



Über beeindruckende
Erfolge und die Beseitigung
von Stolpersteinen

Die Gentherapie kommt aus den Kinderschuhen

von Hildegard Büning und Manuel Grez

Rückschläge werfen eine neue Technologie um Jahrzehnte zurück – besonders, wenn Menschenleben zu beklagen sind. Bei der Gentherapie wird aber oft vergessen, dass sie nur bei Patienten angewendet wird, für die es keine konventionelle Therapie mehr gibt. Nach der Euphorie und den Rückschlägen der Anfangsjahre können Forscher nun die ersten Erfolge vorweisen.

Max Planck soll einmal gesagt haben: »Eine Wissenschaft, die nicht so einfach ist, dass man sie auf der Straße jedem erklären könnte, ist nicht wahr!«. Für das Konzept der Gentherapie trifft diese Aussage zu. Hier der Beweis: Gene sind die Matrize für die Herstellung von Proteinen. Diese wiederum nehmen bestimmte Funktionen in der Zelle, dem Organ oder dem gesamten Organismus wahr. Fehlt ein bestimmtes Gen, ist es fehlerhaft, oder unterliegt seine Produktion einer Fehlregulation, können Krankheiten entstehen. Solche Defekte können entweder angeboren sein oder zu einem späteren Zeitpunkt im Leben erworben werden. Das Ziel der Gentherapie ist, durch die Einbringung

von Genen oder im weitesten Sinne von Nukleinsäuren, solche Krankheiten zu heilen oder zumindest zu lindern.

Gen-Taxis oder der Fuhrpark der Genterapeuten

Will man Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in eine Zelle bringen, so muss man ihre äußere Begrenzung, die Zellmembran, überwinden. Um den Transport effizienter zu machen, benötigt man Gen-Taxis (Vektoren). Bei den nicht-viralen Vektoren wird die Nukleinsäure mit einer künstlichen Schutzhülle aus Polymeren oder Lipiden ummantelt, die eine Bindung an die Zelle vermitteln. Virale Vektoren, die zweite Vektor-Klas-

se, leiten sich von Viren ab. Viren haben hoch effiziente Strategien entwickelt, um ihre Erbinformation in Zellen einzuschleusen und sich dort zu vermehren. Virale Vektoren interagieren mit der Zelle in gleicher Weise, wie es die ursprünglichen Viren tun. Ihre Erbinformation (Genom) wird allerdings gegen die zu transportierende Nukleinsäure ausgetauscht. Solche »entschärften« Viren können sich – im Gegensatz zu ihren natürlichen Vorfahren – nicht mehr vermehren; sie dienen nur als Transportvehikel.

Die bisher am häufigsten verwendeten viralen Vektoren beruhen auf Retroviren, Lentiviren, Adenoviren und Adeno-Assoziierten Viren (AAV). Eine Besonderheit der Retro- und Lentiviren ist der obligatorische Einbau des viralen Genoms in das Erbgut der infizierten Zelle. Dadurch wird es zusammen mit dem zellulären Genom vor der Zellteilung vermehrt und an die Tochterzellen weitergegeben. Diese Eigenschaft ist für die Gentherapie von großer Bedeutung, da eine erfolgreiche Veränderung der Zelle durch einen lenti- oder retroviralen Vektor auch in sich teilenden Zellen stabil ist. Dadurch bietet sich zum Beispiel die Möglichkeit, nach erfolgreichem Transfer einer korrekten Genkopie in Blutstammzellen, das gesamte Immunsystem des Patienten mit nun funktionierenden Zellen zu konstituieren. Die Fähigkeit zur Integration birgt aber auch die Gefahr der Insertionsmutagenese, auf die wir bei den Grenzen der Gentherapie noch eingehen.

Im Gegensatz zu retro- und lentiviralen Vektoren handelt es sich bei Vektoren, die auf Adeno- und Adeno-Assoziierten Viren beruhen, um nicht-integrierende Systeme. Vor allem mit AAV-Vektoren, die deutlich weniger Immunreaktionen hervorrufen als adenovirale Vektoren, kann eine langfristige Modifikation in Zellen oder Geweben erreicht werden, die sich nicht teilen. Dazu gehören Skelettmuskeln, das Gehirn oder die Leber. In Geweben oder Zellen, die sich teilen, verliert sich der therapeutische Effekt jedoch schnell, da sich die Menge der eingebrachten Erbinformation mit jeder Teilung »verdünnt«.

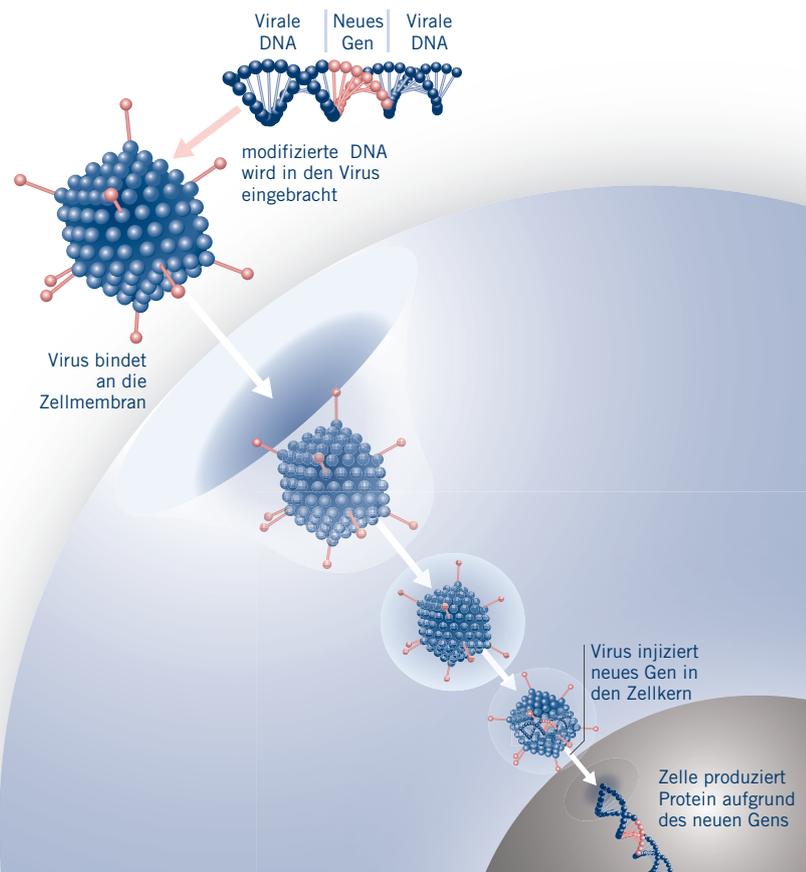
Die Vektoren der ersten Generation wurden bereits in einer Reihe von klinischen Ansätzen mit zum Teil sehr guten Ergebnissen getestet. Doch zeigte sich auch, dass – analog zu den ersten Automobilen – eine Optimierung der Systeme hinsichtlich Sicherheit und Effizienz wünschenswert wäre. Eine Möglichkeit, sowohl die Effizienz des Gentransfers als auch die Sicherheit von Vektoren für die Anwendung direkt im Patienten zu verbessern, ist das »cell surface targeting«. Ziel dieser Technologie ist es, den Vektor so zu verändern, dass er ganz gezielt und spezifisch an einen Rezeptor an der Oberfläche der Zielzelle bindet und dass der Gentransfer über diese neue, vom Anwender festgelegte Interaktion erfolgt. Die Veränderung in der Schlüssel-Schloss-Interaktion (Ligand-Rezeptor-Interaktion) zwischen dem Vektor und der Zelle kann dabei zum Beispiel geschehen, indem man einen neuen Liganden in die »Virushülle« einfügt. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines Adapters, beispielsweise ei-

nes bi-spezifischen Antikörpers, der eine Verbindung zwischen dem Vektor und dem Zielrezeptor herstellt.

Gentherapie 2013 – eine Standortbestimmung

Mehr als 10 000 Krankheiten sind bekannt, die auf Defekte (Mutationen) eines einzelnen Gens zurückzuführen sind und die für eine Gentherapie infrage kommen würden.¹¹ Teil dieser Gruppe sind die über 150 verschiedenen Typen der primären Immundefizienzen (PIDs). Die betroffenen Patienten leiden unter andauernden und lebensbedrohlichen Infektionen mit Bakterien, Pilzen oder Viren, die für gesunde Menschen keine Gefahr darstellen. Viele der Erkrankungen können auf konventionelle Art behandelt werden, zum Beispiel durch die regelmäßige Gabe von Antibiotika oder Immunglobulinen. In besonders schweren Fällen ist jedoch eine Stammzelltransplantation die einzige Möglichkeit, den Patienten zu helfen. Kann kein passender Spender gefunden werden, stellt die Gentherapie autologer (eigener) Blutstammzellen eine mögliche Alternative dar. Basierend auf den Erfahrungen der Stammzelltransplantation werden patienteneigene Blutstammzellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut (nach Ausschwemmung aus dem Knochenmark) isoliert, im Labor (*ex vivo*) mit einer funktionellen Kopie des defekten Gens modifiziert und anschließend zurück in den Patienten infundiert. Dort tragen die genmodifizierten Zellen zur Blutbildung bei.

Im Laufe der letzten zehn Jahre gab es eine Reihe klinischer Gentherapiestudien mit insgesamt mehr als 115 Patienten und mit zum Teil beeindruckenden Erfolgen im Bereich der PID.¹² So konnte bei über 60 Patienten mit dem schweren kombinierten Immundefekt SCID, einer lebensgefährlichen Erkrankung, eine deutliche Verbesserung des Krankheitsbildes bis hin zur Heilung erreicht werden. Die Patienten, meist Kinder, führen heutzutage ein normales Leben, sind nicht



Um neue Gene in eine Zelle einzubringen, verwendet man in der Regel Viren als Gen-Taxis. Das gewünschte Gen wird dazu in die virale DNA eingefügt. Die modifizierten Viren transportieren ihre Nukleinsäure in die Zelle.



Im Inkubator können sich die Zellen unter optimalen Bedingungen vermehren.

mehr von der regelmäßigen Einnahme von Medikamenten abhängig und von ihren gleichaltrigen Schulkameraden nicht mehr zu unterscheiden. Voraussetzung für diese Erfolge ist, dass die genmodifizierten Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber den defekten Zellen des Patienten besitzen. Dann kann auch ein kleiner Anteil genmodifizierter Stammzellen einen massiven Beitrag zu den reifen Effektorzellen leisten. Haben die genmodifizierten Zellen jedoch keinen Vorteil gegenüber den Empfängerzellen, bleibt ihr Beitrag zur Gesamtblutbildung meist viel zu gering, um therapeutische Erfolge zu erzielen. In diesen Fällen muss im Knochenmark der Patienten durch eine Chemotherapie Platz geschaffen werden, damit die neuen genmodifizierten Stammzellen sich dort einnisten und überleben können. Das ist zum Beispiel bei Patienten mit X-chromosomal vererbter septischer Granulomatose (X-CGD) der Fall, einer primären Immundefizienz, die im Rahmen des CGT Frankfurt gentherapeutisch behandelt wird. Als erste Gruppe weltweit ist es am CGT tätigen Wissenschaftlern gelungen, in zwei CGD-Patienten therapieresistente Infektionen durch Gentherapie vorübergehend zu eliminieren. Leider hat der Effekt der Gentherapie mit der Zeit nachgelassen, so dass die Patienten an ihrer Grunderkrankung und schweren Nebeneffekten gestorben sind. In der Zwischenzeit sind von CGT-Wissenschaftlern neue Gen-Taxis entwickelt worden, so dass die gentherapeutische Behandlung von CGD-Patienten wieder aufgenommen wird.

In den letzten Jahren hat sich das Anwendungsspektrum der Gentherapie deutlich erweitert. Erfolgsmeldungen über die Behandlung von HIV-infizierten Patienten sind vor Kurzem veröffentlicht worden. Bei diesen Patienten ist die Bindungsstelle des HI-Virus auf der Zelloberfläche der T-Lymphozyten, den Zielzellen des HI-Virus, gentechnisch zerstört worden, so dass das Virus diese Zellen nicht mehr befallen und sich demzufolge auch nicht mehr vermehren kann.¹³¹ Damit konnte die Viruslast im Blut dieser Patienten bis zur Nachweisgrenze reduziert werden. Auch im Bereich

der Krebsbehandlung durch gentherapeutische Verfahren sind enorme Erfolge erzielt worden. Ein neues Beispiel ist die Behandlung von Patienten mit einer bestimmten B-Zell-Leukämie. In diesen Fällen wurden Patienten-eigene Lymphozyten isoliert und mithilfe eines retroviralen Vektors so modifiziert, dass sie ein ganz bestimmtes Tumormerkmal (CD19) auf der Zelloberfläche der Tumorzellen erkennen. Nach Infusion der genetisch veränderten T-Zellen wurden die Tumorzellen durch die genmodifizierten Lymphozyten zerstört, wodurch es zu einer signifikanten Abnahme der Tumormasse kam¹⁴¹ [zu Zelltherapien bei Leukämie siehe auch Evelyn Ullrich und Peter Bader: »Wenn Zellen zu Medikamenten werden«, Seite 38].

Erfolge bei erblichen Augenkrankheiten und Stoffwechselstörungen

Neben *Ex-vivo*-Ansätzen, mit denen man überwiegend Stammzellen manipuliert, werden Vektoren auch *in vivo* eingesetzt. Zu den therapeutischen Erfolgen durch Gentherapie gehört die Behandlung einer erblichen Form der Erblindung (Lebersche Kongenitale Amaurose, LCA). Patienten mit LCA fehlt ein Protein, das ein funktionsfähiges Pigmentepithel auf der Netzhaut aufrechterhält. Um den Krankheitsverlauf zu mildern, wird ein viraler Vektor, der sich von AAV ableitet und die intakte Version des RPE65-Gens trägt, unterhalb der Netzhaut appliziert.¹⁵¹ Die Patienten können dann im Dämmerlicht besser sehen. Da aber nur ein kleiner Teil des Auges behandelt wird, kann man nicht von einer Heilung sprechen. Bei Patienten mit Lipoproteinlipase-Defizienz (LPLD), einer extrem seltenen Fettstoffwechselstörung, wird ein AAV-Vektor mit der Information für ein Protein für den Abbau von Lipoproteinen eingesetzt, das in Muskelzellen und in der

Die Autoren



Dr. Manuel Grez studierte Chemie an der Universität Católica (Chile). 1978 promovierte er an der Universität Marburg. Als Postdoktorand ging er an das Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin und das Deutsche Krebsforschungszentrum in Heidelberg. 1982 bis 1985 war er

wissenschaftlicher Mitarbeiter an der University of Southern California in Los Angeles, USA, anschließend an der Universität Hamburg. Seit 1990 ist er Gruppenleiter am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt.

Privatdozentin Dr. Hildegard Büning studierte Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster und der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, wo sie 1997 promovierte. 1997 bis 2003 war sie Postdoktorandin in der Arbeitsgruppe Gentherapie, Genzentrum der LMU München; seit 2004 leitet sie die Arbeitsgruppe AAV Vektorentwicklung an der Universität zu Köln. Sie ist seit 2010 Präsidentin der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie e. V. (DG-GT e. V.).



grez@em.uni-frankfurt.de
hildegard.buening@uk-koeln.de

Leber hergestellt wird. Für diese Erkrankung gibt es kein zugelassenes Medikament der Schulmedizin, weshalb der gentherapeutische Ansatz im letzten Herbst für Patienten mit wiederkehrenden, schweren Episoden LPLD-bedingter Bauchspeicheldrüsenerkrankungen zugelassen wurde. Es ist das erste gentherapeutische Medikament in der westlichen Hemisphäre.^{16/} Es wird lokal durch eine Injektion in den Muskel verabreicht. Neben gentherapeutischen Korrekturen mit lokal begrenzter Wirkung sind auch systemische *In-vivo*-Anwendungen in den Bereich des Möglichen gerückt. Hierbei wird ein AAV-Vektor über eine Infusion appliziert.^{17/} Die Zielgruppe dieses Ansatzes sind Patienten, die an einer Blutgerinnungsstörung (Hämophilie B) leiden. Der Vektor akkumuliert in der Leber, um dort in den Leberzellen die Information für das fehlende Protein bereitzustellen, das anschließend in das Blut abgegeben wird.

Grenzen der Gentherapie

Retro- und lentivirale Vektoren bauen ihre Erbinformation an bestimmten Stellen des Genoms ihrer Zielzelle ein: einfache Gammaretroviren bevorzugen regulatorische Elemente, Lentiviren hingegen transkriptionell aktive Regionen im Genom. Dadurch kann es zu Veränderungen im Aktivitätsmuster der betroffenen oder benachbarten Gene kommen – eventuell mit schweren Folgen, wie die Entstehung von Leukämien bei einigen der behandelten Patienten uns gelehrt hat. Dieses Phänomen, Insertionsmutagenese genannt, ist in den letzten Jahren intensiv erforscht worden. Heutzutage kennen wir die molekularen Mechanismen, die dazu geführt haben. Aufgrund dieser Information sind unsere Gen-Taxis heute wesentlich sicherer als die der ersten Vektorgeneration, obwohl ein Restrisiko bei integrierenden Vektoren immer bestehen wird.

Um die Sicherheit weiter zu erhöhen, versucht man durch die Einbringung von Proteinen, die wie molekulare Scheren fungieren, für den bevorzugten Einbau in einer vom Anwender gewünschten Region zu sorgen. Der »sicherste« Ort wäre der, an dem sich das defekte Gen befindet. Wenn es gelänge, dieses exakt aus dem Genom der Zelle auszuschneiden und durch die intakte Kopie zu ersetzen, unterläge das Ersatz-Gen vollständig den natürlichen Kontrollmechanismen. Erste vielversprechende Versuche in dieser Richtung wurden bereits gemacht; sie sind aber alle noch in einem Anfangsstadium der Entwicklung.

Unser Körper widersteht viralen Infektionen und erkennt »neue« Proteine. Dies führt zur Aktivierung des Immunsystems. Dabei werden Immunzellen in Alarmzustand versetzt und große Mengen an Botenstoffen ausgeschüttet. Nichts anderes ist zu erwarten, wenn von Viren abgeleitete Vektoren *in vivo* appliziert werden. Bekannt geworden ist der Fall von Jesse Gelsinger, der im Jahr 1999 in den USA an den Folgen einer heftigen systemischen Immunreaktion gegen den applizierten adenoviralen Vektor verstarb. Auch das therapeutische Produkt kann durch das Immunsystem als fremd erkannt werden, etwa wenn es vorher aufgrund des Gendefekts nicht im Patienten produziert wurde. Ein Beispiel hierfür ist die Hämophilie A. Den Patienten fehlt der Blutgerinnungsfaktor VIII. Daher werden die Zellen, die das neu eingeführte Faktor-VIII-Protein produzieren, als fremd erkannt und durch

Auf den Punkt gebracht

- Der schwere kombinierte Immundefekt SCID gehört zu den ersten Krankheiten, die mit Gentherapie behandelt wurden. Von den weltweit 80 Patienten, meist Kindern, können heute mehr als 95 Prozent ein normales Leben führen.
- Die Gentherapie wird an einem ganzen Spektrum von Krankheiten erprobt, die nur auf einem einzelnen Gendefekt beruhen. Erfolgreich behandelt wurden unter anderem Krankheiten aus dem Bereich der primären Immundefizienzien (PID), sowie eine erbliche Form der Erblindung und einige Stoffwechselerkrankungen.
- Erfahrungen mit Gen-Fahren kommen auch der Therapie von HIV und Krebserkrankungen zugute.
- Um Sicherheit und Effizienz der Gentherapie zu erhöhen, entwickeln Forscher Methoden, Gene gezielt an bestimmten Stellen des Genoms einzufügen sowie Vektoren, die spezifisch für die jeweiligen Zielzellen sind.

das Immunsystem zerstört. Um diesem Problem zu begegnen, wird zum einen in jeder präklinischen Prüfung die minimale therapeutische Vektor-Dosis ermittelt, um die Zahl der Fremdeiweiße möglichst gering zu halten. Zum anderen ist man bestrebt, die Erkennung des therapeutischen Proteins durch das Immunsystem zu vermeiden, indem man das Protein (zum Beispiel Faktor VIII) von Zellen produzieren lässt, für die das Immunsystem »blind« ist.

Gentherapie: Medizin der Zukunft

Wie jede andere neue Therapieform hat die Gentherapie Erfolge und Rückschläge erlebt. In den letzten Jahren aber zeichnen sich deutlich mehr Erfolge als Rückschläge auf – ein Indiz dafür, dass die Gentherapie ihre »Kinderkrankheiten« überwunden hat. Es ist nur eine Frage der Zeit, bis sie sich zu einer Standardtherapie für ein breites Spektrum von genetisch bedingten Krankheiten entwickelt. Bis dahin gilt es, ihre Sicherheit und Effizienz zu steigern. Die Ansätze hierfür werden bereits heute erforscht. Auf lange Sicht wird die Gentherapie die Erwartungen, die vor 20 Jahren an sie gestellt wurden, erfüllen: ein therapeutisches Mittel gegen sonst unheilbare Krankheiten. ♦

Literatur

^{1/1} <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html>.
^{1/2} Cavazana-Calvo et al., *Current Opinion in Immunology* 2012, 24:580–584; Aiuti et al., *Current Opinion in Immunology* 2012, 24:585–591; Fisher et al., *J. Allergy Clin Immunol* 2011, 127:1356-1357; Seymour & Trasher, *Nat Biotech* 2012, 30:58-593.
^{1/3} Maier et al., *Human Gene Therapy* 2013, 24:245–58.
^{1/4} Grupp et al., *N Engl J Med* 2013, 25. März; Kalos et al., *Sci Transl Med* 2011, 3:95ra73; Porter et al., *N Engl J Med* 2011, 365:725–733.
^{1/5} Brainbridge et al., *N Engl J Med* 2008; 358:2231-9; Hauswirth et al., *Hum. Gene Ther.* 2008, 19, 979–990; Maguire et al., *N. Engl. J. Med.* 2008, 358, 2240–2248.
^{1/6} Büning EMBO, *Mol Med* 2013; Carpentier et al., *J Clin Endocrinol Metab* 2012, 97: 1635–1644; Gaudet et al., *Gene Ther* (2012) DOI: 10.1038/gt.2012.43; Gaudet D et al., *Curr Opin Lipidol* 2012, 23: 310–320.
^{1/7} Nathwani AC et al., *N Engl J Med* 2011, 365: 2357–2365.