

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Holger Höhn**

**Somatische Gentherapie monogener Erbkrankheiten –
Einfache Lösungen für einfache Defekte ?**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Jörg Fabian Pokall
aus Gunzenhausen**

Würzburg, Juli 2003

Referent : Prof. Dr. med. H. Höhn

Korreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2003

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2. PRINZIPIEN DER SOMATISCHEN GENTHERAPIE	2
2.1. Gentransfer	2
2.2. Vektoren	3
2.2.1. Virale Vektoren	3
2.2.1.1. Retroviren	3
2.2.1.1.1. Wildtyp	3
2.2.1.1.2. Vektorproduktion	5
2.2.1.1.3. Typen retroviraler Vektoren	7
2.2.1.2. Adenoviren	9
2.2.1.2.1. Wildtyp	9
2.2.1.2.2. Vektorproduktion	11
2.2.1.2.3. Typen adenoviraler Vektoren	11
2.2.1.3. Adeno-assoziierte Viren	12
2.2.1.3.1. Wildtyp	12
2.2.1.3.2. Vektorproduktion	13
2.2.1.4. Herpesviren	14
2.2.1.4.1. Wildtyp	14
2.2.1.4.2. Vektorproduktion	16
2.2.1.5. Andere Viren	16

2.2.1.5.1. Vaccinia Virus	16
2.2.1.5.2. Baculovirus	17
2.2.2. Nicht-virale Vektoren	17
2.2.2.1. DNA-Moleküle	19
2.2.2.2. Oligodeoxynukleotide	19
2.2.2.3. Ribozyme	20
3. GENTHERAPIE MONOGENER ERBKRANKHEITEN	22
3.1. SCHWERE KOMBINIERTE IMMUNSCHWÄCHE (SCID)	22
3.1.1. Klinisches Bild	22
3.1.2. Genetik	23
3.1.3. Klinische Diagnose	23
3.1.4. Konventionelle Behandlungsoptionen	24
3.1.5. Gentherapeutische Voraussetzungen und Ziele	25
3.1.6. Gentherapie	26
3.1.6.1. ADA-SCID	26
3.1.6.1.1. Retrovirale Vektoren	26
3.1.6.1.2. Transplantation transgener peripherer Blut-Lymphozyten	27
3.1.6.1.3. Transplantation transgener Hämatopoietischer Stammzellen	30

3.1.6.2. X-SCID	31
3.1.6.1.1. Transplantation transgener Hämatopoietischer Stammzellen	31
3.2. HÄMOPHILIE	34
3.2.1. Klinisches Bild	34
3.2.2. Genetik	34
3.2.2.1. Gene der Gerinnungsfaktoren	34
3.2.2.2. Mutationen	35
3.2.3. Klinische Diagnose	36
3.2.4. Konventionelle Behandlungsoptionen	36
3.2.4.1. Substitution der Gerinnungsfaktoren	36
3.2.4.2. Inhibitoren in der Substitutionstherapie	37
3.2.5. Gentherapeutische Voraussetzungen und Ziele	38
3.2.6. Gentherapie	39
3.2.6.1. Virale Vektoren	39
3.2.6.1. Retrovirale Vektoren	39
3.2.6.2. Lentivirale Vektoren	40
3.2.6.3. Adenovirale Vektoren	40
3.2.6.4. AAV - Vektoren	41
3.2.6.2. Ex vivo Applikationen	43
3.2.6.2.1. Transfizierte autologe Fibroblasten	43
3.2.6.2.2. Knochenmarkstromazellen	44
3.2.6.2.3. Transgene Hauttransplantate	45
3.2.6.2.4. Implantierte Mikrokapseln	45

3.2.6.3. Nackte DNA	46
3.2.6.3.1. Parenterale Anwendung nackter DNA	46
3.2.6.3.2. Orale Anwendung nackter DNA	47
3.3. CYSTISCHE FIBROSE	49
3.3.1. Klinisches Bild	49
3.3.2. Genetik	49
3.3.2.1. Das <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> - Gen	49
3.3.2.2. Mutationen	50
3.3.3. Klinische Diagnose	51
3.3.4. Konventionelle Behandlungsoptionen	52
3.3.5. Gentherapeutische Voraussetzungen und Ziele	52
3.3.6. Gentherapie	54
3.3.6.1. Virale Vektoren	54
3.3.6.1.1. Adenovirale Vektoren	54
3.3.6.1.2. AAV – Vektoren	56
3.3.6.2. Nicht-virale Vektoren	58
4. DISKUSSION	61
4.1. Barrieren der Gentherapie	61
4.2. Balance etablierter und gentherapeutischer Verfahren	69

4.3. Klinische Umsetzbarkeit der Genterapie	73
4.3.1. Invasivität, Expansivität, Toxizität	73
4.3.2. Assoziierte Mortalität und Morbidität	74
4.3.3. Keimbahntransfer, Mutagenesis, Replikationsfähige Viren	75
4.3.4. Behandlung von Chemoresistenz durch Genterapie	76
5. RESÜMEE	77
LITERATUR	79

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Jahrtausendwende bildete den Rahmen einer lebhaften Zeit in der Gentherapie. Öffentlichkeitswirksame Berichte von bahnbrechenden Erfolgen schienen die Mühen jahrzehntelanger Grundlagenforschung endlich zu den prognostizierten Ergebnissen geführt zu haben, wenn auch vorerst nur in recht kleinen Nischen des Feldes. Begleitet von geschärfter öffentlicher Aufmerksamkeit, vor allem nach einem Todesfall im Rahmen einer gentherapeutischen Studie, schuf die Publikation des ersten therapeutischen Erfolges bei der „Severe Combined Immuno Deficiency“ (SCID) im Millenniumsjahr eine willkommene Atempause für die somatische Gentherapie. Die mediale Vermengung jeglicher genetischer Forschung sowohl mit weit überzogenen Erwartungen als auch mit Horrorszenarien hatte in den Jahren zuvor immer wieder zu Unterbrechungen und grundlegenden Hinterfragungen der Forschungsarbeit geführt. Da bei monogenen Defekten im Gegensatz zu polygenen bzw. multifaktoriell bedingten Leiden die Reparatur des jeweiligen Genlokus theoretisch zu einer vollständigen Korrektur führt, waren erste gentherapeutische Fortschritte vor allem in diesem Feld prognostiziert worden. Allerdings stellten sich diese Überlegungen sehr bald als ein in der täglichen Praxis der Laborarbeit mit immer neuen Hindernissen behaftetes Unternehmen heraus, so dass entgegen vorschnell geäußerter Ankündigungen die erwarteten Lösungen meist nur in Ansätzen zu Stande kamen.

Ziel dieser Arbeit ist es nun, anhand ausgewählter monogener Erbkrankheiten den derzeitigen Stand der somatischen Gentherapie einer eingehenden Analyse zu unterziehen. Dabei werde ich zunächst auf die derzeit zur Verfügung stehenden Vektoren des Gentransports eingehen, anhand ausgewählter monogenetischer Leiden einen Überblick der Progression bis dato entwickelter Therapieformen geben und diese auf ihre Umsetzbarkeit, auch in der klinischen Anwendung, beleuchten.

<i>Disease</i>	<i>Number of registered trials</i>
Cancer	237
Monogenic diseases	49
Infectious diseases	33
Other	35

Abb.: Im August 2002 beim Recombinant DNA Advisory Committee der National Institutes of Health (USA) registrierte Gentherapey-Studien

2. Prinzipien der somatischen Gentherapie

2.1. Gentransfer

Unter den verwendeten Formen gentherapeutischer Verfahren lassen sich prinzipiell drei Arten des Gentransfers unterscheiden. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Übertragung der genetischen Information in Form von Nukleinsäuren durch den jeweiligen Transportvektor in die Zielzelle des Organismus. Dieser Prozess wird als Transfektion oder auch Transduktion bezeichnet.

Beim *in vitro* Gentransfer werden die Zielzellen vom eigentlichen Organismus isoliert und sowohl die Transfektion des genetischen Materials als auch die Analyse der Transferfolgen werden in der Zellkultur durchgeführt.

Das *ex vivo* Verfahren ist eine Weiterentwicklung dieser Methode, bei dem Körperzellen zunächst vom Organismus isoliert, im Labor transfiziert und multipliziert werden, um dann wieder dem Ursprungsorganismus zugeführt zu werden. Voraussetzung für das *ex vivo* Verfahren ist die Möglichkeit, ausreichend Zellen aus dem Organismus isolieren bzw. dann *in vitro* multiplizieren zu können. Darüber hinaus ist die erfolgreiche Reimplantation der transgenen Zellen ein limitierender Faktor des Therapieerfolgs.

Bei der *in vivo* Therapie wird versucht, den Zielzellen das genetische Material direkt durch einen viralen oder nicht-viralen Transportvektor zu verabreichen. Auch hier ist der Therapieerfolg direkt von der notwendigen Spezifität der Transfektion sowie der Lebenserwartung der Zielzellen abhängig.

<i>Delivery system</i>	<i>Number of registered trials</i>
Retrovirus	158
RNA	4
Adenovirus	103
AAV	8
Plasmid	36
DNA-liposomes	55
Canarypox	5
Vaccinia	20
Fowlpox	7
Herpes simplex virus	1

Abb.: Im August 2002 beim Recombinant DNA Advisory Committee des Institute of Health (USA) für gentherapeutische Studien registrierte Vektoren

2.2. Vektoren

2.2.1. Virale Vektoren

2.2.1.1. Retroviren

2.2.1.1.1. Wildtyp

Retroviren stammen entwicklungsgeschichtlich von beweglichen zellulären Elementen ab, die sich zu autonomen Formen wandelten und unter Vertebraten als exogene oder endogene parasitäre Entitäten weit verbreitet sind. So nimmt man zum Beispiel an, dass bis zu 1% des menschlichen Genoms retroviralen Ursprungs ist. Der Wildtyp ist durch die Aktivierung nachgeschalteter Onkogene potentiell in der Lage die Induktion sowohl chronischer als auch akut progredienter maligner Erkrankungen zu verursachen (223). Der prominenteste Vertreter der Familie der Retroviren ist wohl das Human Immunodeficiency Virus (HIV), das trotz weltweiter angestrebter Forschungsarbeit noch immer durch das von ihm ausgelöste Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) Jahr für Jahr tausende von Menschenleben kostet.

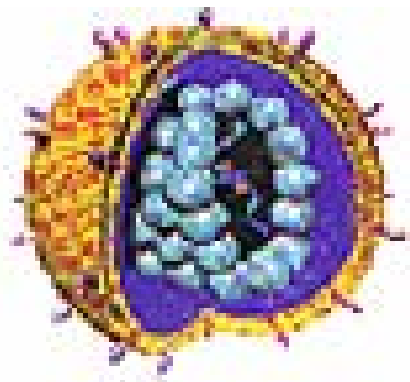


Abb: Der Retrovirus-Wildtyp (aus 64)

Die um die 100 nm großen Retroviren können anhand von Variationen in ihrer Hüllstruktur, der Morphologie des Nukleocapsids, der Art des Partikelzusammenbaus und ihrer Nukleotidsequenz in sieben verschiedene Genera unterteilt werden. Der Hüllstruktur kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu, da die unterschiedlichen Rezeptoren der einzelnen retroviralen Untergruppen die Fusion mit der Wirtszelle oder einem endosomalen Kompartiment vermitteln. Als einfaches Beispiel für den Aufbau eines Retrovirus dient das Moloney Murine Leukaemia Virus (MLV), das sowohl einen ecotropischen Rezeptor zur Reproduktion in seinen Ursprungszellen aus der Familie der Nagetiere als auch einen amphotropischen Rezeptor für eine große Anzahl anderer

potentieller, unter anderem auch humaner Wirtszellen besitzt. Das zur Familie der Lentiviren gehörige HIV trägt einen CD 4 Rezeptor auf seiner Oberfläche, der die Bindung an menschliche Lymphozyten möglich macht. Innerhalb der verschiedenen retroviralen Genera finden sich darüber hinaus vielfältige Rezeptortypen, die die verschiedenen Partikel je nach anvisierter Zielzelle für gentherapeutische Anwendungen interessant machen (37, 38, 85, 238).

Alle Vertreter der Familie der Retroviren haben ein Genom aus zwei Kopien einsträngiger Plusstrang-RNA von 7-10 kb gemein, das nach der Infektion der Wirtszelle durch die viruseigene Reverse Transkriptase (RT) in Doppelstrang-DNA (dsDNA) umgewandelt wird. Der daraus resultierende dsDNA-Provirus wird durch eine virale Integrase an einer zufälligen Stelle in das Wirtsgenom integriert und bildet die Basis für die Produktion neuer viraler Partikel durch zelluläre Transkriptions- und Translationsmechanismen. Der reproduktive Kreis schließt sich durch das Ausknospen neuer infektiöser Partikel von der Oberfläche der Wirtszelle (238).

Da für den Transport des Provirus in den Zellkern der Wirtszelle die Kernmembran eine unüberwindliche Barriere darstellt, findet dieser Prozess in sich teilenden Zellen nur während der Mitose statt. Allerdings besitzen Lentiviren spezielle Proteine und nukleäre Lokalisationssignale innerhalb ihrer Matrix, die einen Transport des Provirus auch in sich nicht in der Teilung befindliche Zellkerne ermöglicht (169).

Hinsichtlich ihrer genomischen Struktur werden einfache Onkoviren und komplexe Lentiviren, sowie die DNA-Spumaviren unterschieden, wobei die genetische Information der für die Virusproduktion unerlässlichen Proteine in Form der Gene *gag*, *pol* und *env* in allen Retroviren enthalten ist. *Gag* kodiert virale Kernproteine von 10 bis 30 kD, die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase sind Produkte des *pol*-Gens und die für die Bindung an zelluläre Oberflächenrezeptoren und die Fusion mit der Zellmembran notwendigen Rezeptorproteine stammen von *env* (37, 38, 57, 102, 249). Komplexe Retroviren kodieren darüber hinaus noch für eine Reihe in die Regulation der Virusvermehrung involvierte Proteine (38, 228).

Nach der Transkription in dsDNA enthält der Provirus sog. Long Terminal Repeats (LTR), die aus den 3' und 5' Enden der viralen RNA entstehen. Diese Nukleotidsequenzen von

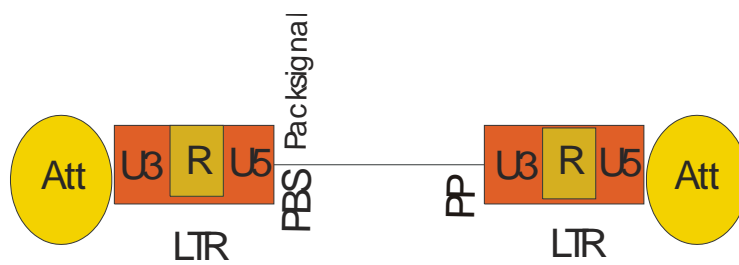


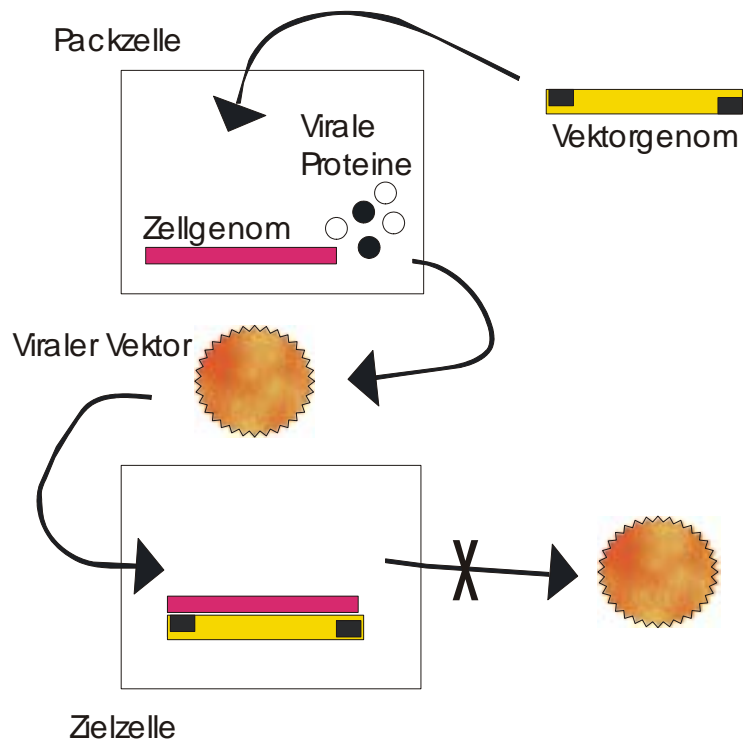
Abb.1: Notwendige retrovirale Elemente zur Produktion von Vektoren (siehe Text)

ca. 600 bp Länge flankieren beide Seiten des proviralen Genoms und können weiter in *Unique 3'*(U3), *Repeat* (R) und *Unique 5'*(U5) unterteilt werden. Die U3 Region enthält die viralen Promotoren und Transkriptions-Enhancer, R und U5 sind essentielle Sequenzen für die reverse Transkription und die Replikation des Virions. Außer o.g. Sequenzen müssen auch noch *PBS*, *PP*, die Integrationssequenz *att* und eine spezifische Packsequenz in retroviralen Vektoren in cis vorhanden sein, um ein Verpacken von genetischer Information in den Partikeln und dessen anschließende Integration in das Genom der Zielzelle zu ermöglichen (37, 38, 57, 102, 249).

2.2.1.1.2 Vektorproduktion

Vorrangiges Ziel bei der Herstellung retroviraler Vektoren ist es, ein Vehikel für den Transport und die Integration des jeweiligen Gens zu produzieren, das im Gegensatz zum Wildtyp nach erfolgreichem Transfer nicht in den viralen Replikationszyklus eintritt. Die hieraus resultierenden replikationsfähigen Partikel könnten durch Infektion weiterer Zellen maligne Potenz entwickeln (227). Es wurden verschiedenste Systeme für die diversen retroviralen Subtypen entwickelt, deren Optimierung hinsichtlich ihrer Sicherheit und dem Ausstoß möglichst hoher Viren-Titer man vorrangig durch die Wahl der richtigen Packzelllinien und Kulturbedingungen zu erreichen versuchte (102, 169, 187, 188). Grundsätzlich müssen sowohl alle für die Transkription und das Verpacken des viralen Genoms als auch für die reverse Transkription und die Integration des Provirus notwendigen Gensequenzen zur Herstellung eines retroviralen Vektor

vorhanden sein (s. Abb.). Allerdings können sämtliche Gene die für die viralen Kern- und Hüllenprotein und -enzyme kodieren durch deren Bereitstellung in den Packzellen in *trans* aus dem Genom des Vektors entfernt werden. Dafür werden Packzell-Kulturen genetisch zumeist so manipuliert, dass sie diese für den Zusammenbau des Viruspartikels



notwendigen Proteine konstitutiv exprimieren. Der dadurch entstandene

Abb : Herstellung retroviraler Vektoren mit Pack-/Helferzellen (s. Text)

Freiraum im Genom des Virus kann nun für den Einbau des therapeutischen Gens genutzt werden. Sind nun also *gag*, *env* und *pol* im Genom der Packzellen oder in Form von zusätzlichen eingebrachten Plasmiden vorhanden, steht der Produktion infektiöser Viruspartikel nichts mehr im Wege. Nach erfolgreicher Infektion verliert der Vektor allerdings diese Kapazität, da die notwendigen Hüll- und Kernproteine in den Zielzellen nicht mehr in *trans* zur Verfügung stehen. In so genannten „split genome“-Konstrukten werden die *gag/pol* und das *env* Gen von zwei verschiedenen vom Virus abgeleiteten Plasmiden, die keine *cis*-Elemente enthalten, in *trans* exprimiert. Hierdurch soll die Gefahr der Entstehung replikationsfähiger Viren durch homologe Rekombination zwischen dem Vektor und den Helferplasmiden ausgeschaltet werden.

Das gleiche Prinzip kommt bei der Vektorherstellung durch transiente Transfektion zur Anwendung, bei der man die Zellkulturen simultan mit dem Vektor und den Helferplasmiden transfiziert und das fertige Produkt nach einigen Tagen „erntet“ (245). Genauso wurden auch induzierbare Systeme konzipiert, die die viralen Proteine auf eine

bestimmte Stimulation hin exprimieren (67, 195). Diese Modifikationen wurden auch deshalb notwendig, da die bei konstitutiver Produktion erreichten hohen Konzentrationen von Virusproteinen zytotoxische Effekte entwickelten (67,195).

2.2.1.1.3 Typen retroviraler Vektoren

Die verschiedenen in der Gentherapie verwendeten retroviralen Vektoren sind im Folgenden aufgelistet (*rev in 102*).

Oncoviren (einfache Retroviren, die nur sich teilende Zellen infizieren)

Murine Leukaemia Virus (MLV)	Der am häufigsten verwendete und am weitesten entwickelte retrovirale Vektor. Enthält beide <i>LTR</i> 's, <i>PBS</i> , <i>PP</i> , <i>att</i> und ein Packsignal. Ausgerüstet mit amphi-, eco- und xenotropischen Rezeptoren. Herstellung in MLV und SNV Helferzellen
Spleen Necrosis Virus (SNV)	Ähnliche Struktur wie MLV. Herstellung in MLV Helferzellen. Ein posttranskriptionaler Block scheint die Replikation in Menschen zu verhindern, was SNV eine erhöhte Sicherheit gegenüber MLV verleihen würde. Allerdings weniger verbreitet und deshalb weniger entwickelt und benutzt als MLV
Rous Sarcoma Virus (RSV)	Replikationsfähiger onkogener Virus mit <i>v-src</i> Onkogen und einfachen <i>cis</i> -Elementen. Nach Ersetzen des Onkogens durch ein therapeutisches Gen für die Herstellung replikationsfähiger Vektoren geeignet. Wenig verbreitet
Avian Leukosis Virus (AVL)	Ähnliche Struktur wie MLV und SMV. Das Packsignal erstreckt sich bis in die <i>gag</i> Region, so dass Teile davon in den Vektor mit einbezogen werden müssen.

Lentiviren (komplexe Retroviren mit akzessorischen Replikationsproteinen und der Fähigkeit ruhende Zellen zu infizieren)

Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV 1)	Enthält die <i>cis</i> -Elemente einfacher Retroviren. Zusätzliche Elemente müssen zum Transport der mRNA in den Zellkern im Vektor enthalten sein (<i>Rev</i> / <i>RRE</i>). Das Packsignal erstreckt sich bis in <i>gag</i> , so dass dieses in mutierter Form im Vektor enthalten sein muss. Das Tat-Protein muss ebenfalls exprimiert werden, um eine Expression vom viralen <i>LTR</i> -Promoter aus zu ermöglichen. Alternativ kann ein anderer interner, nicht-viraler Promoter eingefügt werden
Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV 2)	Ähnliche Struktur wie HIV 1, wird allerdings als weniger pathogen eingestuft.
Spumavirus	DNA enthaltender unkonventioneller Retrovirus mit verschiedenen Formen der Replikation. Enthält alle <i>cis</i> -Sequenzen der einfachen Retroviren. Soweit keine Pathogenität im Wirtsorganismus bekannt. Teile von <i>pol</i> und <i>gag</i> sind für das Verpacken in <i>cis</i> notwendig. Das Tat-Protein muss ebenfalls für eine Transkription vom <i>LTR</i> -Promoter vorhanden sein

2.2.1.2. Adenoviren

2.2.1.2.1. Wildtyp

Adenoviren wurden zuerst in den epithelialen Drüsen von Patienten mit akuten Infektionen der oberen Atemwege entdeckt. Darin spiegelt sich ihr natürlicher Tropismus für das menschliche respiratorische Epithel wieder, wobei sie jedoch auch ein weites Spektrum anderer Säugetiere und Vögel infizieren. Die verbreitetsten endemischen Serotypen sind 1,2 und 5, die auch für epidemische Ausbrüche von milden, selbst-limitierenden Formen der Konjunktivitis und kindlicher Gastritis verantwortlich sind. In immunkomprimierten Patienten kann eine Dissemination der Viren allerdings auch zu einem lethalen Ausgang der Infektion führen.

Zurzeit sind über 100 verschiedene Mitglieder der Familie der Adenoviren bekannt, die man anhand biochemischer und serologischer Kriterien in sechs Subgenera von A bis F und deren entsprechende Serotypen einteilen kann. Die für genterapeutische Zwecke am häufigsten verwendeten Serotypen sind 2 und 5. Die viralen Partikel haben einen Durchmesser von 70-100 nm

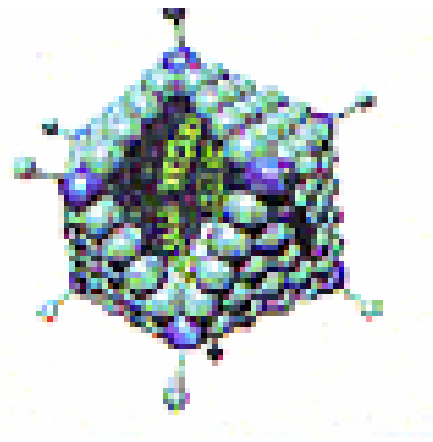


Abb.: Der Adenovirus-Wildtyp (aus 64)

und enthalten eine doppelsträngige DNA von 36 kb. Die Infektion der Wirtszelle wird durch ein Faserprotein der viralen Kapsel vermittelt, das zusammen mit einem Hexonprotein auch Angriffspunkt der Immunabwehr des potentiellen Wirtes darstellt. Nach der Bindung an den primären Oberflächenrezeptor gelangt der Adenovirus über ein endosomales Kompartiment in den Zellkern. Dort persistiert die virale DNA als ein extrachromosomales Episom und initiiert den Replikationszyklus. An dessen Ende steht innerhalb von 24 h eine Nachkommenschaft von an die 10.000 Partikel, die durch die nachfolgende Lyse der Wirtszelle die Infektion des Organismus fortsetzt. Menschliche

Adenoviren könne eine große Anzahl verschiedener Zellen infizieren, sind allerdings nur in humanen Zellen replikationsfähig (131, 238).

Adenovirale Gene von beiden Strängen der DNA transkribiert werden und zeigen ein verhältnismäßig komplexes Splicing-Muster. Man findet fünf unmittelbare (*immediate early*) und frühe (*early*) Transkriptionseinheiten (E1-E5) für die frühen viralen Proteine, zwei verzögerte und eine dominierende späte (*late*) Transkriptionseinheit, die für fünf mRNAs kodiert (L1-L5). Die Expression der späten Gene wird erst nach der Replikation des Genoms

initiiert und umfasst das Faserprotein sowie die Hexon- und Pentonproteine des Viruscapsids. E1a kodiert für zwei

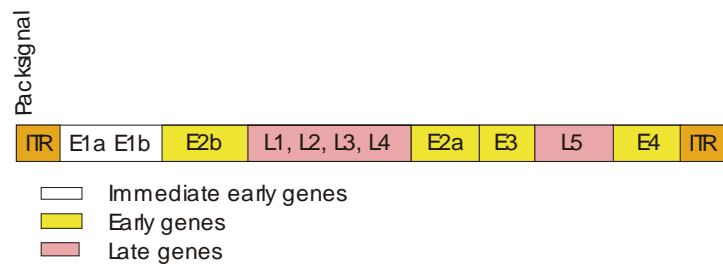


Abb.: Wichtige adenovirale Gene (siehe Text)

Polypeptide, die durch Bindung an entsprechende

Faktoren der Zelle den Zellzyklus und die Transkription der Virus-DNA initiieren. Das 55 kD Proteinprodukt des E1b verhindert einen Block im Zellzyklus bzw. die Apoptose der Wirtszelle. E2 und E4 kodieren für Proteine des Replikationszyklus, während das von E3 stammende Protein die Präsentation der MHC I Domäne der Zelle und die TNF vermittelte Zytolyse hemmt. Die Translation des Wirtszellgenoms wird gleichzeitig durch das durch die RNA Polymerase III transkribierte VA Gen verhindert (99, 131, 169). Weiterhin enthält das Genom ein Packsignal, das ähnlich dem der Retroviren die Interaktion der Kapselproteine mit der viralen DNA steuert. An beiden Enden des Genoms befinden sich außerdem Sequenzen von 100-140 bp, die sog. „Inverted Terminal Repeats“ (ITR). Die ITRs ermöglichen es der DNA durch Basenpaarung die während des Replikationszyklus wichtige „Pfannenstiel“- Konfiguration einzunehmen, des Weiteren vermitteln sie die Bindung des viralen Genoms an die Kernmatrix der Wirtszelle (99). Die ITRs, das Packsignal und eine für ein Transkriptionsprotein kodierende Sequenz des E2 Gens müssen in adenoviralen Vektoren vorhanden sein.

2.2.1.2.2. Vektorproduktion

Die natürliche Eigenschaft der Adenoviren, hohe Titer von Partikeln in Wirtszellen zu replizieren vereinfacht die Herstellung adenoviraler Vektoren für die Gentherapie. Allerdings ist es umso schwerer, die mit um die 36 kb verhältnismäßig großen Vektoren mit den gebräuchlichen Standardverfahren zu klonieren, da singuläre Restriktionsstellen im kompletten Genom nicht zu finden sind. Die HEK293 Zelllinie exprimiert die adenoviralen E1 Gene konstitutiv und hat sich als Reservoir für Helfer- bzw. Packzellen bei der Herstellung adenoviraler Vektoren etabliert. Nach der Replikation der Vektoren kommt es zum Zelltod, der sich in der Kultur durch ein sich an der Oberfläche bildende Plaque bemerkbar macht. Mit dem gereinigten Vektoren können durch Reinfektion weiterer Helferzellen dann bis zu 10^{12} Partikel oder „plaque forming units (pfu)“ pro Milliliter Vektorzubereitung gewonnen werden.

2.2.1.2.3. Typen adenoviraler Vektoren

Bei der ersten Generation der Adenovektoren wurde lediglich ein Teil des E1 Gens durch den gewünschten Promoter und eine cDNA ersetzt. Die Immunantwort auf residuale Gene führte allerdings dazu, dass mit diesen Vektoren zwar eine hohe aber nur transiente Expressionsrate erzielt werden konnte (55). Entsprechend wurden bei späteren Generationen E2, E3 und E4 ebenfalls gelöscht, um die Immunogenität des Vektors zu vermindern und auch um mehr Platz für die Geninsertion zu schaffen. Die Deletion von E2 und E4 machte dabei die Bereitstellung dieser Gene *in trans* in entsprechenden Zelllinien notwendig, während E3 gelöschte Vektoren auch in den HEK293-Zellen hergestellt werden konnten (*rev in 94*). Da die Produkte des E3 Gens die Immunantwort des Wirtes modifizieren, erhöht dessen Deletion im Gegensatz zur Löschung von E4 allerdings die Instabilität des Vektors *in vivo* (9, 81).

Da aber auch bei der zweiten Generation dieser Adenovektoren immer noch eine signifikante Produktion von Antikörpern im Wirtsorganismus festgestellt wurde, ging man im Folgenden dazu über, sämtliche Gene bis auf die ITRs und das Packsignal zu entfernen (143, 206). Diese sog. „ausgeweideten“ Adenovektoren bieten bis zu 36 kb für die Insertion eines therapeutischen Gens und zeichnen sich gegenüber ihren

Vorgängern durch eine wesentlich geringere Immunogenität aus (145, 146, 147, 204). Allerdings kann das um das Genom auf die passende Maß für die Virushülle zu bringen oftmals notwendige Auffüllen mit „Stopfsequenzen“ die Effektivität der Produktion und Expression des Vektors erheblich beeinflussen (170, 204). Zudem müssen diese Adenovektoren unter Zuhilfenahme von die fehlenden Sequenzen tragenden Helfervektoren hergestellt werden, die schlussendlich vom eigentlichen Transfektor getrennt werden müssen. Um diese Kontamination zu minimieren, sind aufwendige Reinigungsprozesse vonnöten, die eine Produktion in großem Stil zu einer kostenintensiven Angelegenheit werden lassen (143, 172, 224).

2.2.1.3. Adeno-assoziierte Viren

2.2.1.3.1. Wildtyp

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) ist ein abhängiger Parvovirus, das zuerst als ein kontaminierender Satellit zusammen mit Adenoviren entdeckt wurde. Bis jetzt konnten sechs verschiedene Serotypen identifiziert werden, die eine über 80-prozentige Übereinstimmung in ihrer Nukleotidsequenz zeigen. Obwohl Antikörper gegen die Serotypen AAV 2, 3 und 5 regelmäßig in humanen Serumproben nachweisbar sind, konnte bisher noch kein humanpathogener Effekt der AAV gezeigt werden. Die Abhängigkeit des AAV besteht darin, dass es normalerweise die Co-Infektion mit einem anderen Virus für eine produktive Infektion benötigt. Dann gelangt das Virus durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle und integriert – auch in Abwesenheit eines Helfervirus – am Locus 19q 13-qter in das humane Chromosom 19 (11). Dort verbleibt es in einem latenten proviralen Zustand, um bei erneuter Infektion mit einem Helfervirus wieder in den Replikationszyklus einzutreten.

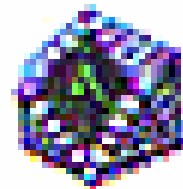


Abb.: Der AAV Wildtyp (aus 64)

AAV Partikel sind 18-16 nm groß, besitzen keine Membran und enthalten eine einsträngige 4,7 kb DNA mit den zwei offenen Leserastern *rep* und *cap*, die für insgesamt sieben an der Replikation und dem Aufbau des Capsids beteiligten Proteine kodieren. Die Transkription wird von drei Promotern (P) gesteuert, die sich an Position 5, 19 und 40 des viralen Genoms befinden.

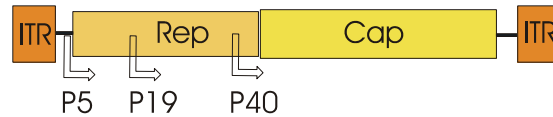


Abb.: Das AAV-Genom (s. Text)

Dabei initiiert P5 die Transkription der regulativen *rep* Proteine 68 und 78, P19 steuert die *rep* Proteine 40 und 52, die für die Akkumulation einsträngiger DNA notwendig sind. Die von *cap* kodierten strukturellen Capsid-Proteine werden schließlich von P40 abgeleitet. Ähnlich den Adenoviren wird auch das AAV-Genom von zwei 145 Basen langen *ITRs* flankiert, die palindromische Sequenzen enthalten, die während der Replikation eine wichtige strukturelle Rolle spielen. Sowohl die beiden *ITRs* als auch die *rep* Proteine 68 und 78 sind für die virale Replikation in *cis* notwendig (169, 201, 243).

2.2.1.3.2. Vektorproduktion

Adenoviren erfüllen in den meisten Fällen die Helferrfunktion für eine produktive Infektion mit dem AAV, aber auch Herpes Simplex-, Cytomegalie- und Pseudorabiesviren können diese Aufgabe übernehmen. Darüber hinaus kann auch durch die Behandlung bereits AAV enthaltender Zellen mit genotoxischen Substanzen wie ultravioletter Strahlung, Hydroxyurea oder anderen chemischen Carzinogenen eine zumindest geringgradige Produktion von AAV-Partikeln induziert werden (201). Um als Helfervirus fungieren zu können, müssen lediglich die frühen Gene des Adenovirus vorhanden sein. Dabei wird die Transkription der AAV-Gene wahrscheinlich durch E1a aktiviert, während E1b und E4 den Transport der Transkripte regulieren und E2a die DNA Replikation vorantreibt (169).

Konventionellerweise wird zur Vektorproduktion eine zuvor mit Adenoviren infizierte HECK 293 Zelllinie benutzt, die sowohl mit einem *rep/cap* Plasmid als auch mit einem

von ITRs flankierten, das Vektorgenom enthaltenden Plasmid cotransfiziert wird. Dabei entstehen einsträngige Vektorgenome, die dann mit den viralen Capsidproteinen verpackt werden, wobei die fehlenden *ITRs* das Verpacken des *rep/cap* Plasmids verhindert. Nach zwei bis drei Tagen werden die Zellen lysiert und der Vektor kann gewonnen und gereinigt werden (93, 201, 243). Die durch diese relativ zeitaufwendige „klassische“ Methode erzielten Vektortiter liegen allerdings noch weit unter den bei einer Wildtyp-Infektion entstehenden Mengen. Alternative Methoden ersetzen den Helfervirus mit einem die entsprechenden Gene tragenden Plasmid (243), trennen die *rep* und *cap* Expressionskassetten (4) oder fügen introns in das *rep/cap* Plasmid ein, um die immer noch signifikante Kontamination mit replikationsfähigen Viren zu minimieren (26). Höhere Virustiter können auch mit induzierbaren Helferzelllinien erreicht werden und dreifache Transfektionsprotokolle schaffen die Vektorherstellung bei gleichzeitigem Verzicht auf ein Helfervirus (50, 106). Trotz alledem ist es noch nicht gelungen, ein zeitsparendes und ausreichend produktives System zur AAV-Vektorproduktion zu formulieren, was zu einem großen Teil auch an den aufwendigen Reinigungsmethoden zur Elimination von Helferviren und Zellbestandteilen liegt (161, 201).

2.2.1.4. Herpesviren

2.2.1.4.1. Wildtyp

Das hervorstechendste Merkmal der Herpesviren im Vergleich zu vorgenannten Virentypen ist wohl deren Eigenschaft, in ihren jeweiligen Wirtszellen für eine unbestimmte Zeit in einem episomalen Latenzzustand verbleiben zu können. Varicella und Herpes Simplex Virus (HSV) etablieren diesen latenten Status in Neuronen, Cytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV) und das Humane Herpesvirus 6 infizieren Lymphozyten. HSV 1 verursacht mukokutane Läsionen an Gesicht, Mund und Augen, in schweren Fällen auch eine Meningitis oder Enzephalitis, HSV 2 ist mit genitalen Läsionen assoziiert. CMV stellt heutzutage die Hauptursache für mentale Retardierung und andere congenitale Defekte dar, EBV verursacht die infektiöse

Mononukleose und wird auch mit malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht (189, 238).

Herpesviren enthalten eine lineare Doppelstrang-DNA von 125-229 kb, besitzen eine Hülle und messen 100-110 nm im Durchmesser. HSV ist das in der Gentherapie am häufigsten verwendete Mitglied der Herpesfamilie. Die HSV-Infektion wird über Heparin-Sulfat-Anteile an der Zelloberfläche mukoeithelialer Zellen vermittelt und nach initialen Replikationszyklen wird das Virus von den axonalen

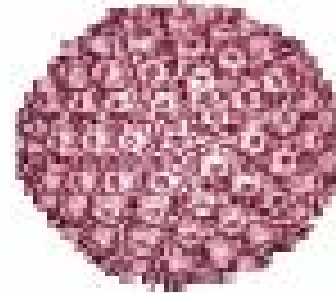


Abb.: Der Herpesvirus-Wildtyp (aus 64)

Enden der den jeweiligen Infektionslokalus innervierenden Neuronen aufgenommen. Nach Transport in den Nukleus führt es dort innerhalb weniger Stunden zur Lyse der Zellen oder etabliert eine latente Infektion durch Aufrechterhaltung eines episomalen Status (189, 238).

Das 152 kb HSV-Genom besteht aus einer langen (U_L) und einer kurzen „unique region“ (U_S) und wird an beiden Enden von ITRs flankiert. Es sind über 80 Genprodukte des HSV bekannt, die ähnlich den Adenoviren sequentiell von „immediate early“ (IE), „early“ (E), und „late“ (L) Genen transkribiert werden. Der Transkriptionsfaktor VP 16 initiiert die Transkription der für die virale Replikation essentiellen IE Produkte „infected cell polypeptide protein“ (ICP) 4 und ICP 27, die die Expression der E und L Gene regulieren. Ein weiteres Produkt, ICP 47, sorgt für eine verminderte Präsentation von MHC I Komplexen an der Zelloberfläche und moduliert so die Immunantwort des Wirtes. Bis zu 50 kb der HSV Gene sind für die Replikation des Virus *in vitro* nicht notwendig, unterhalten aber den Lebenszyklus des Virus *in vivo* (71, 238). Während der Latenzphase befindet sich das Virusgenom zum größten Teil in einem Ruhezustand, allerdings können sog. „Latenz-assoziierte Transkripte“ (LAT) nachgewiesen werden. Obwohl keine direkte Abhängigkeit des Latenzstadiums von diesen LATs nachgewiesen werden konnte, scheinen sie dennoch eine Rolle bei der Reaktivierung des Virus zu spielen (71, 193). Die von einer immunologischen Reaktion unbehelligte Persistenz des HSV-Genoms und die Möglichkeit bis zu 50 kb große

DNA-Sequenzen zu inserieren machen HSV trotz seiner Komplexität zumindest als Vektor innerhalb des Spektrums seiner natürlichen Wirtszellen interessant.

2.2.1.4.2. Vektorproduktion

Auch für die Produktion von HSV-Vektoren kommen Packzelllinien, die virale Gene in *trans* exprimieren, zu Anwendung. Durch die Bereitstellung der viralen Gene in *trans* versucht man neben der Verhinderung der Entstehung replikationsfähiger Partikel auch die durch IE Gene vermittelte Inhibition der Proteinproduktion der Wirtszellen und direkte zytotoxische Effekte zu minimieren (121, 202, 203, 242). Allerdings macht deren inhärente Toxizität es sehr schwierig, eine stabile Expression der IE Gene in *trans* in Packzelllinien zu erreichen. Entsprechend zeigte sich bisher auch eine im Verlauf konstante Abnahme der Vektorproduktion in verschiedenen Helferzelllinien, die eines oder mehrere der IE Gene in *trans* exprimierten (100, 202, 203). Auch die alternative Mutation des VP 16 anstelle der Deletion der ICP kodierenden Gene konnte die Vektor-Toxizität nicht wesentlich vermindern, da VP 16 wegen seiner strukturellen Eigenschaften nicht komplett gelöscht werden kann (148).

2.2.1.5. Andere Viren

2.2.1.5.1. Vaccinia Virus

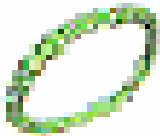
Das neuerdings auch wieder außerhalb der Gentherapie in die Diskussion gekommene Vaccinia Virus stammt aus früheren Immunisierungsprogrammen gegen die Pocken. Neben der Pockenimpfung wurde es auch zur Immunisierung gegen Enzephalitis, Tollwut und eine Reihe anderer Erkrankungen eingesetzt. Das Virus besitzt eine doppelsträngige 191 kb DNA mit 198 offenen Leserastern, wovon 50 kb als nicht essentiell für die virale Replikation gelten und somit reichlich Insertionsfläche für ein Transgen bieten. Vaccinia wird zurzeit vor allem in Krebstherapiestudien verwendet. Der regelmäßig zu beobachtende zytopathische Effekt des Virus bzw. eine bereits bestehende Immunität des Wirtsorganismus stellen die in Zukunft zu überwindenden Hürden dieses Vektors (83, 103, 175).

2.2.1.5.2. Baculovirus

Das Baculovirus besitzt eine doppelsträngige DNA von 80-230 kb und repliziert im Gegensatz zu o.g. humanpathogenen Viren als Wildtyp sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Insektenzellen. Das Virus kann große Mengen exogenen Materials aufnehmen und vermeidet als Xenovektor die Konfrontation mit präformierten Antikörpern des menschlichen Organismus. Seine Gene werden in Säugetierzellen nicht exprimiert, was im Prinzip eine exklusive Transkription des jeweiligen Transgens ohne virale Nebenprodukte möglich machen würde. Humane Zellen, vor allem Hepatozyten, wurden schon erfolgreich transduziert und eine selektive, wenn auch transiente Expression eines Säugetier-Promoters und seines Transgens beobachtet (69, 135, 181).

2.2.2. Nicht-virale Vektoren

In dieser heterogenen Gruppe werden alle Methoden des Gentransfers zusammengefasst, die keine viralen Partikel mit einbeziehen. DNA die in Bakterien oder eukaryoten Zellen propagiert werden kann, kann zu Nukleinsäuren gereinigt und zur Expression therapeutischer Proteine oder als „antisense RNA“ verwendet werden. Folgende Formen nicht-viraler Vektoren kommen zur Anwendung:

Plasmid 	Zirkuläre, doppelsträngige DNA mit bakteriellem „origin of replication“ (ORI) Bis zu 15 kb Gen-Insert Verbreitetester nicht-viraler Vektor
Bakteriophage	Doppelsträngige, lineare DNA Bis zu 20 kb Gen-Insert

Cosmid	<p>Modifiziertes Plasmid mit einer Signalsequenz zur Verpackung in Bakteriophagen</p> <p>Bis zu 45 kb Gen-Insert</p>
Künstliches bakterielles Chromosom	<p>Enthält chromosomale Elemente für Replikation und Segregation</p> <p>Bis zu 100 kb Gen-Insert</p>
Künstliches Hefe-Chromosome	<p>Enthält Telomere, ORIs und Segregations-Sequenzen für Hefezellen</p> <p>Keine Replikation in Säugetierzellen</p> <p>Bis zu 1000 kb Gen-Insert</p>
Künstliches menschliches bzw. Säugetier-Chromosom	<p>Das künstliche menschliche Chromosom ist bis jetzt ein sehr ineffizientes Werkzeug des Gentransfers</p> <p>Künstliche Mäusechromosomen werden zur Erzeugung transgener Nachkommenschaft durch nukleäre Mikroinjektion verwendet</p>
Oligo(deoxy)nukleotide	<p>DNA-Stücke von 15-25 Nukleotiden</p> <p>Modulation der zellulären DNA-Expression durch eine Vielzahl von Mechanismen</p>
Ribozyme	<p>„Antisense“ RNA-Moleküle mit katalytischer Aktivität</p> <p>Werden zur gezielten Inaktivierung von RNA benutzt</p>

2.2.2.1. DNA Moleküle

Der größte Vorteil dieser nicht-viralen Vektoren liegt in dem völligen Wegfall des Risikos der Entstehung replikationsfähiger infektiöser Partikel durch Rekombinationsereignisse. Plasmide dominieren bis zum jetzigen Zeitpunkt die Sparte der amplifizierbaren DNA/RNA-Moleküle, vorrangig durch die Einfachheit ihrer Herstellung in Bakterienzellen und ihrer geringen Größe, die die Insertion in die Zielzellen erleichtert.

Ihr geladener Zustand macht allerdings sowohl den *ex vivo* als auch den *in vivo* Transfer von DNA Molekülen zu einer schwierigen Angelegenheit. Unter Zuhilfenahme von Methoden der Elektroporation, hydrodynamischen Verfahren, Polymerumhüllungen, kationischen Lipiden oder Liposomen (58, 105, 142, 197) können in den besten Fällen Transfektionsraten von 5-10 % erzielt werden. In der Regel lässt sich der Transport in die Zielzellen umso weniger effizient durchführen je größer der transgene DNA-Abschnitt ist. Auch die deutliche Instabilität blanker DNA in den Zielzellen beschränkt die Dauer der Expression des jeweiligen Transgens (169). Nichtsdestotrotz wurden Plasmide in mehreren Studien zur Therapie monogener Erkrankungen (s.dort) und letztlich auch in einer klinischen Studie der Phase I/II bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit eingesetzt. Bei letzterer konnten nach mehrfacher intrakardialer Katheterapplikation von für VEGF 2 (vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor) kodierenden Plasmiden nach drei Monaten eine deutliche Besserung der Beschwerden bei neun von zwölf Patienten festgestellt werden (136).

2.2.2.2. Oligodeoxynukleotide

Natürliche Oligodeoxynukleotide (ODN) bestehen aus Phosphodiester-Oligomeren und besitzen eine Halbwertszeit von 15-60 Minuten in Serum.

Die zelluläre Genexpression kann durch ODN auf drei verschiedene Arten moduliert werden. Das Ankoppeln von ODN an die DNA-Doppelhelix führt zur Bildung einer kolinearen Verbindung von drei Deoxynukleotidsträngen, die das Andocken von Transkriptionsfaktoren blockiert. Durch die schwache Bindungsaffinität von ODN in Zellen ist dieser Block jedoch nur von kurzer Dauer. Die Bindung von ODN an mRNA

kann darüber hinaus in Abhängigkeit deren Splicing bzw. Translation verhindern oder zu einem vollständigen Abbau durch RNAse H führen. Zuletzt kann die Bindung an Transkriptionsfaktoren deren Interaktion mit endogenem Material verhindern.

Modifikationen des Phosphodiester-Rückgrates durch die Substitution von Schwefel- oder Methylgruppen können Nuklease-resistente Moleküle mit deutlich verlängerter Lebenszeit hervorbringen (169). Um ODN in die Zelle zu schleusen kommen, den bei Plasmiden verwendeten Methoden entsprechend, feldelektrische und *in-vivo*-liposomale Verfahren zur Anwendung (152, 178). In präklinischen Studien wurden ODN zur „antisense“-Blockade der Gene von Angiotensinogen, Angiotensin I und weiterer in die Blutdruckregulation involvierter Gene verwendet. Dabei wurde im Tiermodell eine Senkung des Blutdrucks für bis zu 12 Wochen erzielt und die Weiterentwicklung zu klinischen Studien ist im Gange (178, 179). Auch in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Restenosierung dilatierter Koronargefäße oder der Okklusion von koronaren Bypassvenen scheinen ODN verheißungsvolle Perspektiven zu besitzen. Sowohl einsträngige „antisense“-Formen als auch durch doppelsträngige „Täuscher“-ODN, die eine Abschwächung der cis-trans Interaktion des Originalgens verursachen, haben sich in präklinischen Studien als effektive Behandlungsinstrumente erwiesen (122, 144). Klinische Studien werden zeigen inwieweit sich diese Ergebnisse im menschlichen Körper reproduzieren lassen.

2.2.2.3. Ribozyme

Ribozyme sind RNA Moleküle mit katalytischer Aktivität, die durch spezifische Hybridisierung gezielt an Nukleotidsequenzen binden und diese durch Zerschneiden des Phosphodiester-Rückgrates inaktivieren. Die zwei bisher am besten erforschten Ribozyme wurden nach ihrer theoretischen Sekundärstruktur „Hammerkopf“ und „Haarnadel“ benannt. „Hammerkopf“ zerschneidet RNA an einer U-A-, U-C- oder U-U-Sequenz durch Hydrolyse einer 3'-5' Phosphodiester-Bindung, „Haarnadel“ schneidet eine C-U-G-Sequenz. Dieser Schneideprozess kann von einem einzelnen Ribozym wiederholt durchgeführt werden (183).

Ribozyme werden von sehr kleinen Transkriptionseinheiten erzeugt, so dass mehrere Ribozyme mit verschiedenen hoch spezifischen Angriffspunkten in ein und denselben

Vektor integriert werden können. In Studien zur Gentherapie der HIV Infektion und von Krebserkrankungen kommen solche „multi-target ribozymes“ bereits zur Anwendung und sind teilweise schon zu klinischen Versuchen der Phase I vorangeschritten (43, 196, 248). Aufgrund ihrer hohen Spezifität könnte die Entwicklung neuer therapeutischer Ribozyme allerdings in der Zukunft geradezu zu einem Wettlauf gegen das Pathogen verkommen, da die bekannt hohen Mutationsraten des HIV und vieler Onkogene sequenzspezifische Therapieformen von heute auf morgen vollkommen wirkungslos machen können. Auch zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen wurden Ribozyme im Modell schon erfolgreich eingesetzt und befinden sich ähnlich den ODN auf dem Weg zur klinischen Erprobung (144).

3. Gentherapie monogener Erbkrankheiten

3.1. Schwere kombinierte Immunschwäche (SCID)

3.1.1. Klinisches Bild

Der Begriff schwere kombinierte Immunschwäche (SCID) fasst eine Vielzahl phänotypisch ähnlicher Krankheitsbilder zusammen, die durch einen frühen Block in der Entwicklung lymphozytärer Zellen charakterisiert sind. Die SCID hat eine Inzidenz von etwa einer in 80.000 Geburten und stellt die schwerste aller angeborenen Immunschwächen dar. Betroffene Kinder zeigen eine schwerwiegend beeinträchtigte zelluläre und humorale Immunantwort und versterben ohne intensivste medizinische Betreuung innerhalb des ersten Lebensjahres an rekurrierenden opportunistischen Infektionen. Die häufigste Form der SCID ist die mit einem Defekt auf dem X-Chromosom einhergehende X-SCID, die fast die Hälfte aller Erkrankungen ausmacht. Betroffene Kinder zeigen eine ausgeprägte Verminderung der T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK), während die B-Lymphozyten, allerdings in dysfunktionaler Form, in normaler oder sogar erhöhter Anzahl vorliegen (T⁻ B⁺ NK⁻ SCID) (22, 128, 164). Der Adenosin-Deaminase-Mangel (ADA-SCID) ist die häufigste der autosomal-rezessiv vererbten SCID-Formen. Der Defekt dieses Enzyms führt zur Akkumulation von deoxyATP und damit zu einer Inhibition der Zellteilung und Induktion der zellulären Apoptose. Im Gegensatz zum Differenzierungsblock der XSCID steht hier die durch die Anhäufung toxischer Metaboliten verkürzte Lebenszeit der unreifen und reifen lymphozytären Zellen im Vordergrund. Die ADA-SCID gleicht dadurch eher einer metabolischen Erkrankung mit weitreichenden Folgen für verschiedenste Organsysteme (17, 192). In 80-90% der Fälle ist die Erkrankung schwer und tritt mit skelettalen Defekten auf. Die restlichen Patienten werden im Alter von ca. 2 Jahren durch eine progressive Immunschwäche auffällig (163).

3.1.2. Genetik

Der für die XSCID verantwortliche Defekt auf dem langen Arm des X-Chromosom (Xq 12-13,1) wurde 1993 dem Gen der gemeinsamen γ -Kette der Cytokin Rezeptoren (γ_c) zugewiesen (158). Diese war zuerst als die γ -Kette des Interleukin 2 Rezeptors (IL-2R) entdeckt, später aber auch als wichtige Komponente der IL 4, 7, 9 und 15 charakterisiert worden (167). So ist die immunologische Signalkette in XSCID gleich an fünf verschiedenen Stellen unterbrochen, was den von diesen Interleukinen aktivierten „Jak-STAT“-

Transkriptionsantrieb außer Kraft setzt (Abb.). Vor allem die defekten IL-7 und IL-15 Rezeptoren scheinen dabei eine entscheidende Rolle für das Ausbleiben normaler T- und NK-Zellentwicklung zu spielen (45, 128).

Die Sequenz und Struktur des ADA-Gens wurden Mitte der 80er Jahre beschrieben (240), das Gen dem

langen Arm des Chromosoms 20 zugewiesen (20q12-q13.11) (107). Multiple Defekte des ADA Gens sind für die ADA-SCID verantwortlich. Die verschiedenen allelen Varianten der SCID-Erkrankungen können im Internet unter www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim eingesehen werden.

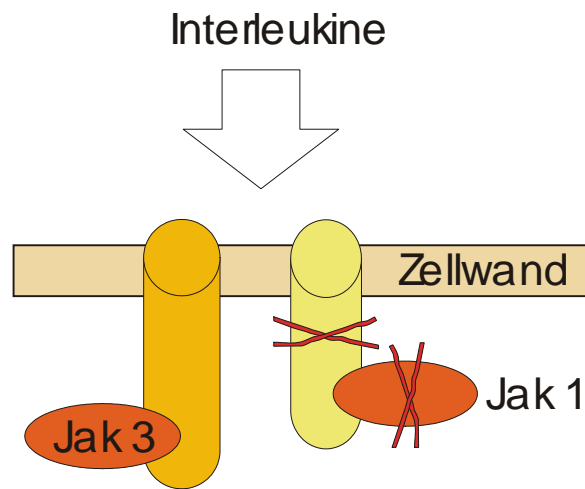


Abb.: Der durch die defekte γ_c Kette unterbrochene Jak-STAT-Pfad in XSCID

3.1.3. Klinische Diagnose

Von einer Form der SCID betroffene Kinder werden bereits in den ersten Lebensmonaten durch rekurrende Pneumonien, Diarrhöen, Mykosen und andere opportunistische Infektionen klinisch auffällig. Im Kind persistierende mütterliche Lymphozyten können eine chronische graft-versus-host Reaktion (gvhR) auslösen, eine transfusionsbedingte Lymphozytenübertragung kann eine akute und fast immer lethale gvhR verursachen. Des Weiteren fallen eine Lymphopenie und negative

Stimulationsversuche mit Mitogenen und Antigenen auf. Trotz bestehender Candidainfektionen bleiben Candida-Ag-Hauttests negativ, ebenso wie der Tuberkulintest trotz BCG-Impfung. Letztere wiederum kann zu einer disseminierten und ebenfalls tödlich Infektion (BCG-itis) führen (22, 231).

3.1.4. Konventionelle Behandlungsoptionen

Neben einer intensiven Chemotherapie bestehender Infektionen und der Substitution von Immunglobulinen (Ig) bestand die einzige kausalthérapeutische Option für betroffene Kinder bei allen Formen der SCID bisher in einer Transplantation funktionsfähigen allogenen Knochenmarks (KM) (231). Da die betroffenen Kinder aufgrund ihrer Erkrankung zu keiner Abstoßungsreaktion fähig sind erübrigt sich eine adjuvante chemotherapeutische Behandlung. Der Gefahr einer graft-versus-host (gvhR) Reaktion durch im Spendermark enthaltene T-Zellen konnte durch während der 80er Jahre entwickelte Methoden, die reife T-Lymphozyten aus dem Spendermark entfernen, begegnet werden (23). Die besten Transplantationsergebnisse wurden bei unter 3,5 Monate alten Kindern erzielt (23, 77, 150). Dieser Zeitpunkt liegt vor dem Wegfall der Protektion durch mütterliche Antikörper. Bei 89 Patienten an der Duke University (USA) betragen die Überlebensraten über einen Zeitraum von 16 Jahren über 90 % mit HLA identischem KM und immerhin noch 70-78 % bei haploidentischem - also nur in einem HLA-Haplotyp übereinstimmendem - KM-Spender. Die nach der Transplantation erreichten T-Zell-Zahlen lagen in den besten Fällen knapp über 2000/ μ l und T-Zell-vermittelte Reaktionen auf Mitogene und Antigene normalisierten sich. B-Zell-Zahlen lagen vor allem für die ADA-Form deutlich unter der Norm, während die XSCID Patienten sowieso schon erhöhte Zahlen dysfunktionaler B-Zellen aufwiesen. Eine Substitution von Immunglobulinen wurde bei 45 von 81 Patienten notwendig (23). Eine europäische Studie zeigte ähnliche Ergebnisse mit einer Wiederherstellung der T-Zellfunktion nach 13 Jahren bei 94% und der B-Zellfunktion bei 69% der überlebenden 80 von 116 Patienten (77). Die Überlebenschancen nach der KMT sind im wesentlichen von der Art der SCID, dem Auftreten von gvhR oder einer trotz T-Zelldepletion zu 5-10% auftretenden graft-versus-graft-Reaktion (gvgR) gegen noch vorhandene mütterliche Lymphozyten abhängig (23, 61, 77, 174).

Ein Mangel an geeigneten KM-Spendern und die in vielen Fällen aufgrund der Komplexität der Erkrankung nicht ausreichende ADA-Substitution durch KM-Transplantation hinterließen auch bei der ADA-SCID viele nicht oder nicht ausreichend behandelbare Patienten. Die 1987 erstmals durchgeführte wöchentliche *intramuskulär* Substitution von boviner Polyethylen-Glykol-Konjugierter ADA (PEG-ADA) stellt deswegen noch heute einen Grundpfeiler der ADA-SCID Therapie dar. PEG blockt degradierende Enzyme, Antikörper und Antigen-präsentierende Zellen und verlängert somit die Halbwertszeit substituierter ADA. Diese Therapie führt bei den meisten, allerdings nicht bei allen Patienten zu erheblich verbesserten laborchemischen Parametern und zu einer partiellen Rekonstitution der immunologischen Funktion (86).

3.1.5. Gentherapeutische Voraussetzungen und Ziele

Ziel der Gentherapie der SCID ist die Transduktion relativ einfach zu gewinnender autologer lymphoider Zellen mit einem funktionsfähigen Transgen. Die in Verbindung mit Knochenmarkstransplantationen von nur teilweise kompatiblen oder nicht verwandten Spendern auftretenden immunologischen Komplikationen wie die gvHR oder gvgR sollen vermieden und T- und B-Zellpopulationen normalisiert werden. Protokolle wurden für die Transduktion peripherer Lymphozyten und vor allem auch für hämatopoietische Stammzellen (HSC) entwickelt. Extensive Proliferationseigenschaften und eine praktisch unbegrenzte Erneuerungsfähigkeit machen HSC zu einem idealen Ziel für die Integration retroviraler Vektoren. Aber auch sich im peripheren Blut befindliche Lymphozyten (PBL) durchlaufen einen weitaus längeren Lebenszyklus als zum Beispiel myeloide oder erythrozytäre Zellen und sind Ziel gentherapeutischer Bemühungen.

Die übermäßige oder unkontrollierte Expression der beteiligten Proteine bei den hier besprochenen SCID-Formen wird im Allgemeinen als nicht gefährlich angesehen. Unerwünschte Folgen werden bei der ADA-Form von der Übersubstitution des Enzyms nicht erwartet, da ADA als sog. „housekeeping“ Protein von den meisten Zellen benutzt wird. Genauso wird auch die γ_c -Kette sehr früh in allen hämatopoetischen Reihen exprimiert und ist einer sehr strengen Regulation durch eine Vielzahl von Faktoren unterworfen (221). Eine Toxizität durch ausufernde Expression ist deshalb auch dort

unwahrscheinlich und konnte im Tierexperiment auch nicht nachgewiesen werden (216). Wie auch bei der Hämophilie existiert ein natürlich vorkommendes Hundemodell für die X-SCID, darüber hinaus wurden Mausmodelle durch die Inaktivierung des Gens der IL-2R- γ -Kette geschaffen (*rev in 128*).

Der Erfolg gentherapeutischer Bemühungen kann an mehreren Parametern gemessen werden. Klinisch weist eine Rekonstitution der T-, B- und NK-Zell-Zahlen im Blut der Patienten in Richtung normaler Werte auf ein wieder funktionales lymphopoietisches System hin. Dazu ist das im ELISA gemessene Ausmaß der T-Zell Proliferation und Antikörper (AK)-Bildung nach Gabe von Antigenen wie Phytohaemagglutinin (PHA) und Vakkzinen wie Tetanus-Toxoid (TT), Diphtherie Toxoid (DT) und Poliovirus, sowie AK gegen *Haemophilus Influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* ein starker Parameter für eine funktionierende Immunantwort. Die Funktion der NK-Zellen kann durch K562 Zielzellen überprüft werden.

Der PCR-Nachweis des Rezeptors oder ein Immunfluoreszenztest von γ_c -tragenden Zellen dient zur Überprüfung einer erfolgreichen Transduktion. Ein zeitlich progredienter Anstieg der nachweisbaren γ_c -Ketten genauso wie die Expression aller Formen der CD3 assoziierten Polypeptidketten, nämlich der T-Zell-Antigenrezeptoren TCR α , β , γ und δ , sind weitere Indizien für eine stabile Transduktion von frühen Vorläuferzellen der lymphopoietischen Reihe

3.1.6. Gentherapie

3.1.6.1. ADA-SCID

3.1.6.1.1. Retrovirale Vektoren

Die ADA cDNA umfasst 1,5 kb und lässt sich somit problemlos in einen retroviralen Vektor integrieren. In den bisher durchgeführten Studien dominierte dabei der LASN/LXSN Vektor, ein Derivat des Moloney Murine Leukaemia Virus (MoMLV), der die ADA cDNA unter der Kontrolle der viralen LTR exprimiert (95, 198). Als Markergen des Vektorgenoms fungierte in den meisten Fällen das Neomycin-Resistenzgen (Neo^r), mit einem Simian Virus (SV40) Promoter (15, 118). Ebenfalls

vom MoMLV abgeleitet sind die DCAI/m und GIADAI Vektoren. Markergen und Promoter sind dem LASN/LXSN identisch. Bei diesen Vektortypen wurden alternative Restriktionsstellen (*m/l*) in den nichtfunktionalen Abschnitt der LTR inseriert. Nach der Transduktion von Knochenmarksvorläuferzellen mit DCAI/m und peripheren Lymphozyten mit DCAI oder GIADAI wird so eine spätere Bestimmung der Herkunft korrigierter Zellen möglich (2, 18).



Abb.: LASN/LXSN-Vektor; die ADA cDNA steht unter der Kontrolle des retroviralen LTR-Promoters (schwarze Kästchen) (nach 15, 118)

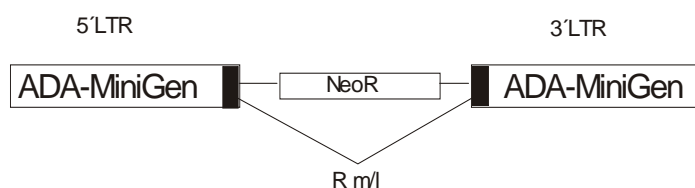


Abb.3b: DCAI/m-Vektor; ADA-MiniGen: cDNA & Promoter; R m/l: alternative Restriktionsstellen zur Kennzeichnung der Zellherkunft (nach 2, 18)

3.1.6.1.2. Transplantation transgener peripherer Blut-Lymphozyten

Die frühe Identifikation des Gens der ADA-SCID in den 80er Jahren ebnete 1995 den Weg für die Veröffentlichung der ersten somatischen Gentherapiestudie einer monogenen Erbkrankheit. Blaese et al. hatten eine zwei- und eine vierjährige Patientin mit einer milden Form der Erkrankung, deren eigentlicher genetischer Defekt unklar war, zwei Jahre lang mit *ex vivo* transduzierten PBL behandelt. Maximale Transduktionsraten von 1 bzw. 10% der PBL wurden erreicht. Die schon zuvor über mehrere Jahre erfolgte PEG-ADA Behandlung wurde während der Gentherapie weitergeführt, wenn auch mit vergleichsweise niedrigen Dosierungen. Verbesserungen der T-Zell Zahlen, zellulären und humoralen Immunantworten stellten sich in Abhängigkeit der verabreichten transgenen PBL ein. Nach einem durch die Infusionen

erreichten Peak zeigte sich auch ein entsprechend rascher Abfall der T-Zellzahlen in der älteren Patientin, die die geringere Menge transgener PBL erhalten hatte. Bei der jüngeren Patientin konnten auch zwei Jahre nach Beendigung der PBL-Infusionen noch korrigierte Zellen nachgewiesen werden, was für eine Transduktion von Vorläuferzellen und gegen ein *silencing* des LTR-Promotes spricht. Beide Kinder waren während der gesamten Studiendauer wohl auf und besuchten öffentliche Schulen (15). Onodera et al. verwendeten dasselbe Studiendesign bei einem vierjährigen japanischen Patienten mit Transduktionsraten von 3-7% der PBL. Bei gleichzeitiger intravenöser Ig-Gabe und PEG-ADA-Substitution konnte nach etwas mehr als einem Jahr eine Stabilisierung der T-Zellen bei 2000/ μ l und eine ADA-Erhöhung auf das Niveau heterozygoter Individuen vermerkt werden. Auch klinisch zeigte der Patient eine deutliche Stabilisierung (165). Bei diesem wie auch der jüngeren Patientin der Blaese-Studie lagen Splice-site-Mutationen vor, die eine „delayed-onset“ Form der ADA-SCID verursachen. Die ältere Patientin hingegen wies eine missense-Mutation auf, die eine mildere „late-onset“ Form der Erkrankung hervorruft. Zusammen mit den signifikant höheren Infusionsdosen korrigierter PBL ist dies eine mögliche Erklärung für die wesentlich besseren Ergebnisse in diesen beiden Fällen.

Bordignon et al. verwendeten in ihrem gleichzeitig veröffentlichten Report die DCAI und DCAM-Vektoren zur Transduktion von PBL und Knochenmarksvorläuferzellen. Die in diese Studie eingeschlossenen zwei Kinder waren zu Beginn der Gentherapie vier und fünf Jahre alt. Durch PEG-ADA-Substitution seit ihrem zweiten Lebensjahr konnten sie T-Zellzahlen und eine ADA-Aktivität innerhalb der Normgrenzen vorweisen. Allerdings war nur bei einem der beiden auch eine signifikante klinische Verbesserung aufgetreten und als sich anhand sinkender T-Zellzahlen bei beiden das Versagen der Substitution ankündigte wurde das gentherapeutische Schema begonnen. Die PEG-ADA-Substitution wurde weitergeführt, die Gabe von Antibiotika und Ig aber bei den ersten Zeichen einer Immunrestitution eingestellt. Beide Kinder erhielten transduzierte PBL und KM-Zellen in einer Größenordnung von $0,2-7 \times 10^8$ Zellen in mehreren Injektionen über einen Zeitraum zwei Jahren. Obwohl einer der Patienten etwas weniger Zellen erhalten hatte zeigten beide eine Erhöhung der T-Zellzahlen auf bis zu 1600/ μ l und eine wesentliche Verbesserung der Immunantwort nach entsprechender *in vitro* Stimulation. Durch die Transduktion mit zwei verschiedenen

Vektoren war es möglich, die Herkunft korrigierter Zellen zu bestimmen. Ein Jahr nach der letzten Infusion wurde so eine Verschiebung zu von KM-Zellen stammenden PBL festgestellt, was sich bei einer angenommenen Lebenszeit von 6-12 Monaten reifer PBL mit einer eigenständigen Produktion korrigierter Zellen deckt. Klinisch waren beide Kinder drei Jahre nach Beginn der Therapie wohlauf, Gewicht und Größe hatten sich normalisiert und es waren keine weiteren schweren Infektionen aufgetreten (18). Vier weitere Kinder wurden darauf folgend mit dem vom LXS_N abgeleiteten GIADA_I-Vektor analog behandelt. In einem dieser Patienten lag der Anteil korrigierter PBL zwei Jahre nach Genterapie bei lediglich 1-3%, der Patient blieb lymphopenisch und in seinen Immunantworten schwer supprimiert. In diesem Patienten wurde die PEG-ADA-Therapie bei gleichzeitigen Booster-Infusionen transduzierter PBL schrittweise ausgeschlichen. Der Anteil der korrigierten PBL stieg in der Folge auf nahezu 100% und auch ADA-Aktivität, *in vitro* Immunantworten und die absoluten CD3⁺ Zahlen verbesserten sich, lagen allerdings immer noch unter Normalniveau. Trotz alledem erhöhte sich schließlich die Konzentration des dAXP wieder, so dass also trotz wieder aufkommender Immunfunktionen die ADA-Produktion der T-Zellen für eine systemische Detoxifikation nicht ausreichend war (2).

Kohn et al. hatten 1993 aus dem Nabelschnurblut gewonnene CD34⁺ Zellen mit einem LAS_N-Vektor transduziert und sie drei Neugeborenen ohne medikamentöse Myeloablation retransplantiert. Nach eineinhalb Jahren lagen korrigierte Zellen nur in sehr niedriger Konzentration vor, doch hatten T-Zellen mit bis zu 10% einen wesentlich größeren Anteil an transgenen Zellen als B-Zellen mit maximal 0,1%. Da außer Antibiotika und Ig auch eine gleichzeitige PEG-ADA-Substitution verabreicht worden war, wurde die substituierte Menge in der Folge zuerst reduziert, dann in einem der Patienten 1997 vollständig abgesetzt, um eine Relation zwischen genterapeutischen Resultaten und klinischem Bild erstellen zu können. Von den drei Patienten, die seit der Geburt eine normale Entwicklung ohne schwere Infektionen durchgemacht hatten, zeigten zwei nach der Halbierung der Enzymdosis einen massiven Abfall der T-Zellen. Der Patient, dessen T-Zellzahlen stabil geblieben waren, entwickelte gleichwohl nach vollständigem Absetzen der Substitution eine signifikante Verschlechterung seines Gesundheitszustandes, so dass das ADA Schema auch hier wieder angesetzt wurde. Während des nur kurz andauernden Wegfalls der Substitution hatte sich allerdings trotz

einer allgemeinen PBL-Verminderung der Anteil der korrigierten T-Zellen von 10% auf 30% erhöht, wieder ein Hinweis auf einen offensichtlichen Selektionsvorteil der transduzierten Zellen. Auch nach sieben Jahren waren noch korrigierte PBL nachweisbar, was eine Transduktion von Vorläuferzellen wahrscheinlich macht (118).

3.1.6.1.3. Transplantation transgener Hämatopoietischer Stammzellen

Hoggerbrugge et al. erreichten bei CD34+ KM-Zellen von drei ADA-SCID Patienten mit einem Retrovirus eine Transduktion von 5-12% der Zellen *in vitro*. Zwei Patienten erhielten während der gesamten Dauer der Studie PEG-ADA, der dritte wurde vier Monaten nach Studienbeginn substituiert. Wohl aufgrund der niedrigen Transduktionsrate und dem fehlenden Wachstumsvorteil bei gleichzeitiger PEG-ADA-Substitution konnte das Gen nach der Reinfusion der Zellen nur kurzfristig in Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden (96).

Aiuti et al. berichteten im Juni 2002 von der ersten erfolgreichen HSC-Therapie für zwei sieben und zweieinhalb Monate alte Patienten, von denen der eine schon eine nicht erfolgreiche KM-Transplantation hinter sich hatte. Diese Forschungsgruppe verwendete das dem DACI-Vektor ähnliche Konstrukt GIADA1. Das Transduktionsprotokoll deckt sich in vielen Punkten mit dem bei der HSC-Therapie der X-SCID beschriebenen (siehe dort). Beide Kinder erhielten im Gegensatz dazu aber vor der KM-Transplantation Busulfan in Dosierungen, die zwar eine transiente Myelosuppression, aber keine vollständige KM-Ablation bewirkten. Nach der Infusion von $8,6 \times 10^6$ bzw. $0,9 \times 10^6$ der zu 21-25% transduzierten HSC, wurden beim jüngeren der beiden nach fünf Monaten PBL von über 2000/ μ l bestimmt, die bis 14 Monate stabil blieben. Die Zellzahlen des älteren stiegen innerhalb der beobachteten 12 Monate auf maximal 400/ μ l. Beide Patienten wiesen laborparametrische Zeichen einer wiederhergestellten Thymusfunktion auf. Hinsichtlich der Zellzahlen in der Blutprobe, der Plasma-ADA-Aktivität und im Ausmaß der hervorrufbaren Immunantworten erreichte nur der jüngere Normgrenzen, der ältere blieb hingegen konstant um ca. die Hälfte unter diesen Werten. Obwohl beide Patienten nach acht Monaten beinahe 100% korrigierte T-Zellen im peripheren Blut zeigten, blieben vor allem die korrigierten B-Zellen und KM-Vorläuferzellen bei letzterem konstant unter 10%, während ersterer an die 100%

korrigierter peripherer B-Zellen, und bis zu 20% korrigierter Vorläufer aufwies. Der höhere Anteil an peripheren B-Zellen spricht wiederum für einen Wachstumsvorteil korrigierter B-Lymphozyten. Sowohl die deutliche niedrigere Anzahl autologer HSC ($\sim 1 \times 10^6$), als auch das höhere Alter des zweiten Patienten könnten die deutlich schlechteren Resultate der Therapie erklären. Auch erhielt dieser Patient perorales Busulfan im Gegensatz zur intravenösen Gabe beim jüngeren Patienten (2). Der nun wohl wichtigste Parameter hinsichtlich der Effizienz der Behandlung, bleibt das klinische Bild der beiden Kinder. Im Verlauf der Therapie kam es bei beiden Kinder zur Ausheilung pneumonischer, gastrointestinaler und anderer opportunistischer Infektionen innerhalb von 12 Monaten. Beide Patienten zeigten keine Wachstums- oder psychomotorische Retardierung und sind nach Angaben der Autoren zu Hause, unter normalen Umweltbedingungen und ohne PEG-ADA-Substitution.

3.1.6.2. X-SCID

3.1.6.2.1. Transplantation transgener Hämatopoietischer Stammzellen

Im XSCID-Mausmodell konnte die Transplantation retroviral transduzierter HSC eine Wiederherstellung der lymphopoietischen Funktionen etablieren (133, 216). Sowohl T-, B- und NK-Zellentwicklung als auch Ig-Spiegel wurden durch diesen *ex vivo* Ansatz signifikant erhöht. Eine IL-2-induzierte Proliferation der offensichtlich nun γ_c -Ketten enthaltenden Zellen und antigenspezifische T-Zell-abhängige Immunantworten wurden beobachtet, was eine Rekonstitution der B- und T-Zellkooperation widerspiegelt. In einer dieser Studien wurden periphere B- und T-Zellen noch ein Jahr nach der Transplantation der transduzierten HSC nachgewiesen (216).

Die Durchführbarkeit der Transduktion der γ_c -Kette in *Eppstein Barr Virus*-transformierte B-Zellen von XSCID-Patienten wurde 1996 relativ zeitgleich von drei Gruppen demonstriert. Membranexpression und Funktion des Rezeptors im physiologischen Bereich im Sinne einer Phosphorylation der Jak Proteine wurden nachgewiesen (25, 74, 222), wobei sowohl B-Zellen mit einer nicht vorhandenen als auch solche mit einer dysfunktionalen γ_c -Kette einen Wachstumsvorteil *in vitro* aufwiesen (74).

Seit dem erfolgten Nachweis der Transduktion *in vitro* hatte die Forschungsgruppe um M. Cavazzano-Calvo am Hôpital Necker in Paris an Verbesserungen der Expansions- und Transduktionsprozeduren für HSC gearbeitet. Mit der dann verwendeten Methode, die mit einer Kombination von Wachstumsfaktoren arbeitet, HSC-bindende Fragmente verwendet und mit einem dem LASN ähnlichen abgewandelten MoMLV Vektor transfiziert, konnte das Transgen in 30-40% der Zellen eingeschleust werden (28, 75).

Im April 2000 veröffentlichte diese Gruppe den ersten Report über eine erfolgreiche gentherapeutische Behandlung der XSCID bei zwei 8 und 11 Monate alten Patienten, für die keine HLA-identischen KM-Spender gefunden werden konnten (27). Zwei Jahre später wurden die Ergebnisse dieser beiden Kinder zusammen mit dreier weiterer in die Studie eingeschlossenen XSCID-Patienten veröffentlicht (75).

Allen fünf waren autologe HSC entnommen, *in vitro* transduziert und ohne vorherige myeloablative Therapie infundiert worden. Vier der fünf Kinder zeigten nach der Reinfusion eine signifikante klinische Verbesserung und konnten nach 45-90 Tagen aus ihrer sterilen Umgebung entlassen werden. Assoziierte Infektionen verschwanden innerhalb der ersten vier Monate, genauso konnten die parenterale Ernährung und die Gabe von Ig abgesetzt werden. Alle vier Kinder zeigten eine normale körperliche und psychomotorische Entwicklung und leben zurzeit unter normalen Umweltbedingungen zu Hause. In einem der fünf Patienten schlug die Rekonstitution der T-Zellpopulation allerdings fehl und machte eine notfallmäßige KM-Transplantation von einem nicht-verwandten Spender notwendig.

In den vier erfolgreich behandelten Patienten konnten per PCR innerhalb von 13-21 Monaten eine 100%ige Transduktionsrate mit dem γ_c -Transgen in peripheren T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Von den B-Zellen, Monozyten und Granulozyten trugen 0,05-2% das Transgen, entsprechend wurden in zwei Patienten auch 1-5% der Knochenmarksvorläuferzellen („colony forming units“ CFU) im Knochenmark mit dem Transgen identifiziert. T-Zellzahlen waren innerhalb von 3-4 Monaten auf normale Werte von 2000-8000/ μ l angewachsen, ebenso konnten in allen vier Kindern spätestens nach einem Jahr eine intrathymische Verarbeitung der Zellen und sonographisch ein normal entwickelter Thymus nachgewiesen werden. Die verschiedenen T-Zell-Untergruppen wurden in physiologischer Verteilung registriert und auch die Proliferationsantwort auf verschiedene Mitogene und Antigene war im normalen

Bereich. NK-Zellen wurden in drei Kindern relativ schnell, in einem erst nach mehreren Monaten entdeckt. In allen Fällen zeigte sich ein einige Monate dauernder Peak der NK-Zellzahlen, die innerhalb von 15 Monaten bei allen fünf Kindern wieder auf Werte unter $50/\mu\text{l}$ abgefallen waren. Die Rate transgener B-Zellen bewegte sich lediglich im Bereich von weniger als 1%. Dennoch konnten bei drei der vier Kinder IgG, IgM und IgA Konzentrationen innerhalb des normalen Niveaus nachgewiesen werden. Nummer vier zeigte nur sehr niedrige AK-Titer, bildete aber nach entsprechender Immunisation AK gegen TT, DT und Poliovirus. Interessanterweise blieb diese Immunantwort bei einem der drei anderen völlig aus.

3.2. Hämophilie

3.2.1. Klinisches Bild

Hämophilie A und B beschreiben phänotypische Krankheitsbilder als Folge einer Mutation der Gene der Gerinnungsfaktoren VIII (FVIII) und IX (FIX), die beide auf dem X-Chromosom lokalisiert sind. Obwohl die Bluterkrankheit schon seit biblischen Zeiten bekannt ist, konnte die Lebenserwartung der Träger dieses Gendefekts erst innerhalb des letzten Jahrhunderts von elf auf über sechzig Jahre gesteigert werden. Die Prävalenz der Hämophilie wird auf etwa 1:10.000 für die A und 1:35.000 für die B Form geschätzt, so dass man erwarten kann, dass einer von 5000 männlichen Neugeborenen mit diesem Defekt zur Welt kommt. Die Schwere des Krankheitsbildes ist eng mit dem Plasmaspiegel an FVIII oder FIX verknüpft. Spiegel von weniger als einem Prozent des Gesunden zeigen eine deutliche Assoziation mit spontanen und teilweise exzessiven Blutungen in Gelenke und Muskeln und nach vergleichsweise geringen Traumen. Patienten, deren Faktorspiegel chronisch unterhalb dieser Grenze liegt, leiden schon in jungen Jahren an chronischen Gelenk- und Muskelschäden und stehen in ständiger Gefahr einer akuten, lethalen Hämorrhagie. In einer neueren amerikanischen Studie wird der Anteil dieser höchst gefährdeten Gruppe an allen amerikanischen Blutern bei 43% genannt. Weitere 26% fallen in die Patientengruppe der moderaten Ausprägung mit einem Faktorspiegel um 1-5% des Normalen und zeigen ein wesentlich milderes Bild der Bluterkrankheit mit deutlich selteneren spontanen Blutungen. Die restlichen 31% werden mit Plasmaspiegeln von 5-25% der normalen Faktorkonzentration in der Gruppe der milden Bluter subsumiert.

3.2.2. Genetik

3.2.2.1 Gene der Gerinnungsfaktoren

Das FVIII Gen liegt am Ende des langen Armes des X-Chromosoms (Xq28), erstreckt sich über 186 kb und beinhaltet 26 Exons. Das Genprodukt ist eine mRNA, die für ein Protein von 300 KD codiert (110). Das FIX Gen liegt dem FVIII Gen benachbart, nur

einige centimorgans entfernt, ebenfalls auf dem langen Arm des X-Chromosoms. Es spannt sich über 34 kb, enthält 8 Exons und codiert für ein 461 Aminosäuren zählendes Vorläufer-Protein.

FVIII ist ein intrinsisch unstabiles Protein, das eine starke elektrostatische Interaktion mit von-Willebrand-Faktor benötigt, um seine Stabilität im Plasma zu erhalten. Faktor VIII- Spiegel im Plasma liegen im Gesunden bei ca. 100 ng/ml. FIX ist ein Mitglied der Serin- Proteasen Familie und schneidet zusammen mit seinem Coenzym FVIII sein Zymogen FX, um ein wichtiges Element der Gerinnungskaskade, nämlich FXa zu erzeugen. Faktor IX erreicht Konzentrationen, die etwa 100-fach höher als die von FVIII bei ca. 10µg/ml liegen. Während FIX wie auch andere γ -Carboxylase abhängige Faktoren hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird, ist der primäre Syntheseort für FVIII noch immer unbekannt, obwohl die Möglichkeit einer kurativen Lebertransplantation in Blutern zumindest einen beträchtlichen Anteil der Produktion in diesem Organ vermuten lassen (8, 84, 116).

3.2.2.2 Mutationen

Die häufigste Mutation des FVIII Gens ist eine bei 45% aller Hämophilie-Patienten auftretende Inversion, die das Gen an Intron 22 unterbricht und vermutlich zu einem unstabilem Protein führt, das nur in unwesentlichen Mengen akkumuliert (8). Diese Inversion tritt fast immer während der männlichen Meiose auf, was von praktischem Nutzen sein kann, da sich bei einer offenbar neuen Mutation die Spur zur Mutter als Trägerin des Gens zurückverfolgen lässt. Weitere 50% zeigen spezifische Punktmutationen in Exons oder Splice-Junctions innerhalb des FVIII Gens im Sinne von Neumutationen, die restlichen Patienten innerhalb dieser Gruppe weisen Deletionen unterschiedlicher Größe auf. Eine Datenbank aller FVIII Mutationen ist im Internet einsehbar: <http://www.europium.csc.mrc.ac.uk/usr/WWW/WebPages/main.dir/main.htm>

Ungefähr ein Drittel aller Veränderungen innerhalb des FIX Gens ereignen sich an CpG Dinukleotiden (116). Ein weiteres Drittel stellen auch hier *de novo* aufgetretene Punktmutationen und Deletionen verschiedenster Größe, wobei eine Verbindung zwischen Deletionsgröße und der Tendenz zu inhibitorischen Faktorantikörpern zu

bestehen scheint (70). Auch FIX Mutationen sind im World Wide Web zur Einsicht verfügbar: <http://www.umds.ac.uk/molgen/haemBdatabase.html> .

3.2.3. Klinische Diagnose

Um das Ausmaß der Schwere der Bluterkrankheit zu bestimmen kommen standardisierte Gerinnungstestverfahren, vor allem die aPTT und die Blutungszeit zur Anwendung. Zusätzlich kann auch die noch vorhandene Aktivität der beiden Faktoren bestimmt werden, um die jeweilige Hämophilieform zuordnen zu können. Kommerziell erhältliche DNA-Analysen für die häufige Inversion am Intron 22 stehen außerdem zur Verfügung. Die meisten anderen Mutationen können mit *direct sequence screening tests* identifiziert werden. In den seltenen Fällen in denen keiner der o.g. Ansätze Erfolg bringt, führt ein *linkage test*, der an Chorionzotten schon in der zehnten Schwangerschaftswoche durchgeführt werden kann, meist doch noch zu einer akkuraten Diagnose (84).

3.2.4. Konventionelle Behandlungsoptionen

3.2.4.1. Substitution der Gerinnungsfaktoren

Eines der essentiellen Ziele der Hämophilie-Therapie ist die Vermeidung rekurrierender Blutungen in Muskeln und Gelenke, die sonst zu schweren Deformitäten führen können. Da Patienten mit der milden oder moderaten Form der Krankheit selten spontane Blutungen in Gelenke erleiden, zielt eine prophylaktische Therapie darauf ab, Faktorenkonzentrationen über 1% des Gesunden aufrechtzuerhalten. Diese Strategie basiert im Besonderen auf den langjährigen Erfahrungen Schwedischer Forschungsgruppen, die die Effizienz frühzeitiger prophylaktischer Therapie eindrucksvoll belegten (134, 156, 177). Eine Arthropathie kann demnach vermieden werden, wenn prophylaktische Behandlungsschemata zu einem möglichst frühen Zeitpunkt begonnen werden (138). Allerdings ist in Anbetracht des ständig notwendigen venösen Zugangs bzw. einer Port-Implantation und der beträchtlichen Kosten einer

solchen Behandlung ein überaus hohes Engagement auf Seiten der Eltern und Kinder erforderlich, um eine solche Therapie erfolgreich durchzuführen (138, 91).

Traditionell waren aus menschlichem Plasma gewonnene Gerinnungsfaktoren die Hauptquelle für die Substitutionstherapie, doch kam es vor allem zu Beginn der Neunziger Jahre zu massenhaften behandlungsbedingten Infektionen von Blutern mit Hepatitis C und HIV Viren (16, 200). Trotz beträchtlicher Verbesserungen bei der Überprüfung von Spendern und der Abtötung potentiell enthaltener Viren während des letzten Jahrzehnts, verbleiben auch heute noch Bedenken um die Übertragung hämatogener Viren wie Hepatitis A & E, CMV, Parvovirus 19 oder der Creutzfeld-Jakob Krankheit auf Empfänger von Faktorpräparaten (62, 140, 247).

Die Entwicklung rekombinanter Faktorkonzentrate schien schließlich die infektiösen Gefahren gespendeten Blutes in Vergessenheit geraten zu lassen, so dass um die Jahrtausendwende auch schon um die 80% aller Bluter in den großen Industrienationen mit diesen Präparaten behandelt wurden. Im Bestreben jegliche Bedenken auszuräumen, werden neuere Formulierungen nun vollkommen frei von stabilisierendem menschlichem oder tierischem Albumin hergestellt (138, 239).

3.2.4.2 Inhibitoren in der Substitutionstherapie

Ein wohlbekanntes Phänomen schon aus der Zeit vor der Anwendung rekombinanter Präparate ist die Bildung inhibitorischer Antikörper gegen den jeweiligen Gerinnungsfaktorerersatz. In den meisten Fällen können niedrige Titer dieser Inhibitoren (*low-responders*) allerdings mit hohen Dosen spezifischer Antikörper neutralisiert werden, um eine Hämostase zu ermöglichen. Bei Patienten mit hohen Konzentrationen (*high-responders*) ist eine Neutralisation allerdings nicht mehr möglich, so dass zusätzliche immunsuppressive Therapien eingesetzt werden müssen (84). Da über 15% der Bluter mit der schweren Form der Krankheit auch inhibitorische Antikörper entwickeln (101), werden z. B. hochdosierter FVIII zusammen mit IgG und Cyclophosphamid (157) oder mit Prothrombinkomplex-Konzentraten (21) verabreicht, um die Toleranz von Faktorkonzentraten zu verbessern. Bisherige Versuche, mit diesen Verfahren auch eine FIX Toleranz zu etablieren, waren zum Teil mit schwersten anaphylaktischen Reaktionen oder Nierenschädigungen gekoppelt (127, 235).

3.2.5. Genterapeutische Voraussetzungen und Ziele

Die Bluterkrankheit erfüllt viele Voraussetzungen, die für einen zumindest weitgehend kurativen Einsatz genterapeutischer Maßnahmen als bedeutend angesehen werden. So sind schon geringe Mengen des Genprodukts im Sinne einer Gerinnungsfaktorenkonzentration von etwas mehr als 1% des Normalen ausreichend, um eine bedeutende Verbesserung im klinischen Bild schwer erkrankter Patienten zu erreichen. Darüber hinaus lässt sich die Effizienz des jeweiligen Verfahrens mit relativ geringem Aufwand mit standardisierten und klinisch bewährten Gerinnungstests wie der aPTT, der Blutungszeit oder dem Verbrauch von rekombinanten Faktorkonzentraten überwachen. Da auch 100% des jeweiligen Faktors im Blut immer noch innerhalb des normalen Bereiches liegen, ergibt sich zudem ein sehr großer therapeutischer Spielraum und Überdosierungen sind eher unwahrscheinlich. Gerinnungsfaktoren zeigen ihre Wirkung im Gefäßsystem und müssen im Gegensatz zu anderen genterapeutischen Produkten, wie z.B. bei der Cystischen Fibrose, nicht an einem spezifischen Ort im Körper in lokal hohen Dosen vorhanden sein. Somit ist der Ort ihrer Produktion von vergleichsweise untergeordneter Bedeutung und im Laufe der Jahre erwiesen sich tatsächlich eine Anzahl der verschiedensten Zelltypen als fähig, Gerinnungsfaktoren zu synthetisieren. Unter anderem Muskel (111) Leber (226), Fibroblasten (197), hämatopoietische (36) und epitheliale Zellen (54) wurden erfolgreich mit genetischem Material transfiziert. Dies eröffnet eine zumindest theoretische Vielzahl von Möglichkeiten, ausreichende Faktormengen in die Zirkulation gelangen zu lassen.

Grosse Tiermodelle sind essentiell, um präklinische Studien mit möglichst großer Nähe zum menschlichen Organismus durchführen zu können, natürlich vorkommende hämophile Hunde bieten diese Ressource für die Genterapie. Des Weiteren wurden auch hämophile *Knock-out*-Mausmodelle generiert, die nun in der Regel den Hunden in den Laboratoriumsstudien vorausgehen. Die Klonierung sowohl der kaninen als auch murinen FVIII und FIX Gene ermöglicht detaillierte Studien im Vorfeld klinischer Versuche.

3.2.6. Gentherapie

3.2.6.1. Virale Vektoren

3.2.6.1.1. Retrovirale Vektoren

Wie bereits erwähnt, ist die Zellteilung eine Hauptvoraussetzung zur erfolgreichen Transduktion einer Zelle mit einem retroviralen Vektor (RV). Da Gerinnungsfaktoren im wesentlichen in der Leber synthetisiert werden und dieses Organ für seine regenerativen Fähigkeiten bekannt ist, wurden in frühen Versuchen mit RV partielle Hepatektomien durchgeführt und das Vektorkonzentrat über die Milzvene infundiert. Abgesehen von der offensichtlich nicht unwesentlichen invasiven Natur dieses Vorgehens führten auch die niedrigen Transduktions- und Expressionsraten in - Tierexperimenten dazu, dass diese Strategie nicht weiter verfolgt wurde (112). Andere Gruppen unterbanden den Blutfluss einiger Pfortaderzweige in Schweinen und Ratten, um die daraufhin stattfindende kompensatorische Vermehrung von Hepatozyten in nicht betroffenen Leberlappen zur Transduktion zu nutzen. Immer noch ein beträchtlicher Eingriff in den Organismus brachte diese Taktik sogar nur 50% der Transduktionsraten der Hepatektomien (20, 52).

Eine weitere Möglichkeit, die Replikation von Hepatozyten zu steigern besteht in der Stimulation mit Wachstumsfaktoren, wie sie natürlicherweise bereits im Neugeborenen geschieht. Im Tiermodell führte die Injektion hoher Titer eines humanen FVIII tragenden RV bei neugeborenen hämophilen Mäusen dazu, dass ein Drittel dieser Tiere mehr als 50% der normalen humanen Plasmaspiegel exprimierte. Die Hälfte dieser Mäuse entwickelte allerdings auch inhibitorische Antikörper (226). C. Gao et al. postulierten, dass eine für diese Art der Therapie ausreichende Proliferation von Hepatozyten auch durch vorherige intramuskuläre Injektion adenoviraler Vektoren, die für hepatischen Wachstumsfaktor codieren, zu erreichen sei. Zumindest im Mausmodell konnten so durch die Injektion des RV während maximaler Hepatozytenreplikation ohne offensichtliche hepatopathische Effekte Transduktionsraten von um die 8% der Leberzellen erzielt werden (66). In einer ersten klinischen Studie der Phase I wird nun ein retroviraler Vektor, der B-Domänen gelöschte Faktor VIII-cDNA trägt, einem

Patientenkollektiv für drei Tage infundiert. Die in diesem Experiment verwendeten Vektorkonzentrationen bewegen sich wesentlich unter den im Tiermodell verwendeten. Bis jetzt konnten laut einem bei dem Jahrestreffen der amerikanischen Hämophilie Stiftung abgegebenen Zwischenbericht keine unerwünschten Wirkungen des Vektors festgestellt werden. Weitere Ergebnisse bleiben abzuwarten.

3.2.6.1.2. Lentivirale Vektoren

Im Mausmodell konnten mit lentiviralen Vektoren (LV) bis fünf Monate nach intravenöser Injektion fluktuierende Konzentrationen von humanen Faktor VIII um die 1ng/ml, also <1% des Normalen, gemessen werden. Am Ende des Experiments überlebten 2 von 3 transduzierten Mäusen durch Abschneiden des Schwanzes provozierte Blutungen (217). Vergleichbare Daten brachte die intraportale Injektion des LV sowohl mit Faktor VIII als auch mit Faktor IX. Hier stagnierten nach der Injektion der höchsten Vektordosis die Faktorkonzentrationen bei 1%, konnten aber durch partielle Hepatektomie noch einmal um das 4-6 fache gesteigert werden (168). Der replikationsfördernde Effekt dieses Verfahrens muss sicherlich mit der Effektivität weitaus weniger invasiven Verfahren verglichen werden.

3.2.6.1.3. Adenovirale Vektoren

Die immunologischen Auswirkungen der frühen Generationen adenoviraler Vektoren (AV) wurden auch bei Arbeiten zur Korrektur der Hämophilie beobachtet. So fiel bei Studien im Mausmodell eine zunächst erreichte phänotypische Korrektur schnell auf kaum mehr messbare Werte der Faktoren im Blut ab (39). Bei Rhesusaffen riefen AV Schädigungen an multiplen Organen wie Muskel, Leber und Lunge hervor (137) und Hunde zeigten bei der Anwendung von E1/E2a/E3-defizienten AV einen Anstieg inhibitorischer Antikörper und eine ausgedehnte Leberschädigung (65). Diese Hepatotoxizität zeigte sich in zwei Phasen direkt nach und innerhalb einer Woche nach der Applikation des Vektors und scheint auf einem direkten zytotoxischen Effekt des Vektors selbst als auch einer zellulären Immunantwort gegen die transgenen Leberzellen zu basieren. Eine gleichzeitige humorale Antwort gegen den zirkulierenden

Faktor VIII verkürzte die anhand der Blutungszeit ermittelte komplette phänotypische Korrektur die Dauer von wenigen Tagen. Die vierte Generation „vollkommen ausgeweideter“ AV, denen auch das E4 Gen fehlt, hat hingegen zumindest in der Maus wesentlich geringere Hepatotoxizität beobachten lassen. Nach 12 Wochen war allerdings auch hier keine Transgensynthese mehr nachweisbar (6). Selbst mit maximal attenuierten, sog. miniAdFVIII Vektoren, wurde in Mäusen die Formation inhibitorischer Antikörper auch in einer Tieren, die zuvor keine anti-humanen FVIII-AB gebildet hatten, nachgewiesen. Durch die gleichzeitige Applikation von anti-CD4 Antikörpern konnte die auf den transgenen Faktor gerichtete Immunantwort jedoch wesentlich reduziert werden. Im Vergleich zu ohne Immunsuppression applizierten E1/E3-gelöschten Vektoren wurden so FVIII Konzentrationen um die 3-5% für länger als einen Monat aufrechterhalten. (205).

Von der ersten klinischen Studie mit einem „ausgeweideten“ AV, bei der der erste Patient wohl über acht Monate persistierende FVIII Konzentrationen über 1% aufwies wurde von einer kalifornischen Firma berichtet. Offizielle Daten liegen allerdings noch nicht vor (153). Zuletzt wurde von einer Erlangerer Forschungsgruppe auch die pränatale Gentherapie der Hämophilie als eine weitere Alternative zur Anwendung sowohl des AV als auch des AAV ins Gespräch gebracht. Die Applikation der Vektoren *in utero* hat das Potential, verheerende peripartale Komplikationen wie intrakranielle Blutungen zu verhindern. In der Maus waren zudem weder gegen die jeweiligen Vektoren, noch den transgenen FIX Immunantworten festzustellen. Die fehlende Immunantwort als auch der relativ rasche Abfall der Faktor IX Konzentration in den meisten Feten unterhalb der therapeutischen 1% Schwelle, mag auch auf die im Vergleich zu anderen Studien relativ geringen Vektorladungen zurückzuführen sein (207). Hinzufügend muss erwähnt werden, dass zur Applikation der Vektoren sämtliche Mäuse einer Laparatomie unterzogen wurden, eine reichlich invasive Prozedur, deren letztendliche klinische Praktikabilität in Frage zu stellen sein dürfte.

3.2.6.1.4. AAV - Vektoren

Adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV) stellen im Moment das dominierende virale Transportmedium in der Gentherapie der Hämophilie. Die Transduktion von Leber- und

Muskelzellen mit diesen Vektoren befindet sich zurzeit in klinischen Studien und erste Erfolge der beteiligten Forschungsgruppen wurden bereits vermeldet.

Herzog et al. demonstrierten Ende der neunziger Jahre eine langdauernde Expression therapeutischer FIX Konzentrationen nach intramuskulärer Injektion eines AAV in die Hinterbeine von Mäusen (88). Der nächste Schritt hin zum Hundemodell zwei Jahre später erbrachte ebenfalls eine Korrektur der Blutungszeit und zumindest bei den mit hohen AAV Titern behandelten Hunden eine partielle Korrektur der aPTT (90), die über mehr als ein Jahr Bestand hatte (87).

Die erste klinische Studie der Phase I/II zur Evaluierung der Sicherheit der intramuskulären Applikation wurde im Frühjahr 2000 in den USA initiiert. Der hier verwendete AAV exprimiert humanen Faktor IX von einem CMV promoter/enhancer und wird ultraschallgesteuert intramuskulär in den Oberschenkel injiziert. Die Studie folgt einem Dosis-Eskalationsschema und beinhaltet eine Gruppe von 9-12 Patienten mit der schweren Form der Hämophilie B. Bisher veröffentlichte Daten der niedrigen und mittleren Dosiskohorten zeigten, trotz des Nachweises von Vektorsequenzen in Serum und Urin während der ersten 48 Stunden, keine Übertragung der genetischen Information in die Keimbahn oder die Bildung inhibitorischer Antikörper. Der Nachweis eines Gentransfers und der Expression von Faktor IX gelang in mehreren Muskelbiopsien, in deren histologischer Untersuchung entzündliche Prozesse nicht nachweisbar waren. Bei einem der Patienten war nach Vektorinjektion ein zweiwöchiger Anstieg auf 1,6 % des Normalen zu vermerken, während die restlichen zwei Patienten keine Änderungen zeigten. Im Bezug auf klinische Verbesserungen konnten allerdings bei allen drei beteiligten Blutern eine deutliche Verringerung von 50-80 % im Verbrauch von Faktorenkonzentraten festgestellt werden (111).

Als zweites großes Angriffsziel AAV-gestützter Gentherapie kristallisierte sich die Leber in mehreren tierexperimentellen Studien heraus. Durch die intraportale Infusion verschiedenster AAV konnten im Mausmodell bis zu 20% der normalen Faktorkonzentrationen mit FIX (151, 215, 233) und FVIII (31) ohne gleichzeitige Anzeichen einer Hepatotoxizität erreicht werden. Auch die Fortführung im Hundemodell zeigte Korrekturen der Blutungszeit, der aPTT und im besten Fall FIX-Konzentrationen im Bereich von 5% des Normalen für einen Zeitraum von mehr als sieben Monaten, ohne eine gleichzeitigen Anstieg von anti-FIX Antikörpern (214, 232).

Zuletzt konnte bei vier Hunden, denen ein vom α 1-Antitrypsin Promoter gesteuerten FIX AAV intraportal injiziert worden war, für über 17 Monate eine deutliche Verbesserung bzw. sogar Normalisierung der Gerinnungszeiten aPTT und ACT gezeigt werden. Die bei den vier Hunden gemessenen Faktorkonzentrationen bewegten sich dabei zwischen 4-10%, was nach klinischer Definition eine Konversion zur moderaten Form der Hämophilie bedeuten würde. Interessanterweise entwickelten auch Hunden mit einer Null-Mutation, die eine Prädisposition zur Formation inhibitorischer Antikörper darstellt, keine anti-FIX Antikörper (149). Klinische Studien für die hepatische Therapie mit Hämophilie-Patienten sind in Vorbereitung.

Das hervorstechendste Hindernis für die Therapie der Hämophilie A mit AAV ist die schiere Größe des Faktor-VIII-Gens. Sogar die Deletion der für einen funktionellen Faktor VIII verzichtbaren B-Domäne hinterlässt ein Transgen von 4.4kb, das schon den Großteil der Kapazität der 5kb des AAV fordert. Zur Überwindung dieses Hindernisses wurde die Größe des verwendeten Promoters auf ein Minimum reduziert, um sowohl Transgen-cDNA als auch den Promoter in den AAV „hineinzuquetschen“ (30, 31). Als einen weiteren Weg zur Reduktion der Transgengröße versuchte Burton das Spalten der genetischen Information in jeweils eine Expressionskassette für die leichte und die schwere Kette des Faktor VIII Proteins. Das so zweigeteilte Gen wurde in zwei mengenmäßig gleiche Vektorkonstrukte verpackt und nach intraportaler Injektion konnten Konzentrationen bis zu 6% des Normalen im Blut der nun wohl erfolgreich co-transduzierten Mäuse gemessen werden (24).

3.2.6.2. Ex vivo Applikationen

3.2.6.2.1. Transfizierte autologe Fibroblasten

Nach präklinischen Studien mit immundefizienten Mäusen, denen Kaninchenfibroblasten in das Bauchfell implantiert wurden, läuft seit 1998 ein klinischer Phase I Versuch der diese Methode in Patienten mit schwerer Hämophilie testet. Die Fibroblasten werden aus einer vom Oberarm gewonnenen Hautbiopsie isoliert und das B-Domänen gelöschte FVIII-Gen mit Fibronektin-Promoter via Elektroporation mit einem Plasmid transfiziert. Nach Replikation und Selektion

stabil transfizierter Zellen werden die Fibroblasten laparoskopisch unter Allgemeinanästhesie in das Omentum Majus implantiert. Bei keinem der sechs Patienten konnte während der einjährigen Versuchsphase eine zytotoxische oder von Antikörpern vermittelte Immunantwort nachgewiesen werden. Klinisch relevante Ergebnisse im Sinne von Faktorenspiegel im Blut, dem Verbrauch exogenen Faktorkonzentrates und neu auftretenden Blutungsepisoden variierten in Abhängigkeit der Faktorproduktion des jeweiligen implantierten Fibroblasten-Klons. Der Patient der den produktionsstärksten Klon erhalten hatte, zeigte demnach die stärkste Erhöhung des Faktorenspiegels auf 4% des Normalen nach zwölf Wochen. Alle anderen ließen minimale bis keine Veränderungen der FVIII Konzentration erkennen und auch o.g. Patient fiel innerhalb von zwölf Monaten wieder auf Spiegel unter 0,5% ab. Entsprechend konnte auch nur bei diesem Patienten ein signifikanter Rückgang im Verbrauch von rekombinatem Faktor bzw. von spontanen Blutungen verzeichnet werden. Mit dem Abfall der FVIII Konzentration kehrten diese wieder auf das Niveau vor der Therapie zurück (197).

3.2.6.2.2. Knochenmarkstromazellen

Aus dem Beckenkamm oder Sternum gewonnene humane Stromazellen wurden mit einem pseudotypisierten Retrovirus *in vitro* transduziert und immundefizienten Mäusen in die Milz injiziert. Diese Mäuse besitzen weder funktionelle B-, T-, noch natürliche Killerzellen und akzeptieren Fremdproteine oder -organe ohne Abstoßungsreaktion. Obwohl der Verbleib von 10% der applizierten Stromazellen in der Milz für mehr als 4 Monate nachweisbar blieb, verzeichneten Chuah et al. einen rapiden Abfall des FVIII von 2ng/ml auf nicht mehr messbare Werte. Bei offensichtlicher Persistenz der Zellen muss hier von einem Versagen des verwendeten MLV-Promoters ausgegangen werden (36). Eine Optimierung des Promoters und die Abklärung humoraler und zellulärer Immunantworten in kompetenten Organismen stehen noch aus.

3.2.6.2.3. Transgene Hauttransplantate

Durch die Transplantation größerer Hautlappen von für die epidermale FVIII-Synthese transgenen Mäusen auf den Rücken einer hämophilen und immundefizienten Züchtung konnte der Nachweis für die Möglichkeit einer therapeutischen FVIII-Expression in der Haut gebracht werden. Nach der Transplantation von 10-15% ihrer Hautoberfläche nahmen zwar nur zwei der neun Mäuse die transgene Haut an bzw. überlebten lange genug, um die tatsächlich FVIII-Produktion studieren zu können. In diesen beiden Mäusen konnten jedoch Serumspiegel von 3-4% des Normalen bis zu acht Wochen lang beobachtet werden, genauso wie eine signifikante Verbesserung der Blutungszeit (54). Die Möglichkeit der therapeutischen Expression von FVIII in leicht zugänglichen Keratinozyten erscheint sicherlich sehr reizvoll, eine Reduktion der Transplantatgröße, die Verwendung homologen Materials, bzw. topische Anwendungen werden zuvor allerdings zu eruieren sein.

3.2.6.2.4. Implantierte Mikro kapseln

Dieser *ex vivo* Ansatz benutzt von einem RV transduzierte Myoblasten, die in eine Kapsel von so geringer Porengröße eingehüllt werden, dass sie vor einer zellulären Immunantwort geschützt sind. Die Myoblasten werden in eine Mischung aus Kalium, Alginate und L-Polylysin eingehüllt und hämophilen Mäusen per Katheter in die Peritonealhöhle appliziert. Anfangs erreichte Faktorkonzentrationen von bis zu 10ng/ml fielen innerhalb von 7 Tagen auf nicht messbare Werte in immunkompetenten Mäusen ab und ein gleichzeitiger Anstieg inhibitorischer antiFVIII-Antikörper wurde beschrieben. Dennoch zeigte sich ein demselben Muster folgender Konzentrationsabfall auch in immundefizienten Mäusen. Ein gleichzeitig festgestellter Rückgang der synthetisierten mRNA weist auf ein Versagen des Vektors bzw. auf *in vivo* beginnende *silencing* Prozesse hin. De-novo-Methylierungen des hier verwendeten Vektors, waren für dieses Phänomen schon von anderer Seite als Erklärung vorgeschlagen worden. Interessanterweise konnten aber auch die Mutation bzw. Deletion der bekannten repressiven cis-Elemente des MLV-LTR die FVIII Expression nicht verbessern (68). Im starken Kontrast dazu stehen die Beobachtung einer mehr als sechs Wochen stabilen

FIX-Expression, die mit den selben eingekapselten Myoblasten der Reihe C2C12 erreicht wurde (98). Dieselben Autoren stellten eine Förderung tumorösen Wachstums durch die verwendete Zellreihe im Gastorganismen fest, was dieses für humane Anwendungen freilich verbietet (97).

3.2.6.3. Nackte DNA

3.2.6.3.1. Parenterale Anwendung nackter DNA

Die intramuskuläre Injektion von nackter DNA in Form von Plasmiden ist eine sehr unberechenbare und uneffektive Methode des Gentransfers. Das Verpacken von Plasmiden in Polymeren erhöht allerdings ihre Stabilität und Membrangängigkeit und konnte im Hundemodell zusammen mit dem Anlegen eines Feldes elektronischer Pulse (*Elektroporation*) die Effektivität des Plasmidtransfers so weit steigern, dass über hFIX Spiegel von 0,5-1,0% des normalen nach *intramuskulärer* Applikation berichtet wurde. Begleitet von einer temporären Schädigung des Muskels durch die Prozedur selbst, war jedoch die Expression der Faktorgene durch die Bildung von anti-hFIX-Antikörpern nur von sehr kurzer Dauer (58).

Plasmid wurden hämophilen Mäusen auch mit der sog. hydrodynamischen Methode infundiert, bei der in 5-8 Sekunden eine Menge Plasmidlösung, die beinahe der gesamten Blutmenge der Maus entspricht, durch die Schwanzvene der Mäuse verabreicht werden. Durch die Bestückung der Plasmidkassette mit einer Hepatischen-Kontroll-Region (HCR) und einem leberspezifischen α 1-antitrypsin Promoter konnten initial Faktorkonzentrationen von 10 μ g/ml erreicht werden, die dann im Verlauf des Experiments auf Werte zwischen 0,5-2,0 μ g/ml, also 5-20% des Normalen, abfielen. In einigen Mäusen konnte eine Stabilisierung dieser Werte für bis zu 550 Tage beobachtet werden. Eine transiente Erhöhung der ALT und AST auf über 20fache Werte, aber keine längerdauernde Lebertoxizität waren auffällig. Weniger schnelle Injektionen der Lösung in 30 statt 8 Sekunden resultierten in über 80% niedrigeren Werten. Eine temporäre Formation inhibitorischer Antikörper fand nur auf einem sehr niedrigen Niveau statt (142). Die verhaltene Immunantwort könnte einerseits in Zusammenhang mit der niedrigen Dosis der Plasmidvektoren als auch mit einer relativen hFIX-Toleranz

der verwendeten Mäuse stehen. Immunologische Mechanismen bei der gentherapeutischen Anwendung von Plasmiden sind gleichwohl noch weitgehend undurchleuchtet. Interessanterweise fiel ins Auge, dass die verwendeten Plasmide offensichtlich in einem recht stabilen episomalen Zustand persistierten, der z.B. eine Übertragung in die Keimbahn verhindern würde oder auch insertionale Effekte unwahrscheinlich macht. Weshalb die effektive Transduktion von Hepatozyten entsprechende Druckgradienten forderte, konnte allerdings noch nicht ergründet werden.

Yant et al. brachten für den Transfer von FIX kodierenden Plasmiden in Hepatozyten ein neues System zur erfolgreichen Anwendung. Dieses synthetische sog. „Transposable Element“ zeigte sowohl bei gesunden als auch hämophilen Mäusen die Fähigkeit, die Integration der Plasmide in Hepatozyten erheblich zu verbessern. Transposons sind natürlich vorkommende Elemente die durch eine *Transposase* die zwischen „short inverted repeats“ (IR) gelegene genetische Information ausschneiden und zu einer anderen chromosomalen Lokalisation transportieren können. Das von Yant et al. verwendete „Sleeping Beauty“ (SB) Element wird von 250bp IR's flankiert und kodiert lediglich für seine Transposase. Ein von diesen SB-IR's flankiertes hFIX-cDNA Plasmid wurde den Mäusen gleichzeitig mit einem SB kodierenden Plasmid unter Verwendung der o.g. hydrodynamischen Methode infundiert. Nach 60 Tagen Konzentrationen wurden um 2% des humanen FIX gemessen und nach wiederholter Applikation konnten innerhalb von mehreren Monaten sogar bis zu 8% festgestellt werden. Eine signifikante Verringerung der Blutungszeit im Vergleich mit einer Gruppe von mit defekten SB infundierten Mäusen ging mit diesen Zahlen einher (246).

3.2.6.3.2. Orale Anwendung nackter DNA

Ein oraler Transfer genetischer Information ist im Hinblick auf die klinisch einfache Durchführbarkeit natürlich eine Methode die einiges an Aufmerksamkeit auf sich zu ziehen vermag. Okoli et al. verfütterten FIX tragende Plasmide an hämophile Mäuse, die danach Faktorkonzentrationen von um die 1% des Normalen erreichten, allerdings nur für eine sehr begrenzte Zeit. Das verwendete Plasmid ist in ein vom Chitin abgeleitetes Biopolymer eingebettet und wurde mit Gelatine umhüllt in Dosen von 25µg

Plasmid pro Portion verabreicht (162). Viele Fragen im Hinblick auf den eigentlichen Syntheseort des Proteins und seine biologische Verfügbarkeit sind zwar noch unbeantwortet, dennoch dürfte die Aussicht auf eine nichtinvasive Gentherapie sicherlich viele Hoffnungen mit diesem oder ähnlichen Projekten verknüpfen.

3.3. Cystische Fibrose

3.3.1. Klinisches Bild

Die Cystische Fibrose (CF) ist mit einer Inzidenz von 1 in 2000 Geburten eine der häufigsten autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankungen. Hierbei kommt es durch die abnormale Zusammensetzung des Sekrets exokriner Drüsen zur Obstruktion der Drüsenausführungsgänge und zur zystisch-fibrösen Umwandlung der betroffenen Organe. In 5-10% der Fälle setzen die Erscheinungen sofort nach der Geburt mit dem Auftreten eines Mekoniumileus ein. Später sind eine intestinale und eine pulmonale Verlaufsform zu differenzieren, die in der Regel aber nebeneinander auftreten. Bei ersterer kommt es durch Verlegung der Ausführungsgänge und fibröse Umwandlung des Parenchyms zur exokrinen Pankreasinsuffizienz und in der Folge zur chronischen Verdauungsinsuffizienz und Gedeihstörung. Vor allem im zweiten Lebensjahrzehnt kann durch den Befall der Schleimdrüsen intrahepatischer Gallengänge eine biliäre Leberzirrhose mit Ösophagusvarizenblutungen hinzutreten. Auch ein durch die progressive Zerstörung des Pankreasgewebes bedingter Diabetes Mellitus stellt sich in 10-20 % der Fälle ein. Die pulmonale Verlaufsform ist durch die durch Verstopfung kleiner Bronchien bedingten obstruktiven, emphysematischen und atelektatischen Veränderungen charakterisiert. In über 80% der Fälle besteht eine chronische Sinusitis. Eine obligate Infektion durch eine mukoide Form von *pseudomonas aeruginosa* sowie die letztendliche Ausbildung eines chronischen Cor pulmonale bestimmen die Prognose dieser lethalen Erkrankung. Die mittlere Lebenserwartung der CF-Patienten liegt in den Industrienationen zurzeit bei über 30 Jahren (41, 42, 190).

3.3.2. Genetik

3.3.2.1. Das *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* - Gen

Das CF-Gen erstreckt sich über 250 Kbp auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q31.2), besteht aus 27 Exons und kodiert ein Protein aus 1480 Aminosäuren. Dieses auch „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR) genannte

Protein ist identisch mit dem cAMP abhängigen Cl⁻ Kanal in der Zellmembran exokriner Drüsen (113, 191, 194).



Abb.: Das CFTR Protein besteht aus zwei Membranspannenden (MSD), zwei nukleotidbindenden (NBF) und einer regulatorischen Domäne (RD); cAMP reagiert mit RD; der häufigste Defekt $\Delta F508$ betrifft die NBF 1 Region (nach 190)

3.3.2.2. Mutationen

Bis zum heutigen Tag sind über 800 Mutationen, die zum klinischen Bild der CF führen, identifiziert worden. Um eine Einteilung dieser Mutationen zu ermöglichen, wurden fünf dem jeweiligen pathophysiologischen Defekt zugeordnete Gruppen geschaffen (rev in 182). Die Mutationen der Klassen 1 und 2 verhindern die Expression des CFTR and der Zellmembran. Bei den Klasse 1 Mutationen verhindern Stop-Codons oder Frameshift-Mutationen die Proteinsynthese durch eine vorzeitige Unterbrechung der mRNA Translation, die Mutationen der Klasse 2 resultieren in einem Defekt der Proteinreifung, der zu einer Degradierung des unreifen Proteins im Endoplasmatischen Retikulum führt. Dazu zählt auch die in unseren Breiten mit 70% der Fälle am häufigsten vorkommende temperaturabhängige Mutation $\Delta F508$. Der hier vorliegende Defekt führt zum Ausbleiben der Proteinreifung bei Körpertemperatur, während bei 27°C teilweise funktionale Cl-Kanäle nachgewiesen werden konnten. Mutationen der Klasse 3 bewirken durch den Austausch oder den Wegfall einzelner Aminosäuren die Expression nicht aktivierbarer Proteine, die der Klasse 4 rufen in ihrer Leitfähigkeit verminderte CFTR-Proteine hervor. Mutationen an Splicing-Stellen, die die Effektivität des normalen mRNA-Splicings herabsetzen, werden in der Klasse 5 zusammengefasst. Diese führen zu einem lediglich partiellen Ausfall der Synthese funktionellen Proteins. Träger der Mutationen der Klasse 1 bis 3 zeigen eine multiple Organe betreffende Erkrankung, die in progressiver pulmonaler Obstruktion, pankreatischer Insuffizienz und männlicher Infertilität durch bilaterale Absenz des Vas deferens resultiert. Zumindest einige der Träger der Klasse 4 Mutationen zeigen durch eine gewisse residuale Cl-sekretorische Kapazität eine phänotypisch mildere Form der

pankreatischen Insuffizienz, Träger der Klasse 5 Mutationen zusätzlich auch eine geringere Affektion des männlichen Genitaltrakts (80, 92). Abhängig von der residualen CFTR-Funktion entwickeln sich so phänotypische Krankheitsbilder verschiedener Schwere. Heterozygote Träger einer Mutation des CFTR-Gens mit einer Restfunktion von 50% zeigen keine Krankheitserscheinungen. Der männliche Genitaltrakt ist bei einer residualen Funktion von weniger als 10% betroffen und reagiert damit am empfindlichsten auf CFTR-Defekte. Die Lunge und die Schweißdrüsen sind ab einer Restfunktion von weniger als 5% sicher involviert, eine pankreatische Insuffizienz scheint sich erst unter 1% einzustellen (42). Bis heute ist die Frage ungeklärt, ob die Veränderung des Oberflächensekrets der Atemwege (ASL) die alleinige Basis für die infektiösen Komplikationen stellt oder auch der CFTR Defekt selbst eine proinflammatorische Wirkung hat. In Bezug auf die Zusammensetzung des ASL wurden zwei konkurrierende Modelle postuliert. Das eine macht eine ungenügende mukoziliäre Funktion durch den Verlust von Na⁺ und Wasser innerhalb der oberen Schicht des ASL, das andere eine erhöhte Ionenkonzentration und in der Folge die Dysfunktion salzabhängiger Abwehrmechanismen für die bakteriellen Infektionen in der Pathogenese der CF verantwortlich (141, 211).

3.3.3. Klinische Diagnose

Der Schweißtest ist die Standardmethode zur Erkennung der CF. Mit Hilfe der Pilokarpin-Iontophorese gewonnener Schweiß wird nach dem Prinzip der Leitfähigkeitsmessung auf seinen Kochsalzgehalt hin untersucht. Werte über 60 mval Na⁺ oder Cl⁻ pro Liter Schweiß gelten als beweisend für eine CF. In 80-90 % der Fälle wird ferner eine Verminderung der Verdauungsenzyme in Duodenalsaft, Stuhl oder Serum festgestellt. Funktionsdiagnostischen Maßnahmen umfassen die Lungenfunktionsprüfung und konventionelle oder computertomographische Röntgenaufnahmen. Ein molekulargenetischer Nachweis des Gendefekts ist ebenfalls möglich (41, 42, 190).

In vielen Ländern, nicht jedoch in Deutschland, wird ein CF-Screening durch eine kombinierte Analyse von DNA und Trypsinogen aus einem Blutstropfen nach der Geburt durchgeführt. Auch eine Pränataldiagnostik anhand der Typisierung von durch

Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese gewonnener DNA ist zur Vorhersage einer CF-Anlage möglich (190).

3.3.4. Konventionelle Behandlungsoptionen

Die konventionelle Therapie der CF ist symptomatisch. Im Vordergrund stehen eine hochkalorische Diät, die Substitution von Pankreasfermenten, die medikamentöse und physiotherapeutische Sekretolyse in den Atemwegen und die antibiotische Intervall- oder Dauerbehandlung von Atemwegsinfektionen.

Neuere Behandlungsformen sind die inhalative Anwendung von Amilorid, das durch Blockade des Na⁺-Stromes in die Epithelzellen das Membranpotential normalisieren soll, die Gabe von das ASL verflüssigender DNase (186) und Anti-Elastase, um einer durch dieses Enzym bedingten Alveolarzellzerstörung entgegenzuwirken.

Entscheidend für die Prognose der Erkrankung ist eine frühzeitige Erkennung möglichst vor Einstellen der pulmonalen Symptomatik und eine konsequente Behandlung von dort an. Im besten Fall kommt es aber ausnahmslos nur zu einer Verlangsamung des letztendlich lethalen Krankheitsprozesses, ein großer Teil der betroffenen Kinder stirbt darüber hinaus wegen einer zu späten Diagnosestellung auch heute noch vor der Pubertät (41, 42, 190).

3.3.5. Gentherapeutische Voraussetzungen und Ziele

In Hinsicht auf die immer noch kontrovers diskutierte Pathogenese der CF verspricht die Gentherapie mit dem Ersatz des defekten Proteins eine elegante Alternative zu konkurrierenden symptomatischen Therapieansätzen. Da die pulmonalen Komplikationen das klinische Bild der CF und letztlich die Lebenserwartung der Patienten bestimmen, haben sich gentherapeutische Studien bisher auf Anwendungen in der Lunge bzw. den Atemwegen konzentriert.

Die absolute Anzahl von CFTR-Rezeptoren in der Lunge ist im Vergleich zu anderen Organen gering und Dorin et al. postulierten nach Versuchen im Mausmodell, dass bereits eine 5%ige Expression des CFTR-Gens zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit des Kanals auf 50 % des Normalen führe, was sich weitestgehend mit den Beobachtungen

von Davis et al. in einem humanen Patientenkollektiv deckt (41, 47). Diese 5% Hürde wurde deshalb in vielen Studien auch als experimentell bestimmbarer Endpunkt für die therapeutische Effektivität des jeweiligen Verfahrens gewählt.

Das Gen der cystischen Fibrose wurde 1989 entdeckt, seine cDNA kloniert und das CFTR-Protein als sein Produkt bestimmt. Mausmodelle der CF existieren ebenfalls und wurden in vielen präklinischen Studien verwendet (46, 213).

Um die Effizienz der Therapie zu bemessen, können mehrere Parameter des CFTR-abhängigen Ionentransports *in vivo* bestimmt werden. Dazu gehört die transepitheliale Potentialdifferenz (PD) des Nasenepithels, die durch eine übermäßige Absorption positiv geladener Na⁺ Ionen bei CF-Patienten weit unter den normal-negativen Werten Gesunder liegt. Zudem zeigen CF Patienten eine gesteigerte Reaktion auf das Diuretikum Amilorid, das Na-Kanäle blockiert, und eine verminderte Reaktion auf den cAMP-Agonisten Isoprenalin, der die Cl⁻ Sekretion stimuliert (115). Diese Untersuchungen können sowohl am Nasenepithel als auch in Vollnarkose bronchoskopisch in den unteren Atemwegen durchgeführt werden (5).

Eine in vielen Studien verwendete *ex vivo* Methode bedient sich einer quantitativen Fluoreszenzmessung. Durch den Ausstoß markierter Iodid-Ionen nach cAMP abhängiger Stimulation zeigen Zellen mit intaktem CFTR und korrigierte CF Zellen eine deutliche Fluoreszenz, die dadurch zum quantifizierbaren Maß der Zellfunktion wird (219). Der Nachweis von Vektor-mRNA durch PCR gelingt in der Regel durch geringfügige Modifikationen etwa der Intronsequenz und die Verwendung spezifischer Primer, die die Unterscheidung exogener von endogener mRNA möglich machen (5, 159). Eine potentiell pathogene Dissemination des Transgens wird in der Regel durch die Suche nach Vektorsequenzen in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Epithelproben analysiert. Klinische Parameter der Effizienz einer Therapie sind Lungenfunktionsmessungen, Untersuchungen der mucoziliären Clearance, Flusseigenschaften des Atemwegssekrets und die Zu- oder Abnahme respiratorischer Infektionen.

3.3.6. Gentherapie

3.3.6.1. Virale Vektoren

3.3.6.1.1. Adenovirale Vektoren

Adenovirale (AdV) Vektoren hatten zu Beginn im CF-Mausmodell trotz ihres natürlichen Tropismus für die Atemwege eine sehr geringe Effektivität in der Transduktion respiratorischen Epithels gezeigt. Nach mechanischer Schädigung der oberen Epithelzellreihen war es allerdings gelungen, Basalzellen *in vivo* zu transduzieren und in der Folge eine langfristige Expression des Transgens zu erreichen (180).

Eine im darauf folgenden Jahr veröffentlichte klinische Phase I Studie testete die Effektivität eines für E1 und E3 gelöschten, replikationsunfähigen Ad-CFTR-Vektor an sechs CF Patienten. Bei dem in HECK 293-Zellen hergestellten Vektor wurden die gelöschten E1 Sequenzen

durch eine 4,5 kb cDNA des humanen CFTR-Proteins ersetzt. Diese wird von einem Packsignal/E1a-Enhancer vom Serotyp

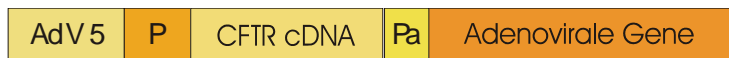


Abb.: Der AdCFTR Vektor. Die CFTR-cDNA ist flankiert von AdV 5-Elementen, einem AdV 2 *Late*-Promoter (P) und einem PolyA-Signal (Pa).

AdV 5, einem *late*-Promoter von AdV 2 und einem Polyadenilierungssignal (PolyA) des „simian virus“ (SV) 40 flankiert. Das gewonnene Vektor-Gemisch wurde den Patienten in Dosierungen von 10^7 bis $5,4 \times 10^8$ pfu sowohl intranasal als auch als Aerosol in die Lunge instilliert. Weder klinische Zeichen noch das gewonnene Serum und Proben der Bronchoalveolären Lavage (BAL) wiesen auf eine Aktivierung des Immunsystems bzw. eine vermehrt Anti-AdV-Antikörperproduktion hin. Der Nachweis der CFTR-DNA in der BAL durch PCR gelang bei der Hälfte der Patienten nach einer Woche, war aber nach drei Wochen nicht mehr möglich. Mit Hilfe immunzytochemischer Verfahren konnten CFTR-positive Zellen zwar in der Nasenschleimhaut, nicht aber in der BAL nachgewiesen werden (13). Die geringe Effektivität des Gentransfers genauso wie die ausgebliebene Immunantwort waren sehr

wahrscheinlich eine Folge der Aerosol-Applikation. Durch diese Methode gelangen tatsächlich nur bis zu 25% der applizierten Vektorpartikel an ihr Ziel, in diesem Fall also maximal bis zu $1,3 \times 10^8$ pfu. Dies minimiert einerseits die Gentransferrate, andererseits liegt diese Dosierung aber auch unterhalb der Schwelle, die in Rhesus-Affen als Auslöser für lymphatische Infiltrate beschrieben wurde (210).

Um bei einem Kollektiv von 14 CF-Patienten mit einem ähnlichen E1/E3-gelöschten AdV-Vektor mit CMV-Promoter eine gleichmäßige Verteilung des Transgens in der Lunge zu erzielen, wurde dieser über ein fiberoptisches Bronchoskop appliziert. Die mit Puffersubstanzen verdünnte Vektorlösung wurde dabei über den sich an der Spitze des Bronchoskops befindlichen Spraykopf in Abständen von drei Monaten und Dosen von 10^6 - 10^9 pfu direkt in den Bronchus des rechten Unterlappens gesprüht. Drei Tage nach der ersten Anwendung konnten bei den Patienten, die mittlere und hohe Dosen erhalten hatten in der BAL CFTR-mRNA-Spiegel im Bereich der als therapeutisch angesehenen 5% der normalen CFTR-Konzentration festgestellt werden. Drei Tage nach der zweiten Applikation wurde diese 5% Marke nur noch von vier Patienten der mittleren Dosisgruppe erreicht. Jeweils 30 Tage nach Sprühstoß 1 und 2 war bei keinem der Patienten mehr CFTR-mRNA nachweisbar. Die dritte Anwendung blieb bei allen Patienten von Beginn an ohne feststellbare Expression von Vektor-basierender mRNA (82). Obwohl in dieser Studie keine schwerwiegende systemische Immunantwort beobachtet werden konnte und auch die systemischen anti-AdV-Antikörper keine signifikante Erhöhung zeigten, gibt sie einen Hinweis auf andere immunologische Mechanismen, wie z.B. lokale Mukosa-Antikörper oder die in der Studie beobachtete Infiltration neutrophiler Zellen, die offensichtlich einer wiederholten Transduktion durch einen AdV-Vektor einen Riegel vorschoben.

Zuckerman et al. wiesen im gleichen Jahr eine zu grippeähnlichen Symptomen und radiologisch nachweisbaren Infiltraten führende Maximaldosis von $2,1 \times 10^{11}$ für einen E1/E4 gelöschten CFTR-AdV-Vektor bei bronchoskopischer Tropf-Instillation nach. Von den elf in die Studie einbezogenen Patienten zeigten alle eine dosisunabhängige Proliferation von AdV-spezifischen T-Zellen, eine Erhöhung der Cytokine IFN γ und IL 10, sowie eine dosisabhängige Temperaturerhöhung. Der durch in-situ-Hybridisierung festgestellte Gentransfer betraf nach 4 Tagen weniger als ein Prozent der Zellen in der BAL und war nach 43 Tagen nicht mehr feststellbar (252). Die beobachtete

Immunantwort war damit auch in den niedrigeren Dosierungsgruppen ab $2,1 \times 10^9$ pfu ausreichend, um das Transgen innerhalb von maximal 43 Tagen auszuschalten.

Ein Vergleich der Effektivität des Aerosol-Verfahrens und der bronchoskopischen Anwendung wurde von Perricone, Joseph et al. an 34 Patienten mit einer moderaten Form der CF durchgeführt. Von den zwei verwendeten E1/E4-gelöschten CFTR-AdV-Vektoren exprimierte der eine (Ad2/CFTR2) die CFTR-cDNA von einem Phosphoglycoat Kinase Promoter, der andere (Ad2/CFTR8) von einem adenoviralen E1a Promoter. Beide Vektoren wurden in Dosierungen von 8×10^6 bis $2,5 \times 10^9$ pfu bronchoskopisch und von 8×10^6 bis $2,5 \times 10^{10}$ pfu als Aerosol verabreicht. Fieber, Schüttelfrost und Myalgien wurden bei beiden Applikationsformen in den höchsten Dosierungsgruppen beobachtet, bei der bronchoskopischen Anwendung zeigte sich bei zwei Patienten auch ein lobäres Infiltrat im Lungen-CT. Funktionelle Lungentests blieben allerdings unverändert und auch eine virale Dissemination war nicht nachweisbar (108). Zwei Tage nach Applikation der Vektoren wurde bei allen Patienten, die den AdV/CFTR8-Vektor erhalten hatten sowohl Vektor-spezifische DNA als auch mRNA in durch BAL gewonnenen Zellen nachgewiesen, nach sieben Tagen war diese Zahl auf die Hälfte der untersuchten Patienten geschrumpft. Die untersuchten Zellen waren sowohl epithelialen als auch nicht-epithelialen Ursprungs und zeigten in der in-situ Hybridisierung eine maximale Transduktionsrate von 2,4 %, wobei die höchste Transduktionsrate bei einer mittleren Dosierung auftrat und somit eine Inaktivierung (zu) hoher Vektordosen vermuten lässt. Bei den 16 Patienten, die den AdV/CFTR2-Vektor erhalten hatten, war dagegen zu keinem Zeitpunkt ein Nachweis von Vektor-spezifischen Sequenzen möglich (176). Die in dieser Studie auffällige Transduktion von bis zu 7% der untersuchten mononukleären Zellen mag zudem einen weiteren Hinweis auf die Hintergründe der mäßigen Transduktionsraten topischer Anwendungen geben.

3.3.6.1.2. AAV - Vektoren

Bereits 1993 hatte ein AAV-CFTR-Vektor *in vivo* die stabile Expression des CFTR Proteins von bis zu 6 Monaten in maximal 5% der Zellen des Bronchusepithels von Kaninchen ermöglicht (63).

Die humane CFTR-cDNA, zusammen mit dem notwendigen polyA-Signal nach dem Stop-Codon beansprucht allerdings 4,6 kb Insertionsfläche innerhalb eines Vektors. Da die beiden essentiellen ITRs eines AAV-Vektors insgesamt 290 bp einnehmen und das Vektorgenom für ein effizientes Verpacken im viralen Capsid 4,7 kb nicht überschreiten sollte, kann die originale CFTR-cDNA nur von dem in der viralen ITR vermuteten Promoter exprimiert werden. Um diesen vergleichsweise schwachen Promoter ersetzen zu können, identifizierten Zhang et al. mehrere nicht essentielle Sequenzen der CFTR-cDNA, deren Deletion die Inkorporation des AAV-P5-Promoters ermöglichte (251).

Klinische Studien mit dem AAV-CFTR-Vektor haben inzwischen die Phasen I und II durchlaufen. Wagner et al. testeten die Kapazität des Vektors bei der Behandlung der fast alle CF-Patienten betreffenden chronischen Sinusitis auch im Hinblick auf deren späteren Übertragung auf das Atemwegsepithel der Lunge (229, 230). In Phase I der Studie wurde der Vektor fünf Patienten über einen Katheter in einen Sinus maxillaris, fünf weiteren im Abstand von einem Monat in beide Sinus instilliert. Im besten Fall wurde eine Potentialdifferenzveränderung (PD) in den Normalbereich von 14 Tagen Dauer registriert. Innerhalb eines Monats trat eine klinische Rekurrenz der Sinusitis bei der Hälfte der zuvor asymptomatischen Patienten auf (230). Den in dem kürzlich durchgeführten Phase II- Protokoll beteiligten 23 Patienten wurden sowohl der Vektor als auch ein Placebo in den kontralateralen Sinus maxillaris verabreicht. Eine signifikante Immunantwort der Atemwege sowie ein Anstieg der anti-AAV-Antikörper im Serum blieben zwar aus, so aber auch eine eindeutige Verbesserung der bestimmten Messgrößen. Die Rekurrenz der klinisch und endoskopisch nachgewiesenen Sinusitis-Symptome, Entzündungszeichen in histologischen Präparaten und elektrophysiologische Untersuchungen wie die Bestimmung der PD zeigten kaum Unterschiede zwischen Vektor- und Placebo-behandelten Patienten (229).

Für eine Phase I Studie, die die pulmonale Applikation des AAV-CFTR untersuchte, verwendeten Aitken et al. Dosierungen von 10^{10} bis 10^{13} Partikeln über ein Verneblersystem (1). Von den zwölf involvierten Patienten, die eine einmalige Gabe der Vektorlösung erhielten, entwickelten drei eine von der jeweils applizierten Vektorladung unabhängige Verschlechterung ihrer pulmonalen Parameter. Husten, Hämoptysen und fluktuierende Veränderungen der FVE_1 fielen im gesamten Patientenkollektiv auf. Lokale Antikörper blieben unverändert, eine bis zu vierfache

Erhöhung der Serum-anti-AAV-Antikörper war aber in den Hochdosisgruppen zu sehen. Diese zeigten als einzige in den Zellen der BAL auch nach 60 Tagen noch Transduktionsraten von im besten Falle 10 %, jedoch war nach 90 Tagen bei keinem der Patienten mehr Vektor-DNA nachweisbar. Vor allem gelang zu keinem Zeitpunkt der Nachweis Vektor-spezifischer mRNA als Beweis für eine Expression des Transgens (1).

3.3.6.2. Nicht-virale Vektoren

Auch der Transport der CFTR-DNA im Komplex mit Liposomen wurde schon recht bald nach der Entdeckung des CFTR-Gens versucht und konnte im Modell die Ionenpermeabilität der Zellmembran annähernd wiederherstellen (104). Die Anwendung kationischer Liposomen an der Nasenschleimhaut von CF-Patienten konnte zwar keine längerfristige Transgenproduktion in Form von nachweisbarer mRNA sicherstellen, Vektor-DNA konnte jedoch in fast allen Patienten bis zu 28 Tage nachgewiesen werden. Bei einigen wenigen zeigte sich als Spiegelbild der CFTR-Funktion auch eine partielle und kurzfristige Normalisierung des transepithelialen Ionentransports (184).

Im direkten Vergleich eines Placebos und eines in das gegenüberliegende Nasenloch applizierten liposomalen Vektors konnten auch Noone et al. zwar die offensichtlich nebenwirkungsfreie Anwendung dieses Vektors zeigen, allerdings auch ohne Nachweis eines effektiven Gentransfers. Den elf Patienten war ein von einem humanen CMV-Promoter gesteuerter Vektor per Spray in Dosen bis zu 4mg DNA in mehreren Hüben verabreicht worden. Der Nachweis vom Plasmid abgeleiteter mRNA in der nasalen Lavage gelang zu keinem Zeitpunkt, obwohl Vektor-DNA für einige Tage in allen Patienten gefunden wurde. Auch eine signifikante Veränderung der Cl⁻-Leitfähigkeit des Epithels oder eine klinische Verbesserung konnten nicht festgestellt werden (159).

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von an der Nasenschleimhaut durchgeführten Studien auf das Lungenepithel wurde von Alton et al. untersucht. Acht Patienten inhalierten hier zunächst bis zu 40 mg des aerosolisierten Lipid-Vektors über den Mund in die Lunge, eine Woche später bis zu 12 mg in die Nase. Eine gleich große Placebogruppe erhielt Wasser anstelle des Vektors. Nach der pulmonalen Anwendung entwickelten sieben der mit Vektor behandelten Patienten passagere grippeähnliche

Symptome und leichtes Fieber, das sich innerhalb 30 Stunden wieder normalisierte. Diese Symptome waren ebenfalls von einem zeitweiligen Anstieg des CRP und Verschlechterungen in den Lungenfunktionstests begleitet, anti-CFTR-Antikörper waren nicht nachweisbar. Obwohl sich auch hier Vektor-DNA in bronchoskopisch gewonnenen Proben zeigte, war dies für vom Vektor abgeleitete mRNA nicht der Fall. Sowohl nach pulmonaler als auch nach nasaler Applikation konnte eine Verbesserung der Cl⁻-Leitfähigkeit von bis zu 25 % im Vergleich zu den Ausgangswerten bei sechs der acht Patienten festgestellt werden. Ähnliches fand sich bei der cAMP-Stimulation der Cl⁻-Kanäle. Eine Verbesserung der Natrium-Kanäle im Amilorid-Test blieb jedoch aus (5).

Auch bei einer späteren „multi-dose“ Studie, bei der ein Lipid-CFTR-Vektor dreimal im Abstand von vier Wochen nasal appliziert wurde, wurde bei der Hälfte der Patienten eine allerdings leichte grippeähnliche Symptomatik beobachtet. Die hier verwendeten Dosierungen lagen weit unter den zuvor beschriebenen. In sechs Patienten, die nach einer der Applikationen für Vektor-DNA, exogene mRNA und auch CFTR-Protein in der Fluoreszenzbestimmung inkonstant positiv waren, wurde eine Verbesserung in einem SPQ-Fluoreszenztest für die Halid-Leitfähigkeit der Zellmembran *in vitro* festgestellt. *In vivo* Tests der Cl⁻-Leitfähigkeit erbrachten hier aber keine signifikanten Verbesserungen gegenüber den Ausgangswerten und auch die Na⁺-Leitfähigkeit blieb unbeeinflusst. Im Gegensatz zu viralen Vektoren war die wiederholte Durchführbarkeit des liposomalen Gentransfers, wenn auch mit sehr niedriger Effizienz, ohne labortechnisch nachweisbare Immunantwort geblieben (105).

Wesentlich größere Vektormengen mit einer analogen Lipidformulierung verwendeten Ruiz et al. zur pulmonalen Applikation mittels Aerosol. Zuvor war die Anwendung dieser Zubereitung bei

gesunden Probanden ohne immunologische

Auswirkungen geblieben (29). Die nun verwendeten

Dosierungen von 6-16 ml mit bis zu 21 mg/ml

Vektor und 114 mg/ml GL

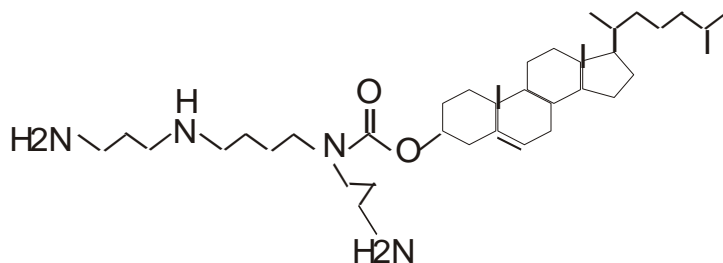


Abb.: Das Lipid 67A (GL-67:DOPE:DMPE-PEG5000)

67A-Lipid führten in den acht CF-Patienten der Studie durchweg zu Grippe-symptomatik und Fieber. Dies provozierte bei einigen der Patienten den Wegfall der bronchoskopischen Evaluation des Gentransfers. Bei zwei Patienten jedoch, die jeweils die höchste Dosis erhalten hatten, wurde in den gewonnenen Zellen Vektor-spezifische mRNA nachgewiesen. Eine Antikörper-Antwort auf den Vektor blieb im Kontrast zu einer signifikanten IL-6-Erhö-hung aus, was auf eine von epithelialen Makrophagen ausgehende Immunantwort hinweisen mag. Der Verbindung von DNA und Lipidkomplex scheint hier die entscheidende Bedeutung zuzukommen, denn eine Proliferation mononukleärer Zellen konnte von den Autoren *in vitro* lediglich auf den DNA/Lipid-Komplex hin, nicht auf DNA allein gezeigt werden (199).

4. Diskussion

4.1. Barrieren der Gentherapie

Im Allgemeinen fällt die Immunantwort auf einen viralen oder nicht-viralen Vektor umso heftiger aus, je mehr Partikel appliziert wurden, während das Ausmaß des Gentransfers sich gegenläufig verhält. Immunantworten können sowohl die viralen Partikel, die Expression des Transgens selbst, oder auch seiner viralen Bestandteile auslösen, vor allem wenn die genetische Information von einer anderen Spezies stammt. Nicht vollständig von viralen Sequenzen befreite Vektoren, wie Adeno- und Lentiviren, ziehen eine T-Zell vermittelte zytotoxische Antwort gegen das transfizierte Gewebe nach sich (137, 168). Aber auch „ausgeweidete“ Adenovektoren reduzieren die Produktion neutralisierender Antikörper nicht auf Null, da sie immer noch virale Capsid-Proteine präsentieren. Eine intramuskuläre Applikation zeigt darüber hinaus in den Hämophilie-Studien eine größere Tendenz zur Auslösung einer B-Zell vermittelten Immunantwort als eine intra- oder perihepatische, was der Leber eine gewisse immunologische Toleranz zuschreiben mag. Eine Formation inhibitorischer Antikörper gegen das transgene Protein wurde vor allem nach intramuskulärer Applikation beschrieben (87), ist aber auf der anderen Seite auch bei einer bestehenden Lebererkrankung nicht sicher auszuschließen (149), wobei sich die Exposition gegenüber Hepatitis B und C Viren z.B. im hämophilen Patientengut zwischen 80% und 90% bewegt (16, 200). Zudem sind über 82% der Patienten mit Hämophilie A und über 48% mit Hämophilie B mit dem HIV Virus infiziert, so dass eine anti-retrovirale Therapie der HIV-Infektion zudem Wechselwirkungen mit retroviralen Vektoren wahrscheinlich macht.

Vor allem bei der Verwendung topischer Verfahren sind aufgrund der zeitlich beschränkten Wirkdauer wiederholte Applikationen notwendig. Dabei wurden sowohl bei viralen (82, 250, 252) als auch nicht-viralen Vektoren (199, 209) zelluläre und humorale Abwehrmechanismen beobachtet, die einen weiteren Gentransfer verhindern oder z.B. durch Inaktivierung des Promoters limitieren (252). Um diese Barrieren zu umgehen, könnte bei jeder Readministration ein anderer Serotyp des jeweiligen viralen Vektors benutzt werden, was abgesehen von einer möglichen Inhibition durch

kreuzreaktive Lymphozyten jedoch auch diesen Serotypen auf eine einmalige Wiederholung beschränken würde (146, 166, 171). Eine Weiterentwicklung ist die Herstellung jeweils unterschiedlicher rekombinanter Serotypen „ausgeweideter“ Adenovektoren durch Verwendung einer großen Anzahl von Helferplasmiden, die im Tiermodell schon erfolgreich erprobt wurde (145). Alternativ sind auch eine Umhüllung des viralen Capsids mit dem in der Pharmakologie bewährten Polyethylene-Glykol und auch eine präpartale Applikation des Vektors in den immunologisch noch naiven Organismus in der Diskussion (207).

Verschiedene Mutationen innerhalb des defekten Gens haben ebenso einen limitierenden Einfluss auf die Anwendung der *in vivo* Gentherapie. Im Tiermodell zeigten sich hier signifikante Unterschiede in der Tendenz inhibitorische Antikörper gegen das Genprodukt zu synthetisieren (59, 89). Zudem zeigten Versuche bei Mäusen, die ein dysfunktionales Protein herstellten, die Gefahr der Erkennung des neuen funktionalen Proteins als Neo-Antigen (6, 205). Entsprechend würde bei Patienten, die z.B. eine Null-Mutation tragen, der transgene Faktor als Antigen identifiziert werden und so eine Antikörperbildung auslösen. Dies könnte für die Anwendung der Gentherapie in Patienten verschiedenster Krankheitsbilder, bei denen noch geringe Mengen funktionsuntüchtigen Proteins synthetisiert werden, als potentes immunologisches Hindernis der Therapie auftreten.

Zur Umgehung solcher Barrieren müssten zeitgleich zur Vektorapplikation immunsupprimierende Medikamente gegeben werden. Vor allem aber bei Patienten mit bereits geschwächten Immunsystem, wie von HIV betroffenen Blutern, oder einem bekannt hohen Risiko bakterieller Besiedlung, wie den schwereren Fällen der CF, scheint dies keine geeignete Alternative. Die regelmäßige Besiedlung durch *pseudomonas aeruginosa* schafft zudem eine anhaltende inflammatorische Situation in CF-Patienten, die im Mausmodell als ein beachtliches Hindernis des Gentransfers Wirkung zeigte (225). Eine Makrophagen-Aktivierung durch IL-6 (199) bei der Verwendung von DOPE-Plasmiden in der Lunge und bis zu 7% des Transgens innerhalb mononukleärer Zellen bei der topischen Therapie mit AdV (176) sind exemplarisch für eine mit großer Wahrscheinlichkeit vor allem den topischen Gentransfer behindernde zelluläre Komponente des Immunsystems (123, 241). Der Verbindung von DNA und Lipidkomplex kommt bei den Plasmiden offenbar die entscheidende Bedeutung zu, da

eine Proliferation mononukleärer Zellen *in vitro* lediglich auf den DNA/Lipid-Komplex hin, nicht auf die eukaryotische DNA allein gezeigt werden konnte (199). Immunologische Mechanismen bei der gentherapeutischen Anwendung von Plasmiden sind gleichwohl zurzeit noch weitgehend undurchleuchtet.

Beim Vergleich verschiedener Zugangswege für AAV zeigt die Leber als Zielorgan insofern einen gewissen Vorteil, als dort wesentlich geringere Dosierungen bereits dem Muskel vergleichbare Ergebnisse hervorriefen (149, 154). Allerdings scheint das Ausmaß der muskulären Expression des Transgens auch wesentlich vom jeweils gewählten viralen Serotyp bestimmt zu werden, da Chao et al. Konzentrationsunterschiede im Bereich des 100fachen des transgenen Proteins in Abhängigkeit vom verwendeten AAV-Serotyp 1-5 nachweisen konnten (30). Notwendige post-translationale Modifizierungen der Faktorproteine werden in der Leber als ihrem angestammten Produktionsort wahrscheinlich ebenfalls reibungsloser als im Muskel vollzogen.

Bereits das Atemwegssekret gesunder Individuen erweist sich als Hindernis für den therapeutischen Gentransfer in die Lunge. Die hohe Viskosität des Sekrets von CF-Patienten, die zudem regelmäßig von einer Hyper- bzw. Metaplasie des Epithels begleitet ist, stellt für virale und nicht-virale Vektoren eine noch wesentlich imposantere und schwer zu durchdringende Barriere (13, 114). Wie schon bei der symptomatischen Therapie werden nun auch hier Mukolytika zur Überwindung dieses Hindernisses diskutiert (218). Wie bei den hämatologischen Erkrankungen wäre es sicherlich auch bei der CF wünschenswert, Stammzellen der epithelialen Zellreihe, die sich in die oberflächlichen Zellen des Epithels differenzieren, stabil zu transduzieren und so eine langfristige Korrektur des CFTR-Defekts zu erreichen. Diese sind in der Basalzellschicht der größeren Atemwege zu finden, Aerosole und andere topische Anwendung erreichen aber gerade einmal die obersten Zellschichten des Epithels. Die dortigen Zellen sind bereits maximal differenziert und haben eine durchschnittliche Lebensdauer von ca. 120 Tagen. Spätestens mit Ablauf dieses Zeitraums verfällt dann auch das Transgen (234, 252). Darüber hinaus wurde die höchste Expressionsrate des CFTR-Rezeptors in gesunden Individuen in den submukösen Drüsen der Atemwege

nachgewiesen (53, 117). Einerseits wirft diese Beobachtung die Frage nach der definitiven Zielzelle einer CF-Gentherapie auf, andererseits sind submuköse Zellen durch topische Vektor-Anwendung nicht erreichbar und die gemeinhin durchgeführte BAL oder die Messung der epithelialen Potentialdifferenz kann keinen Nachweis erfolgreich transfizierter Zellen liefern.

Bei adenoviralen Vektoren hängt die Effizienz der Transfektion unter anderem auch vom Vorhandensein bestimmter Integrine ab, die je nach Differenzierungsgrad des Epithels auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Davon unabhängige Mechanismen der Vektoraufnahme in die Zelle erlauben nur geringe Transfektionsraten (72). Obwohl das Atemwegsepithel das natürliche Ziel des Adenovirus darstellt, stellte sich heraus, dass der adenovirale CAR-Rezeptor sich auf der basalen Seite der Zelle befindet und somit ein pharmakologisches Aufbrechen der interzellulären tight junctions notwendig wird, um den Gentransfer in die Zellen zu erhöhen (173, 236). Dieser Prozess zieht möglicherweise aber eine Destabilisierung des Epithels und folglich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Ödembildung oder invasive Infektionen nach sich, was die klinische Anwendung problematisch macht.

Anstelle der Durchbrechung interzellulärer Barrieren ist auch eine Pseudotypisierung von Adenovektoren für an der Zelloberfläche natürlicherweise vorhandene Rezeptoren denkbar. Für Immunglobulinrezeptoren oder den Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor wurde diese *in vitro* schon erfolgreich durchgeführt (49). Ähnlich den Adenoviren mag auch die mangelnde Effektivität der AAV an basolateral gelegenen und damit durch ein Aerosol nicht erreichbaren Rezeptoren liegen. Doch auch von der Rezeptordichte unabhängige endosomale Barrieren werden diskutiert (51).

Alternativ zur topischen Anwendung bietet sich die systemische intravenöse Applikation eines Vektors an. Virale Vektoren besitzen einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Tropismus für verschiedene Gewebe, wie z.B. Adenoviren für die Leber, bei nicht-viralen Vektoren wurde eine vorrangige Ablagerung in der Lunge beobachtet (132). Um eine Verbesserung der Zielsicherheit der Therapie zu erreichen werden sowohl Veränderungen an der äußeren Hülle des jeweiligen Vektors als auch gezielte Ergänzungen im Vektorgenom selbst vorgenommen. Beide Verfahren können die „Treffsicherheit“ eines Vektors zwar signifikant erhöhen, bisher ist allerdings trotz

verschiedenster Manipulationen noch von keinem ausschließlichen Tropismus für eine bestimmte Zellart bzw. Organ berichtet worden. Solange dies nicht der Fall ist bieten alle Arten von Vektoren bei einer intravenösen Anwendung die Gefahr einer unkontrollierten Dissemination in verschiedenste Organsystem mit nicht vorhersehbaren Konsequenzen für den Gesamtorganismus.

Obwohl die Transduktionsmethoden für periphere lymphozytäre Zellen und lymphatische Stammzellen im Laufe eines Jahrzehnts kontinuierlich verbessert wurden, werden im allerbesten Fall 40% der Zellen erreicht (2, 15, 18, 27, 28, 75, 118). Pluripotente, sog. unsterbliche Hämatopoietische Stammzellen befinden sich *in vivo* zumeist in einem Ruhezustand, während der größte proliferative Beitrag von sich selektiv differenzierenden Vorläuferzellen der jeweiligen Zellreihen geleistet wird (120, 237). Die Ergebnisse der Pariser XSCID-Gruppe sprechen für eine erfolgreiche Transduktion zumindest einiger dieser Knochenmark-Vorläuferzellen (CFUs), deren Lebenszeit im Knochenmark ca. zwei Jahre beträgt. Nimmt man nun gleichzeitig eine sehr kleine Anzahl transgener

pluripotenter CD34+CD38- Zellen an, würde der proliferative Effekt der CFUs entsprechend schnell verschwinden.

Da nun aber bei den SCID-Erkrankungen ein selektiver Wachstumsvorteil für genetisch korrigierte Zellen vorzuliegen scheint, kann besagte primär zahlenmäßige

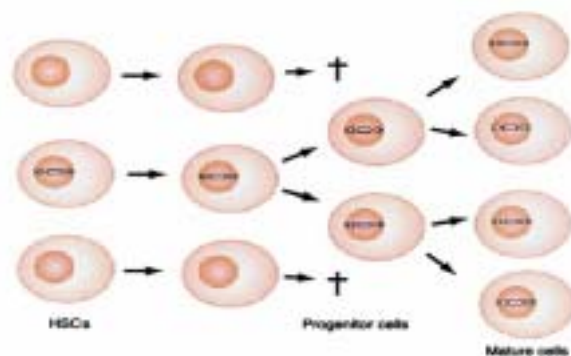


Abb.: Wachstumsvorteil für genetisch korrigierte Zellen; Zellen ohne das Transgen werden verdrängt oder sterben vorzeitig (aus 120)

Unterlegenheit der korrigierten Stamm- und Vorläuferzellen vom Organismus durch entsprechende Proliferation wieder ausgeglichen werden. Dies führt dann trotz niedriger Transduktionsraten zu einer genetischen Korrektur der hämatopoetischen Zellreihen und dem berichteten klinisch sichtbaren Erfolg (2, 75, 124, 216). Dennoch ist der metabolische Defekt der ADA-Form mit von transgenen T-Zellen synthetisierter ADA nicht vollständig auszugleichen, da sich 98% der ADA-Aktivität in Erythrozyten abspielt. Die Korrektur dieser Zellen durch eine Transduktion entsprechender

erythropoetischer Stammzellen ist für einen vollständigen therapeutischen Erfolg auf genetischer Basis demnach essentiell.

Plasmid-Vektoren sind nach dem Eintritt in die Zelle einem endosomalen Abbau ohne spezielle Gegenmaßnahmen quasi schutzlos ausgeliefert. Das Einbetten der nackten DNA in liposomale Hüllstrukturen schafft hier zwar Abhilfe, je nach Art des verwendeten Lipidkomplexes können aber mithin ausgeprägte immunologische Abwehrmechanismen provoziert werden (5, 199). Werden Dosierungen verwendet, die ohne nachweisliche Immunreaktion bleiben, wird in der Regel auch nur ein minimaler Gentransfer in die Zielzellen erreicht (5, 104, 105, 159, 199). Die schlussendliche Expression des Transgens ist weiterhin von einem Transport des Plasmids in den Nukleus abhängig, was nur einem winzigen Anteil der aus den Endosomen freigesetzten Plasmiden gelingt. Schuld daran ist zum einen die für Plasmide schwer überwindbare Kernmembran, zum anderen eine cytosolische Nuklease, die den größten Anteil der DNA sofort degradiert (126). Eine Blockade dieses Enzyms genauso wie eine Erleichterung des Übertritts in den Zellkern scheinen unerlässlich, um ausreichend genetisches Material in den Nukleus der Zielzelle zu befördern und die Plasmid-basierte Gentherapie in die Nähe der Effizienz und Lebensdauer viraler Verfahren zu bringen.

Im Gegensatz dazu haben Viren effektive Mechanismen entwickelt, um den Weg bis in den Zellkern relativ unbeschadet zu meistern. Aber auch nach vollkommener Überwindung zellulärer Eintrittsbarrieren persistiert adenovirale DNA im Zellkern nur in einem episomalen und damit vor allem bei häufiger Zellteilung kurzdauernden Zustand. Ähnlich den Plasmiden wird auch die Internalisierung des Genoms von AAV-basierten Vektoren durch endosomale Verdauungsmechanismen und eine schwierige Penetration der Kernmembran behindert (51), so dass mitunter nur ein Drittel der Menge des durch PCR identifizierten Transgens sich tatsächlich per in-situ-Hybridisierung als im Zellkern gelegen nachweisen lässt (176). Als einziger sicher integrierender Vektor haben die Retroviren trotz der Verwendung neuerer lentiviraler Partikel immer noch mit einer effizienten Transfektion sich nicht teilender Zellen zu kämpfen.

Die Expression von Genen unterliegt einer natürlichen Regulation innerhalb des Organismus, um bestimmte Muster der Proteinproduktion aufrechtzuerhalten. Im Idealfall sollte deshalb ein Transgen in derselben Art und Weise exprimiert werden wie das gesunde Gen. Die Auswahl des dem jeweiligen Gen vorgeschalteten Promotors hat hierbei weitreichende Auswirkungen auf die tatsächliche Proteinsynthese, bisher waren die Raten des Gentransfers jedoch zu gering, um die Auswirkungen der üblicherweise verwendeten starken viralen Promotoren eindeutig beurteilen zu können. So wird sich erst nach einer Steigerung des Gentransfers erweisen, ob diese Promotoren trotz ihrer mangelnden Zellspezifität für die Verwendung in Vektorkonstrukten der humanen Gentherapie geeignet sind. Einer Beschränkung bzw. exakten Regulation der Expression des Transgens kommt eine entscheidende Bedeutung zu, wenn toxische oder anderweitig negative Effekte von einer heterotopen oder übermäßigen Genexpression zu erwarten sind. Bei der CF sind beispielsweise Veränderungen des Membranpotentials und der Wachstumsrate nach der Expression des CFTR in nicht-epithelialen Zellen (220) als auch eine durch Überexpression in der Lunge bedingte stark erhöhte Mortalität von Versuchstieren (125) beschrieben worden.

Der retrovirale MoMuLV-Vektor erzeugt in reifen T-Lymphozyten trotz guter Transfektionseffektivität nur niedrige Expressionsraten, was diese Zellen als Ziel der SCID-Therapie ins Hintertreffen gegenüber hämatopoietischen Stammzellen brachte. Die jeweils verwendeten Transgene stehen unter der Kontrolle der viralen LTR. Retrovirale LTR haben in der Vergangenheit aber immer wieder *silencing*-Effekte *in vivo* gezeigt, die eine längerfristige Expression des Transgens verhinderten. In einer der SCID-Studien konnte wohl auch wegen solcher *silencing*-Effekte die ADA-Substitution nach erfolgter Gentherapie nicht abgesetzt werden (118, 120).

Diese *silencing*-Effekte sind wahrscheinlich auf zelluläre Mechanismen zurückzuführen, die zur Abwehr viraler Wildtyp-Infektionen dienen. Die am häufigsten verwendeten viralen Promotoren wie die retrovirale LTR, CMV und SV40 Promotoren zeigten denn auch bei *in vitro*-Studien eine deutliche Promotor-Abschwächung durch Cytokine wie IFN- γ oder TNF- α (185). Diese Attenuation vollzieht sich auf der Stufe der mRNA und verläuft ohne eine Zerstörung der Vektor-DNA oder der transfizierten Zellen. Eukaryote Promotoren oder eine Inhibition der beteiligten Cytokine könnten

hier Besserung versprechen, ein weiterer Schritt wäre zudem, Promotoren zu finden, die das natürliche Expressionsmuster des defekten Gens in den Zielzellen *in vivo* nachahmen. Für das CFTR-Gen, dessen eigentlichen, natürlichen Expressionsantriebe noch unklar sind, scheinen virale Promotoren den eukaryoten Gegenspielern noch im Hinblick auf Ausmaß und Dauer der Expression des Transgens überlegen zu sein (13, 176), allerdings sind schon wesentlich stärkere Kandidaten quasi-spezifischer eukaryoter Promotoren in der Diskussion (35).

Die große Problematik bei der Gentherapie mit dem AAV ist die limitierte Insertionsfläche von maximal ca. 4,7 kb, die dieser Vektor bietet. Sowohl für das Gen des Gerinnungsfaktors VIII als auch für das CFTR-Gen der Cystischen Fibrose mussten deshalb *mini-* oder *split-*Konstrukte entworfen werden, um Gen und Promoter im AAV Capsid verpacken zu können (24, 30, 31, 251). Dies lässt dennoch wenig Spielraum für das Einbringen größerer eukaryotischer Promotoren, die womöglich im menschlichen Organismus wesentlich ausgeprägtere Effizienz zeigen würden.

4.2. Balance etablierter und gentherapeutischer Verfahren

In einer Langzeitbeobachtung von mit allogenen Knochenmark transplantierten SCID-Patienten zeigte sich ein Wiederaufflammen der Thymusfunktion mit einem Gipfel in den ersten zwei Jahren nach der Transplantation. Dann folgte ein Abfall bis auf nicht mehr nachweisbaren T-Zellausstoß innerhalb von 14 Jahren. Der gleiche Prozess dauert in gesunden Individuen etwa 80 Jahre (174). Patel et al. äußerten deshalb den Verdacht, dass die bei SCID-Patienten bekanntermaßen nur residuale Thymusdrüse nach der Transplantation mit dem Ausstoß großer Zahlen nun funktionsfähiger Zellen überfordert sei, bzw. zu wenige Stammzellen den Weg in den Thymus gefunden hätten. In dem für einen Zeitraum von 18 Jahren studierten Patientenkollektiv von 83 Kindern war allerdings noch bei keinem eine Verminderung der Immunkompetenz aufgetreten. Bei der Pariser X-SCID-Therapie wurde ebenfalls eine sonographische Kontrolle durchgeführt, die bei vier erfolgreich behandelten Patienten eine substantielle Thymusdrüse demonstrierte. Dies könnte bei gleichzeitig persistierender Lympho- und Thymopoese zu einem der entscheidenden Vorteile der Gentherapie gegenüber der Knochenmark-Transplantation avancieren. Auch weil in schweren Fällen ein rasches Handeln die einzige Überlebenschance darstellt, muss eine Knochenmarkstransplantation im Vergleich zur Gentherapie sehr frühzeitig durchgeführt werden. Da klinische Zeichen in der Regel aber erst nach mehreren Monaten auffällig werden, muss ein Blutbild-Screening durchgeführt werden, um rechtzeitig eingreifen zu können (22). Der hierfür notwendige kollektive Aufwand muss konsequenterweise in Relation zur exorbitant teuren, aber auch zu einem späten Zeitpunkt noch sehr wirksamen Gentherapie gesetzt werden. Dennoch muss auch hier angemerkt werden, dass zumindest in der erfolgreichsten ADA-Studie ein deutlicher Unterschied hinsichtlich des Gentransfers zwischen dem jüngeren und dem älteren Patienten augenfällig war, wenn auch ohne signifikantes klinisches Korrelat (2). Die Kosten für die konventionelle Behandlung der X-SCID betragen ca. 60.000 Euro pro Jahr, für die PEG-ADA Substitutionstherapie ca. 100.000 Euro pro Jahr für Kleinkinder und 2-3 soviel für ältere Patienten (86). Die in der Studie von Aiuti et al. behandelten Kinder hatten aufgrund ihrer Staatsangehörigkeit keinen Zugang zu einer vom italienischen Gesundheitswesen subventionierten Therapie. Bei o.g. Kosten ist es auch keine allzu große Überraschung, dass sich die Eltern außer

Stände sahen, eine PEG-ADA Therapie selbst zu finanzieren (2). Eine einmalige erfolgreiche Gentherapie könnte hier tatsächlich trotz des punktuell erheblichen Aufwandes ebenfalls eine gewisse Erleichterung verschaffen.

Im weiteren direkten Vergleich mit der allogenen und hier v.a. der haploidentischen Knochenmarks-Transplantation zeigt die Gentherapie Hämatopoietischer Stammzellen eine deutlich schnellere und imposantere Rekonstitution der T-Zellzahlen zwischen 2000-8000/ μ l verglichen mit Werten um die 2000/ μ l für Knochenmarks-Transplantationen. Bei der ADA-Form war zumindest bei einem Patienten auch eine beinahe 100% Transduktionsrate und eine Rekonstitution der B-Zellen auf bis zu 1200/ μ l nachweisbar, diese bleibt nach Knochenmarks-Transplantationen regelmäßig aus (2, 22, 23, 75, 77). Über die rein zahlenmäßige Wiederherstellung eines funktionierenden Immunsystems hinaus muss sich der Erfolg der Therapie natürlich auch an der Notwendigkeit der Immunglobulin- und/oder ADA-Substitution messen lassen. Diese war soweit in keinem der sechs erfolgreich mit korrigierten hämatopoietischen Stammzellen behandelten Patienten notwendig, was selbst bei niedrigen B-Zellzahlen für eine ausreichende eigene Immunglobulinproduktion spricht. Im Gegensatz dazu bedurften über die Hälfte der Patienten in einer der Knochenmarks-Transplantationsstudien zusätzliche Immunglobulininfusionen (23). Bei der X-SCID ist allerdings noch unklar, ob die wenigen transduzierten B-Zellen (~1%) tatsächlich die Ig-Produktion übernommen haben, oder ob diese Funktion von nicht-transduzierten B-Zellen übernommen wurde. Eine im Verhältnis höhere Anzahl von B-Gedächtniszellen als γ_c -korrigierte Zellen spricht zumindest teilweise für diese Annahme. Bei mit korrigierten PBL behandelten Patienten blieben die wenigen Versuche, die beibehaltene ADA-Substitution abzusetzen bis auf eine Ausnahme erfolglos (2, 118). Selbst dort konnte die für die systemischen Auswirkungen entscheidende Detoxifikationsfunktion der ADA nicht ausreichend wiederhergestellt werden und die toxischen Abbauprodukte stiegen wieder an (2). Die Transfektion reifer Lymphozyten scheint soweit nur unter einer Beibehaltung des PEG-ADA-Schemas sinnvoll, obschon es das erklärte Ziel der Gentherapie ist, durch Beseitigung der genetischen Ursache exakt diese Substitution von Genprodukten überflüssig zu machen. Bis heute kann nur die Therapie mit transduzierten hämatopoietischen Stammzellen dieses Attribut ins Feld tragen.

Für die selteneren Formen der SCID stellt die Knochenmarks-Transplantation mit ihrer unter idealen Bedingungen durchaus beeindruckenden Immunrestitution und Überlebensrate als potentes Heilmittel aller SCID-Formen immer noch die dominante therapeutische Option (23, 77, 150). Überdies mag es sich im Gegensatz zur nicht notwendigen Regulierung der Transgenexpression der γ_c und ADA als wesentlich schwieriger erweisen, die in den anderen SCID-Formen involvierten Gene strengen Expressionsgrenzen zu unterwerfen.

Bei der Hämophilie haben sich gentherapeutische Ansätze an der Etablierung von 1-2% der normalen Faktorkonzentration orientiert, um spontane Blutungen zu verhindern (134, 177). Eine Verbesserung der Lebensqualität höchstgefährdeter Bluter kann durch solche Konzentrationen definitiv erreicht werden. Chronische Gelenkerkrankungen allerdings, wie sie vor allem bei langjährigen Blutern bestehen, machen im klinischen Alltag schon heute die Anwendung hochdosierter Gerinnungsfaktor-Therapie notwendig, so dass die o.g. Konzentrationen hier wohl nicht ausreichend sein werden. Wahrscheinlich sind mindestens 30% an aktivem Faktor im Blut notwendig, um z.B. auch durch akzidentelle Verletzungen verursachte schwere Blutungen zu verhindern (44). Bisher wurden von zwei Forschungsgruppen Faktorkonzentrationen um die 1% auch beim Menschen nach gentherapeutischer Intervention berichtet (111, 153). Unglücklicherweise betreffen die die Substitutionstherapie mit rekombinanten oder humanen Faktor erschwerenden Auswirkungen inhibitorischer Antikörper auch zahlreiche gentherapeutische Anwendungen. Darüber hinaus ist die Hämophilie eine weltweit verbreitete Erkrankung, die mit einem Mangel an zur Verfügung stehenden Faktorkonzentrationen zu kämpfen hat (3). Bis zu vier Fünftel aller Patienten weltweit erhalten jetzt schon keine Therapie mit Faktorkonzentrationen (14). Eine globale Verbreitung gentherapeutischer Maßnahmen ist deshalb genauso wie eine weithin finanzierbare Form dieser Therapie noch schwer vorstellbar.

Im genetisch manipulierten Mausmodell und bei bestimmten natürlich vorkommenden Mutationen des CF-Gens konnte gezeigt werden, dass bereits eine CFTR-Expression in Höhe von etwa 5% des Normalen wesentlich mildere phänotypische Erscheinungen bewirkt. Noch liegt kein Bericht über einen erfolgreichen Gentransfer dieses Ausmaßes in den menschlichen Respirationstrakt vor. Und auch dann muss sich erst zeigen, ob diese oder erst wesentlich höhere Expressionsraten des CFTR-Gens auch klinisch

reproduzierbare Verbesserungen erbringen. Die verminderte Expression des Proteins durch *alle* Zellen und die erhöhte Expression des Proteins durch ca. 5% der Zellen müssen nicht zwangsläufig die gleichen Auswirkungen zeigen. Solange bleibt die etablierte symptomatisch-medikamentöse Therapie wohl die einzige Alternative für Patienten mit dieser Erkrankung. Inwiefern Screening-Programme zur Früherkennung der Cystischen Fibrose auch im Hinblick auf eine vielleicht bald effektivere genetische Therapie von Nutzen sein könnten, muss gesondert diskutiert werden.

4.3. Klinische Umsetzbarkeit der Gentherapie

4.3.1. Invasivität, Expansivität, Toxizität

Sowohl die Knochenmarkstransplantation nach entsprechender T-Zell-Depletion als auch die Stammzell-Gentherapie ohne myeloablative Therapie mit Chemotherapeutika zeigen eine hohe Effizienz des Gentransfers bei SCID-Patienten. Beide Therapieformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Toxizität nur geringfügig (23, 27, 28, 75, 150). Ein limitiertes chemotherapeutisches „Platzschaffen“ im Knochenmark mit verringerten Dosierungen wurde jedoch als vorteilhaft für die Einnistung korrigierter hämatopoetischer Stammzellen propagiert (2).

Muskel als Zielorgan der Gentherapie bietet einen sehr praktikablen Zugangsweg durch einfache intramuskuläre Injektion und eine zumindest theoretische Reversibilität der Therapie durch Exzision des transfizierten Gewebes. Eine hepatische Therapie war bisher hingegen mit intraportalen Infusionen verbunden, deren Voraussetzung eine unter Allgemeinanästhesie durchgeführte Laparotomie ist. Dazu ist sie, einmal verabreicht, irreversibel. Die effektive Transduktion von Hepatozyten mit nicht-viralen Vektoren erforderte zudem entsprechende Druckgradienten, um das Transgen in die Zellen zu schleusen. Ob sich dieses System als Umgehung der viralen Vektoren als praktikabel erweisen wird, ist abgesehen von noch nicht geklärten möglichen immunologischen Spätfolgen auch davon abhängig, ob ein der hydrodynamischen Methode gleichwertiges System mit weitaus geringerer Einwirkung auf den Organismus gefunden werden kann (142, 246).

Von erheblichem invasivem Charakter ist auch die laparoskopische Implantation bei der Transplantation transgener Zellen, zudem ist für jeden einzelnen Patienten eine aufwendige Präparation des Transplantats notwendig (197). Allerdings könnten die mit viralen Vektoren verbundenen immunologischen oder mutagenen Probleme wahrscheinlich umgangen werden.

Im Sinne einer klinisch praktikablen Methode wäre sicherlich auch eine effektive orale Anwendungsform eines Transgens mehr als wünschenswert. Die mit Plasmiden zum Beispiel an hämophilen Mäusen durchgeführten Experimente waren unglücklicherweise bisher sehr ineffektiv und bieten zudem noch eine Unzahl von offenen Fragen

hinsichtlich der Verarbeitung und Expression des Transgens, grundsätzlich lassen sie aber solche Anwendungsformen möglich erscheinen (162).

4.3.2. Assoziierte Mortalität und Morbidität

Eines der wohl gewichtigsten Argumente vor allem auch gegen die hepatische Gentherapie stellt der bisher einzige Todesfall im Rahmen der Therapie monogenetischer Erbkrankheiten dar. Der 18-jährige Jesse Gelsinger, der an der seltenen Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz litt, verstarb im September 1999 wenige Tage nach der Injektion von $3,8 \times 10^{13}$ adenoviralen Vektoren in seine Arteria Hepatica. Die genaue Todesursache konnte nicht völlig geklärt werden, eine Akkumulation des Vektors in Lymphknoten, Milz und Knochenmark konnte allerdings autoptisch gesichert werden. Diese Dissemination des Vektors war wohl die Grundlage für eine massive Immunantwort seines Körpers, gefolgt von einem letztlich lethalem Multiorganversagen (139, 155). Interessanterweise waren bei einer weiblichen Versuchsperson, die eine ähnlich hohe Dosis des Vektors erhielt, keine unerwünschten Wirkungen desselben auszumachen. Eine mögliche Sensibilisierung gegenüber dem Vektor durch eine vorangehende Wildtyp-Infektion mag eine Erklärung für dieses Phänomen sein (19), vor allem da spätere Studien an Affen eher auf eine Assoziation der inflammatorischen Reaktion mit den Proteinen des Viruskapsids als mit der genetischen Ladung des Vektors hinwiesen (208). Der Fall Gelsinger war einer der entscheidenden Gründe für einen längerfristigen Stop hepatischer Therapieversuche bei Blutern und einer Konzentration auf die muskuläre Therapie (73).

Die bei retroviralen Studien immer mitschwingende Furcht vor mutagenen Insertionseffekten bekam ausgerechnet durch kürzlich beobachtete kanzerogene Effekte der Therapie bei zwei der erfolgreich behandelten französischen X-SCID-Patienten neue Berechtigung. Durch die Insertion des Vektorgenoms in der Nähe oder direkt im LOM2-Onkogen einzelner Zellen scheint es zu dessen Aktivierung und damit zur malignen, leukämieartigen Proliferation dieser Zellen gekommen zu sein. Bei einem dritten Kind wurde ebenfalls eine entsprechende Insertion allerdings ohne mutagene Effekte festgestellt (33, 76,109). Wie oben erwähnt, basiert der therapeutische Effekt der von Calvazzano-Calvo et al. erfolgreich durchgeführten Therapie eben auf einem

proliferativen Vorteil der genetisch modifizierten Lymphozyten, der aber offensichtlich Gefahr läuft, durch gleichzeitige insertionale Effekte maligne Ausmaße zu erreichen. Aus diesem Grund hat in der Folge auch das Biological Response Modifiers Advisory Committee (BRMAC) der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA), die Anwendung der X-SCID-Gentherapie nur noch als eine lediglich therapeutische Reserve bei nicht verfügbarer Primärtherapie wie einer Knochenmarkstransplantation empfohlen (32).

4.3.3. Keimbahntransfer, Mutagenesis, Replikationsfähige Viren

Der Transfer genetischen Materials in die Keimbahn und damit eine Weitergabe des veränderten Genoms an kommende Generationen bleibt wohl einer der am heftigsten diskutierten Punkte gentherapeutischer Forschung. Bisher konnte allerdings in keiner der hier betrachteten Studien die Übertragung des Transgens in Keimzellen nachgewiesen werden. Ein transientes Vorliegen der exogenen DNA in Körperflüssigkeiten war allerdings durchaus in einer größeren Zahl von Studien zu beobachten. Natürlich drehen sich die Hauptbedenken im Rahmen des Keimbahntransfers weniger um die Weitervererbung eines korrigierten Defektes, was schwerlich als belastend für die nächsten Generationen ausgelegt werden könnte. Vielmehr veranlassen die auch weiterhin nur schemenhaft beleuchteten Prozesse der Weiterverarbeitung genetischer Information während des Reifungsprozesses eines Organismus *in utero* zur Sorge um eine deletiöse Veränderung von in die Keimbahn transferierter Gene. Einerseits sind bereits zahlreiche mutagene und lebensverkürzende Effekte aus der Keimzellforschung mit Tieren bekannt, andererseits bergen vor allem einige virale Vektoren das Potential zu verheerenden insertionalen mutagenen Veränderungen des Genoms. Plasmide hingegen persistieren offensichtlich in einem recht stabilen episomalen Zustand, der eine Übertragung in die Keimbahn verhindern, bzw. insertionale Effekt unwahrscheinlich machen würde.

Vor allem retrovirale aber auch andere virale Vektoren tragen sowohl das Versprechen einer durch Integration lang anhaltenden Transfektion der Zielzellen als auch das Stigma einer potentiellen Bildung rekombinanter, replikationsfähiger Partikel oder mutagener Auswirkungen des Transgens im Organismus. Obwohl ein Keimbahntransfer

bisher oder die Bildung replikationsfähiger Partikel bisher nicht nachgewiesen werden konnten, ist die o.g. mutagene Auswirkung eines Vektors ein herber Rückschlag für die Gentherapie. Hinzu kommt, dass die mögliche Entartung eines integrierten Vektors mithin eher eine Frage von Dekaden als von wenigen Tagen sein kann. Sowohl die in Tiermodellen beobachteten mutagenen Effekte der Gentherapie (98) als auch die Etablierung einer besseren Vergleichbarkeit mit bestehenden Therapieformen machen eine Langzeitbeobachtung gentherapeutisch behandelter Patienten deshalb essentiell.

4.3.4. Behandlung von Chemoresistenz durch Gentherapie

In letzter Zeit wurden gentherapeutische Verfahren für das Einbringen von Chemoresistenzgenen in CD 34+ Zellen entwickelt. Da die begleitende Myelotoxizität hochintensiver Verfahren zum Beispiel bei Keimzelltumoren, multiplen Myelomen oder hochgradigen Lymphomen deren Behandlung oft limitiert, wäre eine Resistenz der im Rahmen der Therapie substituierten hämatopoietischen Zellen sicherlich ein Schritt in Richtung intensiverer und mithin auch effizienterer Verfahren. Auch wenn diese Form der Gentherapie ebenfalls noch am Beginn ihrer Entwicklung steht und nicht alle der bisher identifizierten Resistenzgene in beliebiger Zahl in Zellen einzubringen sind, verspricht sie doch Hoffnung für ein großes Kollektiv von Patienten, die mit den bisherigen Schemata nur begrenzt therapierbar waren (129).

5. Resümee

Zum heutigen Zeitpunkt kann man sowohl für die X- als auch die ADA-SCID zwar keine vollständige aber dennoch eine soweit protektive Rekonstitution des Immunsystems durch somatische Gentherapie bei insgesamt sechs Patienten konstatieren. Die erzielten klinischen und labortechnischen Ergebnisse erweisen sich in vielen Belangen denen der konventionell durchgeführten Knochenmarkstransplantation überlegen. Vor allem aber ist eine effektive ursächliche Therapie und damit eine Einstellung der Substitution von Genprodukten erreicht worden. Ein Keimbahntransfer des Transgens oder direkte toxische Effekte des Provirus konnten bislang nicht nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz wirft die kürzliche Entdeckung des mutagenen insertionalen Effektes des verwendeten Retrovirus die Gentherapie der SCID erneut zurück und hat dafür gesorgt, dass nun etablierte Knochenmarkstransplantationen wieder als das Mittel der Wahl propagiert werden.

Eine Minderung der Blutungsneigung bei von der schwersten Ausprägung der Erkrankung betroffenen hämophilen Patienten scheint mit der Anwendung adenoviraler und AAV-Vektoren in greifbare Nähe gerückt zu sein. Dieser Effekt kann schon mit minimalen Konzentration des transgenen Faktors erreicht werden, eine darüber hinausgehende Prävention vor akzidentellen Blutungen und den Folgeerscheinungen der Bluterkrankheit bleibt bis auf weiteres die Domäne rekombinanter oder humaner Faktorenkonzentrate. Perspektivisch kann die Gentherapie bewährte Methoden wohl auch in näherer Zukunft nicht ersetzen, denkbar ist aber eine Art Basisschutz durch transgenen Faktor, der die Lebensqualität schwer kranker Bluter erheblich verbessern dürfte.

Für die cystische Fibrose existiert bis dato kein gentherapeutisches Verfahren, das eine signifikante klinische Verbesserung betroffener Patienten erreichen kann. Die Therapie der Cystischen Fibrose steht exemplarisch für die Schwierigkeiten einer lokal begrenzten Anwendung gentherapeutischer Verfahren, die auch bei Erkrankungen wie der Muskeldystrophie (7, 56, 212, 160) zu sehen sind. Da das Ziel hier in einer Funktionsverbesserung der Zielzellen besteht, stellt die größte Hürde immer noch die Aufgabe, das Transgen möglichst gleichmäßig auf diese zu verteilen, um den gewünschten Effekt im ganzen Organ zu erzielen. Im Gegensatz zur Institution der

Produktion und Ausschüttung eines transgenen Proteins wird dieses gentherapeutische Problem wohl noch einige Jahre bis zu seiner Lösung in Anspruch nehmen.

Nichtvirale Vektoren, wie z.B. nackte DNA, Plasmide oder transposable Elemente sind allein wegen der Möglichkeit sie in großen Mengen zu relativ niedrigen Kosten herstellen zu können eine reizvolle Spielart der Gentherapie. Die bei diesen Systemen aufgetretenen Probleme der Integration und langfristigen Expression von Transgenen müssen allerdings noch überwunden werden, ohne dabei den Organismus allzu dramatischen Prozeduren auszusetzen. Auch viele Vektorapplikationen setzen noch größere chirurgische Eingriffe voraus, die eine Anwendung für größere Patientenkollektive schwer vorstellbar machen. Abgesehen von der schieren physikalischen Belastung der Patienten auf der einen Seite kann auch die monetäre und logistische Belastung der beteiligten Institutionen des Gesundheitswesens nicht vernachlässigt werden. Deshalb muss die Entwicklung eines industriell herstellbaren und einfach verabreichbaren Vektors das Ziel für eine nicht nur zahlungskräftigen Einzelindividuen zur Verfügung stehende Therapie sein.

LITERATUR

1. Aitken ML, Moss RB, Waltz DA et al.; A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease; *Hum Gen Ther* 2001; 12:1907
2. Aiuti A, Slavin S, Aker M et al.; Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning; *Science* 2002; 296:2410
3. Aledort LM et al; Correspondence in *N Engl J Med* 2001; 14: 1066
4. Allen JM, Debelak DJ, Reynolds TC, Miller AD; Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production; *J Virol* 1997; 71:6816
5. Alton EFWF, Stern M, Farley R et al.; Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial; *Lancet* 1999; 353:947
6. Andrews JL, Kadan MJ, Gorziglia MI et al.; Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII; *Mol Ther* 2001; 3:329
7. Angelini C, Bonifati DM; New therapies in muscular dystrophies; *Neurol Sci* 2000; 21:S919
8. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M et al.; Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A : Results of an international consortium study ; *Blood* 1995 ; 86 :2206
9. Armamento D, Zabner J, Sacks C et al.; Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors; *J Virol* 1997; 71:2408
10. Aiuti A, Vai S, Mortellaro A et al.; Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement; *Nat Med* 2002; 8:423
11. Bartelett JS, Wilcher R, Samulski RJ; Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors; *J Virol* 2000; 74:2777
12. Beck SE, Jones LA, Chesnut K et al.; Repeated delivery of adeno-associated virus vectors to the rabbit airway ; *J Virol* 1999 ; 73 :9446
13. Bellon G, Michel-Calemard L, Thouvenot D et al.; Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients : a phase I clinical trial ; *Hum Gen Ther* 1997 ; 8 :15
14. Bird A, Isarangkura P, Almagro D et al.; Factor concentrates for haemophilia in the developing world; *Haemophilia* 1998; 4:481
15. Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al.; T lymphocyte directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years; *Science* 1995; 270:475
16. Blanchette VS, Vorstman E, Shore A et al.; Hepatitis C infection in children with hemophilia A and B; *Blood* 1991; 78:285
17. Bollinger ME, Arrendo-Verga FX, Santisteban I et al.; Brief report: hepatic dysfunction as a complication of adenosine deaminase deficiency; *N Engl J Med* 1996; 334:1367
18. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N et al.; Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients; *Science* 1995; 270:470

19. Bostanci A; Blood test flags agent in death of Penn subject; *Science* 2002; 295:604
20. Bowling WM, Kennedy SC et al.; Portal branch occlusion safely facilitates in vivo retroviral vector transduction of rat liver; *Hum Gene Ther* 1996; 7:2113
21. Brackmann HH; Induced immunotolerance in factor VIII inhibitor patients; *Progr Clin Biol Res* 1986; 150:180
22. Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE et al.; Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic and functional diversity in one hundred eight infants; *J Pediatr* 1997; 130:378
23. Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI et al.; Hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency; *N Engl J Med* 1999; 340:508
24. Burton M, Nakai H, Colosi P et al.; Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein; *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 95:12725
25. Candotti F, Johnston JA, Puck JM et al.; Retroviral-mediated gene correction for X-linked severe combined immunodeficiency; *Blood* 1996; 87:3097
26. Cao L, Liu Y, Durning MJ, Xiao W; High-titer, wild-type free recombinant adeno-associated virus vector production using intron-containing helper plasmids; *J Virol* 2000; 74:11456
27. Cavazzano-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G et al.; Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease; *Science* 2000; 288:669
28. Cavazzano-Calvo M, Hacein-Bey S, Yates F et al.; Gene therapy of severe combined immunodeficiencies; *J Gene Med* 2001; 3:201
29. Chadwick SL, Kingston HD, Stern M et al.; Safety of a single aerosol administration of escalating doses of the cationic lipid GL-67/DOPE/DMPE-PEG5000 formulation to the lungs of normal volunteers; *Gene Ther* 1997;4:937
30. Chao H, Liu Y, Rabinowitz J et al.; Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors; *Mol Ther* 2000; 2:619
31. Chao H, Mao L, Bruce AT et al.; Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector; *Blood* 2000; 95:1594
32. Check E; Cancer risk prompts US to curb gene therapy; *Nature* 2003; 422:7
33. Check E; Gene therapy: a tragic setback; *Nature* 2002; 420:116
34. Chen ZY, Yant SR, He CY et al.; Linear DNAs concatemere in vivo and result in sustained transgene expression in mouse liver; *Mol Ther* 2001; 3:403
35. Chow YH, Plumb J, Wen Y et al.; Targeting transgene expression to airway epithelia and submucosal glands, prominent sites of human CFTR expression; *Mol Ther* 2000; 2:359
36. Chuah MK, VanDamme A, Zwinnen H et al.; Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice; *Hum Gene Ther* 2000; 11:729
37. Coffin JM; Retroviridae and their replication; in Fields BN, Knipe DM (eds); *Fundamental Virology* (2nd edition); Raven Press Ltd., New York, NY, USA, 1991
38. Coffin JM; *Retroviridae: The viruses and their replication*; Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA, 1996

39. Conelly S, Andrews JL, Gallo AM et al.; Sustained phenotypic correction of murine haemophilia A by in vivo gene therapy; *Blood* 1998; 91:3273
40. Danos O, Mulligan RC; Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges; *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:6460
41. Davies JC, Geddes DM, Alton EFW; Gene therapy for cystic fibrosis; *J Gene Med* 2001; 3:409
42. Davis PB, Drumm M, Konstan W; Cystic fibrosis; *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1229
43. De Feyter R, Li P; Technology evaluation: HIV ribozyme gene therapy, Gene Shears Pty Ltd.; *Curr Opin Mol Ther* 2000; 2:332
44. Di Michele D, Neufeld JE; Haemophilia: a new approach to an old disease; *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12:1315
45. Di Santo JP, Kuhn R, Muller W; Common cytokine receptor gamma chain (gamma-c)-dependent cytokines understanding in vivo functions by gene targeting; *Immunol Rev* 1995; 148:19
46. Dorin JR, Dickinson P, Alton EW et al.; Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis; *Nature* 1992; 359:211
47. Dorin JR, Farley R, Webb S et al.; A demonstration using mouse models that successful gene therapy for cystic fibrosis requires only partial gene correction; *Gene Ther* 1996; 3:797
48. Dornburg R; From the natural evolution to the genetic manipulation of the host range of retroviruses; *Biol Chem* 1997; 378:457
49. Drapkin PT, O'Riordan CR, Yi SM et al.; Targeting the urokinase plasminogen activator receptor enhances gene transfer to human airway epithelia; *J Clin Invest* 2000; 105:589
50. Drittanti L, Jenny C, Poulard K et al.; Optimised helper virus free production of high quality adeno-associated virus vectors ; *J Gene Med* 2001 ; 3 :59
51. Duan D, Yue Y, Yan Z et al.; Endosomal processing limits gene transfer to polarized epithelia by adeno-associated virus ; *J Clin Invest* 2000 ; 105 :1573
52. Duncan JR, Hicks M, Cai SR et al.; Embolization of portal vein branches induces hepatocyte replication in swine. A potential step in hepatic gene therapy; *Radiology* 1999; 210:467
53. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA et al.; Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus; *Nat Genet* 1992; 2:240
54. Fakharzadeh SS, Zhang Y, Sarkar R et al.; Correction of the coagulation defect in hemophilia A mice through factor VIII expression in skin; *Blood* 2000; 95:2799
55. Fang B, Wang H, Gordon G et al.; Lack of persistence of E1-recombinant adenoviral vectors containing a temperature sensitive E2A mutation in immunocompetent mice and hemophilia B dogs; *Gene Ther* 1996; 3:217
56. Fassati A, Bresolin N; Retroviral vectors for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy; *Neurol Sci* 2000; 21:S925
57. Fassati A, Dunckley MG, Dickson G; Retroviral vectors; in Dickson G (ed): *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*; Chapman and Hall, 1995

58. Fewell JG, MacLaughlin F, Mehta V et al.; Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation; *Mol Ther* 2001; 3:574
59. Fields PA, Arruda VR, Armstrong E et al.; Risk and prevention of anti factor IX formation in AAV-mediated gene transfer in the context of a large deletion of F9; *Mol Ther* 2001; 4:201
60. Fields PA, Kowalczyk DW, Arruda VR et al.; Role of vector in activation of T-Cell subsets in immune response against the secreted transgene product factor IX; *Mol Ther* 2000; 1:225
61. Fischer A; Thirty years of bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency; *N Engl J Med* 1999; 340:559
62. Flores G, Juarez JC, Montoro JB et al. ; Seroprevalence of parvovirus B19, cytomegalovirus, hepatitis A virus and hepatitis E virus antibodies in haemophiliacs treated exclusively with clotting factor concentrates considered safe against human immunodeficiency and hepatitis C; *Haemophilia* 1995; 1:115
63. Flotte TR, Afione SA, Conrad C et al.; Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector; *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10613
64. Förstermann U; Gentherapie: Erste Erfolge – viele noch unerfüllte Hoffnungen; *Dtsch Arztebl* 2003; 100: A314
65. Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL et al.; Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in haemophilia A dogs; *Blood* 2001; 97:107
66. Gao C, Jokerst R, Gondipalli P et al.; Intramuscular injection of an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor facilitates hepatic transduction with a retroviral vector in mice; *Hum Gen Ther* 1999; 10:911
67. Gao X, Kemper A, Popko B; Advanced transgenic and gene targeting approaches; *Neurochem Res* 1999; 24:1181
68. Garcia-Martin C, Chuah MK, VanDamme A et al.; Therapeutic levels of human factor VIII in mice implanted with encapsulated cells: potential for gene therapy of haemophilia A; *J Gene Med* 2002; 4:215
69. Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K et al.; Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy; *Mol Ther* 2002; 6:5
70. Giannelli F, Choo KH, Rees DJG et al.; Gene deletions in patients with haemophilia B and antifactor IX antibodies; *Nature* 1983; 303:181
71. Glorioso J, Bender MA, Fink D, Deluca N; Herpes simplex virus vectors; in Dickson G (ed): *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*; Chapman & Hall, 1995
72. Goldman MJ, Wilson JM; Expression of alpha v beta 5 integrin is necessary for efficient adenovirus-mediated gene transfer in the human airway; *J Virol* 1995; 69:5951
73. Gura T; After a setback gene therapy progresses...gingerly; *Science* 2001; 291:1692
74. Hacein-Bey S, Cavazzano-Calvo M, Le Deist F et al.; γ_c gene transfer into SCID XI patients B-cell lines restores normal high affinity IL2 receptor expression and function; *Blood* 1996; 87:6108

75. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Charlier F et al.; Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy; *N Engl J Med* 2002; 346:1185
76. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M et al.; A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency; *N Engl J Med* 2003; 348:255
77. Haddad E, Landais P, Friedrich W et al.; Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a european retrospective study of 116 patients; *Blood* 1998; 91:3646
78. Halbert CL, Standaert TA, Aitken ML et al.; Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence and readministration; *J Virol* 1997; 71:5932
79. Halbert CL, Standaert TA, Wilson CB, Miller AD; Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure; *J Virol* 1998; 72:9795
80. Hamoshi A, Corey M; Cystic fibrosis genotype-phenotype consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis; *N Engl J Med* 1993; 329:1308
81. Han Y, Droguett G, Chowdhury NR et al.; Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular responses and permits long-term-expression; *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:2587
82. Harvey BG, Leopold PN, Hackett NR et al.; Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus; *J Clin Invest* 1999; 104:1245
83. Hawkins LK, Lemoine NR, Kirn D; Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform; *Lancet Oncol* 2002; 3:17
84. Hedner U, Tengborn L; Management of haemophilia A with antibodies: The effect of combined treatment with factor VIII, hydrocortisone and cyclophosphamide; *Thromb Haemost* 1985; 54:776
85. Hehlmann R; Human Retroviruses; in *Textbook of Human Virology* (2nd edition); Mosby Year Book Inc.; St Louis, MO, USA, 1991
86. Hershfield MS, Buckley RH, Greenberg ML et al.; Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase; *N Engl J Med* 1987; 316:589
87. Herzog RW, Fields PA, Arruda VR et al.; Characterization of B- and T-cell responses against factor IX in AAV vector-based gene therapy for canine hemophilia B; *Mol Ther* 2000; 1:S27
88. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung ZH et al.; Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus; *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:5804
89. Herzog RW, Mount JD, Arruda VR et al.; Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation; *Mol Ther* 2001; 4:192
90. Herzog RW, Yang EY, Couto LB et al.; Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector; *Nat Med* 1999; 5:56
91. High KA; Gene therapy: a 2001 perspective; *Haemophilia* 2001; 7(suppl1):23

92. Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z et al.; A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease and normal sweat electrolytes; *N Engl J Med* 1994; 331:974
93. Hirata RK, Russell DW; Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors; *J Virol* 2000; 74:4612
94. Hitt MH, Parks RJ, Graham FL; Structure and genetic organisation of adenovirus vectors; in Friedmann (ed); *The development of human gene therapy*; Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, USA, 1999
95. Hock RA, Miller AD, Osborne WR et al.; Expression of human adenosine deaminase from various strong promoters after gene transfer in human hematopoietic cell lines; *Blood* 1989; 74:876
96. Hoggerbrugge PM, van Beusechem VW, Fischer A et al.; Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency; *Gene Ther* 1996; 3:179
97. Hortelano G, Wang L, Xu N et al.; Sustained and therapeutic delivery of factor IX in nude haemophilia B mice by encapsulated C2C12 myoblasts: concurrent tumorigenesis; *Haemophilia* 2001; 7:207
98. Hortelano G, Xu N, Vandenberg A et al.; Persistent delivery of factor IX in mice: gene therapy for hemophilia using implantable microcapsules; *Hum Gene Ther* 1999; 10:1281
99. Horwitz MS; Adenoviridae and their replication; in Fields BN, Knipe DM (eds): *Fundamental Virology* (2nd edition); Raven Press Ltd., New York, NY, USA, 1991
100. Howard MK, Kershaw T, Gibb B et al.; High efficiency gene transfer to the central nervous system of rodents and primates using herpes virus vectors lacking functional ICP 27 and ICP 34.5; *Gene Ther* 1998; 5:1137
101. Hoyer LW; The incidence of factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A; in Aledort LM, Hoyer LW, Lusher JM (eds.): *Inhibitors to coagulation factors*; Plenum Press, New York, NY, USA, 1995:35
102. Hu WS, Pathak YK; Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy; *Pharmacol Rev* 2000; 52:493
103. Hwang C, Sanda MG; Prospects and limitations of recombinant poxviruses for prostate cancer Immunotherapy; *Curr Opin Mol Ther* 1999; 1:471
104. Hyde SC, Gill DR, Higgins CF et al.; Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy; *Nature* 1993; 362:250
105. Hyde SC, Southern KW, Gileadi U et al.; Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis ; *Gene Ther* 2000 ; 7 :1156
106. Inoue N, Russell DW; Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors; *J Virol* 1998; 72:7024
107. Jhanwar SC, Berkvens TM, Breukel C et. al.; Localization of human adenosine deaminase (ADA) gene sequences to the q12-q13.11 region of chromosome 20 by in situ hybridization; *Cytogenet Cell Genet* 1989; 50:168.
108. Joseph PM, O'Sullivan BP, Lapey A et al.; Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods safety and clinical implications; *Hum Gene Ther* 2001; 12:1369
109. Kaiser J; Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial; *Science* 2003; 299:457

110. Kaufmann RJ; Biological regulator of factor VIII activity; *Ann Rev Med* 1992; 43:325
111. Kay MA, Manno CS, Ragni MV et al.; Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector; *Nat Genet* 2000; 24:257
112. Kay MA, Rothenberg S, Landen CN et al.; In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX deficient dogs; *Science* 1993; 262:117
113. Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA et al.; Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis; *Science* 1989; 245:1073
114. Kitson C, Angel B, Judd D et al.; The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium; *Gene Ther* 1999; 6:534
115. Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC; In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis; *Hum Gene Ther* 1995; 6:445
116. Koeberl DD, Bottema CDK, Ketterling RP et al.; Mutations causing haemophilia B: direct estimate of the underlying rates of spontaneous germ-like transitions, transversions, and deletions in a human gene; *Am J Hum Genet* 1990; 47:202
117. Koehler DR, Hitt MM, Hu J; Challenges and strategies for cystic fibrosis lung gene therapy; *Mol Ther* 2001; 4:84
118. Kohn DB, Hershfield MS, Carbonaro D et al.; T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA deficient neonates; *Nat Med* 1998; 4:775
119. Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA et al.; Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency; *Nat Med* 1995; 1:1017
120. Kohn DB; Gene therapy for genetic haematological disorders and immunodeficiencies; *J Intern Med* 2001; 249:379
121. Krisky DM, Wolfe D, Goins WF et al.; Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long term gene expression in neurons; *Gene Ther* 1998; 5:1593
122. Kume M, Komori K, Matsumoto T et al.; Administration of a decoy against the activator protein-1 binding site suppresses neointimal thickening in rabbit balloon-injured arteries; *Circulation* 2002; 105:1226
123. Kuzmin AI, Finegold MJ, Eisensmith RC; Macrophage depletion increases the safety, efficacy and persistence of adenovirus-mediated gene transfer in vivo; *Gene Ther* 1997;4:309
124. Lantz O, Grandjean I, Matzinger P et al.; γ chain required for naive CD4+ T cell survival but not for antigen proliferation; *Nat Immunol* 2000; 1:54
125. Larson JE, Delcarpio JB, Farberman MM et al.; CFTR modulates lung secretory cell proliferation and differentiation ; *Am J Physiol* 2000 ; 279 :L333
126. Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M et al.; Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer; *Gene Ther* 1999; 6:482
127. Lenck H, Bierback U, Schille R; Inhibitor to FIX in haemophilia B and nephritic syndrome in the course of immune tolerance treatment; *Haemophilia* 1996; 2(Suppl.1):72
128. Leonard WJ; X-linked severe combined immunodeficiency: from molecular cause to gene therapy within seven years; *Mol Med Tod* 2000; 6:403

129. Leurs C, Hanenberg H; Gentransfer in hämatopoietische Stammzellen; *in* Medizinische Genetik Edition 2: Fanconi Anämie; Verlag Medizinische Genetik, München, 2003
130. Li Z, Düllmann J, Schiedlmeier B et al.; Murine leukemia induced by retroviral gene marking; *Science* 2002; 296:497
131. Liu C; Adenoviruses; in *Textbook of Human Virology 2nd edition*; Mosby Year Book Inc., St Louis, MO, USA, 1991
132. Liu F, Qi H, Huang L, Liu D; Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration; *Gene Ther* 1997; 4:517
133. Lo M., Bloom ML, Imada K et al.; Restoration of lymphoid populations in a murine model of X-linked severe combined immunodeficiency by a gene therapy approach; *Blood* 1999; 94:3027
134. Loefquist T, Nilsson IM, Berntorp E et al; Haemophilia prophylaxis in young patients – a long term follow up; *J Intern Med* 1997; 241:395
135. Loser P, Huser A, Hillgenberg M et al.; Advances in the development of non-human viral DNA-vectors for gene delivery; *Curr Gene Ther* 2002; 2:161
136. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC et al.; Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia; *Circulation* 2002; 105:2012
137. Lozier JN, Csako G, Mondoro TH et al.; Toxicity of first-generation adenoviral vector in rhesus macaques; *Hum Gen Ther* 2002; 13:113
138. Lusher JM, Kreuz W, Gazengel C et al.; Inhibitor formation monitoring in pediatric patients with severe hemophilia A receiving a second generation rFVIII concentrate formulated with sucrose; *Blood* 1999; 94:237a
139. Marshall E; Gene therapy death prompts review of adenovirus vector; *Science* 1999; 286:2244
140. MASAC, The International Haemophilia Foundation, Medical and Scientific Advisory Council (MASAC) resolution on Creutzfeld-Jakob disease, new variant CJD and plasma derived coagulation products; MASAC recommendation #99, June 10, 2000
141. Matsui H, Grubb BR, Tarran R et al.; Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease; *Cell* 1998; 95:1005
142. Miao CH, Thompson AR, Loeb K, Ye X; Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo; *Mol Ther* 2001; 3:947
143. Mitani K, Graham FL, Caskey CT et al.; Rescue, propagation, and partial purification of a helper-virus dependent adenovirus vector ; *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92:3854
144. Morishita R, Aoki M, Kaneda Y, Ogihara T; Gene therapy in vascular medicine: recent advances and future perspectives; *Pharmacol Ther* 2001; 91:105
145. Morral N, O'Neal W, Zhou H et al.; Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different serotypes for long-term liver directed gene transfer in baboons; *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12816

146. Morral N, O'Neal W, Zhou H et al.; Immune response to reporter proteins and high viral dose limit duration of expression with adenoviral vectors: comparison of E2A wild-type and E2A deleted vectors; *Hum Gen Ther* 1997; 8:1275
147. Morsy MA, Gu M, Motzel S et al.; An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin gene; *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7866
148. Mossmann KL, Smiley JR; Truncation of the C-terminal acidic transcriptional activation domain of herpes simplex virus VP 16 renders expression of the immediate early genes almost entirely dependent on ICP0; *J Virol* 1999; 73:9726
149. Mount JD, Herzog RW, Tillson DM et al.; Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with factor IX null mutation by liver-directed gene therapy; *Blood* 2002; 99:2670
150. Myers LA, Patel DD, Puck JM et al.; Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in the neonatal period leads to superior thymic output and improved survival; *Blood* 2002; 99:872
151. Nakai H, Herzog R, Hagstrom JN et al.; AAV mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver; *Blood* 1998; 91:4600
152. Nakamura H, Morishita R, Kaneda Y; Molecular therapy via transcriptional regulation with double-stranded oligodeoxynucleotides as decoys; *In Vivo* 2002; 16:45
153. Nasto B; Questions about systemic adenovirus delivery; *Mol Ther* 2002; 6:652
154. Nathwani AC, Davidoff A, Hanawa H et al.; Factors influencing in vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA; *Blood* 2001; 97:1258
155. National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Report; Assessment of adenoviral vector safety and toxicity; *Hum Gene Ther* 2002; 13:3
156. Nilsson IM, Bernkorp E, Loeffquist T et al.; Twenty-five years experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B; *J Intern Med* 1992; 232:25
157. Nilsson IM, Berntorp E, Zetterval O et al.; Noncoagulation inhibitory factor VIII antibodies after induction of tolerance to factor VIII in hemophilia A patients; *Blood* 1990; 75:378
158. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al.; Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans; *Cell* 1993; 73:147
159. Noone PG, Hohnecker KW, Zhou Z et al.; Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis; *Mol Ther* 2000; 1:105
160. O'Brien KF, Kunkel LM; Dystrophin and muscular dystrophy: past, presence and future; *Mol Gen Metab* 2001; 74:75
161. O'Riordan CR, Lachapelle AL, Vincent KA, Wadsworth SC; Scaleable chromatographic purification process for recombinant adeno-associated virus (rAAV); *J Gene Med* 2000; 2:444
162. Okoli G, Hortelano G, Leong K; Oral delivery of plasmid DNA encoding factor IX gene; *Mol Ther* 2000; 1:S28
163. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man); www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim; OMIM Entry 102700, ADA-SCID
164. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man); www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim; OMIM Entry 300400, Xlinked-SCID

165. Onodera M, Ariga T, Kawamura N et al.; Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency; *Blood* 1998; 91:30
166. Ostapchuk P, Hearing P; Pseudopackaging of adenovirus type 5 genomes into capsids containing the hexon proteins of adenovirus serotypes B, D or E; *J Virol* 2001; 75:269
167. Parish-Novak J, Dillon SR, Nelson A et al.; Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function; *Nature* 2000; 408:57
168. Park F, Ohashi K, Kay MA; Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1 based lentiviral vectors in mouse liver; *Blood* 2000; 96:3
169. Parker Ponder K; Vectors of Gene Therapy; in Kresina TF (ed); *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*; Wiley Liss Inc., New York, NY, USA, 2001
170. Parks R, Bramson Y, Wan Y et al.; Effects of stuffer DNA on transgene expression from helper-dependent adenovirus vectors; *J Virol* 1999; 73:8027
171. Parks R, Eveleigh C, Graham F ; Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration ; *Gene Ther* 1999 ; 6 :1565
172. Parks RJ, Chen L, Anton M et al.; A helper-dependent adenoviral vectors system: removal of helper virus by cre-mediated excision of the viral packaging signal; *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13565
173. Parsons DW, Grubb BR, Johnson LG et al.; Enhanced in vivo airway gene transfer via transient modification of host barrier properties with a surface-active agent; *Hum Gen Ther* 1998; 9:2661
174. Patel DD, Gooding ME, Parrott RE et al.; Thymic function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency; *N Engl J Med* 2000; 342:1325
175. Peplinski GR, Tsung K, Norton JA; Vaccinia virus for human gene therapy; *Surg Oncol Clin N Am* 1998; 7:575
176. Perricone MA, Morris JE, Pavelka K et al.; Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium; *Hum Gene Ther* 2001; 12:1383
177. Petrini P; What factors should influence the dosage and interval of prophylactic treatment in patients with severe haemophilia A and B ?; *Haemophilia* 2001; 7:99
178. Phillips MI, Galli SM, Mehta JL; The potential role of antisense oligodeoxynucleotide therapy for cardiovascular disease; *Drugs* 2000; 60:239
179. Phillips MI; Gene therapy for hypertension: the preclinical data; *Hypertension* 2001; 38:543
180. Pickles RJ, Barker PM, Ye H et al.; Efficient adenovirus-mediated gene transfer to basal but not columnar cells of cartilaginous airway epithelia; *Hum Gene Ther* 1996; 7:921
181. Pieroni L, La Monica N; Towards the use of baculovirus as a gene therapy vector; *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3:464
182. Pilewski JM, Frizzell RA; Role of CFTR in airway disease; *Physiol Rev* 79:S215
183. Poeschla E, Wong-Staal F; Antiviral and anticancer ribozymes; *Curr Opin Oncol* 1994; 6:601

184. Porteous DJ, Dorin JR, McLachlan G et al.; Evidence for safety and efficiency of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis; *Gene Ther* 1997; 4:210
185. Qin L, Ding Y, Pahud DR et al.; Promoter attenuation in gene therapy; Interferon- γ and tumor necrosis factor- α inhibit transgene expression; *Hum Gene Ther* 1997; 8:2019
186. Ranasinha C, Assoufi B, Shak S et al.; Efficacy and safety of short-term administration of aerosolised recombinant human DNase I in adults with stable stage cystic fibrosis; *Lancet* 1993; 342:199
187. Reeves L, Cornetta K; Clinical retroviral vector production: step filtration using clinically approved filters improves titers; *Gene Ther* 2000; 7:1993
188. Reeves L, Smucker P, Cornetta K; Packaging cell line characteristics and optimizing retroviral titer: the National Gene Laboratory experience; *Hum Gen Ther* 2000; 11:2093
189. Reid-Mattison H, Eisenberg RJ, Reichmann RC; Herpes simplex virus; in *Textbook of Human Virology 2nd edition*; Mosby Year Book Inc., St Louis, MO, USA, 1991
190. Reinhardt D; Erkrankungen der Atemwegsorgane; in Koletzko (Hrsg.): *Kinderheilkunde (11. Auflage)*; Springer-Verlag Heidelberg, 2000, S.417-464
191. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S et al.; Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA; *Science* 1989; 245:1066
192. Rogers MH, Lwin R, Fairbanks L et al.; Cognitive and behavioral abnormalities in adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency; *J Pediatr* 2001; 139:44
193. Roizman B, Sears AE; HSV and their replication; in Fields BN, Knipe DM (eds): *Fundamental Virology 2nd edition*; Raven Press Ltd., New York, NY, USA, 1991
194. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S et al.; Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping; *Science* 1989; 245:1059
195. Rossi FM, Blau HM; Recent advances in inducible gene expression systems; *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:451
196. Rossi JJ; The application of ribozymes to HIV infection; *Curr Opin Mol Ther* 1999; 1:316
197. Roth DA, Tawa NE, O'Brien JM et al.; Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A; *N Engl J Med* 2001; 344:1735
198. Royal RE, Kershaw MH, Reeves ME et al.; Increased functional expression of transgene in primary human lymphocytes using retroviral vectors modified with IRES and splicing motifs; *Gene Ther* 2002; 9:1085
199. Ruiz FE, Clancy JP, Perricone MA et al.; A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis; *Hum Gene Ther* 2001; 12:751
200. Rumi GM, Colombo M, Gringeri A et al.; High prevalence of antibody to hepatitis C virus in multitransfused hemophiliacs with normal transaminase levels; *Ann Intern Med* 1990; 112:379
201. Russell DW, Kay MA; Adeno-associated virus vectors and hematology; *Blood* 1999; 94:864

202. Samaniego LA, Neiderhiser L, Deluca NA; Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate early proteins; *J Virol* 1998; 72:3307
203. Samaniego LA, Neiderhiser L, Deluca NA; The herpes simplex virus immediate early protein ICP 0, affects transcription from the viral genome and infected cell survival in the absence of ICP 4 and ICP 27; *J Virol* 1997; 71:4614
204. Sandig V, Youil R, Bett AJ et al.; Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo; *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1002
205. Sarkar R, Gao GP, Chirmule N et al.; Partial correction of murine hemophilia A with neo-antigen murine factor VIII; *Hum Gene Ther* 2000; 11:881
206. Schiedner G, Morral N, Parks RJ et al.; Genomic DNA transfer with a high capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity; *Nat Genet* 1998; 18:180
207. Schneider H, Muhle C, Douar AM et al.; Sustained delivery of therapeutic concentrations of human clotting factor IX – a comparison of adenoviral and AAV vectors administered in utero; *J Gene Med* 2002; 4:46
208. Schnell MA, Zhang Y, Tazelaar J et al.; Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors; *Mol Ther* 2001; 3:708
209. Schwarz DA, Quinn TJ, Thorne PS et al.; CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract; *J Clin Invest* 1997; 100:68
210. Sene C, Bout A, Imler JL et al.; Aerosol-mediated delivery of recombinant adenovirus to the airways of nonhuman Primates; *Hum Gene Ther* 1995;6:1587
211. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP et al.; Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid; *Cell* 1996; 85:229
212. Smythe GM, Hodgetts SI, Grounds MD; Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy; *Mol Ther* 2000; 1:304
213. Snouwaert JN, Briggman KK, Latour AM et al.; A murine model of cystic fibrosis; *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:S59
214. Snyder RO, Miao C, Meuse L et al.; Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors ; *Nat Med* 1999 ; 5 :64
215. Snyder RO, Miao CH, Patijn GA et al.; Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors; *Nat Genet* 1997; 16:270
216. Soudais C., Shiho T, Sharara LI et al.; Stable and functional lymphoid reconstitution of common cytokine receptor γ chain deficient mice by retroviral-mediated gene transfer; *Blood* 2000; 95:3071
217. Stein CS, Kang Y, Sauter SL et al.; In vivo treatment of haemophilia A and mucopolysaccharidosis type VII using nonprimate lentiviral vectors; *Mol Ther* 2001; 3:850
218. Stern M, Caplen NJ, Browning JE et al.; The effects of mucolytic agents on gene transfer across a CF sputum barrier in vitro; *Gene Ther* 1998; 5:91
219. Stern M, Munkonge FM, Caplen NJ et al.; Quantitative fluorescence measurements of chloride secretion in native airway epithelium from CF and non-CF subjects; *Gene Ther* 1995; 2:766

220. Stutts MJ, Gabriel SE, Olsen JC et al.; Functional consequences of heterologous expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in fibroblasts; *J Biol Chem* 1993; 268:20653
221. Sugamura K, Asao H, Kondo M et al.; The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in X SCID; *Annu Rev Immunol* 1996; 14:179
222. Taylor N, Uribe L, Smith S et al.; Correction of interleukin-2 receptor function in X-SCID lymphoblastoid cells by retrovirally mediated transfer of the gamma-c gene; *Blood* 1996; 87:3103
223. Trent RJ (ed); *Molecular Medicine: An Introductory text*; Churchill Livingstone, New York, NY, USA, 1997
224. Umana P, Gerdes CA, Stone D et al.; Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination; *Nat Biotechnol* 2001; 19:582
225. van Heekeren A, Ferkol T, Tosi M; Effects of bronchopulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* on gene transfer to airway epithelial cells in mice; *Gene Ther* 1998; 5:345
226. VandenDriesche T, Vanslembrouck V, Goovaerts I et al.; Long-term expression of human clotting factor VIII and correction of haemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in factor VIII deficient mice; *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:9973
227. Vile RG, Russell SJ; Retroviruses as vectors; *Br Med Bull* 1995; 51:12
228. Vogt VM; *Retroviral Virions and Genomes*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1997
229. Wagner JA, Nepomuceno IB, Messner AH; A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinusitis delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies; *Hum Gene Ther* 2002; 13:1349
230. Wagner JA, Nepomuceno IB, Shah N et al.; Maxillary sinusitis as a surrogate model for CF gene therapy clinical trials in patients with antrostomies; *J Gene Med* 1999; 1:13
231. Wahn U, Wahn V; *Erkrankungen des Immunsystems*; in Koletzko (Hrsg.): *Kinderheilkunde* (11. Auflage); Springer-Verlag Heidelberg, 2000, S.289-318
232. Wang L, Nichols TC, Read MS et al.; Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver; *Mol Ther* 2000; 1:154
233. Wang L, Takabe K, Bidlingmaier SM et al.; Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy; *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:3906
234. Warburton D, Wuenschell C, Flores-Delgado et al.; Commitment and differentiation of lung cell lineages; *Biochem Cell Biol* 1998; 76:971
235. Warrrier I, Lusher JM; Development of anaphylactic shock in haemophilia B patients with inhibitors; *Blood Coagul Fibrinol* 1998; 9:S125
236. Weiss DJ, Borneau L, Liggitt D; Instillation of perfluorochemical (PFC) liquid to lungs of spontaneously breathing mice transiently opens tight junctions between airway epithelial cells: a possible mechanism for enhancement of gene expression using PFC liquids; *Mol Ther* 2001; 3:S337
237. Weissmann IL; Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution; *Cell* 2000; 100:157

238. White DO, Fenner FJ (eds); Medical Virology 4th edition; Academic Press Inc., San Diego, USA, 1994
239. White GC II, Beebe A, Nielsen B et al.; Recombinant factor IX; *Thromb Haemost* 1997; 78:261
240. Wiginton DA, Kaplan DJ, States JC et al.; Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase; *Biochemistry* 1986; 25:8234
241. Worgall S, Leopold PL, Wolff G et al.; Role of alveolar macrophages in rapid elimination of adenovirus vectors administered to the epithelial surface of the respiratory tract; *Hum Gene Ther* 1997;8:1675
242. Wu N, Watkins SC, Schaffer PA, DeLuca NA; Prolonged gene expression and cell survival after infection by a herpes simplex virus mutant defective in the immediate-early genes encoding ICP 4, ICP 27 and ICP 22; *J Virol* 1996; 70:6358
243. Xiao W, Chirmule N, Berta SC et al.; Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1 ; *J Virol* 1999; 73:3994
244. Xiao X, Li J, Samulski RJ; Produktion of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus; *J Virol* 1998; 72:2224
245. Yang S, Delgado R, King SR et al.; Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection; *Hum Gen Ther* 1999; 10:123
246. Yant SR, Meuse L, Chiu W et al.; Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system; *Nat Gen* 2000; 25:35
247. Yee TT, Cohen BJ, Pasl KJ et al.; Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by clotting factor concentration; *Br J Haematol* 1996; 83:457
248. Yokoyama Y, Wan X, Shinohara A et al.; Hammerhead ribozymes to modulate telomerase activity of endometrial carcinoma cells; *Hum Cell* 2001; 14:223
249. Yu SF, Sullivan MD, Linial ML; Evidence that the human foamy virus genome is DNA; *J Virol* 1999; 73:1565
250. Zabner J, Ramsay BW, Meeker DP et al.; Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis; *J Clin Invest* 1996; 97:1504
251. Zhang L, Wang D, Fischer H et al.; Efficient expression of CFTR function with adeno-associated virus vectors that carry shortened CFTR genes; *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:10158
252. Zuckerman JB, Robinson CB, McCoy KS et al.; A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis; *Hum Gene Ther* 1999; 10:2973

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Pokall
Vornamen: Jörg Fabian
Geburtsdatum: 14.11.1974
Geburtsort: Gunzenhausen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

Schulbildung

1980 – 1984 Grundschole Ornba
1984 – 1993 Johann-Sebastian-Bach Gymnasium Windsbach

Studium

1994 – 2002 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Nov. 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dissertation

Feb. 2001 – Mai 2003 im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg

Seit Januar 2003 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Unfallkrankenhaus Berlin - Marzahn

Würzburg, Juni 2003