

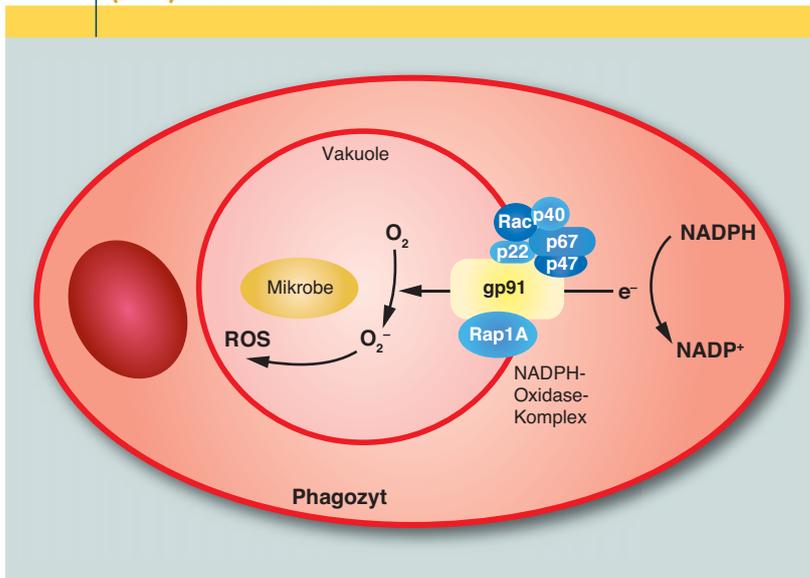
Der Weg zur erfolgreichen Therapie einer angeborenen Immundefizienz

Gentherapie der septischen Granulomatose: Chancen und Risiken

JOACHIM SCHWÄBLE | STEPHAN SCHULTZE-STRASSER | STEFAN STEIN | MANUEL GREZ

Die septische Granulomatose ist eine seltene erbliche Immundefizienz. Als monogene Erbkrankung ist sie zur Entwicklung einer Gentherapie sehr gut geeignet. In den vergangenen Jahren sind mehrere Gentherapie-Studien zur Behandlung dieser Erkrankung durchgeführt worden, die von zeitlich befristeten klinischen Besserungen, aber teilweise auch von schwerwiegenden Nebenwirkungen begleitet waren.

ABB. 1 ABTÖTUNG VON MIKROBEN DURCH SUPEROXIDPRODUKTION (ROS) IN PHAGOZYTEN



Der membranständige NADPH-Oxidase-Komplex vermittelt den Elektronentransfer von NADPH auf O_2 , wodurch ROS entstehen. Innerhalb der Phagozytenvakuole können so z.B. Bakterien und Pilze abgetötet werden. Diese angeborene Immunreaktion ist bei CGD-Patienten defekt, aufgrund von Mutationen in den Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes. Daher leiden diese Patienten unter wiederkehrenden lebensbedrohlichen Infektionen.

Einleitung

Die septische Granulomatose (engl. *Chronic Granulomatous Disease*, CGD) wird durch Mutationen in einem der fünf Gene, die für Komponenten des Nikotinamid-Dinukleotidphosphat-Oxidase-Komplexes (NADPH-Oxidase) codieren, hervorgerufen. Der NADPH-Oxidase-Komplex besteht aus zwei membrangebundenen (gp91phox und p22phox), sowie drei zytosolischen Komponenten (p47phox, p67phox und p40phox) (Abb. 1) [1, 2]. Daneben spielen die beiden kleinen G-Proteine Rac1 und Rac2 bei der Regulation der Aktivität dieses Komplexes eine wesentliche Rolle [3-5]. Der NADPH-Oxidase-Komplex katalysiert die Produktion von Superoxid-Anionen aus Sauerstoff, aus denen reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) wie z.B. Wasserstoffperoxid oder Hypochlorid-Ionen entstehen [1, 6-8].

Für die antimikrobielle Aktivität von Phagozyten ist die NADPH-Oxidase von grundlegender Bedeutung: In den Vakuolen dieser Zellen werden die phagozytierten Keime durch reaktive Sauerstoffspezies direkt abgetötet. Daneben kontrolliert die NADPH-Oxidase durch Regulation des Kationen-Einstroms und des pH-Wertes in Vakuolen die Aktivität von Proteasen, wie der Neutrophilen Elastase oder Cathepsin B, die ihrerseits wichtige Funktionen bei der intrazellulären antimikrobiellen Aktivität von Phagozyten wahrnehmen [9].

Ferner geben neutrophile Granulozyten ROS-abhängig zyttoplasmatische Proteine und Chromatin an ihre Umgebung ab, was zur Bildung von so genannten *neutrophil extracellular traps* (NETs) führt. Diese NETs zeigen eine antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien und Pilze [10, 11]. In CGD-Patienten werden pathogene Keime zwar phagozytiert, persistieren aber, aufgrund des Fehlens reaktiver Sauerstoffspezies, in den Vakuolen der Phagozyten und sind dort vor der humoralen Immunabwehr des Patienten und vor Antibiotika geschützt [9].

Die septische Granulomatose tritt mit einer Inzidenz von ca. 1:200.000 bis 1:250.000 aller Lebendgeburten auf [1, 2, 6, 7, 12]. Etwa zwei Drittel aller Fälle sind durch Mu-

tationen im gp91phox-Gen (CYBB) bedingt. Dieses Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, entsprechend zeigt sich das Bild eines klassischen X-chromosomal rezessiven Vererbungsschemas mit nahezu ausschließlich männlichen Erkrankten. Diese Form der Erkrankung wird auch als X-CGD bezeichnet. Die weiblichen Trägerinnen des mutierten Gens zeigen ein Mosaik mit unterschiedlicher Verteilung gesunder und erkrankter Zellen aufgrund der differentiellen Inaktivierung des X-Chromosoms. Neben der X-chromosomal vererbten Form kommen autosomal-rezessiv vererbte Formen vor, welche die Gene für p47phox (NCF-1), p22phox (CYBA) oder p67phox (NCF-2) betreffen [1, 6, 7]. Daneben wurde kürzlich erstmals von einer Mutation im NCF-4-Gen (p40phox) berichtet [13].

Das klinische Bild der septischen Granulomatose wird von wiederholten lebensbedrohlichen Infektionen durch Bakterien und Pilze geprägt. Dabei sind am häufigsten Haut, Lymphknoten, Lunge und Leber betroffen. Als häufigster pathogener Keim wird *Staphylococcus aureus* (Lymphadenitis, Leberabszesse) gefunden. Lebensbedrohliche Infekte sind hingegen meist Pneumonien oder eine Sepsis, verursacht durch *Aspergillus*-Spezies oder *Burkholderia cepacia*. Neben rezidivierenden Infekten wird das klinische Bild der septischen Granulomatose wesentlich durch überschießende Entzündungsreaktionen geprägt. Histologisch handelt es sich dabei um diffuse Entzündungsherde oder nicht verkäsende Granulome.

Pathogenetisch spielt die Deregulation pro-inflammatorischer bzw. anti-inflammatorischer Entzündungsmediatoren sowie eine verminderte Elimination aktivierter neutrophiler Granulozyten durch Apoptose oder anderer Zellen wie Monozyten eine Rolle. Am häufigsten kommt es zu Entzündungen im Magen-Darm-Trakt, die klinisch und histologisch einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung ähneln. Ferner kommen Entzündungen im Bereich der ableitenden Harnwege vor, die zu Obstruktionen und Harnaufstau führen können [14]. Erst kürzlich wurde bei CGD-Patienten die so genannte „Mulch-Pneumonitis“, ein akuter inflammatorischer Prozess im Bereich der Lungen, beschrieben [15]. Etwa zwei bis drei Tage nach Exposition mit *Aspergillus*-Sporen, z.B. nach Hantieren mit verrottendem Laub oder Erdboden, treten Fieber und Dyspnoe mit interstitiellen Lungeninfiltraten und Hypoxie auf. Bei diesem hoch akuten Krankheitsbild muss neben einer Antimykose eine immunsuppressive Therapie mit Steroiden erfolgen. Seltener werden hyperinflammatorische Prozesse der Haut, Augen, Gelenke oder des zentralen Nervensystems beobachtet.

Patienten mit septischer Granulomatose müssen ihr Leben lang vorbeugend antibiotisch und antimykotisch behandelt werden. Derzeit wird eine Prophylaxe mit Co-Trimoxazol und Itraconazol empfohlen [16]. Zudem kann Interferon-gamma zur Prophylaxe von Infektionen eingesetzt werden. In Europa wird die Interferonprophylaxe nur in Einzelfällen durchgeführt, während sie in den Vereinigten Staaten häufiger angewandt wird [6, 16].

Infektiöse Komplikationen müssen frühzeitig empirisch, nach Erregerisolation gezielt gemäß Resistogramm, antibiotisch und antimykotisch behandelt werden. Die empirische antibiotische Behandlung sollte dem bei CGD-Patienten typischen Erregerspektrum mit gramnegativen Keimen und Staphylokokken Rechnung tragen. Neben der Antibiose sollte bei infektiösen Komplikationen, insbesondere der Lunge, frühzeitig eine antimykotische Therapie erfolgen.

Infektionen sind bei CGD-Patienten meist langwierig und bedürfen einer antimikrobiellen Therapie über einen längeren Zeitraum. Bei schweren Infektionen können die Patienten zusätzlich mit allogenen Granulozytentransfusionen behandelt werden, allerdings besteht bei wiederholter Gabe die Gefahr einer Alloimmunisierung. Mit zunehmender Effektivität der Antimykotika verliert diese Therapieform ihren Stellenwert. Zur Entlastung von Abszessen oder Obstruktionen sind oft chirurgische Maßnahmen erforderlich, wobei hier die verzögerte Wundheilung und die Neigung zur Fistelbildung bei CGD-Patienten zu bedenken sind [16].

Die allogene Stammzelltransplantation mit Zellen von HLA-identen verwandten oder nichtverwandten Spendern ist eine kurative Therapie der septischen Granulomatose. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine erfolgreiche allogene Stammzelltransplantation auch nach reduziert toxischer Konditionierung bei Patienten mit erhöhtem Risiko möglich ist [17]. Die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation sollte früh gestellt werden, da die Komplikationsrate mit zunehmendem Alter steigt. Von einer allogenen Stammzelltransplantation profitieren insbesondere Patienten mit rezidivierenden schweren Infekten trotz adäquater antimikrobieller Prophylaxe, sowie Patienten mit Steroid-abhängigen hyperinflammatorischen Komplikationen [18]. Gerade für Patienten ohne passenden Spender und Patienten mit schweren Infektionen oder Steroid-refraktären hyperinflammatorischen Komplikationen ist die Entwicklung alternativer therapeutischer Ansätze notwendig.

Gentherapie der septischen Granulomatose

Als monogene Erbkrankheit, bei der die Zielzellen (hämatopoetische Stammzellen) *ex vivo* genetisch modifiziert werden können, eignet sich die septische Granulomatose exzellent zur Entwicklung einer somatischen Gentherapie. Dabei werden dem Patienten durch G-CSF mobilisierte autologe Blutstammzellen mittels Leukapherese entnommen. Aus dem Leukapheresat werden die CD34-positiven Zellen isoliert und anschließend *in vitro* mit einem retroviralen Vektor, der die cDNA des zu ersetzenden Gens als Transgen trägt, genetisch verändert, bevor sie dem Patienten reinfundiert werden. Während in den frühen Gentherapiestudien zur Behandlung der septischen Granulomatose die genkorrigierten Zellen ohne vorherige myelosuppressive Konditionierung des Patienten zurückgegeben wurden, ist heute eine Konditionierung des Patienten vor Reinfusion der Zellen Standard [21].

Erfahrungen aus der Frankfurter Studie

Im Universitätsklinikum Frankfurt wurden im Jahre 2004 zwei Patienten mit X-CGD (25 und 26 Jahre alt) mit genmodifizierten, G-CSF-mobilisierten peripheren Blutstammzellen behandelt. Für den Gentransfer wurde ein gamma-retroviraler Vektor, SF71gp91phox, mit gp91phox-cDNA unter der transkriptionellen Kontrolle viraler Steuerungselemente verwendet. Der Anteil an genmodifizierten Zellen nach der Transduktion betrug 40 bis 45 %. Nach fünftägiger *ex-vivo*-Kultur wurden die genkorrigierten Zellen in einer Dosierung von 9 bis $11,3 \times 10^6$ CD34⁺-Zellen/kg Körpergewicht (KG) reinfundiert.

Vor der Transplantation wurde beiden Patienten eine nicht-myeloablative Konditionierung mit 8 mg/kg KG liposomalem Busulfan verabreicht [19]. Der Ablauf der Behandlung ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Die Transplantation der genmodifizierten Zellen verlief ohne Komplikationen. Bei keinem der Patienten kam es in der

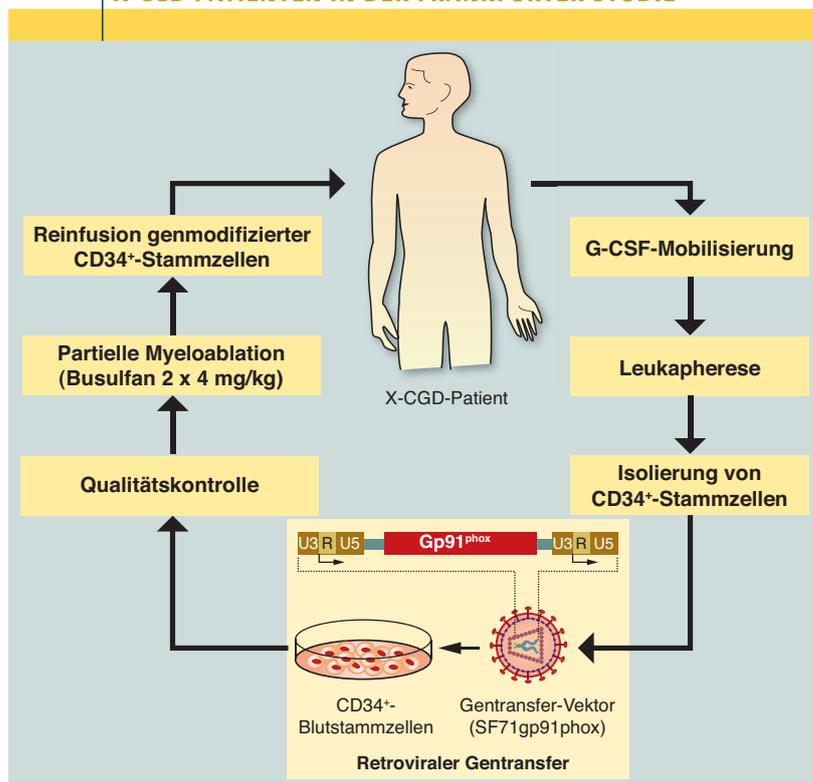
anschließenden Phase der durch die Konditionierung bedingten Myelosuppression zu schwerwiegenden Komplikationen. Die Regeneration des peripheren Blutbildes erfolgte zeitgerecht mit einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten auf $> 500/\mu\text{L}$ am Tag 21 (Patient 1) bzw. Tag 18 (Patient 2) nach Infusion der genkorrigierten Zellen. Während der ersten fünf Monate nach der Gentherapie waren im peripheren Blut der Patienten ca. 15 % genmarkierte Zellen mit Oxidase-Aktivität nachweisbar, die zu einer deutlichen klinischen Besserung der Infektsituation geführt hat: 50 Tage nach der Gabe der genmodifizierten Zellen war es bei Patient 1 zu einer kompletten Rückbildung von Leberabszessen mit *S. aureus* gekommen. Im gleichen Zeitraum heilte eine invasive pulmonale Aspergillose bei Patient 2 fast vollständig ab [19, 20] (Abb. 3). Somit zeigten die genkorrigierten Zellen in beiden Patienten eine signifikante antimikrobielle Aktivität.

Im nachfolgenden Zeitraum nahm der Anteil genmodifizierter Zellen bis auf 50 bis 65 % im Monat 26 (Patient 1) bzw. Monat 36 (Patient 2) zu. Diese Zunahme des Anteils genmodifizierter Zellen beruhte auf einer Expansion von Klonen mit Integrationen des Vektors in oder in der Nähe von Wachstum stimulierenden Genen wie PRDM16 und MDS1/EVI1, die zu einer transkriptionellen Aktivierung dieser Gene führte. Zunächst war in den genmarkierten Zellen die Expression von gp91phox nachweisbar und funktionelle Analysen zeigten eine Rekonstitution der Oxidase-Aktivität.

Etwa acht Monate nach der Gentherapie war ein zunehmender Verlust der gp91phox-Expression und Oxidase-Aktivität bei gleichbleibendem Anteil genmarkierter Zellen zu beobachten. Der Verlust der Transgenexpression war auf eine selektive epigenetische Inaktivierung des viralen Promotors zurückzuführen, wogegen der virale *Enhancer* weiterhin aktiv war und durch Transaktivierung von PRDM16 bzw. MDS1/EVI1 die Dominanz einzelner Klone in der Hämatopoese weiter förderte.

Im weiteren Verlauf entwickelten beide Patienten zunächst eine Panzytopenie und später ein Myelodysplastisches Syndrom mit Monosomie 7. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Überexpression von EVI1 zu einer erhöhten genomischen Instabilität führt und somit vermutlich für die Entwicklung des Myelodysplastischen Syndroms mit Monosomie 7 verantwortlich war. Patient 1 verstarb zweieinhalb Jahre nach der Gentherapie an einer schweren Sepsis nach pseudomembranöser Kolitis mit Perforation. Für Patient 2 konnte ein Knochenmarkspender identifiziert werden. 45 Monate nach der Gentherapie erfolgte eine allogene Stammzelltransplantation [20]. In Abbildung 4 ist der Verlauf der geschilderten Ereignisse schematisch dargestellt.

ABB. 2 SCHEMA DER GENTHERAPIEBEHANDLUNG FÜR X-CGD PATIENTEN IN DER FRANKFURTER STUDIE



Blutstammzellen wurden durch G-CSF-Gabe in das periphere Blut der Patienten mobilisiert und mittels Leukapherese gesammelt. Isolierte CD34-positive Stammzellen wurden anschließend durch retroviralen Gentransfer stabil genmodifiziert. Bei dieser Transduktion wurde ein gamma-retroviraler Vektor (SF71gp91phox) verwendet, der eine gesunde gp91phox-Genkopie unter der Steuerung viraler Expressionselemente trug. Eine Qualitätskontrolle behandelter Zellen ergab 40 bis 45 % genmodifizierte CD34-positive Zellen. Nach einer nicht myeloablativen Konditionierung mit Busulfan erfolgte die Reinfusion der Zellen in die X-CGD-Patienten. Die genmodifizierten Stammzellen wuchsen im Knochenmark der Patienten an und etablierten eine funktionelle Hämatopoese. U3-R-U5: virale Steuerungselemente der Genexpression.

Weitere klinische Gentherapiestudien zur septischen Granulomatose

Weitere Gentherapiestudien mit einer Konditionierung der Patienten wurden in Zürich, London, Seoul und am NIH in

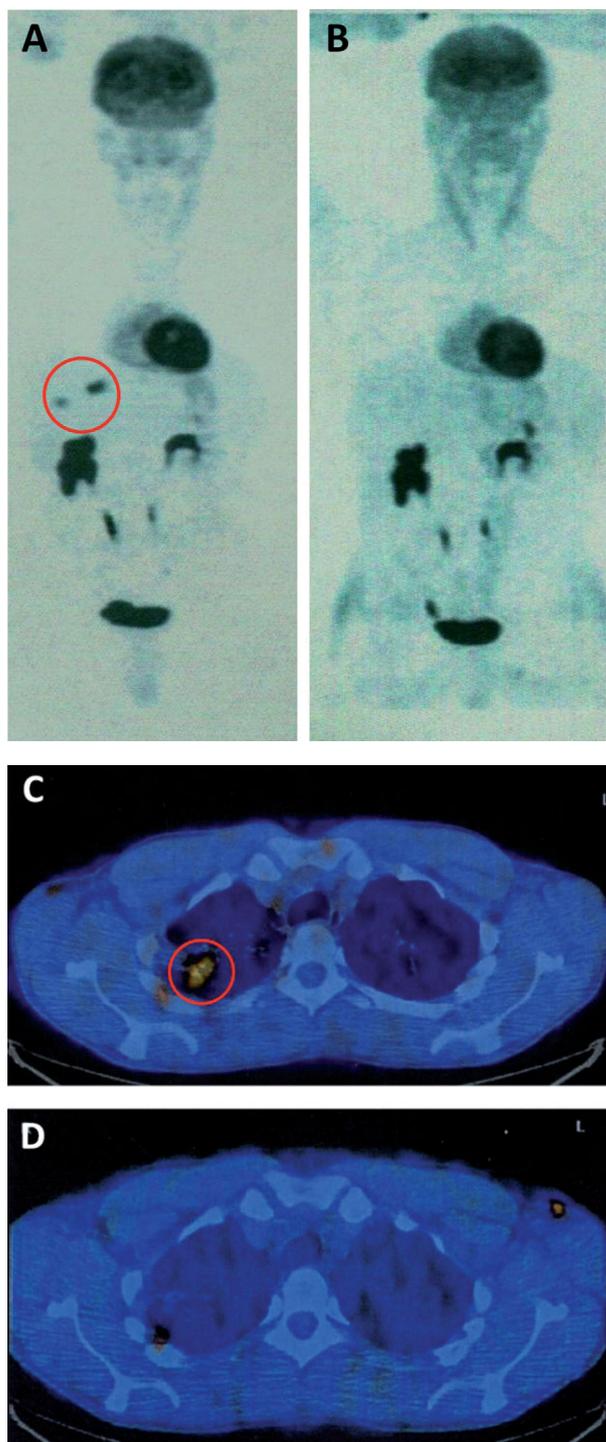


ABB. 3 Klinische Besserung bereits kurz nach Gentherapie bei zwei X-CGD Patienten. PET-Scan von Patient 1 bzw. PET-CT Scan von Patient 2 vor (A, C) und ca. 50 Tage nach (B, D) Gentherapie. Zwei aktive Leberabszesse (*Staphylococcus aureus*) bei Patient 1 (A) bzw. eine schwere Infektion (*Aspergillus fumigatus*) in der Lunge von Patient 2 (C) sind mit einem roten Kreis markiert. Nach der Gentherapie bildete sich der Abszess bei Patient 1 (B) vollständig und die Infektion in der Lunge von Patient 2 (D) weitestgehend zurück. Beide Infektionsherde waren zuvor unter intensiver antimikrobieller Behandlung therapieresistent gewesen. PET: Positronen-Elektronen-Tomographie; CT: Computer-Tomographie.

Bethesda durchgeführt [21-23] (A. Thrasher, persönliche Mitteilung). In diesen Studien kamen gammaretrovirale Vektoren, bei denen die Expression des Transgens durch die viralen *Long Terminal Repeats* (LTRs) getrieben wurde, zum Einsatz. Kurz nach der Behandlung lag der Anteil genkorrigierter Zellen zwischen 4 und 30 %. Jedoch zeigte sich, mit einer Ausnahme, durchweg ein niedriges Langzeit-*Engraftment* der genmodifizierten Zellen. Diese Studien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

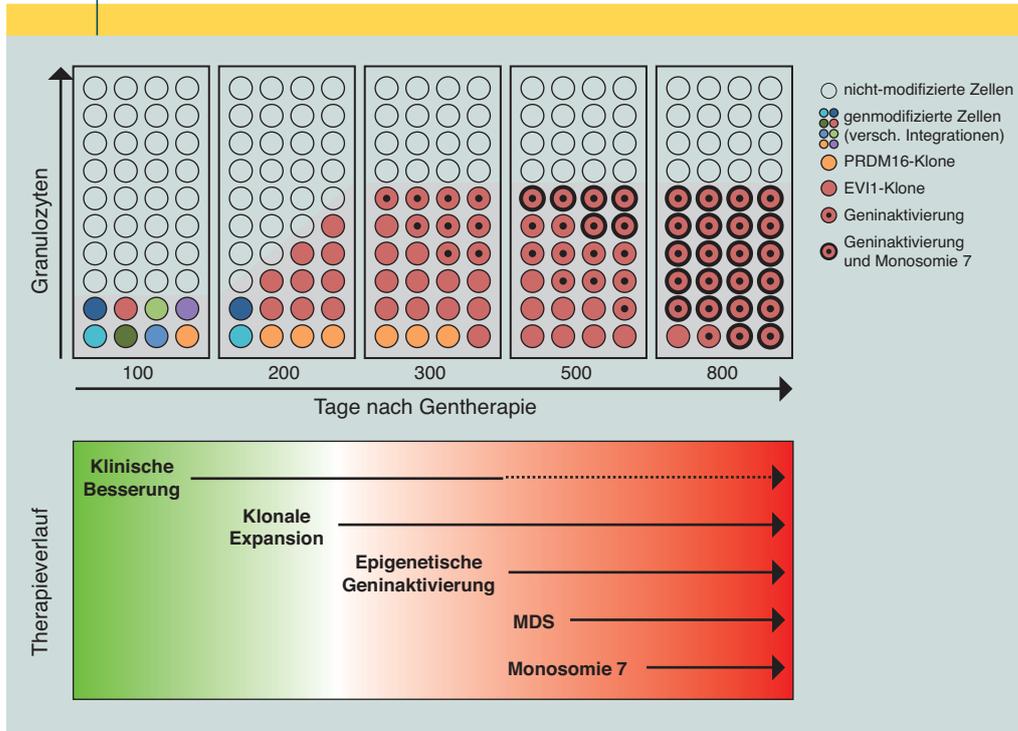
Insgesamt wurde bei den bislang behandelten Patienten ein länger anhaltendes *Engraftment* genkorrigierter Zellen nur im Zusammenhang mit einer klonalen Expansion durch die insertionsbedingte Aktivierung von EVI1 beobachtet.

Klinische Besserungen nach der Gentherapie

Trotz des nur transienten Nachweises einer geringen Anzahl genkorrigierter Zellen mit Superoxidproduktion im Blut der Patienten in den oben beschriebenen Studien konnte häufig eine klinische Besserung der Infektionssituation, mit Abheilung von zuvor therapierefraktären Infektionsherden, nach der Gentherapie beobachtet werden. Bei den beiden Patienten in der Frankfurter Studie kam es zur Rückbildung von Leberabszessen und einer Pilzinfektion der Lunge innerhalb von 50 Tagen [19]. Danach waren beide Patienten, unter einer für CGD-Patienten typischen antimikrobiellen Prophylaxe, über 18 Monate klinisch stabil und frei von Infekten. Dabei lag die Anzahl Oxidase-positiver Granulozyten im Blut bei 180 bis 400/ μL [20]. Ebenso kam es bei dem in Zürich behandelten Patienten innerhalb von 42 Tagen nach der Gentherapie zur Rückbildung einer *Aspergillus*-Infektion der Lunge mit nur ca. 180 genkorrigierten Granulozyten/ μL im peripheren Blut [21]. In der südkoreanischen Studie heilten bei einem Patienten innerhalb von sechs Monaten mehrere Leberabszesse ab. Hier lag die Menge funktionierender Granulozyten bei 110 bis 130/ μL Blut [22].

Grundsätzlich kann die breite antibiotische und antimykotische Behandlung im Rahmen der autologen Stammzelltransplantation zu den geschilderten Besserungen der Infektionssituation der Patienten beigetragen haben. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die in den Studien eingeschlossenen Patienten meist an chronischen Infekten litten, die über Jahre hinweg aggressiv mit verschiedenen Antibiotika oder Antimykotika behandelt worden waren, ohne dass ein Ausheilen der Infektherde erreicht werden konnte. Die Tatsache, dass es nach der Gentherapie zu einem Ausheilen der Infektionen kam, spricht für einen substanziellen Beitrag der genkorrigierten Zellen bei diesem Prozess. Anhand von Beobachtungen von Trägerinnen der X-CGD konnte gezeigt werden, dass zum Schutz vor schweren Infektionen 5 bis 10 % funktionierende Granulozyten ausreichend sind [24-26]. Diese und andere Beobachtungen zeigten, dass ein relativ geringer Anteil genkorrigierter Granulozyten zum Schutz vor schweren Infektionen genügen.

ABB. 4 KLINISCHER VERLAUF EINES PATIENTEN AUS DER FRANKFURTER GENTHERAPIE-STUDIE ZUR BEHANDLUNG DER SEPTISCHEN GRANULOMATOSE



Der Anteil genmodifizierter Granulozyten (farbige Kreise) nahm bei dem ersten X-CGD-Patienten von initial ca. 15 % auf etwa 60 % innerhalb von 200 Tagen nach Beginn der gentherapeutischen Behandlung zu. Diese Zellexpansion wurde durch transkriptionelle Aktivierung der Gene EVI1 bzw. PRDM16 in einzelnen Klonen hervorgerufen (Insertionsmutagenese). Gleichzeitig wurde ein Verlust der Superoxidproduktion in den Granulozyten des Patienten beobachtet (schwarze Punkte). Die Ursache hierfür war eine epigenetische Abschaltung der Transgenexpression durch Hypermethylierung des verwendeten viralen Promotors. Eine Methylierung des viralen Enhancers war nicht vorhanden, daher entstand eine Enhancer-vermittelte Transaktivierung mit klonaler Expansion im Verlauf der Gentherapie. Darüber hinaus wurde der Verlust einer Kopie von Chromosom 7 (Monosomie 7) in Klonen mit Integrationen im EVI1-Genlokus und die Entstehung eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) im Therapieverlauf festgestellt. Letztlich verstarb dieser Patient an einer schweren Sepsis nach einer pseudomembranösen Kolitis 815 Tage nach Therapiebeginn.

Weiterentwicklung der Gentherapie für die septische Granulomatose

Die Erfahrungen aus den bisherigen Gentherapiestudien zur Behandlung der X-chromosomalen septischen Granulomatose zeigen, dass *ex vivo* genkorrigierte autologe hämatopoetische Stammzellen von X-CGD-Patienten grundsätzlich in der Lage sind, nach Transplantation in den Patienten eine Hämatopoese mit Oxidase-positiven Zellen zu etablieren und zur Abheilung von zuvor therapieresistenten Infektionen führen können. Jedoch ging die Gentherapie in dieser Studie mit schwerwiegenden Nebenwirkungen einher. Aus den Erfahrungen der bisherigen Studien zur Gentherapie der X-CGD ergeben sich folgende Herausforderungen in der Entwicklung zukünftiger Therapieprotokolle:

1. Verbesserung der Sicherheit des eingesetzten Vektors durch Vermeidung von Genotoxizität.
2. Verhinderung einer epigenetischen Abschaltung des für die Transgenexpression verantwortlichen Promotors.

3. Verbesserung des *Engraftments* und Etablierung einer langfristigen Hämatopoese durch genkorrigierte hämatopoetische Stammzellen.

Um die Sicherheit der Gentherapie für die septische Granulomatose zu erhöhen, werden derzeit von uns und anderen Arbeitsgruppen so genannte „selbst inaktivierende Vektoren“ (SIN-Vektoren) für den Einsatz in der somatischen Gentherapie weiterentwickelt. Dabei wird ein Teil der viralen Steuerungselemente entfernt, so dass nach Einbau des Virus in das Wirtsgenom kein funktioneller viraler Promotor mehr vorhanden ist. Dadurch wird die Gefahr der Transaktivierung benachbarter Gene minimiert [27, 28]. Weil in diesen Vektoren die Transgenexpression nicht mehr durch den viralen Promotor getrieben wird, enthalten SIN-Vektoren eine interne Promotorsequenz, in der Regel von humanen Genen, deren Expressionsprofil der gewünschten therapeutischen Transgenexpression entspricht. Im Gegensatz zu viralen Promotoren werden humane Promotorfragmente in eukaryotischen Zellen in weitaus geringerem Ausmaß epigenetisch stillgelegt, so dass es zu keinem Verlust der Transgenexpression in genmarkierten Zellen mehr kommen sollte. Der Aufbau eines solchen SIN-Vektors im Vergleich zu einem LTR-getriebenen Vektor ist in Abbildung 5 dargestellt.

Eine weitere Verbesserung der Sicherheit stellt der Einsatz von lentiviralen Vektoren in der Gentherapie dar. Lentivirale Vektoren neigen aufgrund ihres Integrationsprofils weniger zu Genotoxizität [27, 28]. Allerdings ist eine Insertionsmutagenese mit klonaler Expansion auch in einer Gentherapiestudie zur Korrektur der β -Thalassämie aufgetreten, bei der ein lentiviraler Vektor eingesetzt wurde [29].

Um die Transgenexpression bei einer Gentherapie zu verbessern, kann eine so genannte „Codon-Optimierung“ der für das Transgen kodierenden cDNA vorgenommen werden. Dabei werden in der cDNA-Sequenz Basen an der zweiten und dritten Stelle eines Codons gezielt verändert, mit dem Ziel die Basensequenz für die Virusproduktion und die Transgenexpression in den Zielzellen zu optimieren, ohne die Aminosäuresequenz des Proteins zu verändern [30]. Durch das Einfügen eines so genannten WPRE (*Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element*) am 3'-Ende der cDNA des Transgens wird der Zellkernexport der mRNA-Transkripte verstärkt, was zu ei-

TAB. 1 | ZUSAMMENFASSUNG DER GENTHERAPIESTUDIEN FÜR DIE X-CGD MIT MYELOSUPPRESSIVER KONDITIONIERUNG

Zentrum	Anzahl behandelter Patienten	Konditionierung	Transduktions-effizienz [%]	Gesamtzahl infundierter CD34 ⁺ -Zellen pro kg	Signifikantes <i>Engraftment</i> > 3 Monate	Initiale klinische Besserung	Genotoxizität	Referenz
Frankfurt	2	Liposomales Busulfan 8,0 mg/kg	P1: 45,0 P2: 39,5	P1: 11,3 × 10 ⁶ P2: 9,0 3 × 10 ⁶	15 % Genmarkierung in CD15 ⁺ -Zellen	Ja	Klonale Expansion in der Myelopoese und MDS mit Monosomie 7	[20] [19]
Zürich	1	Liposomales Busulfan 8,8 mg/kg	32,3	6.0 × 10 ⁶	20 % Genmarkierung in CD15 ⁺ -Zellen	Ja	Klonale Expansion in der Myelopoese	[21] R. Seger, persönliche Mitteilung
London	4	Melphalan 140 mg/m ²	5–20	0,2–10 × 10 ⁶	Nein	Ja	Nein	A. Thrasher, persönliche Mitteilung
NIH	3	Busulfex 10 mg/kg	25–73	18,9–71,0 × 10 ⁶	Nein	Ja	Nein	[23]
Seoul	2	Busulfex 6,4 mg/kg Fludarabin 120 mg/m ²	P1: 10,5 P2: 28,5	–	Nein	Ja	Nein	[22]

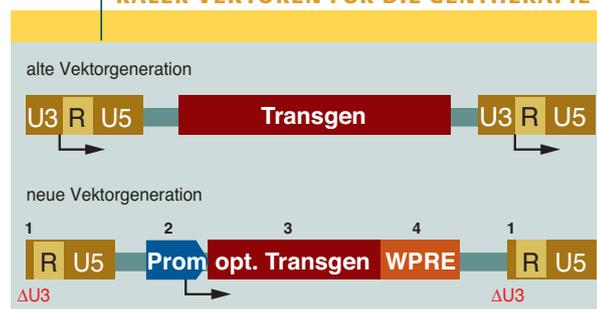
ner Verbesserung der Virustiter und der Transgenexpression führt [31].

In den bisher durchgeführten Gentherapiestudien für die X-CGD wurde ein langfristiges *Engraftment* mit einem ausreichenden Anteil genmarkierter Zellen nur im Zusammenhang mit einer klonalen Expansion aufgrund einer insertionsbedingten Aktivierung von EVI1 beobachtet. Die Ursachen für das schlechte *Engraftment* der genkorrigierten Zellen können vielfältig sein. Genkorrigierte hämatopoetische Zellen von CGD-Patienten haben gegenüber nicht modifizierten Zellen keinen Wachstumsvorteil. Bei der Gentherapie anderer Erkrankungen, bei denen die Korrektur des betroffenen Gens einen Wachstumsvorteil mit sich bringt, wie der Adenosin-Desaminase (SCID) oder dem Wiskott-Aldrich-Syndrom, wurde unter ähnlichen Bedingungen wie in den Gentherapiestudien zur X-CGD mit nicht-myeloablativer Konditionierung ein langfristiges *Engraftment* mit 10 bis 20 % genkorrigierter Zellen erreicht [32-37]. Es zeichnet sich ab, dass für die autologe Transplantation genkorrigierter Zellen ohne *in-vivo*-Wachstumsvorteil, die bisher angewandten Konditionierungen mit reduzierter Intensität nicht ausreichen. Eine Intensivierung der Konditionierung könnte das *Engraftment* genmodifizierter Zellen und somit die Effektivität der Gentherapie erhöhen. Diese Strategie wurde bereits in einer Gentherapiestudie zur Behandlung der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie angewendet. Dabei wurde nach einer myeloablativen Konditionierung (200 mg/kg KG Cyclophosphamid und 16 mg/kg KG Busulfan) ein langfristiges *Engraftment* genkorrigierter Zellen erreicht [38].

Die *in-vitro*-Kultur und Stimulation hämatopoetischer Stammzellen mit Wachstumsfaktoren, wie sie für eine Transduktion mit gammaretroviralen Vektoren notwendig ist,

führt zu einem Verlust Langzeit-repopulierender Zellen. Ein Ziel in der Weiterentwicklung von Gentherapie-Protokollen für die CGD muss deshalb eine Minimierung der *ex-vivo*-Manipulation der Zellen bei der Transduktion sein. Der Einsatz von lentiviralen Vektoren erlaubt eine deutliche Verkürzung der *ex-vivo*-Kultur unter weniger stark Wachstum-stimulierenden Kulturbedingungen, bei einer hervorragenden Transduktionseffizienz hämatopoetischer Zellen [38].

ABB. 5 | STRATEGIEN ZUR VERBESSERUNG RETROVIRALER VEKTOREN FÜR DIE GENTHERAPIE



Die Reduktion vektorbedingter Genotoxizität wird in neuen Vektorgenerationen durch Deletion der viralen Promotor-Enhancer-Elemente in der U3-Region angestrebt (1). Die Transgenexpression wird folglich von internen Promotoren gesteuert (2). Diese sollen eine zelltypspezifische Expression in definierten Zielzellen erlauben. Darüber hinaus ist eine epigenetische Abschaltung der Genexpression bei Verwendung humaner Promotoren weniger wahrscheinlich. Eine gute Expression kann durch Codon-optimierte Transgensequenzen (3) und durch erhöhten Zellkernexport der mRNA-Transkripte mithilfe des WPRE (4) erreicht werden. opt.: optimiert; Prom: Promotor; WPRE: Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element.

Ein weiterer Grund für ein mangelhaftes *Engraftment* der genkorrigierten Zellen können immunologische Vorgänge sein, die zur Elimination genmodifizierter Zellen führen [39]. In allen bisherigen Gentherapiestudien zur Behandlung der X-CGD wurde gp91phox nicht nur in reifen Blutzellen, wie in gesunden Patienten, sondern in hämatopoetischen Zellen aller Reifungsstufen exprimiert. Es ist denkbar, dass das Transgen eine Immunabwehr gegen die genmodifizierten Zellen induziert. Dabei könnten allogene Granulozytentransfusionen der Patienten zu einer entsprechenden Sensibilisierung des Immunsystems bereits vor der Gentherapie geführt haben. Um solche Effekte zu verhindern, wäre eine immunsuppressive Behandlung der Patienten denkbar. Allerdings gibt es bislang keine Hinweise, dass derartige immunologische Vorgänge bei den Patienten mit mangelndem *Engraftment* stattgefunden haben und die immunsuppressive Behandlung mit Rapamycin in der Studie der *National Institutes of Health* führte zu keiner Verbesserung des *Engraftments* [23].

Grundsätzlich ist auch ein toxischer Effekt durch die Überexpression von gp91phox in frühen hämatopoetischen Stammzellen denkbar. Untersuchungen zur Rolle von Sauerstoffradikalen in hämatopoetischen Stammzellen führten zur Identifikation einer Stammzellpopulation mit niedrigen Sauerstoffradikal-Spiegeln (ROS_{low}-Zellen) [40]. Diese Zellen ruhen in der Osteoblasten-Nische und zeichnen sich durch Langzeit-repopulierende Eigenschaften aus. Die Expression von gp91phox in diesen Zellen könnte die Repopulierungsfähigkeit dieser Zellen beeinträchtigen und somit zu einer Verschlechterung des *Engraftments* der genkorrigierten Zelle führen. Jedoch gibt es trotz eingehender Untersuchungen der Rolle des NADPH-Oxidase-Komplexes in der Hämatopoese keinen Hinweis, dass die Überexpression von Komponenten dieses Komplexes in unreifen hämatopoetischen Zellen die Fähigkeit zum *Engraftment in vivo* beeinträchtigt. Interne myeloische Promotoren in den Gentherapie-Vektoren, die eine spezifische Transgenexpression in reifen Granulozyten und Makrophagen induzieren, sollen eine gp91phox-bedingte Toxizität in frühen hämatopoetischen Stammzellen verhindern.

Die Verwendung gammaretroviraler oder lentiviraler SIN-Vektoren mit myelospezifischen Promotoren in Kombination mit einer optimierten Konditionierung der Patienten lässt das Ziel einer sicheren somatischen Gentherapie mit langanhaltendem therapeutischem Erfolg für Patienten mit septischer Granulomatose in greifbare Nähe rücken.

Zusammenfassung

Im Jahre 2004 sind am Universitätsklinikum Frankfurt zwei Patienten mit X-CGD gentherapeutisch behandelt worden. Nach einer initialen Phase mit Nachweis ausreichender Mengen Oxidase-positiver Zellen im Blut der Patienten und einer deutlichen klinischen Besserung vorbestehender Infektionsherde kam es zu einem Verlust der Transgenexpression durch epigenetische Veränderungen des viralen Promotors. Ferner entwickelte sich durch Insertionsmutagenese eine klonale

Expansion in der Hämatopoese und schließlich ein myelodysplastisches Syndrom mit Monosomie 7 bei beiden Patienten. In der Zusammenschau mit anderen Gentherapiestudien zur X-CGD zeigt sich, dass bislang ein langanhaltendes Engraftment funktionierender genkorrigierter Zellen nur im Zusammenhang mit einer Insertionsmutagenese beobachtet wurde. Zukünftige gentherapeutische Strategien zur Behandlung der X-CGD müssen das Risiko einer Insertionsmutagenese minimieren und gleichzeitig die Effektivität des Engraftments genkorrigierter Zellen steigern. Dies soll durch den Einsatz von SIN-Vektoren sowie einer Intensivierung der Konditionierung der Patienten erreicht werden.

Zitierte Literatur

- [1] Roos, D. *Immunol. Rev.* 138 (1994), 121–157.
- [2] Segal, A.W. *Mol. Med. Today* 2 (1996), 129–135.
- [3] Abo, A., Pick, E., Hall, A., et al. *Nature* 353 (1991), 668–670.
- [4] Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, et al. *Science* 254 (1991), 1512–1515.
- [5] Yamauchi, A., Marchal, C.C., Molitoris, J., et al. *J. Biol. Chem.* 280 (2005), 953–964.
- [6] Holland, S.M. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 38 (2010), 3–10.
- [7] Segal, B.H., Leto, T.L., Gallin, J.I., et al. *Medicine (Baltimore)* 79 (2000), 170–200.
- [8] Dinauer, M.C. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* (2005), 89–95.
- [9] Segal, A.W. *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005), 197–223.
- [10] Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., et al. *Science* 303 (2004), 1532–1535.
- [11] McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., et al. *Microbes Infect.* 12 (2010), 928–936.
- [12] van den Berg, J.M., van Koppen, E., Ahlin, A., et al. *PLoS One* 4 (2009), e5234.
- [13] Matute, J.D., Arias, A.A., Wright, N.A., et al. *Blood* 114 (2009), 3309–3315.
- [14] Schappi, M.G., V. Jaquet, D.C. Belli, K.H. Krause. *Semin Immunopathol.* 30 (2008), 255–71.
- [15] Siddiqui, S., Anderson, V.L., Hilligoss, D.M., et al. *Clin. Infect. Dis.* 45 (2007), 673–681.
- [16] Seger, R.A. *Br. J. Haematol.* 140 (2008), 255–266.
- [17] Gungor, T., Halter, J., Klink, A., et al. *Transplantation* 79 (2005), 1596–1606.
- [18] Seger, R.A. *Neth. J. Med.* 68 (2010), 334–340.
- [19] Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., et al. *Nat. Med.* 12 (2006), 401–409.
- [20] Stein, S., Ott, M.G., Schultze-Strasser, S., et al. *Nat. Med.* 16 (2010), 198–204.
- [21] Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., et al. *Blood* 114 (2009), 2619–2622.
- [22] Kim, J.G., Ahn, H.S., Kang, H.J., et al. *Blood* 112 (2008), Abstract 2349.
- [23] Kang, E.M., Choi, U., Theobald, N., et al. *Blood* 115 (2010), 783–791.
- [24] Woodman, R.C., Newburger, P.E., Anklesaria, P., et al. *Blood* 85 (1995), 231–241.
- [25] Mardiney, M. 3rd, Jackson, S.H., Spratt, S.K., et al. *Blood* 89 (1997), 2268–2275.
- [26] Johnston, R.B. 3rd, Harbeck, R.J., Johnston, R.B. Jr. *J. Pediatr.* 106 (1985), 50–55.
- [27] Modlich, U., Navarro, S., Zychlinski, D., et al. *Mol. Ther.* 17 (2009), 1919–1928.
- [28] Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., et al. *Nat. Biotechnol.* 24 (2006), 687–696.

- [29] Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., et al. *Nature* 467 (2010), 318–322.
- [30] Moreno-Carranza, B., Gentsch, M., Stein, S., et al. *Gene Ther.* 16 (2009), 111–118.
- [31] Schambach, A., Wodrich, H., Hildinger, M., et al. *Mol. Ther.* 2 (2000), 435–445.
- [32] Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., et al. *Science* 296 (2002), 2410–2413.
- [33] Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., et al. *N. Engl. J. Med.* 360 (2009), 447–458.
- [34] Aiuti, A., Cassani, B., Andolfi, G., et al. *J. Clin. Invest.* 117 (2007), 2233–2240.
- [35] Gaspar, H.B., Bjorkegren, E., Parsley, K., et al. *Mol. Ther.* 14 (2006), 505–513.
- [36] Sokolic, R., Kesserwan, C., Candotti, F. *Curr. Opin. Hematol.* 15 (2008), 375–380.
- [37] Boztug, K., Schmidt, M., Schwarzer, A., et al. *N. Engl. J. Med.* (363), 1918–1927.
- [38] Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., et al. *Science* 326 (2009), 818–823.
- [39] Arruda, V.R., Favaro, P., Finn, J.D. *Mol. Ther.* 17 (2009), 1492–1503.
- [40] Jang, Y.Y., Sharkis, S.J. *Blood* 110 (2007), 3056–3063.



Dr. Stefan Stein; Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 1992–1996 Promotion am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen in der Abteilung Molekulare Zellbiologie; 1996–1998 Postdoc am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie; seit 1998 Postdoc am Georg-Speyer-Haus in der Gruppe Molekulare Virologie und Gentherapie.



Dr. Manuel Grez; Studium der Chemie an der Universität Católica (Chile); 1978 Promotion an der Universität Marburg; 1978–1980 Postdoc in der Abteilung für Zellbiologie, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin; 1980–1982 Postdoc in der Abteilung für Zellbiologie, am DKFZ in Heidelberg; 1982–1985 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Dept. of Microbiology, University of Southern California (Los Angeles, USA); 1985–1990 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Zell- und Virusgenetik am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg; seit 1990 Gruppenleiter am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/M.

Die Autoren:



Dr. med. Joachim Schwäble; 1991–1998 Studium der Humanmedizin in Tübingen; 1998 Promotion an der Eberhard-Karls Universität Tübingen; 1998–2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik A (Hämatologie und Onkologie) des Universitätsklinikums Münster; seit 2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik II (Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektiologie) des Klinikums der Goethe-Universität Frankfurt am Main.



Dr. Stephan Schultze-Strasser; 1999–2004 Biologie-Studium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main; 2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main in der angewandten Virologie; 2006–2009 Promotion unter Leitung von Dr. Manuel Grez im Graduiertenkolleg „Biologicals 1172“; seit 2010 wissenschaftlicher Angestellter in der Molekularen Hämatologie an der Medizinischen Klinik II des Klinikums der Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Anschrift:

Joachim Schwäble, Stephan Schultze-Strasser,
Stefan Stein, Manuel Grez
Chemotherapeutisches Forschungsinstitut
Georg-Speyer-Haus
Paul-Ehrlich-Straße 42-44
D-60596 Frankfurt

Joachim Schwäble, Stephan Schultze-Strasser
Medizinische Klinik II
Abt. Hämatologie und Onkologie
Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main
Theodor-Stern-Kai 7
D-60590 Frankfurt am Main