transduzierten Zellen hatten. Letzteren fehlten weiterhin die für Lymphozytenentwicklung und Wachstum notwendigen Zytokinrezeptoren. Molekulare Studien zeigten, dass das Immunsystem bei den meisten behandelten Kindern komplett wiederhergestellt wurde, einschließlich eines dokumentierten Ansprechens auf standardisierte Impfungen im Kindesalter sowie einer adäquaten Antwort auf Infektionen und eine bemerkenswerte Verbesserung des Wachstums. Bei 5 von 20 in zwei separaten Studien behandelten Kindern kam es jedoch zu einem Syndrom, das einer akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie mit Splenomegalie, steigenden Leukozytenzahlen und dem Auftreten eines einzigen T-Zell-Klons entsprach. In diesen Kindern hatte sich der retrovirale Vektor in die DNS im Bereich eines Gens mit der Bezeichnung LMO-2 (LIM only-2) integriert. LMO-2 kodiert für einen Teil eines Transkriptionsfaktorenkomplexes, der eine Rolle bei der hämatopoetischen Entwicklung spielt. Das retrovirale LTR (long terminal repeat) erhöht die Expression von LMO-2 und führt so zur T-Zell-Leukämie.

TABELLE 91e-2 Mögliche Komplikationen der Genthapie

Gen-Silencing: Repression des Promoters
Genotoxizität: Komplikationen durch eine insertionale Mutagenese
Phänotoxizität: Komplikationen durch die Überexpression oder ektopische Expression des Transgens
Immuntoxizität: schädliche Immunreaktion auf den Vektor oder das Transgen
Gefahr der horizontalen Transmission: Abgabe des infektiösen Vektors in die Umgebung
Gefahr der vertikalen Transmission: Keimlinientransmission der gespendeten DNS

Studien an Patienten mit X-chromosomaler SCID waren ein Wendepunkt in der Evolution der Genthapie, weil sie zeigten, dass die Genthapie eine Erkrankung heilen kann. Von den 20 Säuglingen, die letztendlich im Rahmen dieser Studien behandelt wurden, erreichten 18 eine Korrektur ihrer Immunschwäche. Leider entwickelten 5 der 20 Patienten später eine Leukämie-ähnliche Krankheit. Ein Patient verstarb hieran, der Rest lebte jedoch bis zu 14 Jahre nach der Behandlung komplikationslos weiter. Diese Studie zeigt, dass eine zu einer Krebsserkrankung führende insertionale Mutagenese mehr als eine hypothetische Möglichkeit ist (Tab. 91e-2). Als Konsequenz aus dieser Studie müssen alle Protokolle, die integrierende Vektoren bei hämatopoetischen Zellen einsetzen, einen Plan für die Überwachung der Insertionsstellen und der klonalen Proliferation enthalten. Der Einsatz einer Suizid-Genkassette in den Vektor, welche die rasche Zerstörung eines fehlgeleiteten Zellklons ermöglicht, ist in diesem Zusammenhang eine erfolgversprechende Strategie, um solche Komplikationen zu vermeiden. Alternativ können Isolationselemente in die Genkassette eingefügt werden, welche die Aktivierung von Genen um die Insertionsstelle herum limitieren. Lentivirale Vektoren, die sich nicht teilende Zielzellen effektiv transduzieren können, sind aufgrund der Insertionsmuster vermutlich sicherer als retrovirale Vektoren; daher werden sie derzeit immer stärker als Alternative verwendet.

Ein wesentlicher Erfolg wurde mit einer Genthapie-Studie für eine andere Variante des SCID, die Adenosin-Deaminase(ADA)-Mangelerkrankung (Kap. 374) erreicht. ADA-SCID ähnelt zwar klinisch dem X-chromosomalen SCID, kann aber mit einer Enzymsubstitutionsbehandlung mit einer pegylierten Form des Enzyms (PEG-AD) behandelt werden. Durch die Enzymsubstitution kommt es zwar zu einer Immunrekonstitution, jedoch nicht immer zu normalen T-Zell-Zahlen. In Deutschland ist die Substanz noch nicht zugelassen; in den USA betragen die Therapiekosten für die dort zugelassene Substanz 200.000–300.000 US-Dollar pro Jahr. Die initialen Studien zur Genthapie bei ADA-SCID waren nicht erfolgreich, wohl aber Protokollmodifikationen, die für die Transduktion eher die Verwendung der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) als die der T-Zellen vorsehen. Im Rahmen des Protokolls wird die PEG-ADA-Therapie zum Zeitpunkt der Vektorinfusion beendet, um so den transduzierten Zellen

einen Proliferationsvorteil gegenüber den nicht transduzierten Zellen zu verschaffen. Darüber hinaus wird ein mildes Konditionierungsregime eingesetzt, um das Anwachsen der transduzierten Zellen zu ermöglichen. Dadurch wurden ohne die in den Studien mit X-chromosomaler SCID beobachteten Komplikationen Erfolge erzielt. Bisher kam es nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von > 8 Jahren bei 10 Kindern, die im Rahmen dieses Protokolls behandelt wurden, zu keinen wesentlichen Komplikationen. Somit ist ADA-SCID ein Beispiel für eine Veränderung der therapeutischen Optionen durch die Gentherapie. Bei HLA-identischem Spender ist eine Knochenmarktransplantation weiterhin die beste Behandlungsoption, dies gilt jedoch nur für einige wenige der Patienten. Ohne HLA-identischen Spender hat die Gentherapie eine ähnlich gute Wirkung wie die PEG-ADA, erfordert keine wiederholten Injektionen und geht nicht mit dem Risiko neutralisierender Antikörper gegen dieses bovine Enzym einher.

■ NEURODEGENERATIVE KRANKHEITEN – AUSWEITUNG DES PRINZIPI

Die SCID-Studien unterstützten die Hypothese, dass der Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen zur Behandlung aller Krankheiten eingesetzt werden kann, die durch eine allogene Knochenmarktransplantation behandelt werden können. Der Einsatz genetisch veränderter autologer Zellen hatte darüber hinaus mehrere Vorteile, so wurde die Graft-versus-host-Krankheit umgangen, war garantiert ein Spender verfügbar (sofern die Krankheit nicht direkt die Stammzellen des Patienten angreift) und bestand ein nur geringes Risiko für das Nichtanwachsen. Cartier und Aubourg machten sich das zunutze und führten bei einer neurodegenerativen Erkrankung, der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie (ALD), die erste Studie mit einer lentiviralen Vektortransduktion von hämatopoetischen Stammzellen durch. Die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie ist eine tödliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems durch Mutationen des für einen Adenosintriphosphat bindenden Kassettentransporter kodierenden Gens. Der Mangel dieses Proteins führt zur Nebenniereninsuffizienz und Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren in Oligodendrozyten und Mikroglia mit Zerstörung der Bereitstellung des Myelins durch diese Zellen. Die betroffenen Jungen weisen im Alter von 6–8 Jahren klinische und neuroradiologische Erkrankungszeichen auf und versterben meistens vor dem Erreichen der Jugend. Nach der lentiviralen Vektortransduktion von autologen hämatopoetischen Stammzellen bei jungen männlichen Kindern mit dieser Krankheit stabilisierte sich die Krankheit eindrucksvoll. Dadurch wurde belegt, dass die Stammzelltransduktion bei neurodegenerativen und immunologischen Krankheiten wirkt. Untersucher in Mailand führten diese Beobachtung einen Schritt weiter und entwickelten eine Behandlung für eine andere neurodegenerative Krankheit, die schlecht auf eine Knochenmarktransplantation anspricht. Die metachromatische Leukodystrophie ist eine lysosomale Speicherkrankheit, die durch Mutationen in dem für die Arylsulfatase A (ARSA) kodierenden Gen entsteht. Die späte infantile Form dieser Krankheit geht mit einer progressiven motorischen und kognitiven Behinderung einher und führt wenige Jahre nach Krankheitsbeginn durch die Akkumulation des ARSA-Substrats Sulfatid in Oligodendrozyten, Mikroglia und manchen Neuronen zum Tod. Da die endogene ARSA-Produktion für eine Kreuzkorrektur durch allogenes Transplantat zu gering war, bauten Naldini und seine Kollegen einen lentiviralen Vektor, der in den transduzierten Zellen eine supraphysiologische ARSA-Expression induzierte. Durch die Transduktion von autologen hämatopoetischen Stammzellen von Kindern, die mit dieser Krankheit geboren worden waren, aber noch keine Symptome aufwiesen, wurde die motorische und kognitive Entwicklung erhalten und konnten über einen Zeitraum von bis zu 32 Monaten, nachdem die betroffenen Geschwister Symptome entwickelten, wichtige Entwicklungsschritte vollzogen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gentherapie durch eine Manipulation der Expressionsspiegel Erfolge erzielen kann, wo die Knochenmarktransplantation scheitert. Vermutlich werden auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten derartige Ansätze umgesetzt werden.

Die Transduktion hämatopoetischer Stammzellen zur Behandlung der Hämoglobinopathien ist eine weitere logische Fortführung der bereits durchgeführten Studien, ist aber wegen des Umfangs der für einen therapeutischen Effekt erforderlichen Transduktion schwieriger. Derzeit laufen Studien zur Thalassämie und zu mehreren anderen hämatologischen Erkrankungen, wie dem Wiskott-Aldrich-Syndrom und der chronischen Granulomatose.

LANGFRISTIGE EXPRESSION BEI GENETISCHEN ERKRANKUNGEN: IN-VIVO-GENTRANSFER MIT REKOMBINANTEN ADENO-ASSOZIERTEN VIRALEN (AAV) VEKTOREN

Rekombinante AAV-Vektoren sind attraktive Genübertragungsvehikel für genetische Erkrankungen. Sie werden aus einem kleinen, replikationsdefizienten DNS-Virus generiert, enthalten keine viralen Kodierungssequenzen, induzieren im Tiermodell eine sehr geringe Immunantwort und sind in der Lage, ruhende Zielzellen zu transduzieren. Da die therapeutische DNS der Zelle in erster Linie in episomaler Form zur Verfügung steht, wird zudem das Risiko einer insertionalen Mutagenese minimiert. Ein Tropismus für bestimmte langlebige Zelltypen, wie Skelettmuskeln, zentrales Nervensystem und Hepatozyten, ermöglicht eine langfristige Expression auch ohne Vektorintegration in das Genom.

■ DAS ERSTE ZUGELASSENE PRODUKT

Die Eigenschaften der AAV wurden zur Entwicklung der ersten in Europa zugelassenen Gentherapie verwendet, einem AAV-Vektor zur Behandlung des autosomal rezessiven Lipoproteinlipasemangels. Diese seltene Krankheit (1–2/Million) entsteht durch Loss-of-function-Mutationen des für Lipoproteinlipase (LPL) kodierenden Gens. Das Enzym Lipoproteinlipase wird normalerweise vom Skelettmuskel hergestellt und ist für den Abbau triglyzeridreicher Lipoproteine und Chylomikronen zuständig. Die Betroffenen haben ein lipämisches Serum und oft auch eruptive Xanthome, eine Hepatosplenomegalie sowie gelegentlich schubweise verlaufende akute Pankreatitiden. Die Sicherheit der intramuskulären Injektion von AAV-LPL und seine Effizienz bei der Senkung der Häufigkeit der Pankreatitiden wurden in klinischen Studien belegt; daraufhin wurde es in Europa zugelassen. Derzeit laufen weitere klinische Studien mit AAV-Vektoren bei genetischen Krankheiten, z. B. bei Muskeldystrophien, α_1 -Antitrypsinmangel, Parkinson-Syndrom, neuronaler Ceroid-Lipofuszinose, Hämophilie B und mehreren Formen der kongenitalen Blindheit.

■ HÄMOPHILIE

Die Hämophilie (Kap. 78) galt lange als viel versprechendes Erkrankungsmodell für einen Gentransfer betrachtet, da das Genprodukt nicht die genaue Regulation der Expression erfordert und biologisch aktive Gerinnungsfaktoren in unterschiedlichen Gewebetypen synthetisiert werden können. Darüber hinaus verbessert die Anhebung der zirkulierenden Faktorspiegel < 1 % (ein Wert, den man bei schwer betroffenen Patienten beobachtet) auf Bereiche von etwa 5 % ganz wesentlich den Phänotyp der Erkrankung. Präklinische Studien mit rekombinanten AAV-Vektoren, die man in skeletale Muskeln oder die Leber infundiert hatte, erzeugten bei einem hämophilen Hundemodell die lang anhaltende (> 5 Jahre) Expression von Faktor VIII oder Faktor IX. Die Applikation eines AAV-Vektors, der Faktor IX exprimiert, in Skelettmuskeln von Hämophiliepatienten war sicher und verursachte eine langfristige Genexpression, die im Rahmen von Muskelbiopsien nachgewiesen werden konnte. Die zirkulierenden Blutspiegel stiegen jedoch in keinem Fall auf > 1 % an. Außerdem war eine hohe Anzahl intramuskulärer Injektionen (> 80–100) notwendig, um eine größere Muskelmasse zu transduzieren. Um die Vorgehensweise zu optimieren, wurde daher in Hämophilietiermodellen eine intravaskuläre Vektorapplikation erprobt. Diese Methode wird wahrscheinlich in zukünftigen Studien für diese und andere Krankheiten zum Einsatz kommen.

In der ersten Studie, in der ein AAV-Vektor, der Faktor IX exprimiert, in die Leber von Menschen mit Hämophilie injiziert wurde, wurden moderate Spiegel (> 5 %) erreicht, die jedoch nach 6–10 Wochen auf den Ausgangswert (< 1 %) zurückfielen. Ursache hierfür ist möglicherweise eine Gedächtnis-T-Zell-Antwort gegen das virale Kapsid. Eine solche Immunantwort findet man beim Menschen, nicht jedoch bei Tierarten, die keine natürlichen Wirte für dieses Virus sind (Tab. 91e-2). Als Reaktion auf diese Ergebnisse wurde eine zweite Studie durchgeführt, in der Patienten bei Abfall des Faktor-IX-Spiegels einen zusätzlichen kurzen Zyklus Prednisolon erhielten. Dieses Vorgehen führte bei Männern mit schwerer Hämophilie B zur Langzeitexpression von Faktor IX im Bereich von 2–5 %. Derzeit konzentrieren sich die Bemühungen auf eine Ausweitung dieser Studien auf die Hämophilie A.

■ GENTHERAPIE BEI NETZHAUTERKRANKUNGEN

Eine logische Schlussfolgerung aus den frühen Erfahrungen mit AAV in der Hämophilie-Studie war, dass der Schlüssel für eine Langzeit-expression in der Unterdrückung einer eventuell eintretenden Immunreaktion liegt. Daher wuchs das Interesse an immunprivilegierten Orten des Körpers, wie der Retina, als therapeutische Angriffspunkte. Am elegantesten wurde diese Interferenz für die degenerative Retinopathie belegt: Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) ist durch früh einsetzende Erblindung gekennzeichnet und gegenwärtig nicht behandelbar. Sie wird durch Mutation in verschiedenen Genen verursacht. Ungefähr 15 % der Fälle mit LCA beruhen auf einer Mutation in dem Gen RPE65, das für ein mit dem retinalen Pigmentepithel assoziiertes Protein mit einer Größe von 65 kDa kodiert. Bei Hunden mit einer Nullmutation für RPE65 konnte die Sehfähigkeit nach der subretinalen Injektion eines AAV-Vektors, der RPE65 exprimiert, wiederhergestellt werden. Da die ersten Tiere vor mehr als 10 Jahren behandelt wurden und elektroretinale und verhaltenspsychologische Hinweise auf eine visuelle Funktionalität bei den Tieren vorliegen, geht man von einer stabilen Transgenexpression aus. Wie bei der gekoppelten SCID-Erkrankung geht man davon aus, dass der Gentransfer relativ früh im Leben erfolgen muss, um eine Korrektur der genetischen Erkrankung zu erreichen. Allerdings muss diese Annahme erst noch in Studien überprüft werden. In AAV-RPE65-Studien in den USA und in Großbritannien wurden bei mehr als 30 Patienten Retinafunktion und Sehvermögen wiederhergestellt, am stärksten bei den jüngsten Patienten. Studien zu anderen hereditären degenerativen Netzhauterkrankungen, wie der Chorioideremie, laufen derzeit, ebenso Studien zu anderen komplexen, erworbenen Erkrankungen, wie der altersabhängigen Makuladegeneration, die mehrere Millionen Menschen weltweit betrifft. Die Neovaskularisierung, die bei der altersabhängigen makularen Degeneration auftritt, kann durch die Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-Hemmern wie Angiostatin oder durch den Einsatz einer RNSi-vermittelten Herunterregulation des VEGF verhindert werden. Es laufen gegenwärtig klinische Studien in frühen Phasen, bei denen siRNS, die VEGF RNS zum Ziel haben, eingesetzt werden. In diesen Studien ist jedoch die wiederholte intravitreale Injektion von siRNS notwendig. Ein AAV-Vektor-vermittelter Ansatz zur längerfristigen Hemmung der biologischen VEGF-Effekte durch einen löslichen VEGF-Rezeptor befindet sich in der klinischen Testung.

■ GENTHERAPIE BEI KREBSERKRANKUNGEN

Die Mehrzahl der klinischen Gentransfer-Studien hat die Behandlung von Tumoren zum Ziel (Abb. 91e-1). Im Vergleich zur konventionellen Tumorthherapie zeichnet sich die Gentherapie maligner Tumoren durch eine geringere Toxizität aus, etwa weil die Therapie lokal begrenzt appliziert wird (z. B. bei intratumoralen Injektionen) oder spezifisch gegen Elemente des Tumors wirkt (Immuntherapie, antiangiogenetische Ansätze). Ein wichtiges Ziel ist die Entwicklung von Therapeutika mit geringeren Nebenwirkungen, weil Krebserkrankungen mit zunehmendem Alter häufiger werden und viele der älteren Patienten gebrechlich sind.

Die Gentherapieprotokolle bei Tumorerkrankungen können in lokale und systemische Ansätze unterteilt werden (Tab. 91e-3). Einige der frühesten Krebsgentherapie-Studien konzentrierten sich auf die lokale Applikation eines Pro-Pharmakons oder eines Suizid-Gens, das die Sensitivität der Tumorzellen auf zytotoxische Substanzen steigern sollte. Eine häufig verwandte Strategie war dabei die intratumorale Injektion eines adenoviralen Vektors, der das Thymidinkinase (TK)-Gen zur Expression brachte. Zellen, die das TK-Gen aufnahmen und exprimierten, konnten durch die Gabe von Ganciclovir, das durch die Phosphorylierung durch TK zu einem toxischen Nucleosid wird, zerstört werden. Da sich die Zellen teilen müssen, damit die toxischen Nucleoside die Zellen schädigen können, wurde diese Strategie initial verwandt, um aggressive Hirntumoren (Glioblastoma multiforme) zu behandeln. Hierbei sollten sich teilende Tumorzellen zerstört werden, ohne ruhende normale Neuronen zu beschädigen. In der jüngeren Vergangenheit wurde dieser Ansatz unter anderem zur Therapie des lokal rezidivierenden Prostata-, Brust- und Kolonkarzinoms eingesetzt.

Bei einer weiteren lokalen Strategie erfolgt die adenoviral vermittelte Expression des Tumorsuppressorgens p53, das bei verschiedenen Malignomen mutiert ist. Mit dieser Vorgehensweise konnte bei einigen Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Hals-Nasen-Ohren-

TABELLE 91e-3 Gentherapiestrategien bei malignen Tumoren

Lokale/regionale Ansätze
Suizidgen/Pro-Pharmakon
Suppressorogen
Onkolytische Viren
Systemische Ansätze
Chemoprotektion
Immunmodulation
Antiangiogenese

Bereich, Ösophaguskarzinomen sowie nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen durch direkte Injektion des Vektors in den Tumor ein komplettes oder partielles Ansprechen erreicht werden. Die Ansprechraten lagen bei etwa 15 % und sind vergleichbar mit manchen konventionellen Monotherapien. So genannte onkolytische Viren, die selektiv in Tumorzellen, aber nicht in normalen Zellen replizieren, sollen beim Plattenepithelkarzinom im HNO-Bereich und anderen soliden Tumoren eingesetzt werden. Ihr Nutzen beruht auf der Beobachtung, dass der Verlust bestimmter viraler Gene die Fähigkeit zur Replikation in normalen Zellen, aber nicht in Tumorzellen verhindert. Die Replikation des viralen Vektors in der Tumorzelle führt dabei nicht nur zur Zerstörung dieser Tumorzelle, sondern darüber hinaus auch zur Verbreitung des replizierten Vektors innerhalb des Tumors. Faktoren wie Fibrose, Infiltration durch gesunde Zellen, Basalmembranen sowie nekrotische Bereiche behindern jedoch die Verbreitung innerhalb des Tumors. In einigen Ländern sind onkolytische Viren bereits zur Tumorthherapie zugelassen.

Da bei den meisten Krebserkrankungen eher die Metastasierung als das unkontrollierte Wachstum des Primärtumors zum Tode führt, gibt es ein beträchtliches Interesse an der Entwicklung systemischer Gentherapieansätze. Eine Strategie ist die Förderung einer effizienteren Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem. Zu den Ansätzen gehören die Transduktion von Tumorzellen mit immunverstärkenden Genen, die für Zytokine, Chemokine oder kostimulatorische Moleküle kodieren und die Ex-vivo-Manipulation von dendritischen Zellen, damit sie vermehrt Tumorantigene präsentieren. Vor kurzem wurden mit der lentiviralen Transduktion von autologen Lymphozyten mit einer für einen chimären Antigenrezeptor (CAR) kodierenden cDNA beträchtliche Erfolge erzielt. CAR besteht aus einer Domäne, die das Tumorantigen bindet (z. B. ein Antikörper gegen das B-Zell-Antigen CD19) und mit einer intrazellulären Signaldomäne fusioniert ist, welche die T-Zell-Aktivierung ermöglicht. Dadurch erkennen die transduzierten Lymphozyten Zellen, die dieses Antigen tragen, und zerstören sie. Dieser CAR-T-Zell-Ansatz war bei der refraktären chronischen lymphatischen Leukämie und der akuten lymphatischen Prä-B-Zell-Leukämie außerordentlich erfolgreich. Durch die Infusion der genmodifizierten T-Zellen, die so verändert wurden, dass sie das B-Zell-Antigen CD19 erkennen, kam es in vivo zu einer mehr als 1000-fachen Expansion. Die CAR-T-Zellen konnten u. a. im Knochenmark nachgewiesen werden und induzierten bei einem Teil der intensiv vorbehandelten Patienten Remissionen. Da die Zellen als CAR-positive Gedächtnis-T-Zellen persistieren, sorgen sie für eine dauerhafte Antitumorwirkung. Bei manchen Patienten tritt verzögert ein Tumorlysesyndrom auf, das unter Umständen intensivmedizinisch behandelt werden muss. Außerdem führt dieser Ansatz über eine On-target-Toxizität zu einer B-Zell-Aplasie, sodass möglicherweise lebenslang IgG-Infusionen erforderlich sind. Derzeit zeigen die Ergebnisse, dass lange andauernde Remissionen erzielt werden können und dass sich diese Strategie theoretisch auch auf andere Tumortypen übertragen lässt, bei denen ein Tumorantigen identifiziert wurde.

Darüber hinaus wurden Gentransferstrategien entwickelt, um die Tumorangio-genese zu hemmen. Diese Ansätze umfassen die konstitutive Expression von Angiogenese-Inhibitoren wie Angiostatin und Endostatin, den Gebrauch von siRNS, um die Spiegel von VEGF oder VEGF-Rezeptor zu reduzieren, und kombinierte Ansätze, bei denen autologe T-Zellen genetisch modifiziert wurden, um Tumorgefäß-spezifische Antigene zu erkennen. Studien hierzu befinden sich noch in frühen Testphasen.

Ein weiterer neuer systemischer Ansatz hat den Schutz gesunder Zellen vor der Toxizität von Chemotherapie zum Ziel. Die am besten untersuchte Strategie ist hierbei die Transduktion hämatopoetischer

Zellen mit Genen, die eine Resistenz gegen Zytostatika induzieren. Dabei wurde das Multidrug Resistenzgen MDRI oder das Gen, das die O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) kodiert, zur Expression gebracht. Die Ex-vivo-Transduktion hämatopoetischer Stammzellen, gefolgt von der Replantation dieser Zellen, wird mit dem Ziel überprüft, höhere Chemotherapie-Dosen als üblich applizieren zu können.

■ GENTHERAPIE BEI VASKULÄREN ERKRANKUNGEN

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die dritte große Erkrankungsgruppe, für die gentherapeutische Ansätze entwickelt werden. Erste Erfahrung wurde dabei im Rahmen von Studien gewonnen, welche die Verbesserung der Durchblutung von Skelett- (kritische Extremitätenischämie) oder Herzmuskulatur (Angina/Myokardischämie) zum Ziel hatten. Die Erstlinientherapie umfasst für beide Gruppen die mechanische Revaskularisierung oder/und ein medikamentöses Management. Ein Teil der Patienten kommt jedoch für keinen der gängigen Ansätze in Frage bzw. hat keinen Erfolg mit den konventionellen Strategien. Derartige Patienten bildeten die ersten Kohorten für die Evaluation von Gentransfer mit dem Ziel einer therapeutischen Angiogenese. VEGF war ein zentrales Transgen bei diesen Studien. Seine Spezifität für endotheliale Zellen macht es besonders attraktiv. Weitere interessante Transgene sind der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) und die α -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (HIF-1 α). Bei den meisten dieser klinischen Studien wird das Transgen-exprimierende Plasmid oder der adenovirale Vektor direkt intramuskulär oder myokardial injiziert. Obwohl beide Vektoren mit großer Wahrscheinlichkeit nur eine transiente Expression von VEGF erlauben, ist diese Strategie möglicherweise ausreichend, da keine Notwendigkeit für eine anhaltende Transgenexpression besteht, nachdem sich neue Gefäße gebildet haben. Die direkte Injektion ermöglicht eine lokale Expression. Außerdem werden sehr wahrscheinlich auf diesem Weg systemische Effekte, wie z. B. die retinale Neovaskularisation oder die Induktion einer neuen Gefäßformation in einem ruhenden Tumor, vermieden. Anfängliche Studien mit Adeno-VEGF- oder Plasmid-VEGF-Injektionen verbesserten die angiografisch darstellbaren Gefäße gegenüber dem Ausgangsbefund, beeinflussten aber weder die Amputationsfrequenz noch die kardiovaskuläre Mortalität. Derzeit laufen Studien mit anderen Administrationsrouten und anderen Transgenen.

In aktuelleren Studien wurden AAV-Vektoren eingesetzt, um einen therapeutischen Ansatz für Patienten mit refraktärer Stauungs Herzinsuffizienz zu entwickeln. In präklinischen Studien hatte ein Vektor, der für die Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a) kodiert, im Schweinemodell einer Herzinsuffizienz durch Volumenüberladung positiv inotrope Effekte auf den linken Ventrikel. Die Ergebnisse einer Phase-II-Studie, in welcher der Vektor bei Patienten mit Stauungs Herzinsuffizienz über die Koronararterien infundiert wurde, belegten die Sicherheit und lieferten erste Hinweise auf die Effizienz; nun sind größer angelegte Studien geplant.

ANDERE ANSÄTZE

Dieses Kapitel befasste sich mit der Genadditionstherapie, bei der ein normales Gen in ein Gewebe übertragen wird, um die Expression eines Genprodukts mit therapeutischer Wirkung auszulösen. Eine weitere einflussreiche Technik, an der derzeit gearbeitet wird, ist das Genom-Editing, bei dem in situ eine Mutation korrigiert wird, sodass unter der Kontrolle durch endogene Steuersignale die Wildtyp-Kopie entsteht. Dieser Ansatz bedient sich neuartiger Reagenzien, wie den Zinkfinger-nukleasen, TALENs und CRISPR, die in der Nähe der Mutation Doppelstrangbrüche in der DNS auslösen. Anschließend wird mithilfe der übertragenen Reparatursequenz und den zellulären Mechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen ein funktionierendes Gen hergestellt. Wieder eine andere Strategie, die inzwischen in klinischen Studien untersucht wird, ist der Einsatz von siRNAs oder Short-hairpin-RNS als Transgene, um die Expression schädlicher Gene zu drosseln (z. B. das mutierte Huntingtin bei der Chorea Huntington oder die Gene des Hepatitis-C-Genoms von infizierten Patienten).

TABELLE 91e-4 Anamnese von Patienten, die im Rahmen von Gentherapiestudien behandelt wurden

Bestandteile der Anamnese von Patienten, die in Gentransferstudien behandelt wurden

1. Welcher Vektor wurde appliziert? Handelt es sich um einen vornehmlich integrierenden (retroviralen, lentiviralen, Herpesvirus [Latenz und Reaktivierung]) oder nicht integrierenden (Plasmid, denoviralen, AAV) Vektor?
2. Über welchen Zugangsweg wurde der Vektor appliziert?
3. Was war das Zielgewebe?
4. Welches Gen wurde transduziert? Ein erkrankungsbezogenes Gen? Ein Markierungsgen?
5. Wurden Nebenwirkungen nach dem Gentransfer beobachtet?

Rasterfragen für die langfristige Nachbeobachtung von Gentransferpatienten^a

1. Wurde ein neues Malignom diagnostiziert?
2. Wurde eine neue neurologische/ophthalmologische Störung oder eine Verschlimmerung einer bestehenden Störung diagnostiziert?
3. Wurde eine neue Autoimmunstörung oder rheumatologische Störung diagnostiziert?
4. Wurde eine neue hämatologische Störung diagnostiziert?

^a Faktoren, die das langfristige Risiko beeinflussen: Integration des Vektors in das Genom; Vektorpersistenz ohne Integration und Transgen-spezifische Effekte.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Schlagkraft und Vielseitigkeit der Gentransferansätze zeigt, dass es nur wenig Erkrankungsentitäten gibt, für die derzeit keine Gentransfertherapien entwickelt werden. Die Entwicklung neuer Klassen von Therapeutika benötigt normalerweise 20–30 Jahre. Monoklonale Antikörper und rekombinante Proteine sind neuere Beispiele hierfür. Gentherapeutika, mit denen zu Beginn der 1990er Jahre klinische Studien begonnen wurden, haben denselben Zeitraum in Anspruch genommen. Da es inzwischen viele Beispiele für klinische Erfolge gibt, dürfte die therapeutische Bedeutung der Gentherapie im 21. Jahrhundert zunehmen. Eine zentrale Frage ist die langfristige Sicherheit des Gentransfers. Daher haben die regulierenden Behörden für in Studien gentherapeutisch behandelte Menschen eine Nachbeobachtungszeit von 15 Jahren verfügt (Tab. 91e-4). Die Umsetzung des therapeutischen Nutzens der modernen Molekularmedizin hängt vom anhaltenden Fortschritt in der Gentransfertechnologie ab.

WEITERFÜHRENDE LITERATUR

- CANDOTTI F, SHAW KL, MUUL L et al: Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood* 120 (18): 3635–46, 2012
- GAUDET D, MÉTHOT J, DÉRY S et al: Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther* 20 (4): 361–9, 2013
- HACEIN-BEY-ABINA S, PAI SY, GASPARD HB et al: A modified γ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 371 (15): 1407–17, 2014
- KOCHENDERFER JN, DUDLEY ME, KASSIM SH et al: Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol* 33 (6): 540–9, 2015
- NATHWANI AC, TUDDENHAM EG, RANGARAJAN S et al: Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 365 (25): 2357–65, 2011